



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EVALUAR LA CAPACIDAD DE UN SANITIZANTE CÍTRICO PARA REMOVER
BIOPELÍCULAS Y/O REDUCIR LA CARGA MICROBIANA EN EQUIPOS DE ACERO
INOXIDABLE EN UN TALLER DE CÁRNICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERIA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ELLMÍ RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

ASESOR:

DRA. CLARA INÉS ÁLVARES MANRIQUE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX

2012



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 esta 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FESCUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ

Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluar la capacidad de un sanitizante citrico para remover biopelículas y/o reducir la carga en equipos de acero inoxidable en un taller de cárnicos

Que presenta el pasante Elmi Rodriguez Rodriguez
Con número de cuenta: 404033987 obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Mex. a 01 de febrero de 2012

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRE S I D E N T E	<u>Dra. Clara Inés Álvarez Manrique</u>	<u>Clara Inés Álvarez M.</u>
V O C A L	<u>M. en C. Guadalupe Amaya León</u>	<u>[Firma]</u>
S E C R E T A R I O	<u>I. A. Ana María Soto Bautista</u>	<u>[Firma]</u>
1er SUPLENTE	<u>M. en C. María Olivia Noguez Cómlova</u>	<u>[Firma]</u>
2º SUPLENTE	<u>M en C Rosalva Euricides Samano Osuma</u>	<u>[Firma]</u>

Gracias por hacer de un sueño, una ilusión, una meta y finalmente una realidad

DEDICATORIAS

A Dios y a la vida, por estar siempre a mi lado, haberme dado el mejor regalo que son mis padres y hermanos que sin su ayuda no hubiera logrado una de las mejores metas en mi vida que es terminar mis estudios profesionales.

El presente trabajo esta dedicado a mis dos grandes ángeles mis padres:

A ti mamá por ser mi mejor amiga, aliada, guía, por darme tu apoyo en los momentos más gratos y difíciles de mi vida, siempre estas ahí TE AMO, eres lo mejor que tengo.

A ti papá por la herencia más valiosa que pudiera recibir, fruto de tu inmenso apoyo y confianza que en mi depositaste para que tus esfuerzos y sacrificios no fueran en vano, TE AMO.

A ti Hermano (a) por tu gran apoyo que me brindaste durante todo este camino recorrido, por tus sabios consejos para que siguiera en la lucha por este objetivo que no fue fácil, TE AMO.

AGRADECIMIENTOS

Debo de agradecer de manera especial y sincera a la **Ingeniera Alicia Pérez Morales** por su importante apoyo para que la Doctora Clara Inés me aceptara a realizar esta tesis bajo su dirección, así como también su disponibilidad y colaboración durante mi estancia en el taller de cárnicos pero sobre todo por su sólida amistad.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi asesora la **Doctora Clara Inés Álvarez Manrique** por su apoyo y confianza en mi trabajo, su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntas, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas en el desarrollo de esta tesis.

Gracias a mis mejores amigas por todos los momentos que hemos compartido llenos de sentimientos, pensamientos, sueños, anhelos, secretos, risas, lágrimas y sobre todo amistad.

- 🕯 **Viridiana Martínez** gracias por ser lo que eres, una maravillosa y excepcional amiga por que siempre he contado contigo, eres un regalo muy especial. ¿Cómo podre expresarte todo el cariño que tengo amiga (bobis)?
- 🕯 **Jelynet Sánchez** gracias mi estima y linda amiga por tu apoyo, compañía, tiempo, lealtad y sobre todo por nuestra amistad que es un regalo precioso e invaluable, sabes que tienes un lugar muy especial en mi corazón.
- 🕯 **Patricia García** gracias amiga por tu apoyo, tus preocupaciones hacia mi y sobre todo por lo que hemos compartido a lo largo de la carrera logrando una amistad verdadera y para toda la vida.
- 🕯 Gracias por las más bellas **mariposas**, las estrellas, por todo el apoyo y las palabras de aliento que me has brindado desde el momento en que te conocí porque ocupas un lugar muy especial en mi mente y

en mi corazón, me has regalado todo tu cariño incondicional solo pidiendo a cambio un abrazo sincero de mi parte, te quiero.

Quiero recodar también a **Laura Camargo** quien realizó sus proyectos en el mismo tiempo que realizaba mi trabajo experimental, logrando una linda y sincera amistad.

Por último quiero agradecer el apoyo al Laboratorio de Microscopia Electrónico y a la Maestra en Ciencias **Sofía González Gallardo**.

Soy orgullosamente UNAM.

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	4
Índice de figuras	5
Índice de gráficos	6
Índice de anexos	6
Justificación	7
Resumen	8
Introducción	9
1. ANTECEDENTES	
1.1. Suciedad	10
1.1.1. Contaminación generada por la suciedad	11
1.1.2. Clasificación de la contaminación	12
1.2. Limpieza	13
1.2.1. Definición	13
1.2.2. Importancia	14
1.2.3. Problema de la limpieza	15
1.2.4. Métodos de limpieza	15
1.2.5. Eficacia de la limpieza	16
1.3. Compuestos limpiadores	17
1.3.1. Limpiador	17
1.3.1.1. Propiedades deseables en los limpiadores	17
1.3.1.2. Detergentes	18
1.3.1.3. Coadyuvantes detergentes	19
1.4. Sanitización	
1.4.1. Objetivos de una sanitización eficaz	22
1.4.2. Requisitos que debe cumplir un buen sanitizante	22
1.4.3. Clasificación y características de los sanitizantes en la industria de alimentos	23
1.5. Mecanismos de acción de los sanitizantes	25
1.5.1. Factores que afectan la acción de los sanitizantes	27
1.5.2. Valoración de la eficacia de los sanitizantes	28
1.5.3. Resistencia a los sanitizantes	29
1.5.4. Los mecanismos de resistencia	31
1.5.5. Incidencia de cepas resistentes en la industria alimentaria	32
1.5.6. Métodos para determinar la eficacia de los sanitizantes	33

1.5.6.1.Pruebas de suspensión	34
1.5.6.2.Dilución en tubo	34
1.5.6.3.Coeficiente fenólico	35
1.5.7. Pruebas en superficie inerte	35
1.5.7.1.Método de dilución de uso	35
1.5.7.2.Pruebas en superficie –In vivo	36
1.6.Neutralización para determinar la actividad de los sanitizantes	36
1.7.Limpieza y sanitización	37
1.7.1. Limpieza y sanitización simultáneas o combinadas	38
1.7.2. Etapas de la limpieza y sanitización	39
1.7.3. Actitud frente a la limpieza y sanitización	39
1.7.4. Aplicación del programa de limpieza y sanitización	39
1.8.Métodos de verificación y vigilancia de la limpieza y sanitización	41
1.8.1. Importancia del muestreo y la identificación de puntos de muestreo	41
1.8.2. Métodos clásicos	42
1.8.3. Ventajas e inconvenientes de las técnicas clásicas	42
1.8.4. Técnicas rápidas	43
1.8.5. Aplicación de las técnicas rápidas para el control microbiológico e higiénico de superficies	43
1.9.Biopelículas	44
1.9.1. Formación de la biopelícula	44
1.9.2. Factores que influyen en la adhesión	45
1.9.2.1.Factores ligados a los microorganismos	45
1.9.2.2.Factores ligados a la superficie del sólidos	45
1.9.2.3.Glicocalix	46
1.9.3. Maduración de la biopelícula	47
1.9.4. Factores que afectan el desarrollo de la biopelícula	49
1.9.5. Bacterias que pueden formar biopelículas	49
1.9.6. Evidencias de una biopelícula	49
1.9.7. Remoción de la biopelícula	50
1.9.8. Propiedades de la superficie de contacto	51
2. METODOLOGIA	
2.1.Objetivos	53
2.2.Cuadro metodológico	54
2.3.Materiales y métodos	55
2.3.1. Origen del material biológico	55

2.3.2. Selección de la bacteria formadora de la biopelícula	55
2.3.3. Identificación de 5 cepas de diferentes microorganismos	55
2.3.4. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	55
2.3.5. Preparación de las superficies de acero inoxidable	56
2.3.6. Actividad biocida del sanitizante en estudio en las placas de acero inoxidable	58
2.3.6.1. Formación de la biopelícula en las placas de acero inoxidable	58
2.3.6.2. Detección de estructuras que forman biopelículas	58
2.3.7. Determinación del efecto biocida del sanitizante	60
2.3.8. Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostático del sanitizante en estudio	62
2.3.9. Detección de biopelículas en un taller de cárnicos	62
2.3.10. Diagnostico de presencia o ausencia de biopelículas y su sensibilidad al sanitizante en estudio y el de rutina	64
2.3.11. Confirmación del efecto bactericida/bacteriostático del sanitizante en estudio y de rutina	65
2.3.12. Neutralización del sanitizante de rutina	65
2.3.13. Toxicidad del neutralizante para la bacteria <i>Klebsiella spp.</i>	66
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Material biológico	67
3.2. Selección de la bacteria para la formación de la biopelícula	68
3.3. Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de <i>Klebsiella spp</i>	69
3.4. Evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante problema frente a <i>Klebsiella spp.</i> en placas de acero inoxidable	70
3.4.1. Etapas del ciclo de desarrollo de la biopelícula	70
3.4.2. Eficacia del efecto biocida del sanitizante en estudio a diferentes concentraciones y edades de las biopelículas	73
3.5. Eficacia del sanitizante en estudio y el de rutina; antes y después de la limpieza y sanitización en el equipo de acero inoxidable en un taller de cárnicos	76
3.5.1. Sitios críticos en equipos de acero inoxidable	76
3.5.2. Posibles evidencias de biopelículas en el molino y mesa de trabajo	77
3.5.3. Sensibilidad del sanitizante en estudio con el de rutina	78
3.6. Verificación de la ausencia de toxicidad del neutralizante (Caldo Letheen)	81
Conclusiones	83
Recomendaciones	84

Anexos	85
Glosario	93
Fuentes de información	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solubilidad de la suciedad en base a sus componentes	11
Tabla 2. Principales enfermedades provocadas por alimentos contaminados	14
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de algunos sanitizantes	20
Tabla 4. Propiedades importantes de los componentes principales de las formulaciones de los detergentes	21
Tabla 5. Actividad antimicrobiana de algunos sanitizantes	24
Tabla 6. Aditivos para neutralizar el principio activo de los sanitizantes	37
Tabla 7. Combinaciones detergentes–sanitizantes más frecuentemente utilizados	38
Tabla 8. Edades de las biopelículas evaluadas a diferentes concentraciones de sanitizante problema	54
Tabla 9. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas	67
Tabla 10. Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la <i>Klebsiella spp.</i> frente al sanitizante cítrico	69
Tabla 11. Rango de concentraciones mínimas a diferentes edades de las biopelículas	74
Tabla 12. Rango de concentraciones máximas a diferentes edades de las biopelículas	75
Tabla 13. Ausencia/presencia de microorganismos en el equipo de acero inoxidable del taller de cárnicos	76
Tabla 14. Posible presencia de biopelícula en las superficies del equipo del taller de cárnicos	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de diferentes programas de limpieza en la calidad bacteriológica de un alimento sometido a proceso	15
Figura 2. Mecanismo de inactivación de los microorganismos por biocidas	27
Figura 3. Representación esquemática de los pasos cíclicos que intervienen en la formación de una biopelícula activa	48
Figura 4. Método para determinar el MCI	57
Figura 5. Placas de acero inoxidable estériles	58
Figura 6. Preparación de membranas plásticas	59
Figura 7. Técnica de tinción negativa	60
Figura 8. Lavado de la placa de acero inoxidable con biopelícula	60
Figura 9. Placa con biopelícula en contacto con sanitizante problema	61
Figura 10. Raspado mediante la técnica de frotación	61
Figura 11. Viabilidad del microorganismos en agar Mac Conkey	61
Figura 12. Mesa de trabajo	63
Figura 13. Rebanadora	63
Figura 14. Tablas Naylamid	63
Figura 15. Embutidora	64
Figura 16. Molino	64
Figura 17. Puntos de muestreo. Mesa de trabajo	64
Figura 18. Puntos de muestreo. Molino	64
Figura 19. Diluciones para determinar el número de microorganismos por unidad de volumen	65
Figura 20. Evolución de la formación del anillo de la biopelícula en el tubo de vidrio	68
Figura 21. Forma de adherirse los microorganismo a superficies no vivas	69
Figura 22. Célula individual	71
Figura 23. Colonización	71
Figura 24. Adsorción	72
Figura 25. Crecimiento y maduración	72
Figura 26. Microorganismos del ambiente	77
Figura 27. Ausencia de toxicidad del neutralizante hacia el microorganismos en estudio	82

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante de rutina en el molino de carne	78
Gráfico 2. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante en estudio en el molino de carne	79
Gráfico 3. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante en estudio en el molino de carne	79
Gráfico 4. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante de rutina en la mesa de trabajo	80
Gráfico 5. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante de estudio en la mesa de trabajo	81

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica del sanitizante en estudio	85
Anexo 2. Diferenciación de las enterobacterias	88
Anexo 3. Ficha técnica del sanitizante de rutina de un taller de cárnicos	90
Anexo 4. Formulación para neutralizar un sanitizante en 1 litro de agua	92

JUSTIFICACIÓN

La limpieza y sanitización son aspectos primordiales en la industria de productos alimenticios, que deben tener en cuenta a la hora de evaluar si un proceso es o no satisfactorio. La presencia de microorganismos contaminantes o ajenos al proceso es en muchos casos inevitable, pero depende de un correcto y adecuado proceso de sanitización.

Es importante no solo escoger el sanitizante adecuado, si no determinar la concentración a la cual se emplea es la más eficaz y la más rentable para quien lo utiliza. Por ello, la importancia de este proyecto de investigación consiste en demostrar experimentalmente, la acción antimicrobiana (bacteriostático y bactericida) de un producto natural 100 % ecológico, biodegradable, no tóxico para humanos, animales, plantas, no corrosivo y volátil; y que además contiene antioxidantes naturales (ácido ascórbico, bioflavonoides, ácido cítrico) con altos niveles de bioestabilidad y tiene excelente sinergismo entre el ácido ascórbico y los bioflavonoides. Este proyecto surge por el interés de sustancias naturales, para prevenir y controlar el crecimiento microbiano así como también el biodeterioro básicamente por los daños que los productos químicos provocan al ambiente, a los equipos que los recibe y al personal que los aplica.

La precisión de la metodología utilizada por medio de la repetitividad de las pruebas evaluadas en esta investigación, permite demostrar la veracidad del procedimiento empleado y la seguridad de obtener en posteriores pruebas, resultados similares, verificables y con seguridad.

RESUMEN

Actualmente los productores de alimentos deben asegurar de que los sanitizantes que utilizan realmente tengan efectos antimicrobianos, por esta razón se han desarrollado estudios para determinar esta actividad y que permitan la selección de productos biocidas eficaces, siendo una importante mejora en la lucha contra los microorganismos patógenos y oportunistas que pueden llegar a las superficies de plantas procesadoras de alimentos y fijarse sobre equipos hasta formar biopelículas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un sanitizante derivado de cítricos 100% biodegradable a diferentes concentraciones, tiempos de contacto y edades de las biopelículas formadas por la *Klebsiella spp.*, microorganismo seleccionado por su capacidad de formar una matriz extracelular de polisacáridos que le permitieron fijarse en menor tiempo en placas de acero inoxidable, material más utilizado en la industria de alimentos. Para tal fin se realizaron ensayos *in vitro*: mínima concentración inhibitoria (MCI) y de superficie. También se determinó la acción bacteriostática y bactericida del sanitizante en estudio mediante la neutralización del mismo.

Se evaluó el sanitizante en estudio en un taller de cárnicos después de haber seleccionado los sitios críticos en algunos equipos (molino y mesa de trabajo) y se comparó su eficacia con el empleado de rutina (microdyna) después de la limpieza y sanitización de los equipos.

El sanitizante en estudio actuó como bactericida a concentraciones de 400-800ppm/15 minutos de contacto con la *Klebsiella spp.*; y tuvo efecto bacteriostático en concentraciones de 200-300ppm/15 minutos de acción, lo que indicó la prueba del MIC que el sanitizante es eficaz al aumentar concentración manteniendo el tiempo de acción durante 15 minutos.

El sanitizante en estudio actuó como bactericida en las biopelículas jóvenes (menos de 24 horas de edad) formadas por la *Klebsiella spp.*, mientras que en biopelículas maduras (3 y 5 días de edad) se necesitaron altas concentraciones de sanitizante y tiempos prolongados de más de 30 minutos actuando como bacteriostático.

El sanitizante en estudio demostró ser eficaz en los sitios críticos de los equipos del taller de cárnicos a la concentración de 800ppm en la eliminación de microorganismos obteniendo resultados similares con el sanitizante empleado de rutina del taller, siendo una opción para la sanitización en la industria de alimentos, siempre y cuando se aumente la concentración y tiempo de acción.

INTRODUCCION

La presencia frecuente de brotes de enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos ha impulsado a desarrollar políticas que disminuyan el riesgo que representan para la salud pública (Trienekens J. y Zuurbier P., 2008). Hoy en día las industrias procesadoras de alimentos han desarrollado un enfoque hacia los alimentos que no causen daño a la salud (inocuidad) (Trienekens et al., 2007), buscando ciertas medidas preventivas para controlar microorganismos patógenos que podrían tener la capacidad de adherirse en superficies y equipos de acero inoxidable y ser un foco de contaminación para el producto; a pesar de que todavía no existe una legislación que exija el control microbiológico de superficies. En la mayoría de ambientes del sector alimentario son conscientes de la importancia de verificar un plan de limpieza y sanitización (Fuster, 2006). Así la limpieza y sanitización tienen como objetivo de reducir, y en algunos casos, eliminar la carga bacteriana y restos de materia orgánica e inorgánica de las superficies alimentarias. De esta forma, se pretende minimizar el riesgo de contaminación cruzada para contribuir a un producto seguro y de calidad (Trienekens et al., 2007).

Actualmente un factor importante a considerar es la eliminación de estructuras denominadas biopelículas, que son comunidades complejas de microorganismos en una matriz de polímeros extracelulares, que les confieren estabilidad, nutrición y resistencia frente a sustancias antimicrobianas. (Romanova et al., 2007). En los últimos años ha creado el interés en la investigación, desarrollo y/o mejora de técnicas para evaluar la contaminación de superficies de acero inoxidable siendo el material que más se utiliza en los equipos de elaboración de alimentos, y pueden presentar poros que permiten una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión, lo cual dificulta su remoción por la posible formación de biopelículas (Fuster, 2006).

La eliminación de biopelículas no es una tarea fácil puesto que factores como la temperatura, tiempo, fuerzas mecánicas y químicas intervienen de manera directa en el proceso de adhesión haciéndolas más firmes (Jessen y Lammert, 2003). Por lo tanto es necesario adoptar medidas de higiene más específicas en cada una de las etapas del proceso (Holah et al., 1998). Además es necesario contar con sanitizantes eficaces para que en un tiempo relativamente corto, eliminen o reduzcan al mínimo los microorganismos de acuerdo a las especificaciones de cada alimento y no causen daños al ambiente, por lo que es de vital importancia seleccionar y valorar aquellas sustancias que sean eficaces y compatibles con el equipo. El empleo de compuestos de origen natural podría ser una alternativa y dentro de éste grupo, se encuentran los sanitizantes derivados de cítricos que se promueven en el mercado actual.

1. ANTECEDENTES

El mayor desafío que enfrenta la industria de producción de alimentos, hoy en día, es la creación de un ambiente sano y completamente libre de contaminantes. Una gran cantidad de métodos de limpieza y sanitización se han empleado en las instalaciones de proceso alimenticio. Las tres constantes en el mantenimiento del proceso alimenticio libre de bacterias y patógenos dañinos, son: la limpieza y sanitización correcta de las áreas de trabajo, la aplicación de las estrictas normativas higiénicas y el uso de superficies y equipos de acero inoxidable. Combinando estas medidas en la proporción apropiada, el resultado es una instalación de proceso de alimentos capaz de resultar libre de enfermedades.

El objetivo de la limpieza es eliminar todo tipo de suciedad, su naturaleza y la manera en cómo se adhiere a la superficie que se pretende limpiar.

1.1.Suciedad

Según Ramírez (2006) es un término general para “materia no deseada” o “que no pertenece a cierto lugar” incluyendo residuos de productos alimenticios, los cuales se encuentran en las superficies de contacto.

La suciedad puede ser polvo, grasa, restos de alimentos e incluso bacterias que forman biopelículas que se construyen sobre sí mismas, que con el tiempo llegarán a ser un plástico resistente que a menudo pueden ser separadas solamente por raspado.

Hyginov (2001) considera tres estados de la suciedad:

- ④ Libre: impurezas no fijas en una superficie, fácilmente eliminables.
- ④ Adherente: impurezas fijas, que precisan una acción mecánica o química para desprenderlas del soporte.
- ④ Incrustada: impurezas introducidas en los relieves.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta es que la suciedad puede ser de diferente composición. Su eliminación radica en lo fácil que resulte disolver estos componentes en agua, así como también, la compatibilidad con los agentes de limpieza.

Algunos componentes de la suciedad se muestran en la tabla 1 y las cualidades que se requieren en el producto de limpieza.

Tabla 1. Solubilidad de la suciedad en base a sus componentes

Componentes de la suciedad	Solubilidad	Facilidad de limpieza	Transformación por el calentamiento durante el proceso	Cualidades requeridas del producto de limpieza
Azúcares solubles (glucosa, sacarosa)	Solubles en agua	+++	Caramelización más difíciles de limpiar	Alcalinos
Otros hidratos de carbono (almidón, celulosa y otros polisacáridos)	Solubilidad baja o nula; formación de geles	+		Poder dispersante
Materias grasas/aceites	Insolubles en agua	++ con ayuda de un detergente	Degradación: más difíciles de limpiar	Poder emulsionante y dispersante
Proteínas	Solubilidad variable en agua Solubles en disoluciones alcalinas Pueden precipitar en medio ácido	+ en agua +++ en disoluciones alcalinas	Desnaturalización: Los depósitos de proteínas desnaturalizadas son más difíciles de limpiar	Alcalino Poder dispersante
Sales minerales (sal de cocina, incrustaciones, óxidos metálicos)	Solubilidad variable en agua, pero la mayoría son solubles en disoluciones ácidas y a veces en disoluciones alcalinas	+++ -, según la solubilidad	Precipitación: Difícil de limpiar	Ácido Poder quelante

+++ : Muy fácil ++ : fácil + : Poco fácil - : difícil

Hyginov, 2001

1.1.1. Contaminación generada por la suciedad

La suciedad puede estar fijada al objeto de muy diversas maneras causando contaminación. Se establecen las siguientes categorías de contaminación (Moreno, 2006):

- ☉ Contaminación directa: se produce a partir de los utensilios de mano, cuchillos, sierras, manos de los operarios, encimeras de las mesas, cintas transportadoras y bandejas para despojos, ganchos, cortadoras, picadoras, etc., estos equipos deben merecer una atención especial en la limpieza y sanitización;
- ☉ Contaminación posible: a partir de la ropa de trabajo y el calzado, marcos de puertas, superficies externas de carretillas y demás equipo, etc.

- Ⓢ Contaminación potencial: paredes, suelos, raíles, superficies inferiores de transportadoras, plataformas, etc.
- Ⓢ Contaminación remota: raíles superiores, paredes situadas detrás de grandes equipos, etc

1.1.2. Clasificación de la contaminación

La contaminación se clasifica como: química, física y biológica.

- a) Contaminación química. La contaminación química puede tener lugar a partir de los ingredientes y durante la producción, distribución o almacenamiento.

Algunos ejemplos son:

- Ⓢ Plaguicidas.
 - Ⓢ Residuos de medicamentos.
 - Ⓢ Metales pesados (cadmio, plomo, mercurio, arsénico, etc.).
- b) Contaminación física. Consiste en la presencia de cuerpos extraños al alimento en cualquier momento de la producción.
- Ⓢ Vidrios.
 - Ⓢ Lubricantes.
 - Ⓢ Polvo.
 - Ⓢ Fibras.
 - Ⓢ Pelos.
- c) Contaminación biológica. Se debe a la presencia de bacterias, virus, hongos y parásitos. La contaminación microbiana, es la causa más común de intoxicación alimentaria y muchas veces se haya vinculada con el desconocimiento y/o negligencia del manipulador de alimentos.
- También se incluyen los microorganismos patógenos que contaminan directamente los alimentos o de manera indirecta ingiriendo sus toxinas, que pueden causar ciertas enfermedades con alta morbilidad y mortalidad, una única fuente de alimentos contaminados pueden afectar a un gran número de personas (Ibusquiza, 2010).

Si los microorganismos se encuentran presentes en los alimentos, comienzan a reproducirse rápidamente si poseen las siguientes condiciones favorables (Marriot, 2003 y Brock, 2006):

- Ⓢ Temperatura. Es un factor ambiental importante en el control de crecimiento microbiano. Las temperaturas fundamentales son: mínima, óptima y máxima (-4°C, 39/60°C y 88/106°C, respectivamente) a las que crece cada organismo.

- ⓐ Nutrientes. Las bacterias como todos los seres vivos, necesitan alimentarse para poder desarrollarse. Prefieren alimentos con un alto contenido de proteínas y humedad.
- ⓐ Actividad de agua (aw). La disponibilidad de agua en un alimento necesaria para la multiplicación de las bacterias recibe este nombre. Y se indica con un número que va desde 0 hasta 1. La mayoría de los alimentos frescos tienen valores de actividad de agua cercanos a 1.
- ⓐ Acidez o pH. El pH de un alimento es la medida de su acidez o alcalinidad. Cuando un alimento tiene un pH mayor a 7.0, es muy susceptible a la contaminación bacteriana. Generalmente, en los alimentos que poseen un pH menor de 4.5 no se desarrollarán bacterias patógenas.
- ⓐ Tiempo. Si le proporcionan a las bacterias, condiciones óptimas de nutrientes, humedad y calor, algunas son capaces de multiplicarse entre 10 y 20 minutos, esto conduce a tener en cuenta las capacidades de adhesión de los microorganismos a los materiales y su aptitud a crecer sobre la superficie para formar biopelículas, según Salgar (2004) están protegidas por una capa de azúcares denominada exopolisacárido, la cual es producida por la misma bacteria, no permitiendo penetrar fácilmente a las sustancias químicas.

Una de las causas más importantes de la presencia de peligros biológicos en los alimentos son las contaminaciones cruzadas. Por contaminación cruzada se entiende la transmisión de microorganismos de un alimento a otro de forma directa o indirecta. Y adquiere su máximo riesgo cuando se produce desde alimentos crudos a alimentos elaborados. En éste caso los posibles patógenos se encuentran con muy pocas barreras y pueden multiplicarse siempre y cuando se den las condiciones adecuadas que se mencionaron anteriormente.

1.2.Limpieza

1.2.1. Definición

Se entiende por limpieza el proceso de empleo correcto de productos químicos en una secuencia dada para eliminar y/o disminuir la suciedad visible o microscópica, de forma que no se afecte la calidad del producto; teniendo en cuenta los factores que influyen directamente como la concentración, temperatura, tiempo de exposición y utilización de herramientas (Ramírez, 2006). En la tabla 2 se mencionan algunos de microorganismos patógenos y las enfermedades que causan.

Tabla 2. Principales enfermedades provocadas por alimentos contaminados

Microorganismo patógeno	Nombre y tipo de enfermedad	Síntomas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcus Intoxicación alimentaria	Náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, debilidad, calambres y deshidratación.
<i>Salmonella typhi</i> y <i>paratyphi</i>	Tifoidea y paratifoidea Infección alimentaria	Dolor abdominal, diarreas, escalofríos, estreñimiento, debilidad, náuseas y fiebre.
<i>Salmonella</i>	Salmonelosis Intoxicación alimentaria	Dolor abdominal, dolor de cabeza, náuseas, vómito, fiebre y diarrea.
<i>Clostridium perfringens</i>	Enteritis Intoxicación alimentaria	Dolor de la boca, del estómago, náusea y diarrea acuosa.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campylobacteriosis (Diarrea) Infección alimentaria	Fiebre, dolor abdominal, cólico, diarrea acuosa.
<i>Bacillus cereus</i>	Gastroenteritis Intoxicación alimentaria	Náusea, diarrea, vómito y dolor abdominal.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis Infección alimentaria	Náusea, vómito, dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, dolor de espalda y meningitis.
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera Intoxicación alimentaria	Diarrea abundante y acuosa, vómito, deshidratación rápida que puede provocar la muerte.
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena Tipo O 157-H7	Intoxicación Alimentaria	Dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, vómito y fiebre.

Bravo, 2002

1.2.2. Importancia

En la industria alimentaria la limpieza es un procedimiento fundamental que debe ser efectuado con precisión, para que no resulte totalmente ineficaz.

El propósito de la limpieza es la eliminación de restos de alimentos, que quedan sobre las superficies, los cuales sirven de sustrato para el desarrollo microbiano y además inhiben la acción de los sanitizantes que pueden ser inactivados por la materia orgánica, impidiendo de este modo su función (Puig-Durán, 2002).

El factor más importante a considerar es la suficiente atención a la limpieza, incluso cuando una superficie parece estar limpia podría haber presencia de biopelículas que representan un peligro potencial que debe ser eliminado inmediatamente, ya que causan alimentos contaminados que pueden afectar a un gran número de personas y calidad microbiológica del producto terminado (Puig-Duran, 2002).

En la figura 1 se aprecian los diferentes programas de limpieza deficientes (Hayes, 1993):

- a) Producto con un excesivo acúmulo de bacterias y con un programa de limpieza deficiente al final de la operación.
- b) El mismo producto con un excesivo aumento de bacterias durante el procesado, pero con una eficiente limpieza al final.
- c) El mismo producto con una limpieza a mitad de la operación.
- d) Producto relativamente uniforme con muy pocos cambios en su carga microbiana.

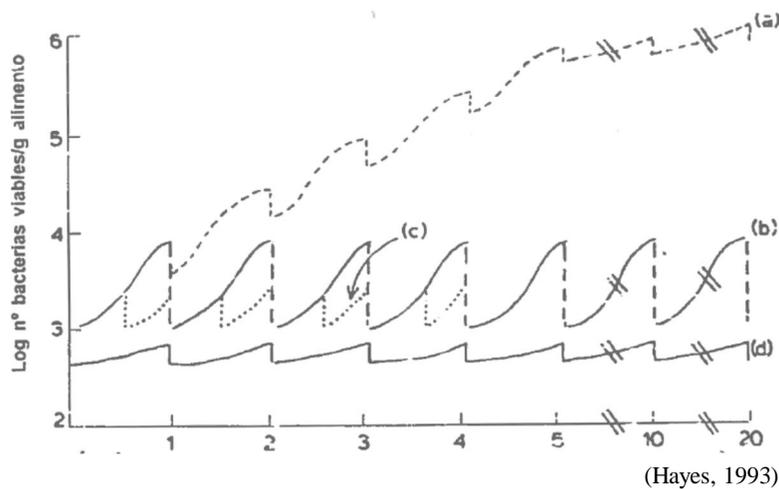


Figura 1. Efecto de diferentes programas de limpieza en la calidad bacteriológica de un alimento sometido a proceso.

1.2.3. Problema de la limpieza

La resolución del problema radica en una serie de diferencias según Reinhard (1998):

1. Materia prima
 - ⊗ Contenido en agua.
 - ⊗ Composición química, azúcares, grasas, proteínas, sales minerales, etc.
 - ⊗ Estado de presentación: sólidos, líquidos, emulsiones, soluciones, suspensiones y coloides.
2. Técnicas de fabricación y características del equipo.
3. Composición y acondicionamiento de los productos acabados.
4. Características de los residuos generados.

1.2.4. Métodos de limpieza

La clasificación de los diferentes métodos de limpieza en la industria alimentaria es la siguiente según Ramírez (2006):

- ⓐ Limpieza manual. Es cuando se requiere eliminar la suciedad fregando (cepillando) con una disolución de detergente. Se sugiere que las partes o piezas desmontables sean remojadas en disoluciones detergentes.
- ⓐ Limpieza de alta presión. El principio se basa en la impulsión automática del compuesto limpiador a través de una boquilla que genera spray a alta presión. La velocidad o fuerza con que la solución limpiadora choca contra la superficie es el factor principal que contribuye a la eficacia de este tipo de limpieza.
- ⓐ Limpieza de baja presión. Con presiones bajas, en ocasiones no se alcanzan todas las superficies a limpiar, produciéndose ausencia de solución limpiadora en orificios. Tiene poca utilidad en la industria de alimentos.
- ⓐ Espuma/aplicación de gel. La limpieza con espuma consiste en liberar poco a poco el líquido limpiador que transporta los componentes químicos, que entonces actúan sobre la suciedad hasta que acaba de fluir la película de líquido, no debe secarse y su eliminación se realizará por simple y fácil enjuagado.
- ⓐ Limpieza automatizada.
 - ⓐ COP (limpieza fuera de lugar), sistema automático o semi-automático de limpieza que requiere un desarme parcial de los componentes mayores de los equipos, estas son llevadas a cuartos de lavado en donde un tanque lava las partes por ciclos, utilizan diferentes agentes de limpieza (detergentes y sanitizantes) a presión y a una temperatura determinada.
 - ⓐ CIP (limpieza en su lugar), es un procedimiento automático, reproducible, con un lavado y enjuague confiable de las soluciones de limpieza a través de los equipos y tuberías, realizado sin desmontar o abrir el equipo y con poca o ninguna intervención manual del operador (Forero y Piedrahita, 2008).

1.2.5. Eficacia de la limpieza

Para obtener una limpieza efectiva es fundamental considerar lo siguiente (Ramirez, 2006):

1. Elección adecuada del producto de limpieza. Se debe tomar en cuenta ciertos criterios: concentración, temperatura y tiempo en el que actúa.

2. El tipo de suciedad que se va a remover. Algunos residuos de proteína o hidratos de carbono pueden persistir, pero estos últimos pueden eliminarse mediante enjuague con relativa facilidad, en cambio si se modifican en virtud de sus procesos de acidificación o desecación, para poderlos eliminar es necesario rehidratarlos previamente.
3. La naturaleza del soporte. La superficie lisa es más fácil de limpiar que una rugosa siendo está más susceptible a la formación de biopelículas; así como ciertos tipos de suciedad son más fáciles de eliminar que otros.
4. Resistencia a la corrosión del material que se limpia. La elección de los materiales adecuados contribuye esencialmente a evitar riesgos de corrosión. Algunos productos químicos pueden implicar corrosiones cuyas consecuencias son graves.
5. Características del agua que se usa. El agua industrial utilizada debe reunir ciertos requisitos para enjuagar una vez concluida la limpieza.

1.3. Compuestos limpiadores

1.3.1. Limpiador

Son agentes constituidos por una amplia variedad de sustancias, con propiedades emulsionantes y poder detergente, para facilitar la eliminación o remoción de residuos y suciedades de las superficies (Marriot, 2003).

Los agentes limpiadores usan una combinación de propiedades físicas y químicas para eliminar contaminantes de sustratos. Los limpiadores acuosos ácidos o alcalinos pueden tener ciertas desventajas como el hecho de atacar las superficies metálicas. Por eso con frecuencia se añaden aditivos a estos agentes con el fin de minimizar los efectos adversos, otra desventaja es que su consumo de agua es mayor y el proceso de secado puede prolongarse por más tiempo (Marriot, 2003).

1.3.1.1. Propiedades deseables en los limpiadores

- a) Humedecer la superficie del material sucio, es decir, disminuir la tensión superficial del agua de forma que esta pueda penetrar en la suciedad y eliminar más fácilmente de la superficie a limpiar.
- b) Dispersar los materiales insolubles, que en otro caso formarían agregados, y mantenerlos en suspensión de forma que puedan ser arrastrados antes de que se redepositen en la superficie limpia.

- c) Disolver las suciedades solubles, tanto orgánicas como inorgánicas; cuanto más rápida sea la disolución mejor será el limpiador.
- d) Emulsificar grasas y aceites, es decir, descomponerlos en glóbulos pequeños y dispersarlos de forma que permanezcan suspendidos en solución.
- e) Saponificar las grasas, es decir, convertir las grasas en jabones solubles.
- f) Secuestrar (es decir, ligar e inactivar) las sales de calcio y magnesio disueltas en las aguas duras, de forma que se evite su precipitación y no disminuya la eficacia de la limpieza. En esencia los limpiadores deben de tener la capacidad de ablandar el agua dura cuando sea necesario, si bien debe anticiparse que en las regiones de aguas duras han de instalarse sistemas de ablandamiento.

Los ingredientes que pueden incluir los agentes limpiadores son:

- a) Disolventes.
- b) Acondicionadores acuosos.
- c) Agentes tensoactivos (detergentes): aniónicos, catiónicos y no iónicos.

1.3.1.2. Detergentes

Un detergente o agente tensoactivo se define como una sustancia usada para limpiar a causa de poseer propiedades disminuidoras de la tensión superficial, acción humectante, emulsionante, dispersante y formadora de espuma; el jabón es un detergente clásico, que es simplemente una mezcla de sales sódicas y de ácidos grasos de cadenas largas. Una molécula de jabón tiene un extremo polar, $-\text{COO}^-\text{Na}^+$ (soluble en agua, se dice que es hidrófilo) y otro no polar de cadena larga con 12 a 18 carbonos (insoluble en agua, se denomina hidrófobo o lipófilo) es evidentemente soluble en disolventes no polares. Este tipo de moléculas se llama anfipático: tiene extremos polares y no polares, es suficientemente grande como para que cada extremo tenga su propio comportamiento de solubilidad. Los extremos polares se proyectan hacia afuera para penetrar en el disolvente polar, el agua.

El agua sola no es capaz de disolver sustancias hidrófobas; en contacto con el agua, las gotitas de aceite tienden a juntarse, de este modo se separa una capa acuosa y otra oleosa, la presencia del jabón cambia esta situación.

Aunque los detergentes sintéticos varían considerablemente en cuanto a estructura, todas sus moléculas tienen características comunes que comparten con el jabón ordinario: son anfipáticas (tienen una cadena saturada no polar muy larga, soluble en aceites y un extremo polar soluble en agua), la diferencia con los jabones es que no se produce ninguna reacción conducente a la formación de grumos. Las terminaciones hidrófilas del jabón coagulan en aguas duras, mientras

estas terminaciones de un detergente sintético (tensoactivos) no cuentan con esta característica. Los detergentes sintéticos son eficaces porque su agregación disminuye la tensión superficial de la solución, favorece la humectación de las partículas, a la vez que libera y suspende las partículas de suciedad. Los detergentes desempeñan importante función como ingredientes de los compuestos limpiadores. La mayoría tiene intensa capacidad emulsionante, dispersante y humectante. No son corrosivos, ni irritantes y normalmente se enjuagan con facilidad del equipo y otras superficies.

Los detergentes se clasifican en tres categorías:

- ④ Agentes catiónicos (como los derivados de sales cuaternarias de amonio), producen iones con carga positiva.
- ④ Agentes aniónicos tienen un ion activo cargado negativamente cuando están en solución.
- ④ Agentes no ionizables no tienen ninguna carga eléctrica cuando están en solución acuosa. Son efectivos tanto en medio ácido como alcalino.

Los detergentes son los responsables de la formación de espuma, lo cual es el principal problema que plantean, por las complicaciones que originan en los sistemas de drenado y agua residuales. Un compuesto limpiador no tiene necesariamente que formar espuma para ser buen limpiador. En la tabla 3 se resumen las propiedades de diversos compuestos sintéticos (Marriot, 2003).

1.3.1.3.Coadyuvantes detergentes

Los coadyuvantes detergentes son aditivos que se incluyen en compuestos limpiadores para proteger superficies sensibles o para mejorar las propiedades limpiadoras de los compuestos. En la tabla 4 se cuantifica la eficacia de los principales componentes de las formulaciones de los detergentes en cuanto a sus diferentes funciones y propiedades.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de algunos sanitizantes

	Actividad superficial			Estabilidad		
	Espuma	Emulsificación	Detergencia	Ácidos	Álcalis	Agua
Aniónicos						
Jabones	Buena	Aceptable	Excelente	Ninguna	Buena	Pobre
Alcoholes sulfurados	Alta	Aceptable	Excelente	Aceptable	Aceptable	Acp/Bue
Olefinas sulfuradas	Buena	Buena	Buena	Aceptable	Aceptable	Aceptable
Aceites sulfurados	Baja	Buena	Pobre	Excelente	Aceptable	Buena
Amidas sulfuradas	Buena	Buena	Buena	Pobre	Buena	Buena
Monoglicéridos sulfurados	Buena	Buena	Buena	Aceptable	Aceptable	Buena
Alquil-aril-poliéter sulfurados						
Alquil sulfonatos: (Petronatos)	Alta	Buena	Excelente	Excelente	Excelente	Buena
(Nitron)	Bajas	Buena	Pobre	Excelente	Buena	Aceptable
Amidas sulfonadas	Buena	Aceptable	Excelente	Excelente	Excelente	Buena
Sulfosuccinato	Alta	Buena	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente
Éteres sulfonados	Buena	Aceptable	Buena	Excelente	Excelente	Excelente
Alquil-aril-sulfonatos	Alta	Buena	Excelente	Buena	Buena	Buena
Sulfonatos heterocíclicos	Alta	Aceptable	Excelente	Buena	Buena	Buena
Catiónicos:	Buena	Aceptable	Buena	Excelente	Excelente	Excelente
Aminas terciarias						
Sulfonatos heterocíclicas	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Pobre	Buena	Pobre
Cuaternarios	Aceptable	Buena	Aceptable	Pobre	Buena	Buena
No iónicos:	Buena	Buena	Buena	Aceptable	Aceptable	Pobre
Condesado ácido graso/amina	Alta	Excelente	Buena	Pobre	Buena	Pobre
Etilén-óxido ácido graso						
Alcoholes alquil-aril-poliéter	Baja	Excelente	Excelente	Aceptable	Aceptable	Excelente
Condensado etilén-oxido/alcohol graso	Alta	Excelente	Excelente	Buena	Aceptable	Excelente
	Baja	Buena	Buena	Excelente	Excelente	Excelente

Acp: Aceptable

Marriot, 2003

Tabla 4. Propiedades importantes de los componentes principales de las formulaciones de los detergentes^a

Detergentes		Poder						Arrastre por agua	Corrosividad ^b	Poder bactericida
Clase	Componente	Humectante	Dispersante	Disolvente	emulsificante	saponificante	secuestrante			
Álcalis inorgánicos	Hidróxido de sodio	1	1	4	1	4	0	1	0	4
	Metasilicato de sodio	2	3	3	3	3	1	3	2	2
	Carbonato de sodio	1	1	2	1	2	0	1	2	1
	Fosfato de sodio	2	3	2	3	3	2	3	1	2
Ácidos	Ácido sulfámico	1	1	3	1	1	3	1	0	3
	Ácido hidroxiacético	1	1	2	1	1	3	2	2	2
Tensioactivos (detergentes)	Alquil-benceno sulfonato de sodio	4	4	2	4	0	0	4	4	0
	Lauril sulfato de sodio ^c	4	4	2	4	0	0	3	4	0
	Nonil-fenol etoxilato	4	4	2	4	0	0	2	4	0
	Dodecil-diaminoetil glicina	4	3	2	4	0	0	3	4	1
Secuestrantes	Pirofosfato de sodio	1	2	2	2	2	3	3	4	1
	Tripolifosfato de sodio	1	3	3	2	1	3	2	4	0
	Hexametáfosfato de sodio	1	3	1	2	1	3	3	4	0

^a 4=excelente; 3=bueno; 2=Regular; 1=pobre; 0=sin actividad.

^b 0 en esta columna corresponde al producto más corrosivo; 4 equivale a no corrosivo.

^c Inestable en presencia de ácidos.

(Leveau, 2002)

1.4.Sanitización

Las aplicaciones sanitarias se refieren a las prácticas higiénicas destinadas a mantener un ambiente limpio, sano para la fabricación, preparación y almacenamiento de los alimentos. La sanitización es más que limpieza.

La sanitización se define como el conjunto de operaciones que tiene como objetivo eliminar y/o reducir hasta un nivel aceptable temporalmente el número total de microorganismos presentes en la superficie de contacto con los alimentos a fin de evitar la contaminación de materias primas y productos, con agentes patógenos y organismos en descomposición (Langsrud *et al.*, 2003).

La proliferación microbiana puede verse afectada por la presencia o la ausencia de sustancias inhibidoras. Las sustancias o agentes que inhiben la actividad microbiana se llaman bacterioestáticos. Aquellos que destruyen los microorganismos se llaman bactericidas. La mayoría de los bactericidas se utilizan como medio de descontaminación de alimentos o como desinfectantes de los equipos ya limpios, de utensilios, y de locales (Marriott, 2003).

1.4.1. Objetivos de una sanitización eficaz

Se derivan los objetivos a los que atiende una sanitización efectiva (Reinhard, 1998):

1. Eliminar los residuos visibles de una fabricación.
2. Eliminar las películas adhesivas de las paredes de los materiales.
3. Destruir la flora microbiana presente en los equipos hasta niveles no perjudiciales para la salud.
4. Respetar la integridad de las superficies a limpiar.
5. Eliminar cualquier rastro de los productos químicos empleados.

1.4.2. Requisitos que debe cumplir un buen sanitizante (Fuster, 2006):

1. Fuerte acción biocida frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus, esporas de mohos y esporas bacterianas.
2. No debe producir olor/sabor/color extraños al ser absorbido o reaccionar con el alimento.
3. No debe ser tóxico a las dosis de empleo ni para animales ni humanos.
4. No ejercer una acción perjudicial sobre las superficies a tratar.
5. Ser efectivo en las condiciones de temperatura, tiempo de contacto, pH y grado de contaminación en que debe ser utilizado.
6. Debe ser estable y fácilmente soluble en el agua.
7. Baja relación costo.
8. Ser eficaz sobre el espectro de microorganismos a tratar.

9. Ser eficaz en cualquiera que sea la calidad del agua empleada e incluso en presencia de materia orgánica.
10. Conseguir la destrucción de gérmenes en un corto espacio de tiempo (5-15 minutos).
11. Debe ser seguro de manipular y usar.
12. No debe crear resistencia con el uso prolongado.
13. Debe tener la capacidad de penetrar, preferentemente con acción detergente.

1.4.3. Clasificación y características de los sanitizantes en la industria de alimentos

Son muchos los sanitizantes químicos que se utilizan para controlar los agentes infecciosos. Existen en el mercado una gran variedad de marcas y fabricantes, pero en general los sanitizantes químicos pertenecen a alguna de las siguientes categorías (Ramírez, 2006):

a) Amonio cuaternario

- ⓐ Posee un menor espectro de actuación que los clorados y iódoforos. Actúan mejor sobre Gram + que sobre Gram -. Tienen una actividad residual alta, por ello está indicado para aquellas zonas en las que se requieren una desinfección periódica y cuyas superficies no contacten con los alimentos. Su eficacia disminuye en presencia de materia orgánica pero menos que los clorados por su capacidad tensoactiva.

b) Halógenos

- ⓐ Cloro. En general los compuestos que liberan cloro son desinfectantes potentes de espectro de actividad amplia. Muchos de los compuestos que liberan cloro son fáciles de usar y no les afecta la dureza del agua. Sin embargo, para prevenir los efectos de la corrosión es imprescindible mantener un pH alto, lo que acarrea, como consecuencia, cierta pérdida de la actividad bactericida.
- ⓑ Yodo. Las combinaciones débiles formadas entre el yodo y agentes superficiales activos se denominan yodóforos. Los yodóforos son las formas más populares de compuestos yodados utilizados en la actualidad, que desarrollan una intensa actividad bactericida en medio ácido.

c) Aldehídos

- ⓐ Formaldehído. Estos compuestos son agentes alquilantes lo que significa que alquilan o unen cadenas cortas de carbono a las enzimas, inactivándolas y matando células. El formaldehído reacciona con las proteínas y los ácidos nucleicos dando lugar a una desnaturalización irreversible.
- ⓑ Glutaraldehído. Actúa por desnaturalización de las proteínas y alquilación de los ácidos nucleicos. Este desinfectante se ha utilizado para controlar el crecimiento de bacterias comunes Gram positivas y Gram negativas.

d) Alcoholes

- ⓐ Dos alcoholes se utilizan principalmente: etílico e isopropílico. Estos dos compuestos son elegidos preferentemente por su poder disolvente y su carácter volátil más que por su actividad antimicrobiana.
- ⓑ Los alcoholes desnaturalizan las proteínas en presencia de un grado de hidratación mínimo.

e) Agentes oxidantes productores de oxígeno

- ⓐ Dentro de este grupo de desinfectantes se encuentran el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno. Ambos son oxidantes potentes frente a los cuales los microorganismos no desarrollan resistencia. Actúan sobre los puentes sulfuro y sobre los dobles enlaces atacando mayor parte de los sitios celulares de manera selectiva y global; rompe los enlaces intramoleculares de las enzimas y compuestos membranales por ruptura oxidativa.

f) Antimicrobiano de origen natural

- ⓐ Hoy se aprecia un fuerte interés por la utilización de sustancias naturales para prevenir y controlar los daños que los productos químicos provocan al ambiente, al soporte que los recibe y al personal que los aplica.
- ⓑ En el mercado se incursionan productos naturales derivados de cítricos, la investigación realizada a estos compuestos ha servido como base, para que actualmente se utilicen dentro de la industria de alimentos, por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Ver anexo 1).

Se observa en la tabla 5 los sanitizantes más comunes que se utilizan en la industria de alimentos y su actividad antimicrobiana.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de algunos sanitizantes

Sanitizante	Bacterias		Levaduras	Mohos	Virus	Toxicidad
	Gram +	Gram -				
Aldehídos	+	+	+	+	+	Alta
Iodo	+	+	+	+	+	Media
Cloro	+	++	++	++	++	Media
Peróxido de hidrógeno	++	++	+	+	+	Baja
Ácido peracético	++	++	++	++	++	Baja
Compuestos de amonio cuaternario	++	+	++	+	Variable	Baja

++: Inactivación rápida; + inactivación.

Burt y Hinton, 1996

1.5.Mecanismo de acción del sanitizante

Los biocidas químicos desempeñan un papel clave en las medidas higiénicas industriales de las “superficies inertes” (instalaciones de producción), sin embargo, si el biocida falla en la eliminación de los microorganismos en la medida esperada, se considera que los parámetros del proceso se aplicaron de manera incorrecta como: concentración, temperatura, tiempo de exposición o falta de toxicidad del producto, resistencia de los microorganismos etc., estas características conducen al estudio de su mecanismo de acción, de resistencia, problemas toxicológicos y su uso correcto; para mejorar nuevos agentes (Bessems, 1998).

Para la deseada reacción entre el desinfectante y los gérmenes a combatir, es un requisito importante el contacto entre ambos, lo que permite que tenga lugar el proceso de la destrucción. Se pueden distinguir dos fases

1. Primera fase: debe asegurarse el contacto directo de la solución desinfectante con los microorganismos. A diferencia de la desinfección térmica, en la que puede alcanzarse la acción desinfectante por transmisión del calor, sin contacto inmediato con el medio que aporta el calor, la desinfección química no puede llevarse a efecto si no existe contacto de los microorganismos con el producto desinfectante. La finalidad de las operaciones de limpieza es hacer a los productos desinfectantes accesibles a los gérmenes.
2. Segunda fase: el proceso de interacción y/o penetración del desinfectante con el microorganismo. En ella, las moléculas del principio activo deben tener acceso a los componentes celulares “vitales” de los gérmenes. El contacto exterior comienza con una adsorción y adhesión, favorecida en parte por cargas eléctricas de signo contrario, y en parte por grupos moleculares.

Se debe considerar que el biocida se encontrará con estructuras que presentan diversos grados de sensibilidad para cada especie bacteriana, las células Gram-negativas ofrecen una barrera adicional de lipopolisacáridos a la penetración del biocida, mientras que las células Gram-positivas no poseen (Denyer, 1995). Otros organismos como: los virus y bacteriófagos o virus de las bacterias por no poseer ningún metabolismo propio, la inactivación eficaz de todas estas especies sólo es posible procediendo a la desnaturalización de sus componentes. Contra los fagos y virus “desnudos”, que pueden considerarse ácidos nucleicos con cápsula proteica, únicamente tienen éxito sustancias destructivas. En cambio, los virus con “envoltura” ofrecen diversos puntos de ataque en su compleja cápsula lipoidea y otros componentes de revestimiento, por lo que

también pueden ser combatidos con éxito con ayuda de otros principios activos (Wildbrett, 2000 y Cloete, 2003).

Los agentes desinfectantes presentan diferentes mecanismos de acción que se pueden considerar, son los siguientes, (Puig-Durán, 2002):

1. Por degeneración de la membrana citoplasmática, extrusión del citoplasma y deterioración de la pared celular.

Los agentes desinfectantes que suelen utilizar este mecanismo son:

- ⊖ Tensoactivos anfotéricos.
- ⊖ Sales de amonio cuaternario.

2. Por desnaturalización o precipitación de las proteínas citoplasmáticas de las células. Los agentes desinfectantes que suelen utilizar este mecanismo son:

- ⊖ Fenoles.
- ⊖ Alcoholes.
- ⊖ Sales de amonio cuaternario.

3. Por inactividad de las enzimas.

Los agentes desinfectantes que suelen utilizarse este mecanismo son:

- ⊖ Sales de plata.
- ⊖ Sales de mercurio.

4. Por aumento de la concentración de iones hidrógeno o hidroxilos. los agentes desinfectantes que suelen utilizar este mecanismo son:

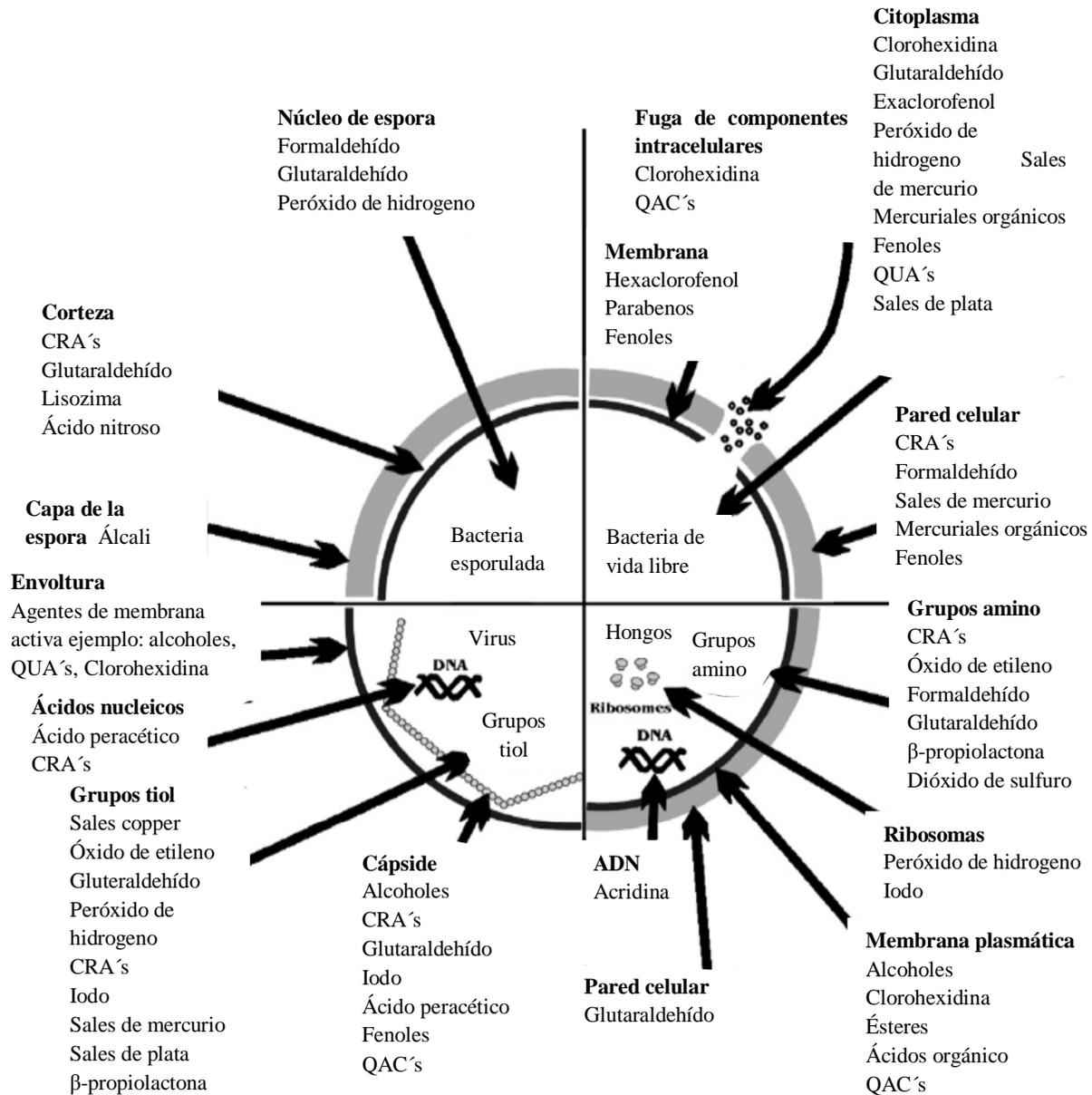
- ⊖ Ácidos.
- ⊖ Alcalis.

5. Por acción oxidante o reductora.

Los agentes desinfectantes que suelen utilizar este mecanismo son:

- ⊖ Peróxido de hidrógeno.
- ⊖ Permanganato potásico.
- ⊖ Productos halogenados.

En la figura 2 se muestra una representación de los diferentes puntos sobre los que actúan los distintos agentes desinfectantes por los diversos mecanismos de actuación.



Cloete, 2003

CRA's= agentes relacionados con cloro, QAC's=compuestos de amonio cuaternario.

Figura 2. Mecanismo de inactivación de los microorganismos por biocidas.

1.5.1. Factores que afectan la acción de los sanitizantes

Los factores que influyen en la sanitización son (Fuster, 2006):

1. Tipo de microorganismo: las formas más resistentes son las esporas bacterianas, los hongos, los cocos Gram positivos, los bacilos Gram positivos y los bacilos Gram negativos (excepto *Pseudomonas* que es especialmente resistente a los cuaternarios de amonio). Los virus grandes con cobertura lipídica son más sensibles que los sin cobertura.

2. Número de microorganismos: si la carga microbiana es elevada, se necesita una cantidad superior de sanitizante o un tiempo mayor de exposición para conseguir un determinado nivel de sanitizante. De ahí la necesidad de limpiar previamente a la aplicación del sanitizante, pues se reducirá la carga microbiana y se eliminará materia orgánica, que no solo protege a los microorganismos sino también puede inactivar al sanitizante.
3. Tiempo de actuación y concentración del producto: generalmente al aumentar el tiempo de contacto, aumenta la tasa de mortalidad. El tiempo de contacto es uno de los factores críticos para asegurar la sanitización. Por lo general para determinar la mortalidad bacteriana a los sanitizantes el tiempo de elección utilizado experimentalmente es de 15 a 30 minutos.
4. Materia orgánica: interfiere la acción del sanitizante básicamente por dos razones, debido a que la materia orgánica inactiva ciertos desinfectantes, como por ejemplo el hipoclorito de sodio. Por ello hay que limpiar previamente a la sanitización. Además, de una forma no reactiva, la materia orgánica e inorgánica forman una barrera protectora, de tal manera, que los microorganismos son protegidos de sus efectos.
5. Otras sustancias: jabones, detergentes, corcho, algodón, goma, etc. Pueden reaccionar con el desinfectante neutralizándolo.
6. Superficie de actuación: la principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de acceso a zonas con ranuras, grietas, puntos ciegos, manchas de corrosión. Las irregularidades de las superficies permitirán el alojamiento de microorganismos y de materia orgánica y, por lo tanto han de limpiarse a fondo, pero deberá guardarse un cierto equilibrio entre la intensidad de la limpieza y el mantenimiento de los instrumentos.

1.5.2. Valoración de la eficacia de los sanitizantes

La actividad bactericida de un agente antimicrobiano se determina por su capacidad de eliminar un determinado número de microorganismos en un período de tiempo establecido. Pasado este tiempo, el medio de cultivo con el neutralizador es usado para inactivar el efecto residual que pudiera tener el agente sobre las células supervivientes. Sin un neutralizador presente en el medio de cultivo, el agente antimicrobiano puede inhibir el crecimiento de microorganismos viables (Bessems, 1998).

Para biocidas, existen una gran cantidad de pruebas de laboratorio para asegurar una mínima actividad antimicrobiana. Para recomendar un biocida en un determinado uso, los productos

deben ser sometidos a una prueba (pruebas realizadas en condiciones sucias) y que corresponde a pruebas de suspensión y en superficie. Éstas se formulan de acuerdo a el área que se destinará el producto (Bessems, 1998).

Las pruebas de eficacia del biocida en suspensión descrita en la normalización Europea (CEN/TC 216) (Reinhard, 1998 y Fuster, 2006), indican que un biocida es eficaz si consigue reducir 5 unidades logarítmicas lo cual se aleja bastante de las condiciones reales de crecimiento de los microorganismos en superficie, donde los sanitizantes deben actuar para inactivar a los microorganismos. Las pruebas de suspensión estándares son suficientemente reproducibles porque las variaciones de resultados están dentro de límites aceptables cuando se realizan réplicas adecuadas. Sin embargo, cuando dichos ensayos de suspensión se realizan en presencia de materia orgánica, los parámetros de repetitividad y reproducibilidad se ven alterados. Es obvio que las pruebas en superficie son aún más difíciles de realizar que las pruebas de suspensión, debido al tipo de soporte utilizado para realizar el ensayo y también debido al comportamiento vital de una bacteria en una superficie seca.

Para desarrollar un protocolo estandarizado de evaluación de eficacia del sanitizante en superficies sólidas es importante identificar las fuentes principales de la variación en el procedimiento. Es importante también tener en cuenta que la susceptibilidad a los sanitizantes varía considerablemente cuando los microorganismos están dentro de una biopelícula o si están desecados en una superficie, respecto si se encuentran libres en una suspensión. Se han realizado estudios de los sanitizantes que deben ser utilizados a concentraciones más altas en superficies y no en suspensiones, puesto que la eficacia de un sanitizante depende en parte de la capacidad de penetración del mismo en una superficie (Fuster, 2006).

1.5.3. Resistencia a los sanitizantes

Cuando se produce un fracaso en la sanitización, es decir, el sanitizante no es capaz de eliminar una cantidad de bacterias esperada, probablemente sea consecuencia de las malas condiciones de uso del sanitizante (concentración inadecuada, temperatura, tiempo de contacto), o bien porque se produce una mala limpieza dejando restos de suciedad en las superficies que posteriormente se desinfectaran (Holah et al., 1998).

Muchos sanitizantes que se emplean en la industria no matan las esporas y por lo tanto el proceso de sanitización se convierte en un proceso de selección de microorganismos. En algunos casos las bacterias sobreviven tras una limpieza y sanitización aparentemente efectivas. Una explicación de ello podría ser que la susceptibilidad de las bacterias presentes en las instalaciones sea más baja de la esperada debido a su estado (tasa de crecimiento, estado nutricional, adhesión a la

superficie) o de su resistencia. Diariamente gran cantidad de microorganismos procedentes de la materia prima, ambiente, agua y suciedad se introducen en las instalaciones de proceso de alimentos. Sin embargo, la diversidad de bacterias evaluadas en las pruebas de eficacia del sanitizante es limitada y las recomendaciones de uso de los desinfectantes están basadas en pruebas de suspensión del laboratorio con distintas cepas patrón. Formular rutinas de sanitizantes ineficientes puede producir también la selección de microorganismos que en teoría se deberían eliminar con el sanitizante aplicado. Si el aclarado del sanitizante es insuficiente, puede quedar una concentración residual del sanitizante que cause un efecto subletal sobre las bacterias que podría conducir a una presión selectiva para retener o adquirir una resistencia genética entre microorganismos o la adaptación de una bacteria inicialmente sensible (Fuster, 2006).

Los microorganismos patógenos resistentes que sobreviven al proceso de sanitización contaminan los alimentos, representan una amenaza para la industria y el consumidor. La resistencia combinada a los sanitizantes y otros tipos de agentes antibacterianos puede convertirse en un problema para la industria en el futuro (Katsuyama, 1995).

Una definición práctica de resistencia sería igual a supervivencia. No obstante en términos adecuados a las sustancias antibacterianas, se considera que si un microorganismo sobrevive o crece en concentraciones de sanitizante más altas que otro microorganismo se considera que el primero tiene mayor resistencia. Y si una cepa que pertenece a una especie determinada sobrevive a concentraciones de un sanitizante que mata a la mayoría de las otras cepas de la misma especie se definen más resistentes (Katsuyama, 1995).

La adaptación puede evitarse con la limpieza y sanitización rigurosa evitando la concentración de sanitizantes por debajo de la concentración microbicida. Hay dos mecanismos de resistencia bacteriana a los biocidas, es decir, resistencia intrínseca y adquirida (Meyer, 2006).

La resistencia intrínseca (tolerancia), es la resistencia natural de las especies microbianas. Los microorganismos son generalmente considerados como “resistentes”, cuando son capaces de “resistir” más que el doble de concentración de un producto recomendado por el proveedor.

La resistencia adquirida, se utiliza cuando ciertas cepas de una especie microbiana difieren significativamente en la susceptibilidad a los biocidas.

1.5.4. Los mecanismos de resistencia

El principal mecanismo de resistencia de adaptación es por la formación de materiales limo (glicocalix) por microorganismos que forman biopelículas. La secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) depende de las condiciones fisiológicas. Las EPS facilitan la formación de capas de microorganismos de vida libre en las superficies internas de las tuberías, contenedores y otros equipos.

Con frecuencia es muy difícil encontrar una solución adecuada para sanitizar el equipo contaminado con biopelículas. Por lo general, es necesario romper o desestabilizar la consistencia pegajosa del glicocalix con el fin de hacer accesibles los microorganismos para los biocidas (Heinzel, 1998).

La falta de eficacia puede tener explicaciones y la resistencia es sólo uno de ellos. Hay muchas razones para causar la pérdida de eficacia de un procedimiento de sanitización que puede ser mal interpretado como resistencia. En breve se resumen de la siguiente manera (Heinzel, 1998):

- ④ El uso de un producto ineficiente, es decir, un sanitizante que tiene un espectro incompleto de la actividad. Por lo tanto todos los microorganismos sobreviven y están fuera del rango de eficiencia de los productos.
- ④ La aplicación del producto sin la debida consideración a las condiciones adecuadas según lo recomendado por el proveedor. Esto se refiere principalmente no solo a la concentración, temperatura, pH y tiempo de aplicación; también a la inactivación por materia orgánica y otros productos. La aplicación prolongada de desinfectantes en concentraciones óptimas provoca la adaptación de los microorganismos a estas subconcentraciones y posiblemente, al desarrollo de una verdadera resistencia.
- ④ Insuficiente contacto del desinfectante con las superficies a tratar. Esto puede deberse a mala accesibilidad o capacidad de drenaje insuficiente del equipo.
- ④ Disponibilidad insuficiente de principio activo (s). Este ha sido el caso de pseudo-resistencia.

Todas estas circunstancias pueden causar que los sanitizantes no funcionen como se esperaría. El usuario, sin embargo, tiende a explicar estos resultados, no por sus propios errores, si no en la pérdida del desinfectante, debido al desarrollo de una resistencia.

1.5.5. Incidencia de cepas resistentes en la industria alimentaria

La presencia de cepas resistentes a los sanitizantes aplicados puede representar un desafío económico para la industria alimentaria además de tener implicaciones en la salud humana.

El uso de sanitizantes puede conducir a la selección de cepas bacterianas que son intrínsecamente resistentes a los agentes antibacterianos aplicados. Además la exposición a sanitizantes en concentraciones subletales produce una resistencia más estable. Es importante diferenciar una respuesta inducida por un estrés, la cual es reversible de la adaptación que produce una resistencia más estable a los sanitizantes.

En condiciones de laboratorio la adaptación de los microorganismos se estudia mediante la exposición de los mismos a concentraciones de sanitizantes gradualmente más altas. En condiciones reales la adaptación ocurre en los nichos de difícil acceso en los cuales el sanitizante queda en bajas concentraciones.

En resumen las bacterias pueden adquirir resistencia más alta a los sanitizantes a través de la adaptación, adquisición de elementos resistentes a nivel genético, respuestas de estrés o formación de biopelículas (Fuster, 2006).

Para evitar la aparición de las resistencias es necesario aplicar los principios básicos y elementales de la higiene entre ellos: realizar una buena limpieza antes de la sanitización, utilizar la concentración y el tiempo de contacto adecuado y finalmente aclarar y secar las superficies tras la sanitización que en muchos casos puede prevenir la aparición de resistencias bacterianas. Una posible solución a los fenómenos de resistencia es la rotación entre distintos sanitizantes que no estén relacionados o la aplicación de concentraciones del sanitizante más altas. En esencia, esta práctica conlleva que, cada cierto tiempo, dependiendo del tipo de contaminación y la extensión de la misma, se cambia el tipo de sanitizante creando un ciclo con dos, y preferiblemente con tres, productos sanitizantes diferentes (Heinzel, 1998).

La producción microbiana que se encuentra sobre el material de las industrias alimentarias es de gran diversidad, se clasifica en función de la resistencia a los biocidas:

1. Microorganismos patógenos

- Ⓢ Su eliminación total es indispensable.
- Ⓢ Son muy sensibles a la acción del calor, sanitizantes y variaciones de pH del medio.
- Ⓢ La adherencia de los microorganismos a las superficies y en puntos críticos (tuberías, válvulas, codos, juntas, etc.), son difíciles de destruir con sanitizantes.

2. Microorganismos banales (para la salud).
 - ⓐ También son sensibles a la acción del calor, sanitizantes y variaciones del pH
3. Microorganismos termorresistentes.
 - ⓐ Difíciles de destruir por el calor.
 - ⓑ Son sensibles a los antisépticos.
4. Microorganismos esporulados.
 - ⓐ Resistentes a los biocidas.
 - ⓑ Sólo destruibles en autoclave a 120°C/30 minutos.

1.5.6. Métodos para determinar la eficacia de los sanitizantes

Los productores de alimentos deben asegurar que los sanitizantes que utilizan, presenten efectividad antimicrobiana a concentraciones y tiempos de acción recomendadas por el fabricante, también que no sean de alto riesgo para las personas, ambiente y objetos que contacten con el producto.

La evaluación de los sanitizantes para la industria de alimentos por métodos de ensayos documentados, repetibles y reproducibles es esencial. Tradicionalmente los sanitizantes han sido evaluados por la prueba de suspensión (mínima concentración inhibitoria) y en ocasiones en la superficie. Dentro de la metodología de la pruebas también es posible probar una amplia gama de variables que incluyen tiempo de contacto, temperatura, tipo de microorganismos y de sustancias interferentes (residuos) (Reybrouck, 1998).

Se encuentran guías de evaluación de los sanitizantes (considerados como plaguicidas), las cuales establecen que se deben realizar pruebas de efectividad del sanitizante mediante métodos utilizados por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos por sus siglas en ingles (AOAC). Las pruebas que se reportan son: pruebas de soporte (Carrier) y dilución de uso (Use-Dilution) para evidenciar la actividad bactericida, micobactericida y esporicida, estas pruebas se conocen como “Pruebas de efectividad de los desinfectantes” o por sus siglas en ingles DET’s (Forero y Piedrahita, 2008).

Recientemente en el año 2007, la Farmacopea de los Estados Unidos por sus siglas en ingles (USP) expidió la sección <1072> “Antisépticos y Desinfectantes” en la cual se detalla la metodología que puede desarrollarse para realizar la evaluación de la efectividad de los

sanitizantes; las pruebas que la farmacopea sugiere son el coeficiente fenólico (pruebas en suspensión) y la dilución de uso (pruebas carrier) (Forero y Piedrahita, 2008).

Los DET's se dividen en tres: pruebas en suspensión, pruebas soporte y desinfección de superficies.

1.5.6.1. Pruebas de suspensión

Son relativamente simples y no requieren piezas especiales o equipos costosos de laboratorio, son económicos de realizar.

Existen diferentes tipos de pruebas en suspensión: las pruebas en suspensión cualitativas, el método del coeficiente fenólico y las pruebas en suspensión cuantitativas.

Todas tienen en común el siguiente procedimiento: se adiciona un volumen apropiado de suspensión bacteriana es adicionado a una concentración determinada de una solución de desinfectante. Después de un tiempo prudente de exposición las muestras son examinadas para evidenciar si la suspensión bacteriana fue inhibida o no. Los resultados cualitativos se dan como crecimiento o no crecimiento.

Mientras que para las pruebas en suspensión cuantitativas se procede a realizar recuentos para identificar el efecto microbiocida, para que un desinfectante apruebe una prueba de suspensión cuantitativa debe haber inhibido por lo menos al 99.999% de los microorganismos lo que equivale a la reducción de 5 unidades logarítmicas (Forero y Piedrahita, 2008).

1.5.6.2. Dilución en tubo

Se realizan diferentes soluciones del desinfectante. El mismo volumen de cada dilución se adiciona en tubos estériles, a cada tubo se le añade la misma cantidad de una suspensión del microorganismo utilizado como prueba. A determinados intervalos de tiempo se transfiere una alícuota de cada tubo a otro que contenga un medio de cultivo. Estos tubos inoculados se incuban a la temperatura y crecimiento óptimo según el microorganismo. Al cabo de este tiempo se examina el crecimiento del microorganismo mediante la aparición o ausencia de turbidez en el tubo (crecimiento positivo o negativo). Aquellos tubos que presentan crecimiento negativo indican la dilución a la cual ese agente químico inhibe al microorganismo prueba. El control de la prueba se realiza con agua estéril siguiendo el mismo procedimiento.

Una complementación de esta técnica es el aislamiento e identificación de una muestra representativa de los tubos positivos con el fin de confirmar que el crecimiento pertenece al

microorganismo estudiado y descartar una posible contaminación que altere los resultados promoviendo la aparición de resultados falsos negativos respecto a la presencia de turbidez.

Por otra parte también es importante tener en cuenta las propiedades del o de los sanitizantes en el momento de realizar la transferencia al tubo con medio de cultivo, ya que la acción bactericida de algunos sanitizantes puede continuar aun después de haber realizado la transferencia al tubo a incubar lo que prolongaría el tiempo de exposición; si el desinfectante se inactiva por dilución (como el alcohol) el procedimiento y los resultados pueden ser confiables, si por el contrario no se inactiva por dilución (que es lo que se realiza al momento de la transferencia), se debe realizar una pre-transferencia a un medio neutralizante los cuales tienen compuestos que inactivan la acción bactericida del o los sanitizantes permitiendo de esta forma obtener resultados reales de la prueba para evitar los resultados falsos negativos (Forero y Piedrahita, 2008).

1.5.6.3. Coeficiente fenólico

Es la técnica más conocida para la evaluación de los desinfectantes en suspensión, está validada por la AOAC; en esta se compara la acción bactericida de un determinado desinfectante frente a la del fenol; se prepara una suspensión conocida del microorganismo, a diferentes concentraciones de los desinfectantes de prueba en tubos (dilución recomendada, una mayor y una menor a esta con un volumen final de 5mL). De igual forma se preparan tres concentraciones de fenol según el microorganismo de estudio generalmente 1/100, 1/90, 1/80. Una vez preparado el material se adicionan 0.5mL o una asada de la suspensión a los tubos con la dilución. El estudio evalúa tres tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos) por cada dilución tanto de desinfectante prueba como de dilución de fenol, cada vez que pase un tiempo de exposición se transfieren 0.5mL o una asada (4mm) del tubo la dilución y microorganismo a un caldo nutritivo y este se deja incubar según el tipo de microorganismo en estudio. Los resultados son expresados cualitativamente (crecimiento o inhibición del crecimiento).

1.5.7. Pruebas en superficie inerte

1.5.7.1. Método de dilución de uso

Este método validado por la AOAC, se utiliza para verificar la acción de un desinfectante frente a un microorganismo el cual está adherido a una superficie inerte. El método consiste en contaminar el soporte carrier (material característico de la industria como: acero inoxidable, polietileno, PVC, etc.) sumergiéndolos con una suspensión del microorganismo en una concentración conocida por 30 minutos; después del tiempo de exposición, el soporte es extraído de la suspensión y se deja secar a temperatura ambiente. Luego, el soporte es sumergido en una dilución conocida de desinfectante por 10 minutos (tiempo estandarizado) y finalizado el tiempo de exposición el soporte es extraído y depositado en un medio neutralizante por 30 minutos para

finalmente ser adicionado a un caldo de crecimiento. La lectura se realiza de forma cualitativa observando la turbidez del tubo, esta prueba se debe realizar simultáneamente con mínimo 10 soportes para mayor confiabilidad. A esta técnica se le puede agregar materia orgánica como interferente, con el fin de evidenciar inactivación de la acción bactericida del desinfectante (AOAC, 2006).

1.5.7.2. Pruebas en superficie –In vivo

Este tipo de prueba se maneja en condiciones reales, tiene como objetivo verificar la dilución del desinfectante bajo condiciones reales de uso en la industria. La prueba consiste en contaminar la superficie (segmento de acero inoxidable) con un inóculo del microorganismo (concentración conocida), después del tiempo de exposición al desinfectante se determina el número de microorganismo sobrevivientes por contacto directo con agar nutritivo (caja de Petri) o por la técnica de lavado, en la cual la parte es lavada con un diluyente y el número de bacterias es determinado en solución residual (Forero y Piedrahita, 2008).

1.6. Neutralización para determinar la actividad de los sanitizantes

Para determinar la actividad bactericida y/o bacteriostática de los biocidas se emplea el método de neutralización para su inactivación química. En la tabla 6 se indican los neutralizantes más comunes para algunos biocidas. Los medios de cultivo líquidos más utilizados como neutralizantes son el caldo Lethen ver (anexo 2), es eficaz para los QAC's y las biguadinas (Espigares et. al, 2003).

En la composición de los neutralizantes se pueden utilizar detergentes no iónicos como el polisorbato 80 (Tween 80), solo o en combinación con lecitina para inactivar los QAC's, clorhexidina y compuestos fenólicos.

En muchos casos los neutralizantes son tóxicos para ciertas especies, y la eficacia de los biocidas es variable según el tipo de microorganismo, y esto requiere diferentes niveles o grados de neutralización. La eficacia o capacidad del neutralizante para inhibir la acción del biocida sobre los microorganismos, puede demostrarse comparando el número de microorganismos recuperados a partir del neutralizante en presencia y ausencia del biocida. Esta comparación evita confundir el efecto tóxico del neutralizante con una inadecuada inhibición del producto biocida.

Tabla 6. Aditivos para neutralizar el principio activo de los sanitizantes

Principio activo	Aditivo inactivador
Cloro activo	Tiosulfato de sodio Tioglucolato de sodio
Compuestos yodados	Tiosulfato de sodio Polisorbato 80 + lecitina + histidina Cumolsulfonato de sodio Suero bovino inactivado
Compuestos de peróxidos	Tiosulfato de sodio Clorhidrato de cisteína Catalasa
Ácidos	Álcalis
Álcalis	Ácidos
Aldehídos	Sulfito de sodio Cisteína Histidina Histidina + lecitina + Polisorbato 80 Saponina Tioglucolato Suero, en especial de bovino
Fenol y derivados	Polisorbato 80 Polisorbato 80+ lecitina + histidina Saponina Cisteína Lauriletersulfato de sodio
Compuestos de amonio cuaternario	Polisorbato 80
Biguadinas	Polisorbato 80 + lecitina
Anfoténsidos	Polisorbato 80 + lecitina Laurilsulfato sódico Lauriletersulfato amónico
Compuestos orgánicos de estaño	Polisorbato 80 + lecitina Cisteína

Espigares *et. al*, 2003

1.7. Limpieza y sanitización

La palabra limpieza y desinfección, en su conjunto son sinónimos de las palabras sanitización e higienización. Consiste en un proceso o conjunto de operaciones por las que se eliminan los restos o residuos orgánicos e inorgánicos y la suciedad presente en el objeto, utensilios o superficies a limpiar, y se arrastran e inactivan los microorganismos (Sánchez, 2003).

La higienización es una parte esencial de la producción de alimentos y la eficiencia con que se lleve a cabo, ejerce una enorme influencia en la calidad microbiológica final del producto.

Una sanitización efectuada correctamente debe conducir a la eliminación completa, tanto como sea posible, de los gérmenes microbianos presentes tanto en superficies como en la atmósfera de los locales de trabajo y en los equipos más concretamente (Scheffler, 2009).

La limpieza y desinfección son difícilmente separables entre si, por la tanto, desinfectar sin efectuar previamente una limpieza es:

- ⓐ No eliminar los focos de contaminación.
- ⓑ Dejar sobre las superficies de los materiales que forman los equipos un medio de cultivo favorable a nuevas proliferaciones, como consecuencia formación de biopelículas.
- ⓒ Llevar a cabo una limpieza sin una posterior sanitización lo más cuidadosa posible, es dejar residuos de microorganismos, capas de suciedad y materia orgánica.

1.7.1. Limpieza y sanitización simultáneas o combinadas

Se aplica en una sola formulación a la vez detergente y sanitizante o un producto que reúne ambas propiedades. En el primer caso, el detergente y sanitizante deben ser compatibles. En la tabla 7, se dan las combinaciones detergente-sanitizante más frecuentemente utilizadas.

Las ventajas de este procedimiento, son la simplificación del trabajo y la economía. Los inconvenientes radican en que generalmente una formulación mixta no es tan eficaz como la aplicación sucesiva del detergente y del desinfectante que contiene, y en que puede anularse la eficacia de este último si la formulación se aplica sobre superficies muy sucias. Por esta razón, porque la suciedad protege a los microorganismos, se debe convencer a los responsables de la higiene de las industrias de alimentos que no utilicen la limpieza y sanitización simultáneas. Se aconseja cambiar de formulaciones periódicamente, para evitar el desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos.

Tabla 7. Combinaciones detergente-sanitizante más frecuentemente utilizados

Limpiadores	Sanitizante
Álcalis inorgánicos	Hipocloritos Compuestos orgánicos liberadores de cloro Compuestos de amonio cuaternario
Ácidos inorgánicos	Surfactantes no iónicos Yodóforos
Tensoactivo aniónicos	Compuestos orgánicos liberadores de cloro
Tensoactivo no iónicos	Compuestos de amonio cuaternario Yodóforos

Forsythe y Rayes, 2002

1.7.2. Etapas de la limpieza y sanitización

La aplicación de distintas etapas depende de (Wildbrett, 2000):

1. Arrastre en seco de residuos: eliminación de suciedad libre.
2. Preenjuague: se trata de realizar una limpieza previa con agua, la eliminar la suciedad más grosera.
3. Aplicación del detergente: se realizará mediante el sistema adecuado en cada caso particular. Esta fase es la responsable de disolver y solubilizar la suciedad.
4. Enjuague: se realizará mediante agua potable abundante.
5. Aplicación del sanitizante: una vez realizado el proceso de limpieza como tal, se procede a aplicar un sanitizante.
6. Enjuague: posteriormente se enjuagará, para evitar los residuos del sanitizante.
7. Secado: en la medida de las posibilidades se realizará una etapa de secado, porque el agua además de favorecer el crecimiento bacteriano, puede ser un vehículo diseminador si hubiese quedado un microorganismo.

1.7.3. Actitud frente a la limpieza y la sanitización

Para que la limpieza y la sanitización puedan dar buenos resultados, es necesario que tanto directivos como técnicos y trabajadores estén convencidos de su importancia y colaboren desde sus respectivas responsabilidades. Así, la dirección debe proporcionar los medios técnicos y facilidades precisas para que puedan ejecutarse los programas de limpieza y sanitización. Y hacer posible la formación y el perfeccionamiento de los trabajadores en cuanto a la observación de las normas de higiene. Los técnicos han de supervisar las operaciones de limpieza y sanitización, enseñar y estimular a los trabajadores que han de realizarlas. Finalmente, todos los trabajadores deben entender que si hacen el trabajo correctamente, manteniendo limpio su entorno, están facilitando las tareas diarias de limpieza y sanitización.

1.7.4. Aplicación del programa de limpieza y sanitización

La higiene debe contemplarse dentro de una perspectiva global como una etapa básica del proceso productivo, considerada como un requisito previo del sistema Análisis de Peligro y Puntos de Control Críticos (APPCC). En un plan de sanitización se deben evaluar las necesidades higiénicas de cada zona y establecer un programa de limpieza y sanitización eficaz según los requerimientos de cada etapa de producción de los alimentos (desde la materia prima hasta su consumo). Por lo tanto en la industria alimentaria es esencial el estado de limpieza física, química y microbiológica de las líneas. La selección de detergentes y sanitizantes en la industria alimentaria depende de la eficacia, seguridad y capacidad de aclarado del agente, así como de si es corrosivo o afecta a los parámetros sensoriales del producto (Pasanen et al., 1996). Para

realizar una buena limpieza y sanitización se debe realizar un estudio previo analizando los siguientes parámetros (Moreno, 2006):

- ④ Conocimiento de la industria, tipo de residuos, procesos que realiza, maquinaria y equipo.
- ④ Calidad y propiedades del agua que utiliza. El agua que se utiliza en las industrias de alimentos tiene que poseer ciertas cualidades. La calidad microbiológica afecta a la eficacia de los procesos de limpieza y sanitización por tal razón el agua a emplear debe ser potable. La calidad química es muy importante. Se llaman *aguas duras* aquellas que contienen cantidad elevada de compuestos de calcio y de magnesio, y en menor medida, de manganeso, aluminio, hierro etc. Las aguas duras forman costras, depósitos o incrustaciones en calderas y equipos industriales. Además las sales de sodio de los jabones (y de otros detergentes aniónicos) reaccionan con los carbonatos, bicarbonatos, cloruros y sulfatos disueltos en el agua y forman compuestos insolubles que precipitan (sales de los ácidos grasos del jabón), formando depósitos. Las aguas blandas tienen una cantidad pequeña de compuestos de calcio y magnesio y son las adecuadas para la limpieza (Moreno, 2006).
- ④ La elección de los agentes tensoactivos y antimicrobianos deben ser adecuados y compatibles, en combinación perfecta.
- ④ La aplicabilidad a diversos tipos: locales, instalaciones y equipos. Hay que distinguir entre las líneas de procesamiento abierta o cerrada y entre las superficies que pueden ser lisas o porosas, lisas o con forma irregular y los espacios vacíos, no corrosivos o de corrosión, horizontal o vertical. Además hay que considerar si el tipo de suciedad a tratar es soluble en agua. Por otra parte se debe diferenciar las condiciones de limpio y sucio, incluso después de un procedimiento de limpieza.
- ④ La eficacia del sanitizante en un tiempo relativamente corto de hasta 30 minutos si es posible y en el rango de temperatura más baja de 4-10°C.
- ④ Los sanitizantes no deben tener influencias organolépticas (sensoriales) sobre el alimento si este entra en contacto con las superficies tratadas.
- ④ La aplicación de seguridad también debe ser consideradas de una manera especial.
- ④ Las características agresivas para los tejidos humanos deben ser excluidos en lo posible.

- ⓐ Se debe considerar el efecto corrosivo sobre los equipos y accesorios en el mismo recinto.
- ⓐ La composición de la microflora es muy compleja dentro de los diferentes alimentos y constituyen hábitats diferentes, hay que tener en cuenta si son Gram-negativos o Gram positivos o levaduras y mohos. En casos especiales la presencia predominante de formadores de esporas y virus se tiene que tener en cuenta.
- ⓐ Impacto ecológico de detergentes, sanitizantes y procedimientos adoptados.
- ⓐ Por último los costos son un punto importante de consideración debido a que los sanitizantes deben ser utilizados con regularidad y en las concentraciones adecuadas, para ser eficaz.

1.8.Métodos de verificación y vigilancia de la limpieza y sanitización

1.8.1. Importancia del muestreo y la identificación de puntos de muestreo

Los análisis microbiológicos constituyen uno de los métodos de evaluación de la calidad microbiana de los alimentos y de la higiene de los utensilios, equipos y superficies que intervienen en el proceso de elaboración.

La obtención de muestras representativas de ciertos productos o elementos relacionados con la industria es complicada debido a la heterogeneidad, tanto espacial como temporal, así como a problemas técnicos relacionados con el sistema de muestreo de la industria. Los microorganismos se encuentran plenamente instalados en cualquier parte de una industria, tal forma que en muchas ocasiones colonizan lugares de difícil acceso, lo cual es beneficioso para ellos, ya que así su supervivencia estará garantizada. Como se ha mencionado es frecuente encontrar microorganismos en el interior de grietas, puntos ciegos de circuitos, juntas y un sinnúmero de lugares que la mayoría de las veces el operador olvida y sin embargo son puntos de control crítico en materia de higiene.

En la gran mayoría de las industrias alimentarias, realizan los análisis microbiológicos sobre unidades de muestra de las cuales deben extraerse los microorganismos para ser cuantificados, aislados e identificados si la situación lo requiere. Un factor fundamental para realizar correctamente dichos controles es el método de muestreo, el cual debe ser simple, rápido, económico, sensible y no presentar riesgo para el operador o el alimento (Surman et. al, 1996).

1.8.2. Métodos clásicos

Tradicionalmente los métodos de control de superficies se agruparon según el método de muestreo en tres categorías ICMSF por sus ingles (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), (Fuster, 2006):

- ⓐ Hisopados: consisten en la frotación de un área limitada con un hisopo o una esponja. Tras el hisopado se introducen en un tubo con diluyente a partir del cual se realizará el estudio microbiológico, dando los resultados en unidades formadoras de colonias (ufc) por cm^2 .
- ⓑ Enjuagues: se agrega un volumen determinado de solución estéril de dilución sobre la superficie a hacer un muestreo, se lava y se recupera el líquido para efectuar los estudios microbiológicos.
- ⓒ Métodos de impresión por contacto: se hace contacto con la superficie a estudiar de forma directa o indirecta con el medio de cultivo, el cual se incuba para efectuar los recuentos.

1.8.3. Ventajas e inconvenientes de las técnicas clásicas

Las técnicas de análisis microbiológico más utilizadas para verificar el grado de sanitización de las instalaciones, tras el proceso de higienización, son aquellas que se realizan mediante la toma de muestras con placas de contacto y frotación de las superficies higienizadas.

Estos métodos reflejan si existe restos de contaminación microbiana residual una vez que se ha sanitizado una zona. Sin embargo, en este caso siempre es aconsejable realizar dos muestreos, antes de la sanitización y después de la misma, con el fin de verificar la efectividad del sanitizante. Asimismo, una desventaja que presenta este método de placa de contacto es que no permite el estudio de las biopelículas adheridas a las superficies porque para su determinación es necesario que se produzca la ruptura de su estructura. En cuanto a la técnica de frotación su problema principal radica en que hay variaciones individuales en la forma de hisopar la superficie, observándose una elevada variabilidad de recuentos por área de muestra. Otro inconveniente de esta técnica es que los microorganismos adheridos y las biopelículas en general, no se recuperan bien con el hisopo, o bien, pueden quedar retenidos en el capuchón y no ser transferidos a los medios de cultivo.

Otra desventaja de las técnicas basadas en la microbiología clásica es la obtención de resultados. Tanto las técnicas de frotación como las de aplicación por impresión son lentas debido a su incubación previa a la lectura, los resultados se obtienen entre 24 y 48 horas.

Existen otras técnicas denominadas métodos rápidos, los cuales permiten cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en las superficies de contacto con alimentos en cuestión de minutos o en menos de 24 horas en función de la técnica elegida.

A pesar de que estas técnicas poseen algunas limitaciones, actualmente siguen siendo aceptadas y de uso común para la detección de bacterias en superficies de contacto. Por lo tanto, es necesario mejorar estas técnicas para optimizar el protocolo de frotación tradicional (Fuster, 2006).

1.8.4. Técnicas rápidas

La necesidad de reducir los tiempos de detección de los microorganismos ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías que permiten con la misma fiabilidad, reproducibilidad y repetitividad que los ensayos clásicos, la certificación de la calidad microbiológica de los productos alimentarios. Éstas fundamentan su aplicación en la detección de microorganismos de manera indirecta o directa. Entre los sistemas indirectos los más utilizados para el control de superficies son las técnicas de bioluminiscencia, de inmunoensayo y de impedancia eléctrica. La desventaja de éstos puede inducir a resultados erróneos. A diferencia de los sistemas directos, cuyo fundamento principal es el recuento directo de las bacterias, como es el caso de la técnica microscópica de epifluorescencia directa (Holah et. al, 1998).

1.8.5. Aplicación de las técnicas rápidas para el control microbiológico e higiénico de superficies

- ④ Microscopia directa epifluorescencia: está basada en la técnica de microscopia de epifluorescencia por filtración. Fue descrita por Holah et. al (1988), se trata de una técnica que permite cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en la superficie de contacto con alimentos en menos de treinta minutos.
- ④ Métodos impedanciométricos: la impedancia eléctrica es una poderosa herramienta que permite evaluar la eficiencia de los diferentes productos sanitizantes y principios activos. Entre las aplicaciones fundamentales en la industria alimentaria, destaca el recuento de aerobios totales, levaduras, enterobacterias, coliformes, así como la confirmación de ausencia de patógenos como *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium* y *Staphylococcus*. También se ha aplicado para el recuento de psicrófilos y lactobacilos, para evaluar la resistencia y evaluar los sanitizantes en suspensión y en superficie.
- ④ Medición de ATP por bioluminiscencia: la detección del ATP (trifosfatos de adenosina) por bioluminiscencia es una de las tecnologías emergentes como método de análisis

microbiológico rápido debido a que proporciona en tiempo real una valoración estimada de la higiene de la superficie total. La detección de ATP por bioluminiscencia se basa en la detección de la energía celular de los organismos vivos. La enzima luciferasa, es añadida a la muestra que contiene ATP junto con la luciferina. Al oxidarse la luciferina emite fotones de luz. La cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de ATP (Fuster, 2006).

1.9. Biopelículas

Desde hace mucho tiempo se han estudiado las bacterias y se ha demostrado que muchas de ellas son perjudiciales, si llegan a estar en contacto con un alimento, que posteriormente va a ser consumido por la persona.

Estas bacterias pueden llegar a las superficies de plantas de alimentos y fijarse sobre los equipos, hasta formar biopelículas, dando origen a focos de contaminación; lo anterior, debido a malas prácticas higiénicas e insuficientes procedimientos de limpieza y sanitización, principalmente (Simoes *et al.*, 2010).

Las biocapas (“biopelículas”), que fueron descubiertas a mediados de los 70, son microcolonias de bacterias estrechamente asociadas a una superficie inerte y sujetas mediante una matriz de un complejo material parecido a un polisacárido en el que otros restos o desperdicios, incluidos nutrientes y microorganismos, pueden quedar atrapados. Una biocapa es un medioambiente único que los microorganismos, generan por sí mismos, permitiéndole el establecimiento de una “cabeza de puente” en una superficie, resistente a los intensos ataques de los agentes sanitizantes (Hans *et al.*, 2007).

1.9.1. Formación de la biopelícula

Recientemente se ha revisado el tema, y se acepta de forma general que la adherencia o adhesión, a la superficie del equipo y utensilios de las industrias de alimentos, es un proceso que se desarrolla en dos fases (Moreno, 2006):

1. Acondicionamiento: la biopelícula bacteriana empieza a formarse cuando alguna célula individual se adhiere inicialmente a una superficie. La capacidad de adhesión de los microorganismos a un sustrato depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, las adhesinas y otras proteínas.
2. Adsorción y fijación: el proceso de adhesión se da en dos fases:

- a) La primera consiste en la retención de las bacterias en una película líquida sobre la superficie. En la adherencia esta fase inicial es reversible y está asociada con una interacción compleja entre las cargas y la hidrofobicidad de las células de la superficie de los alimentos. Cuando las bacterias están a ≥ 50 nanómetros (nm) de la superficie, actúan únicamente las fuerzas de Van der Waals, mientras que cuando la separación es de 10-20nm entran en juego interacciones electrostáticas. La adherencia o adhesión se asocia también con interacciones de los apéndices externos de las células microbianas (flagelos, fimbrias y polisacáridos extracelulares) con receptores específicos de las superficies.
- b) La segunda fase que es irreversible, se caracteriza porque las bacterias forman exopolímeros (glicocalix). Estos polímeros extracelulares proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento y subsiguiente adherencia de más bacterias, otros microorganismos y restos, todo esto ha favorecido la formación de biopelículas en determinadas condiciones. La adherencia irreversible de las células microbianas a una superficie se puede dar entre 30 minutos y algunas horas, lo cual depende de diversos factores como tipo de bacteria y temperatura (Moreno, 2006).

1.9.2. Factores que influyen en la adhesión

1.9.2.1. Factores ligados a los microorganismos (Puig-Duran, 2002):

- Ⓢ Organismos celulares. Los microorganismos inmovilizados que están en adhesión reversible podrán adherirse de manera irreversible por medio de pili, flagelos, etc. Estas estructuras de pequeño diámetro (0.05 a 0.1 micrómetros) son capaces de posicionarse en la primera fase porque la barrera repulsiva es para ellos muy débil.
- Ⓢ Propiedades físico-químicas de superficie del microorganismo. A parte del tipo de organismo celular del que se trate, se deben considerar las propiedades físico-químicas de superficie del microorganismo. Estas son las constituidas por la propia célula (grupos carboxilos, fosfatos, proteínas, etc.) así como su metabolismo que confiere a los microorganismos sus propiedades eléctricas (en general carga negativa, punto de carga nula –o punto isoelectrico- a pH ácido) así como su carácter hidrófobo o hidrófilo. La modificación de las propiedades por adsorción de moléculas juega gran importancia en el fenómeno de adhesión.

1.9.2.2. Factores ligados a la superficie del sólido

- Ⓢ Propiedades físico-químicas. Carga y propiedades hidrófilas o hidrófobas del sólido desempeñan un papel clave en los procesos de adhesión. Así por ejemplo, un

microorganismo hidrófilo se adhiere mucho a un soporte hidrófilo e inversamente un microorganismo hidrófobo a un soporte hidrófobo. Para disminuir o favorecer la adhesión, es conveniente modificar las características del sólido. Estas modificaciones pueden ser aportadas de diversas maneras por el medio circundante:

- ⊗ Adsorción de cationes como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , etc. Su presencia favorece a la adhesión y su ausencia o su eliminación pueden en algunos casos interrumpir la adhesión.
 - ⊗ Adsorción de residuos de productos utilizados en la limpieza y sanitización.
 - ⊗ Modificación química en superficie, debida en muchos casos a la acción de los productos que contactan con la superficie; o a los productos de limpieza y sanitización.
 - ⊗ Reordenamiento conformacional de las moléculas superficiales.
- Ⓢ Rugosidad. Además del carácter hidrófobo o hidrófilo, la rugosidad juega un papel importante en la adhesión. El lavado turbulento, al favorecer los “impactos” superficie-microorganismos, favorece la adhesión, contrariamente al lavado laminar (Puig-Durán, 2002).

1.9.2.3. Glicocalix

En los últimos años se ha hecho evidente que en los entornos naturales e industriales la adhesión bacteriana está dada por el glicocalix. Este es un polisacárido hidratado en una matriz polianiónica producido por las polimerasas de los compuestos lipopolisacáridos de la pared celular.

En medios acuosos, las bacterias con capacidad de generar glicocalix abundan y menos del 0.1 % de las bacterias están presentes en forma planctónica. Varios factores contribuyen a la selección preferencial de tales microorganismos en estos ambientes acuáticos (Kumar y Anand, 1998):

- Ⓢ Los nutrientes orgánicos e inorgánicos se concentran en la interfase sólido-líquido, los organismos son capaces de asegurar este nicho siendo una ventaja.
- Ⓢ El glicocalix actúa como matriz de intercambio iónico, atrapan los nutrientes que son transportados en la célula por permeabilidad altamente eficiente.
- Ⓢ El glicocalix conserva y concentra las enzimas digestivas liberadas por las bacterias, lo que aumenta la eficiencia metabólica de las células.

- El glicocalix constituye una barrera física que proporciona una protección parcial de los agentes antibacterianos.
- Los estudios actuales sugieren que polisacáridos de alto peso molecular, no actúan directamente en la adhesión, posiblemente los polisacáridos de bajo peso molecular que se producen en pequeñas cantidades, son las que llevan proceso de colonización inicial y enseguida los de mayor peso molecular.

Recientemente se ha propuesto que la formación del glicocalix puede ser una respuesta de los microorganismos de cooperación a las limitaciones de densidad celular iniciado por las bacterias. Los mecanismos involucrados en la adhesión bacteriana dependen no sólo del estado fisiológico de los microorganismos, sino también de la composición del sustrato; la unión a superficies vivas puede ser de carácter más específico debido a las interacciones de los receptores. Mientras la adherencia a las superficies no biológicas no es específica, por la naturaleza electroquímica y la hidrofobicidad relativa de la superficie, pueden ser factores importantes en este proceso. Las superficies más rugosas son preferentemente colonizadas, ofrecen nichos que están protegidos de los efectos de los esfuerzos de corte, el flujo turbulento y la actividad biocida. Varios estudios de laboratorio han demostrado que los microorganismos incrustados dentro de las biopelículas están protegidos contra los efectos mortales de los biocidas (Kumar y Anand, 1998).

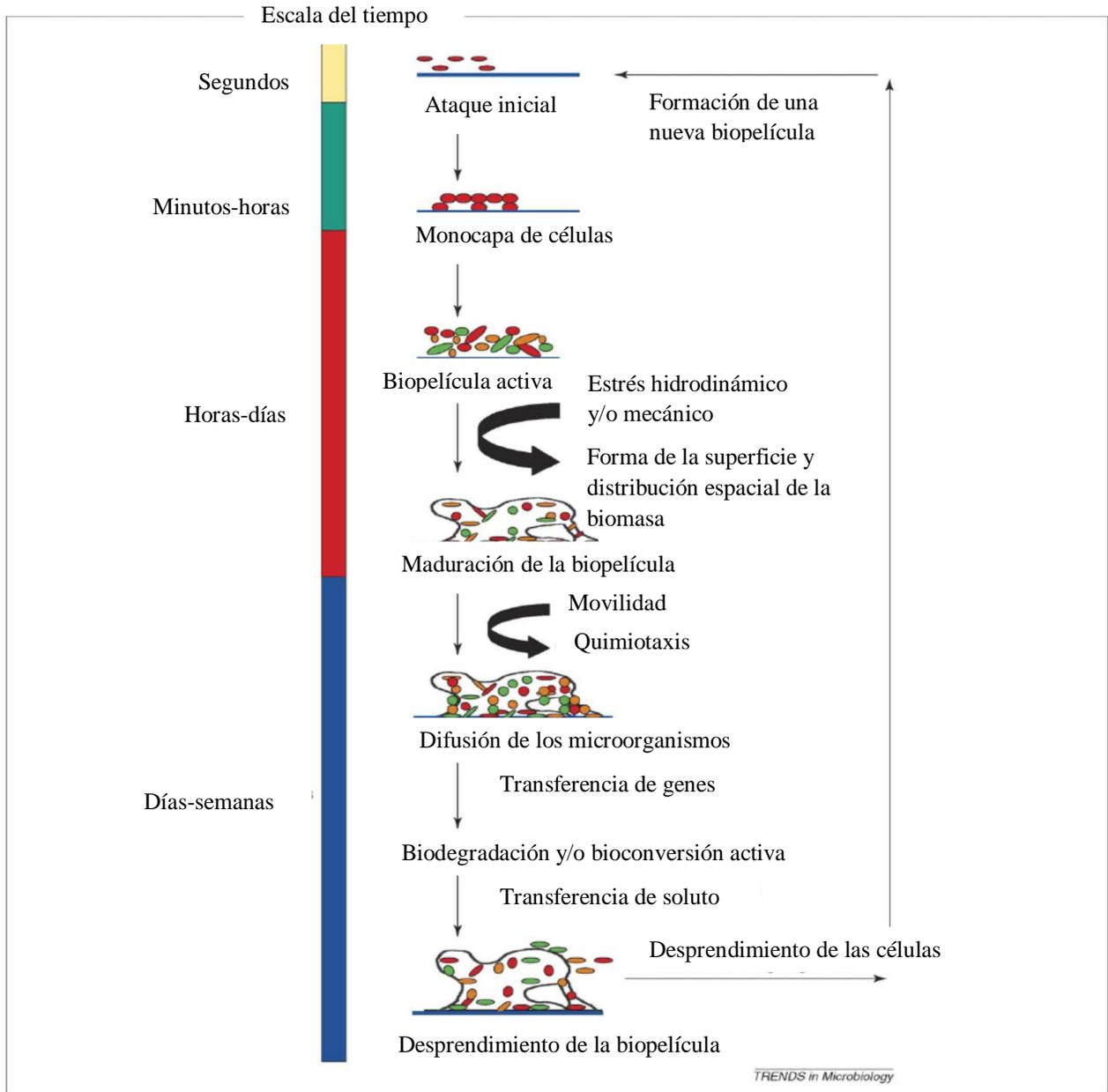
1.9.3. Maduración de la biopelícula

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente de la biopelícula, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración. Una biopelícula madura puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o en estructuras por sustancias poliméricas extracelulares.

A medida que madura la biopelícula, se adapta a los nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, forman microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas. Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz de la biopelícula, cerca de los canales de agua cuyo número se reduce con la edad de la biopelícula; en una biopelícula joven han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan solo un 50% en una madura (Fuster, 2006).

Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz de la biopelícula y se mueven por difusión (Singh, et al. 2006 y Hans, 2007).

En la figura 3 se muestran los pasos cíclicos de la formación de una biopelícula.



Singh, *et al.* 2006

Figura 3. Representación esquemática de los pasos cíclicos que intervienen en la formación de una biopelícula activa.

Las células inicialmente se unen por interacciones físico-químicas o de la secreción de la matriz extracelular para formar una monocapa de células, en la que expresan pili y tienen movilidad o la posibilidad de someterse a la quimiotaxis (movimiento de un organismo hacia (positivo) o

alejándose (negativo) del gradiente de un compuesto químico). Las células proliferan en la monocapa y otros microorganismos se adhieren para formar una biopelícula activa, el desarrollo está influenciado por factores ambientales como el estrés hidrodinámico y mecánico. Las células de la biopelícula maduran, son móviles y se someten a la quimiotaxis, que conduce a la propagación de microorganismos y una mayor tasa de transferencia horizontal de genes. Los procesos de formación y desprendimiento de las células vivas de las biopelículas se repiten en otro ciclo, lo que permite un mayor desarrollo de biopelículas similares, que puedan servir para alcanzar una nueva dimensión como resultado de las influencias ambientales. El período de tiempo aproximado para cada una de las fases se muestra a la izquierda.

1.9.4. Factores que afectan el desarrollo de la biopelícula

Algunos factores que afectan el desarrollo de la biopelícula, inclusive las propiedades de la superficie y de la interfase, son (Salgar, 2004):

- ④ Textura del material de soporte.
- ④ Características hidrodinámicas del sistema.
- ④ Tipo de microorganismos que lo componen.
- ④ Naturaleza de la fase líquida.
- ④ Disponibilidad de nutrientes.

1.9.5. Bacterias que pueden formar biopelículas

Muchas bacterias principalmente Gram negativas, tienen la habilidad de formar biopelículas, incluyendo algunos patógenos tales como (Salgar, 2004):

- ④ *Pseudomona*.
- ④ *Escherichia coli* (algunas variedades son patógenas).
- ④ *Acinetobacter*.
- ④ *Flavobacterium*.
- ④ *Salmonella* (patógeno).

Y en menor proporción bacterias Gram positivas, mohos, levaduras y algas.

1.9.6. Evidencia de una biopelícula

Hay varias formas de determinar que una biopelícula ha iniciado su formación en una superficie de contacto con alimentos. La detección puede ser mediante el uso de varios sentidos:

- ④ Visual, aparición de un “arco iris” en el acero inoxidable

- ⓐ Tacto, se detecta una sensación viscosa en la superficie del equipo.
- ⓑ Olor, puede detectarse olores agrios, aunque no indica presencia de biopelícula pero si indica que el equipo no se limpió a fondo.

Desde el punto de vista analítico, otro indicador de las biopelículas es un aumento de microorganismos esporádico en el ambiente debido a desprendimientos, estos se pueden encontrar a través de pruebas ambientales. Así como también, en los recuentos bacterianos en los alimentos, si estos son superiores a lo normal se debe considerar la posibilidad de la formación de biopelículas y se deben aplicar inmediatamente medidas de control para su eliminación (Cramer, 2006).

1.9.7. Remoción de la biopelícula

Las biopelículas no se formarán si hay un buen diseño de equipo sanitario, limpieza periódica y profunda para eliminar la suciedad superficial. Los equipos de fabricación de alimentos plantean muchos problemas de diseño sanitario como: rodillos, huecos, tuberías, válvulas, soldaduras, etc. que hacen difícil la limpieza. Una vez que las biopelículas se establecen en una superficie son más difíciles de eliminar (Amaral, 2011).

Existen algunos métodos y el más eficaz es la limpieza con acción mecánica y/o tratamiento químico del acero inoxidable con un agente alcalino caliente (NaOH) para la hidrólisis de la materia orgánica; y después del enjuague, tratamiento con ácidos fuertes (fluorhídrico o nítrico) para la remoción de óxidos adheridos a la superficie (Amaral, 2011).

Según Cramer (2006), recomienda las siguientes acciones preventivas:

- ⓐ Eliminar puntos de acumulación de agua.
- ⓑ Prever sanitización frecuente en tuberías y todo el sistema.
- ⓒ Las válvulas tienen que ser abiertas y cerradas durante la sanitización.
- ⓓ Hacer monitoreo de la calidad del agua potable y purificada.
- ⓔ Realizar por lo menos una pasivación (formación de una película sobre la superficie del acero inoxidable, que lo protege de la acción de agentes externos) por año, por ejemplo con ácido cítrico 10% (p/p)/60 minutos.
- ⓕ Procedimientos de higiene frecuente en el personal.
- ⓖ Determinar sitios críticos.
- ⓗ Exponer los sitios críticos a saneamiento de rotación.
- ⓘ Elegir detergentes y sanitizantes adecuados.

Actualmente el Servicio de Investigación Agrícola por sus siglas en inglés (ARS) de Estados Unidos ha realizado estudios en la formación y composición de biopelículas, así como sus medios de prevención y eliminación. En el estudio los investigadores encontraron que en el acabado de acero inoxidable, los tratamientos como el electropulido, la colocación del acero inoxidable en un baño de ácido y circular una corriente eléctrica a través de la solución y previene la formación de biopelículas (Cramer, 2006).

Esto es debido a que las bacterias poseen una carga negativa y la corriente a través del medio de comunicación ácido puede cambiar la polaridad sobre el metal, de esta manera se puede reducir la capacidad de las bacterias para fijarse y formar biopelículas (Cramer, 2006).

1.9.8. Propiedades de la superficie de contacto

Las superficies en contacto con los alimentos deben ser inocuas y no absorbentes, no porosas y no corrosivas. De los varios materiales utilizados, el acero inoxidable es el que más conviene para las superficies que entran en contacto con los alimentos.

El acero inoxidable no es un metal simple sino un grupo de aleaciones de hierro, cromo, níquel, carbono, molibdeno, titanio, silicio, fósforo, manganeso y azufre, en diferentes proporciones.

El acero inoxidable es resistente a la corrosión aunque no está totalmente exento a sus efectos. En su superficie se forma una película de óxido de cromo autopreservante. Si se destruye esta película, por ejemplo, cuando se limpia la superficie, la película se forma por simple contacto con el aire. Si se utiliza en la limpieza un material abrasivo, la superficie quedará rayada lo que facilita así la corrosión. El empleo de productos químicos cáusticos produce picado de la superficie; en ambos casos la limpieza y la sanitización del equipo resultan difíciles (Vera, 2001).

En la industria alimentaria una composición del acero inoxidable muy utilizada es la que contiene del 14% al 18% de cromo y del 7% al 9% de níquel.

Los numerosos ensayos de contaminación metálica de productos orgánicos o de alimentos realizados con aceros inoxidables muestran que este tipo de aceros son difícilmente atacables.

Un aspecto importante para tomar en cuenta es el pulido del material o superficie a tratar ya que es indispensable para conseguir una buena resistencia a la corrosión y facilidad de limpieza.

No existe alguna aleación de acero inoxidable que resista todos los ataques corrosivos, de tal forma que dependiendo del tipo de acero de los equipos se facilitará un tipo u otro de corrosión.

Se pueden distinguir diversos tipos de corrosión que pueden afectar al acero inoxidable: corrosión general, intergranular, galvánica, por fisuras bajo presiones mecánicas y corrosión “por picaduras”. En esta última, la formación de cráteres localizados en algunos puntos resulta favorecida por suciedades o depósitos minerales adheridos a la superficie metálica y por acción del cloro, oxígeno, iones cloruro e iones hidrógeno. Por lo tanto se debe evitar el contacto prolongado (más de media hora) con soluciones que contengan más de 200mg de cloro residual por litro, ácido clorhídrico y con soluciones ácidas o alcalinas de cloruros de sodio o calcio. Los aceros inoxidables resisten bien la sosa y los detergentes alcalinos, lo que unido al pulido de su superficie permite un buen mantenimiento y ayuda a luchar contra la corrosión (Vera, 2001).

Investigaciones recientes sobre métodos de saneamiento de diferentes microorganismos patógenos entre ellos *L. monocytogenes* y *Ps. Aeruginosa*, demuestran la importancia de los fenómenos de adhesión a las superficies y la formación de biopelículas que pueden proporcionar un alto grado de protección frente a la mayoría de los sanitizantes químicos habitualmente empleados. Este fenómeno, se debe a la existencia de capas superficiales de bacterias que actúan como barreras de protección o bien a la síntesis de sustancias en el exterior que neutralizan la sustancia desinfectante o sanitizante. La eliminación de estas colonias adheridas a superficies lisas y pulidas puede realizarse mediante una limpieza profunda y la sanitización posterior destruirá a los gérmenes residuales. En cambio, las superficies rugosas, agrietadas u oxidadas, ofrecen un ambiente óptimo para la formación de estas biopelículas que serán prácticamente imposibles de eliminar (Puig-Durán, 2002 y Charalambia *et al.*, 2010).

2. METODOLOGIA

2.1 . OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar, mediante un análisis microbiológico, la capacidad de un sanitizante comercial a base de cítricos para remover biopelículas y/o reducir la carga microbiana en equipos de acero inoxidable en la elaboración de embutidos en un taller de cárnicos.

Objetivo particular 1.

Determinar “in vitro” la concentración mínima inhibitoria del sanitizante cítrico frente a una concentración conocida de la bacteria formadora de biopelícula.

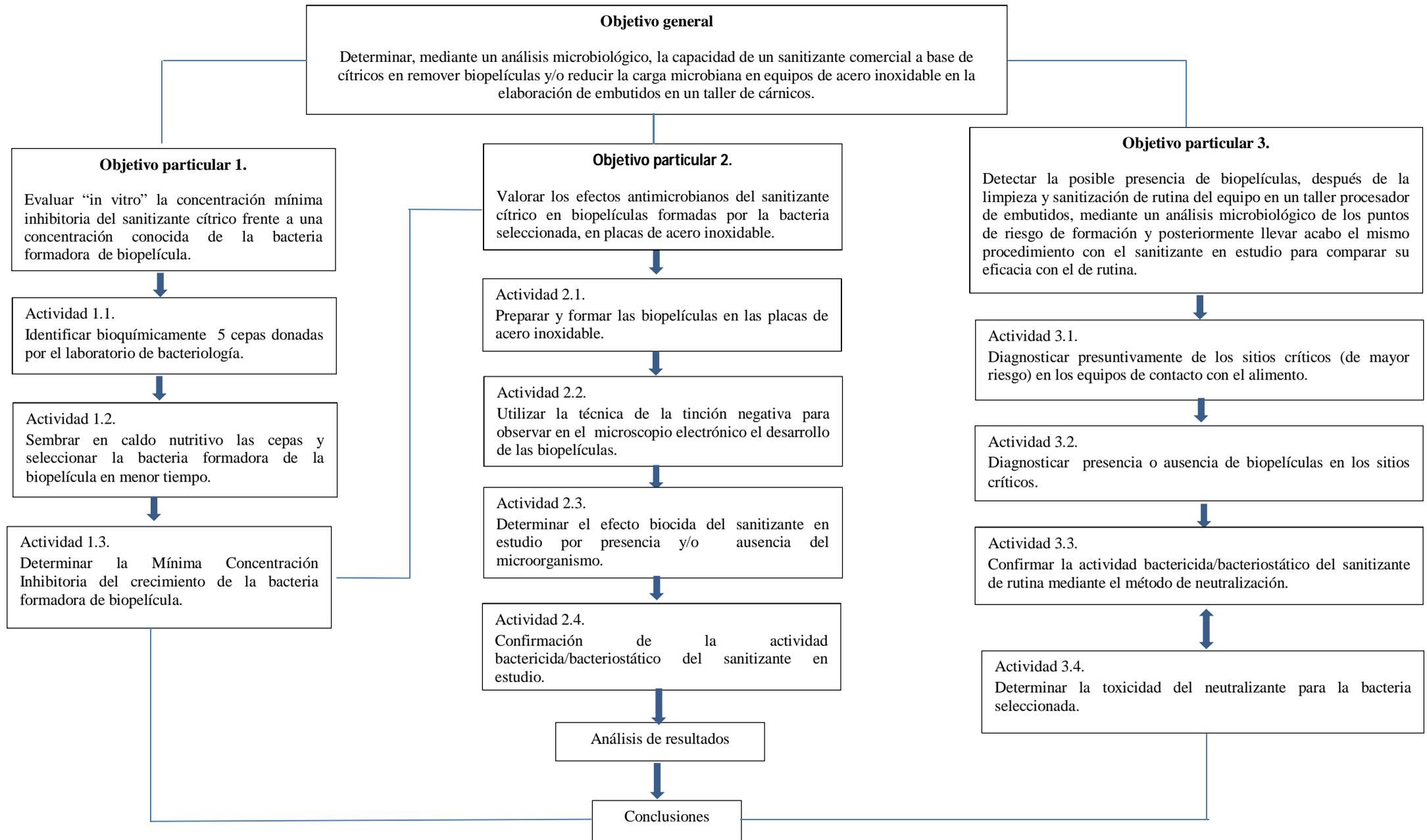
Objetivo particular 2.

Valorar los efectos antimicrobianos del sanitizante cítrico en biopelículas formadas por la bacteria seleccionada, en placas de acero inoxidable.

Objetivo particular 3.

Detectar la posible presencia de biopelículas, después de la limpieza y sanitización de rutina del equipo en un taller procesador de embutidos, mediante un análisis microbiológico de los puntos de riesgo de formación y posteriormente llevar acabo el mismo procedimiento con el sanitizante en estudio para comparar su eficacia con el de rutina.

2.2. Cuadro metodológico



2.3.MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Origen del material biológico

Las 5 cepas fueron suministradas por los Laboratorios de Bacteriología de la Unidad de Posgrado de la Fes Cuautitlán.

- ④ Escherichia coli 1 (Laboratorio de Bacteriología 1).
- ④ Escherichia coli 2 (Laboratorio de Licenciatura 1).
- ④ Escherichia coli 3 (Laboratorio de Licenciatura 2).
- ④ Escherichia coli 4 (Laboratorio de Licenciatura 3).
- ④ Klebsiella spp. (Laboratorio de Bacteriología 5).

2.3.2. Selección de la bacteria formadora de la biopelícula

2.3.3. Identificación de 5 cepas de diferentes microorganismos

Las cepas se reactivaron en Agar de Soya Tripticasa (TSA) e incubaron a 37°C/24-72 horas. Posteriormente se realizó la identificación de cada cepa para seleccionar la formadora de la biopelícula mediante las siguientes pruebas bioquímicas según Cowan y Steel's (1985) (ver anexo 2):

- | | |
|----------------------------------|---|
| ⊖ Citrato | ⊖ Catalasa |
| ⊖ Malonato | ⊖ Oxidasa |
| ⊖ Urea | ⊖ Prueba de Oxidación-
Fermentación (OF) |
| ⊖ Movilidad-Indol-Ornitina (SIM) | |
| ⊖ Lisina de aminosas (LIA) | |
| ⊖ Rojo de metilo (MR) | |
| ⊖ Vogues-Proskauer (VP) | |

Una vez que se identificaron las 5 cepas, se inoculó una colonia de cada microorganismo en 4.5mL del caldo nutritivo Infusión Cerebro Corazón por sus siglas en inglés (BHI) y se incubaron con agitación (37°C/40rpm); el mismo procedimiento se realizó sin agitación a temperatura ambiente. De cada tubo se tomó 1mL de suspensión cada 24 horas para la resiembra durante 5 días para fomentar la formación de la biopelícula y seleccionar aquella cepa que formara un anillo denso adherido al vidrio en menor tiempo de resiembra.

2.3.4. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria

Procedimiento

- a) Una vez que se seleccionó el microorganismo se inocularon 16 colonias en 10mL de solución salina fisiológica (SSF) estéril como, se realizaron las diluciones decimales hasta 10^{-6} y cada una de ellas se homogeneizó durante 2 minutos empleando un vortex®; y se sembraron por el método de gota (Miles y Misra 1938) en agar Mac Conkey para lo cual

se dividió la caja con el agar en cuatro cuadrantes y se sembraron 20µL en cada uno incubando a 37°C/24-48 horas y posteriormente se realizó la lectura como se muestra en la figura 4.

- b) El sanitizante en estudio a evaluar se probó a diferentes concentraciones: 100, 200, 300, 400, 800 y 1400ppm en agua destilada estéril en base a las especificaciones del proveedor (ver anexo 1).
- c) Se adicionó 1mL (1000µL) de cada dilución de la bacteria a 4.5mL del santizante en las concentraciones mencionadas anteriormente y se dejaron en contacto durante 15 y 30 minutos, pasado el tiempo se tomó 1mL de la mezcla y se inoculó en 4.5mL de caldo BHI y se incubó a 37°C/24-48 horas. La lectura se realizó por la presencia o ausencia de turbidez, lo cual indicó la sensibilidad o resistencia del microorganismo a cada concentración del sanitizante cítrico y se confirmó la inhibición sembrando la mezcla en agar Mac Conkey 37°C/24-48 horas.

2.3.5. Preparación de las superficies de acero inoxidable

1. Se utilizaron 70 placas de acero inoxidable de acabado 304, calibre 20, acabado P3 y pulido Gritt 120 (rugosidad), se sumergieron en alcohol en cajas de petri estériles, durante 3 horas para eliminar residuos del proceso de fabricación y presencia de grasa como se muestra en la figura 5.
2. Se lavaron con detergente.
3. Se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar al aire libre.
4. Se colocó cada placa en tubos de ensayo y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

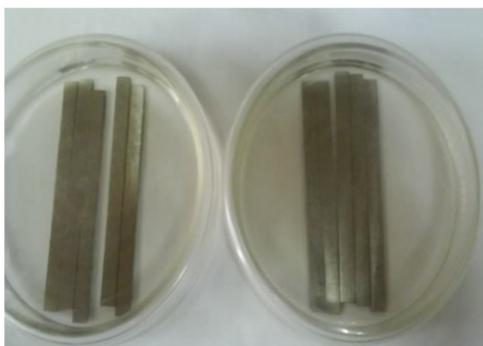


Figura 5. Placas de acero inoxidable estériles

2.3.6. Actividad biocida del sanitizante en estudio en las placas de acero inoxidable

2.3.6.1. Formación de la biopelícula en las placas de acero inoxidable

Para realizar esta actividad se utilizaron 69 placas de acero inoxidable estériles. Cada placa se colocó con su respectivo tubo que contenía 4.5mL de caldo BHI y a cada una se le inoculó 1mL de un cultivo de 24 horas/37°C de incubación de la bacteria seleccionada para formar biopelículas de 6, 12, 24, 72 y 120 horas de edad.

Una vez que se formaron las biopelículas en las placas para cada una de las edades que se mencionan anteriormente se procedió a mantenerlas en contacto con el sanitizante cítrico a evaluar durante 15 minutos y se probaron a diferentes rangos de concentraciones de acuerdo a la edad de la biopelícula (>edad>concentración) como se muestra en tabla 8, con el fin de encontrar la concentración mínima del biocida que eliminara el microorganismo de prueba. La experimentación se realizó por triplicado para cada concentración.

2.3.6.2. Detección de estructuras que forman biopelículas

Se observaron las estructuras de las biopelículas de 6, 12 y 120 horas de edad mediante la técnica de tinción negativa (González, 2003) que constituye la principal metodología para un rápido diagnóstico de muestras biológicas.

Procedimiento.

- a) Preparación de las muestras de origen biológico.

Para eliminar cualquier residuo proteico las muestras se lavaron con solución salina fisiológica, y posteriormente fueron fijadas con glutaraldehído al 1%.

- b) Preparación de las rejillas con membrana fomvar

1. Las rejillas se lavaron con acetona y secaron previamente. Como se aprecia en la figura 6.

Tabla 8. Edades de las biopelículas evaluadas a diferentes concentraciones de sanitizante problema

Edad biopelícula	Concentración sanitizante en estudio ppm
6 horas	400
	500
	600
	800
	1400
12 horas	1400
	2000
	2500
	3000
24 horas	2500
	2800
	3000
	4000
3 días	2500
	2800
	3000
	4000
	5000
5 días	2800
	3000
	4000
	5000
	5500



Figura 6. Preparación de membranas plásticas

c) Tinción negativa

Una gota de suspensión bacteriana se depositó sobre un papel parafilm, y se colocó en 2 rejillas con membrana con el fin de adsorber la muestra durante un tiempo de 30 minutos; posteriormente se tomaron las rejillas y el exceso se absorbió con papel filtro. Enseguida fueron teñidos con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un periodo de 30 minutos; se recogieron las rejillas, se secaron a temperatura ambiente y se absorbió el exceso de colorante como se observa en la figura 7. Se observaron y fotografiaron las muestras en el microscopio de transmisión. Este procedimiento se realizó en cada edad mencionada anteriormente.

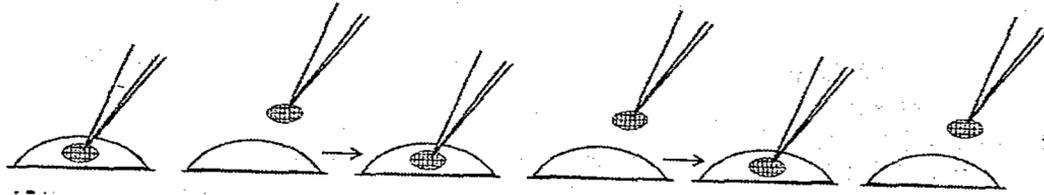


Figura 7. Técnica de tinción negativa

2.3.7. Determinación del efecto biocida del sanitizante

1. Una vez que se formaron las biopelículas en 3 placas de acero inoxidable, se retiraron en ambiente estéril y se colocó cada placa en 20mL de agua destilada estéril como se muestra en la figura 8. Se agitó suavemente la placa para eliminar las células que estuvieran libres.

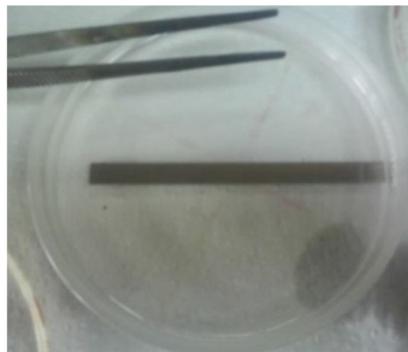


Figura 8. Lavado de la placa de acero inoxidable con biopelícula

2. Se tomó cuidadosamente cada placa de acero inoxidable y se puso la primera en contacto durante 15 minutos en 20mL de sanitizante cítrico en cajas Petri estériles como se observa en la figura 9. Este proceso se repitió para las otras dos placas se mantuvieron en contacto 30 y 60 minutos respectivamente.

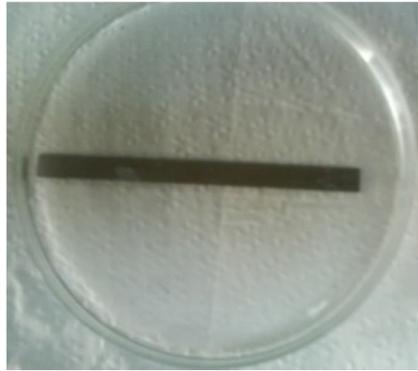
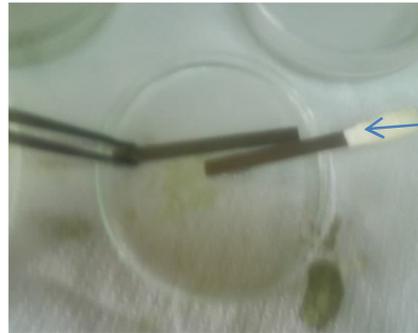


Figura 9. Placa con biopelícula en contacto con sanitizante problema

3. Posteriormente se retiró cada placa y se rasparon con espátulas de acero inoxidable, para retirar la biopelícula como se observa en la figura 10.



Espátula de
acero inoxidable

Figura 10. Raspado mediante la técnica de frotación

4. Posteriormente la placa donde se formó la biopelícula, la espátula y el agua de lavado, se transfirieron a 4.5mL caldo BHI y se incubaron a 37°C/24-48 horas, para reactivar los microorganismos que pudieran haber sobrevivido. Se confirmó la viabilidad de los microorganismos sembrándolos en Agar Mac Conkey como se observa en la figura 11, se incubaron a 37°C/24-48 horas.



Figura 11. Viabilidad del microorganismo en agar Mac Conkey

2.3.8. Confirmación de la actividad bactericida/bacteriostático del sanitizante en estudio

Se llevo a cabo mediante la neutralización del sanitizante con NaOH al 5%. Según Wildbrett (2000) un biocida ácido se neutraliza con un álcali. El evento se realizó por triplicado.

Procedimiento

- 1) Se seleccionó la concentración del sanitizante a la que se inhibió o eliminó cada una de las biopelículas (6, 12, 24, 72 y 120 horas).
- 2) Previamente se neutralizó el sanitizante en estudio que presentó un pH inicial de 2.5 llevando la mezcla a pH 7.0 con NaOH al 5% y se determinó la cantidad de gotas de álcali para neutralizar cada una de las concentraciones que fueron seleccionadas anteriormente.
- 3) Se realizó la formación de las biopelículas en las placas de acero inoxidable siguiendo el mismo procedimiento del apartado 2.3.6.1 y 2.3.7 se pusieron en contacto las respectivas edades de las biopelículas para cada concentración seleccionada durante 15 minutos y posteriormente se agregó la cantidad de álcali para cada concentración y se dejó actuar durante 15 minutos.
- 4) Posteriormente se sembró cada muestra en agar TSA y se incubó a 37°C/24-48 horas y la lectura se realizó por presencia o ausencia del microorganismo.

2.3.9. Detección de biopelículas en un taller de cárnicos

El estudio se realizó en las instalaciones del taller de cárnicos, ubicado en Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, el cual está dividido en dos áreas (sacrificio y proceso de embutidos) mismos que son independientes. La comparación del sanitizante en estudio con el de uso cotidiano en el taller se llevó a cabo en el área de proceso de embutidos (lugar que no cuenta con la esterilidad para evitar el desarrollo de microorganismos del ambiente), donde se realizan diversos productos como: salchicha, chorizo, jamón, hamburguesa y paté. Los equipos que se utilizan en la elaboración de estos embutidos son: masajeadora, embutidora, rebanadora de carne, molino de carne y mesas de trabajo fueron estos equipos donde se llevó a cabo el diagnóstico presuntivo de los sitios críticos (mayor riesgo).

El taller de cárnicos es un lugar donde el proceso no se realiza de manera continua, debido a que presenta poco volumen de materia prima, por lo que el muestreo se realizó de acuerdo a su calendario de proceso. El sanitizante de rutina se utilizó conforme a su metodología de higienización del taller, (ver Anexo 3).

Se tomaron las muestras antes y después de la limpieza y sanitización de rutina en los puntos señalados en la figuras 12, 13, 14, 15 y 16; los puntos de muestreo se eligieron teniendo en cuenta su ubicación, desgaste y por el nivel de riesgo microbiológico del equipo. En cada una de las superficies se muestrearon con hisopos de algodón, al azar 3 áreas de 15cm², el muestreo se realizó en superficies planas por la técnica de “zig-zag”, en áreas cilíndricas en forma “circular”, el medio de transporte fue una solución salina fisiológica y simultáneamente se tomaron muestras al ambiente exponiendo el agar BHI durante 15 minutos cerca puntos críticos. Las muestras se llevaron al laboratorio de bacteriología en hielera.

Posteriormente en el laboratorio se cultivó 1mL de cada muestra (antes y después) en caldo BHI y se incubaron a 37°C/24 horas. La detección se realizó por ausencia o presencia de microorganismos. Los resultados obtenidos del caldo BHI se confirmaron sembrándolos en agar Mac Conkey y TSA se incubaron a 37°C/24-48 horas.



Figura 12. Mesa de trabajo

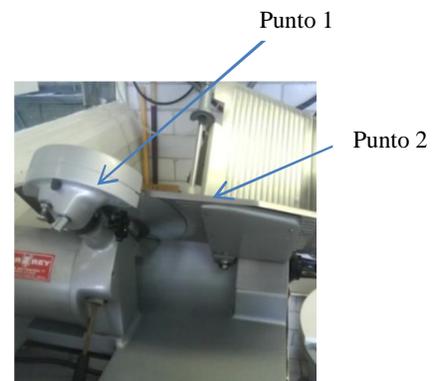


Figura 13. Rebanadora



Figura 14. Tablas Naylamid



Figura 15. Embutidora



Figura 16. Molino

2.3.10. Diagnóstico de presencia o ausencia de biopelículas y su sensibilidad al sanitizante en estudio y el de rutina

Una vez que se seleccionaron los sitios en los equipos por su nivel de contaminación y difícil acceso a la limpieza (molino y mesa de trabajo), se procedió a tomar muestras una vez a la semana durante un mes por frotación con hisopo en 3 puntos distintos ver figura (17 y 18), antes y después de la limpieza y de la sanitización de rutina del taller con ambos sanitizantes. Se trasladaron las muestras al laboratorio de bacteriología donde se realizó la cuantificación mediante diluciones decimales.



Figura 17. Puntos de muestreo
Mesa de trabajo



Figura 18. Puntos de muestreo
Molino

A partir de la dilución inicial 1:10 de la muestra, se realizaron las diluciones decimales ver figura 19.

Procedimiento:

1. Se distribuyó 4.5mL del diluyente (SSF) en tubos de ensayo y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.
2. Se transfirió 1mL de la dilución inicial 1:10 (muestreo de sitios críticos) al tubo que contenía volumen 4.5mL de diluyente.
3. Se agitó durante 30 segundos.
4. Se obtuvo una dilución 1:100.
5. De la mezcla anterior, se incorporó 1mL a otro tubo que contenía 4.5mL de solución salina fisiológica (SSF).
6. Se mezcló con el mismo procedimiento mencionado en el punto anterior.
7. La dilución que resultó de 1:1000 y así sucesivamente se obtuvieron las siguientes diluciones hasta 10^{-6} .
8. Se sembraron 20μL en agar cuenta estándar para el análisis microbiológico, se incubó 37°/24-48 horas.
9. El estudio se realizó por triplicado.

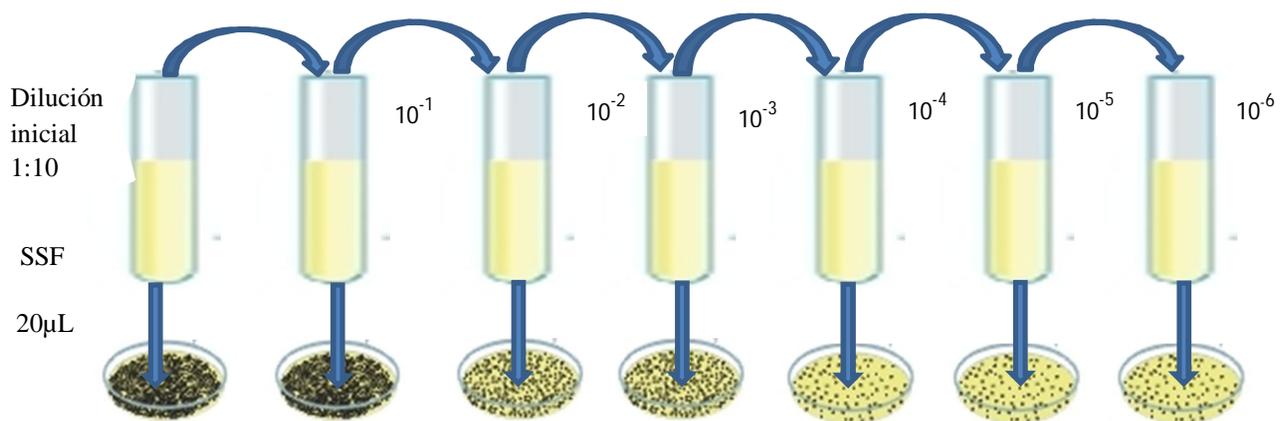


Figura 19. Diluciones para determinar el número de microorganismos por unidad de volumen.

2.3.11. Confirmación del efecto bactericida/bacteriostático del sanitizante en estudio y de rutina

2.3.12. Neutralización del sanitizante de rutina

El objetivo principal de este ensayo fue determinar las células capaces de sobrevivir después de la exposición al agente antimicrobiano. Varios neutralizantes y medios de cultivo han sido formulados para este fin, de los más conocidos se usó el caldo Letheen se siguieron las especificaciones que se enlistan en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999, métodos generales de

análisis como la determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas (Ver anexo 4).

2.3.13. Toxicidad del neutralizante para la bacteria (*Klebsiella spp.*)

Diversos inhibidores químicos de antimicrobianos son tóxicos por sí mismos. Por lo que se determinó si el neutralizante caldo letheen tenía efectos tóxicos. Este factor se estimó como una comparación entre dos poblaciones de microorganismos: una expuesta al bactericida y otra al neutralizante.

Procedimiento

1. Se adicionó 1mL de bacteria seleccionada de biopelícula de edad de 3 días (*Klebsiella spp.*) en 9mL de sanitizante de rutina diluido en agua destilada y se dejó en contacto durante 15 minutos y posteriormente se sembró en agar cuenta estándar y se incubó a 37°C/24-48 horas.
2. De la misma manera se adicionó 1mL de bacteria en 9mL de neutralizante caldo letheen se mantuvo en contacto durante 15 minutos y posteriormente se sembró en agar cuenta estándar y se incubó a 37°C/24-48 horas.
3. Se confirmó la toxicidad del neutralizante por ausencia del microorganismo en el medio de cultivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Material biológico

Las cepas donadas por el laboratorio de bacteriología fueron confirmadas por pruebas bioquímicas como: 4 *Escherichia coli* y 1 como *Klebsiella spp.* como se muestran en la tabla 9 y anexo 2.

Tabla 9. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas

Cepas	Prueba	Resultado	Identificación	Cepas	Prueba	Resultado	Identificación
1	Citrato Malonato Urea SIM LYA RM VP Catalasa Oxidasa OF	Negativo Negativo Negativo Positivo Positivo Positivo Negativo Positivo Negativo Positivo	<i>Escherichia coli</i>	4	Citrato Malonato Urea SIM LYA RM VP Catalasa Oxidasa OF	Negativo Negativo Negativo Positivo Positivo Positivo Negativo Positivo Negativo Positivo	<i>Escherichia coli</i>
2	Citrato Malonato Urea SIM LYA RM VP Catalasa Oxidasa OF	Negativo Negativo Negativo Positivo Positivo Positivo Negativo Positivo Negativo Positivo	<i>Escherichia coli</i>	5	Citrato Malonato Urea SIM LYA RM VP Catalasa Oxidasa OF	Negativo Positivo Negativo Positivo Negativo (inmóvil) Negativo Negativo Positivo Positivo Negativo Positivo	<i>Klebsiella spp.</i>
3	Citrato Malonato Urea SIM LYA RM VP Catalasa Oxidasa OF	Negativo Negativo Negativo Positivo Positivo Positivo Negativo Positivo Negativo Positivo	<i>Escherichia coli</i>	RM: Rojo de metilo. VP: Voges-Proskauer. SIM: Movilidad-indol-ornitina. OF: Prueba de oxidación-fermentación. LIA: Lisina de aminosas.			

3.2. Selección de la bacteria para la formación de la biopelícula

La selección dependió del espesor del anillo de la biopelícula formada en el tubo de vidrio en el menor tiempo, este parámetro se consideró de gran importancia porque a mayor espesor de biopelícula, mayor cantidad de microorganismos y mejor fijación (Zottola, 1994).

En la figura 20 se observa en el caldo BHI la evolución del crecimiento de las cinco cepas a temperatura ambiente; del primer al tercer día se apreciaron diferencias en el crecimiento en cada una de las cepas estudiadas se observó turbidez en el medio. En el quinto día, el anillo que mejor se formó y en menor tiempo fue con la *Klebsiella spp.* debido a esto se seleccionó como cepa de estudio en la formación de la biopelícula en las placas de acero inoxidable.

Algunos autores han demostrado que la producción de polisacáridos de las bacterias Gram negativas se inicia a las 5-6 horas tras su adhesión a la superficie (Fuster, 2006). Esta característica concuerda con los resultados obtenidos puesto que la secreción de exopolisacáridos de las 5 cepas aumentó a medida que el anillo se formó hasta evolucionar hacia una biopelícula madura. En las cinco cepas estudiadas se observó la formación inicial de la biopelícula a las 24 horas.

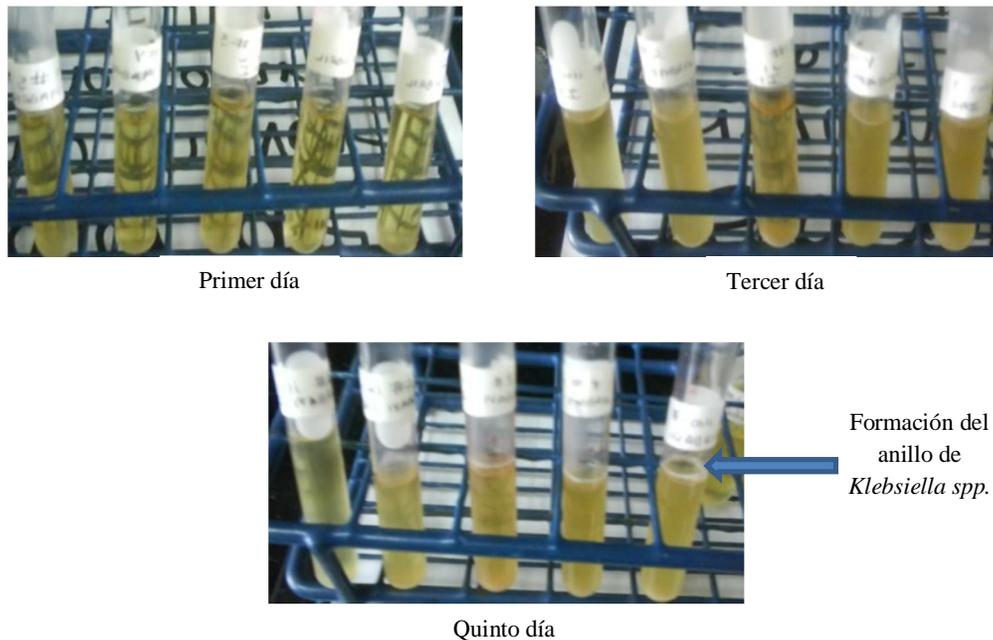


Figura 20. Evolución de la formación del anillo de la biopelícula en el tubo de vidrio

Las enterobacterias se han descrito en la bibliografía como microorganismos capaces de formar biopelículas con bastante facilidad (Puig-Duran, 2002 y Moreno, 2006). Los resultados obtenidos muestran que los microorganismos patógenos u oportunistas como *Klebsiella spp.* pueden

desarrollarse y multiplicarse en las superficies no vivas de manera irreversible por medio de fimbrias (son estructuras más cortas que los flagelos y mas abundantes, les permite a los organismos adherirse a superficies inertes) y glicocalix (material extracelular de naturaleza polisacárida o proteica producida por las bacterias), estructuras que se observan en la figura 21 por microscopia electrónica a 10,000 aumentos; también se observaron los flagelos de *Escheherichia coli*, que le proporcionan movilidad y sus escasas fimbrias las cuales no favorecieron la formación de la biopelícula.

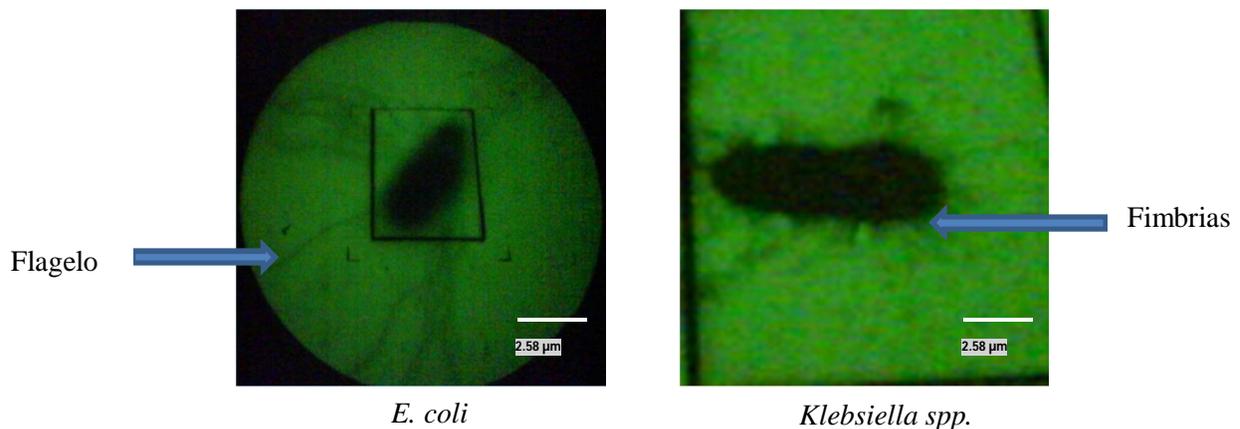


Figura 21. Forma de adherirse los microorganismos a superficies no vivas.

3.3. Mínima concentración inhibitoria de *Klebsiella spp.*

Los ensayos se realizaron de manera cualitativa es decir presencia o ausencia de microorganismos supervivientes y de manera cuantitativa mediante un recuento del número de microorganismos supervivientes como se muestran en la tabla número 10.

Tabla 10. Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la *Klebsiella spp.* frente al sanitizante cítrico

Concentración del sanitizante cítrico ppm	Crecimiento cualitativo		Crecimiento cuantitativo \bar{x} de 3 repeticiones (log)	
	15 minutos	30 minutos	15 minutos	30 minutos
200	Presencia	Ausencia	3.348	0.00
300	Presencia	Ausencia	2.990	0.00
400	Ausencia	Ausencia	0.00	0.00
600	Ausencia	Ausencia	0.00	0.00
800	Ausencia	Ausencia	0.00	0.00

Se usó caldo BHI para determinar el MCI cualitativo por sus propiedades nutritivas en las que el microorganismo podía reactivarse después del estrés por contacto con el sanitizante. Se determinó su crecimiento mediante la aparición o ausencia de la turbidez del medio, aquellos tubos que presentaron crecimiento negativo (ausencia) indicaron la dilución a la cual el agente cítrico inhibió al microorganismo prueba y se confirmó sembrándolos en Agar Mac Conkey.

Para complementar los resultados de esta técnica se aislaron e identificaron los tubos con crecimiento positivo con el fin de confirmar que el crecimiento perteneciera al microorganismo en estudio, y descartar posibles contaminaciones que pudieran alterar los resultados.

La determinación cuantitativa del MCI se muestran en la tabla 10 siendo las concentraciones mínimas de 200 y 300ppm de sanitizante cítrico las que demostraron la resistencia de la *Klebsiella spp*, después de la exposición del sanitizante; según Holah (1998), los microorganismos resistentes son aquellos que sobreviven al proceso de sanitización, representan una amenaza para la industria y el consumidor. La resistencia puede evitarse con la limpieza y sanitización rigurosa, aumentando concentraciones y/o tiempo de contacto del sanitizante (Meyer, 2006). Como se puede ver en la tabla 10 al aumentar las dosis de sanitizante y tiempo (30 minutos) no se obtuvo crecimiento en agar Mac Conkey por lo tanto la *Klebsiella spp*. fue sensible a tales concentraciones.

Según la normalización europea (CEN/TC 216) (Reinhard, 1998 y Fuster, 2006) un biocida es eficaz si consigue reducir 5 unidades logarítmicas. En este estudio el sanitizante logró reducir 6 ciclos a 800ppm/15 minutos o 200-300ppm/30 minutos lo que indicó la eficacia del sanitizante en estudio, superando la norma europea.

3.4. Evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante problema frente a *Klebsiella spp*. en placas de acero inoxidable

3.4.1. Etapas del ciclo de desarrollo de las biopelículas

Recientemente se revisó el tema acerca de la adherencia de los microorganismos a la superficie de acero inoxidable, este mecanismo se lleva a cabo con la ayuda de filamentos (fimbrias) y el glicocalix (Marriott, 2003). En estudios realizados por (Charalambia *et al.*, 2010), sobre la formación de biopelículas en diferentes superficies encontró que el acero inoxidable fue el mejor para que se adhiran los microorganismos. La presencia de restos de alimentos y de imperfecciones en las superficies sirve de cavidades que atraen e integran las células microbianas, esto se observó en las placas de acero inoxidable con las que se realizó este trabajo.

A continuación se presentan las fotografías de microscopio electrónico a 10,000 aumentos en diferentes etapas del ciclo de desarrollo de la biopelícula de *Klebsiella spp*.

Ⓢ Célula bacteriana (*Klebsiella spp.*) libre (figura 22)

La *Klebsiella spp.* presentó estructuras como: fimbria y cápsula características que le permitieron la adhesión para la formación de biopelícula en las placas de acero inoxidable. Según Puig-Duran (2002) la biopelícula bacteriana se forma o inicia su formación cuando alguna célula individual se adhiere a superficies de acero inoxidable y esta capacidad de adhesión del microorganismo depende de factores físicos, biológicos y ambientales. La adhesión inicial a una superficie está influida por energía libre superficial y de proximidad de las células bacterianas.

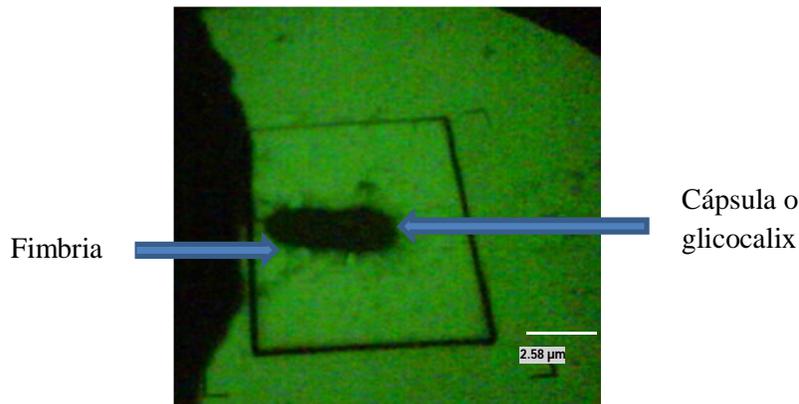


Figura 22. Célula individual

Ⓢ Colonización bacteriana (figura 23)

En una biopelícula de 12 horas de edad se observó que la *Klebsiella spp.* como se adhirió e inició su división celular, colonizó la superficie y proporcionó una “película de enlace”. Según Moreno (2006) la adherencia en esta fase inicial es reversible y está asociada con una interacción compleja entre cargas y la hidrofobicidad de las células.

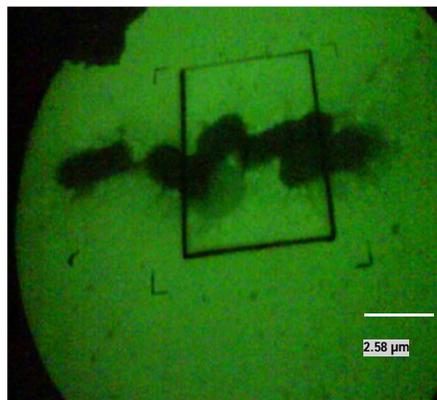


Figura 23. Colonización

Ⓢ Adsorción (figura 24)

Como se mencionó la *Klebsiella spp.* tiene la capacidad de formar polisacáridos y adherir más bacterias como se observa en la figura. Según Sánchez (2003) es una fase irreversible donde las células adheridas producen polisacáridos extracelulares que estabilizan las colonias y protegen a las bacterias de las fluctuaciones del medio circundante.



Figura 24. Adsorción

Ⓢ Maduración de la biopelícula (figura 25)

Se observa en la figura una biopelícula madura de 5 días de edad, formando capas para su crecimiento y según Fuster (2006) si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente de la biopelícula, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración. Una biopelícula madura puede consistir en una simple capa de células en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o en estructuras por sustancias poliméricas extracelulares.



Figura 25. Crecimiento y maduración

3.4.2. Eficacia del efecto biocida del sanitizante en estudio a diferentes concentraciones y edades de las biopelículas

En la biopelícula de 6 horas de contacto con el sanitizante, no fue suficiente la concentración de 500ppm y 15 minutos ya que hubo crecimiento del microorganismo en las placas de agar Mac Conkey. Sin embargo, cuando se repitió el evento con la misma concentración pero aumentando el tiempo a 30 y 60 minutos hubo ausencia de microorganismos en agar Mac Conkey, para confirmar la inhibición se comprobó neutralizando el sanitizante (ver tabla 11).

Para las biopelícula de 12 y 24 horas de edad hubo supervivencia de la *Klebsiella spp.* en la superficie de acero inoxidable a 2500ppm de sanitizante pero al aumentar el tiempo de contacto (30 y 60 minutos) a la misma concentración hay ausencia de microorganismos en agar Mac Conkey y se confirmó su inhibición al neutralizar el sanitizante.

En las biopelículas de 72 y 120 horas de edad, se observó que a concentraciones de 2800 y 3000ppm de sanitizante respectivamente hay crecimiento de la *Klebsiella spp.* en un tiempo de acción de 30 minutos lo que indica que son biopelículas maduras que requieren mayor tiempo de contacto con el antimicrobiano.

En la tabla 12 se muestran los rangos de concentraciones máximas (600-2800ppm) donde el sanitiznte de estudio actuó como bactericida en las biopelículas de 6, 12 y 24 horas de edad. Esto se comprobó con la neutralización del sanitizante. Sin embargo, en las edades de 72 y 120 horas el antimicrobiano actuó como bacteriostático, ya que después de la neutralización hubo supervivencia de los microorganismos. Así como se observó que en el estudio del MIC fue importante el tiempo de contacto y concentración del sanitizante con cada edad de la biopelícula, a mayor concentración y tiempo, mayor eficacia del sanitizante, según Fuster (2006) al aumentar el tiempo de contacto, aumenta la tasa de mortalidad. El tiempo de contacto es uno de los factores críticos para asegurar la sanitización. Por lo general, para determinar la letalidad bacteriana a los sanitizantes el tiempo que se utilizó fue de 15 a 30 minutos.

Tabla 11. Rango de concentraciones mínimas a diferentes edades de las biopelículas

Edad de la biopelícula/ horas	Tiempo de contacto/minutos	Concentración mínima del sanitizante problema/ppm	Presencia/Ausencia del microorganismo en estudio	Sanitizante Neutralizado
6	15	500	Presencia	Presencia
	30	500	Ausencia	Ausencia
	60	500	Ausencia	Ausencia
12	15	2500	Presencia	Presencia
	30	2500	Ausencia	Ausencia
	60	2500	Ausencia	Ausencia
24	15	2500	Presencia	Presencia
	30	2500	Ausencia	Ausencia
	60	2500	Ausencia	Ausencia
72	15	2800	Presencia	Presencia
	30	2800	Presencia	Presencia
	60	2800	Ausencia	Ausencia
120	15	3000	Presencia	Presencia
	30	3000	Presencia	Presencia
	60	3000	Ausencia	Ausencia

Tabla 12. Rango de concentraciones máximas a diferentes edades de las biopelículas

Edad de la biopelícula/ horas	Tiempo de contacto/minutos	Concentración máxima del sanitizante problema/ppm	Presencia/Ausencia del microorganismo en estudio	Sanitizante Neutralizado
6	15	600	Ausencia	Ausencia
	30	600	Ausencia	Ausencia
	60	600	Ausencia	Ausencia
12	15	2800	Ausencia	Ausencia
	30	2800	Ausencia	Ausencia
	60	2800	Ausencia	Ausencia
24	15	2800	Ausencia	Ausencia
	30	2800	Ausencia	Ausencia
	60	2800	Ausencia	Ausencia
72	15	3000	Ausencia	Presencia
	30	3000	Ausencia	Ausencia
	60	3000	Ausencia	Ausencia
120	15	4000	Ausencia	Presencia
	30	4000	Ausencia	Ausencia
	60	4000	Ausencia	Ausencia

En general los resultados que se obtuvieron son similares a los de otros autores quienes han demostrado que la edad de la biopelícula afecta la eficacia del sanitizante y aumenta la dificultad de su eliminación. Para las biopelículas de 24, 72 y 120 horas, teóricamente (Hood y Zottola, 1995) ya son biopelículas maduras, que por lo general es necesario romper o desestabilizar el glicocalix con el fin de hacer accesible el biocida a los microorganismos. Como se observa en los resultados se utilizaron altas concentraciones de sanitizante y tiempos de actuación de 1 hora para obtener ausencia de microorganismos. Sin embargo, durante la neutralización se pudo observar presencia de microorganismos a estas edades de biopelículas, es decir las bacterias establecidas en una biopelícula, no se pudieron erradicar mediante un tratamiento único como en este caso. Otros investigadores (Holah J. T. *et al.*, 1998) informan que la limpieza mecánica es un método eficaz para la eliminación de biopelícula, pero podría tratarse de una tarea ardua, en su lugar se recomienda la rotación de sanitizantes.

Este estudio no se realizó de manera cuantitativa porque a medida que la biopelícula madura los microorganismos regeneran continuamente células maduras por jóvenes. Esta razón hace inviable el recuento. Estudios hechos por Surman *et al.* (1996) mencionan que las biopelículas son tan heterogéneas que pueden causar problemas en la visualización al microscopio ya que las bacterias que están debajo de la capa superior no pueden ser observadas o cuantificadas.

3.5. Eficacia del sanitizante en estudio y el de rutina; antes y después de la limpieza y sanitización en el equipo de acero inoxidable en un taller de cárnicos

3.5.1. Sitios críticos en equipos de acero inoxidable

En la tabla 13 se observan los equipos en donde hubo mayor contaminación microbiana fueron: el molino y la mesa de trabajo los cuales mostraron irregularidades como rayas y huecos; estos fueron seleccionados como sitios críticos para evaluar la eficacia del sanitizante en estudio comparada con el de rutina. Varios autores coinciden en que la principal limitación de la limpieza reside en los problemas de acceso a zonas con ranuras, grietas, puntos ciegos, manchas de corrosión, etc. estas irregularidades de las superficies permiten el alojamiento de microorganismos y de materia orgánica (Leveau, 2002).

Sin embargo, la contaminación de los equipos del taller de cárnicos se vio afectada por el entorno, lo cual permitió la contaminación en los mismos, como se muestran en la tabla 13 los resultados cualitativos positivos.

Tabla 13. Ausencia/presencia de microorganismos en el equipo de acero inoxidable del taller de cárnicos

Equipo	Crecimiento en caldo BHI	Crecimiento Agar Mc Conkey	Crecimiento en TSA
Rebanadora	Ausencia	Negativo	Negativo
Molino	Presencia	Positivo	Positivo
Embutidora	Ausencia	Negativo	Negativo
Mesa	Presencia	Positivo	Positivo
Tablas naylamid	Ausencia	Negativo	Negativo
Ambiente	Presencia	Positivo	Positivo

Se observó que los microorganismos que se encontraron en el molino y mesa de trabajo, pertenecen (por la forma y viscosidad de las colonias) al ambiente. Estos microorganismos se muestran en la figura 26 lo cual es una posibilidad de contaminación del equipo. Así mismo, se observó que los equipos del taller se encuentran expuestos a corrientes de aire debido a su ubicación cerca de la puerta de entrada lo que provoca la contaminación del sitio.



Figura 26. Microorganismos del ambiente

3.5.2. Posibles evidencias de biopelículas en el molino y mesa de trabajo

En los resultados que se obtuvieron de los sitios críticos seleccionados antes de la limpieza y sanitización se encontró el mismo número de bacterias en tres muestreos consecutivos, sin embargo, después de la limpieza y sanitización con el antimicrobiano de rutina del taller no hubo crecimiento (ver la tabla 14). A excepción del molino en el punto 2 donde hubo presencia de microorganismos después de la limpieza y sanitización se disminuyó el conteo considerablemente. El detectar crecimiento de las bacterias mostró la presencia de biopelícula. En otros experimentos realizados por Jessen B. and Lammert L. (2003), se presentó una situación similar donde se identificó la formación de biopelícula después de tomar 3 muestras en la zona crítica antes y después de la higienización en la cual se detectó el mismo número de microorganismos.

Tabla 14. Posible presencia de biopelícula en las superficies del equipo del taller de cárnicos

Sitio crítico	Antes de la limpieza (diluciones 10 ⁻⁶) Log (ufc/mL)	Después de la limpieza (diluciones 10 ⁻⁶) Log (ufc/mL)
Molino		
Punto 1	3.29	0
Punto 2	4.428	1.298
Punto 3	2.356	0
Mesa de trabajo		
Punto 1	2.980	0
Punto 2	1.934	0
Punto 3	1.290	0

3.5.3. Sensibilidad del sanitizante en estudio con el de rutina

Los resultados obtenidos que se presentan a continuación es el promedio (logaritmos (ufc/ml)) de la carga microbiana de mesófilos aerobios en tres sitios críticos (puntos de mayor riesgo) antes y después de la higienización del molino de carne y mesa de trabajo, en un tiempo de acción de 15 minutos con el sanitizante de rutina utilizado en el taller de cárnicos y el sanitizante en estudio.

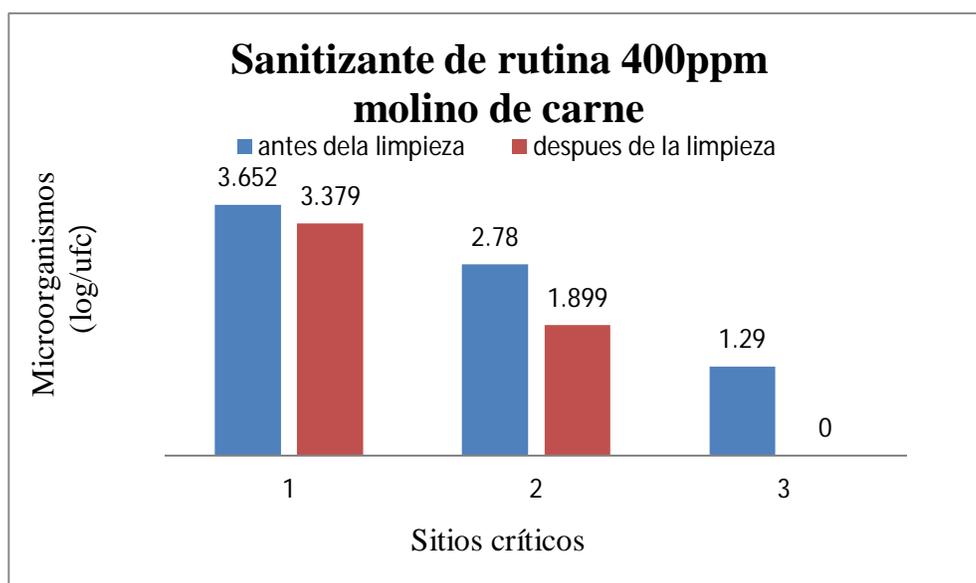


Grafico 1. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante de rutina en el molino de carne

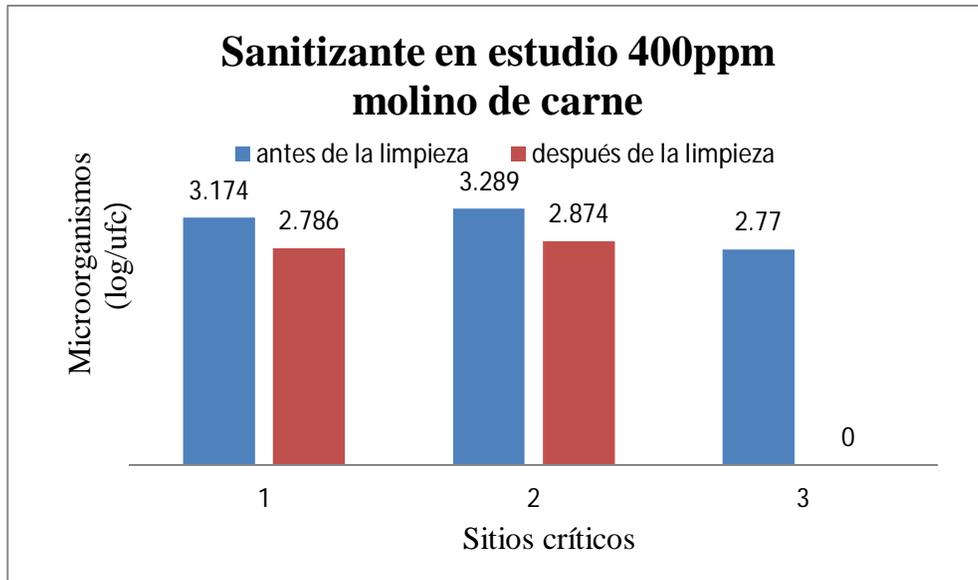


Grafico 2. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante en estudio en el molino de carne

Como se puede observar en el grafico 1 y 2 ambos sanitizantes disminuyeron la carga microbiana que había antes de la higienización, sin embargo, la concentración y el tiempo de acción que fueron evaluados no fue suficiente para eliminar la carga microbiana ya que actuaron como bacteriostáticos. Esto se comprobó por el crecimiento de microorganismos después de la neutralización.

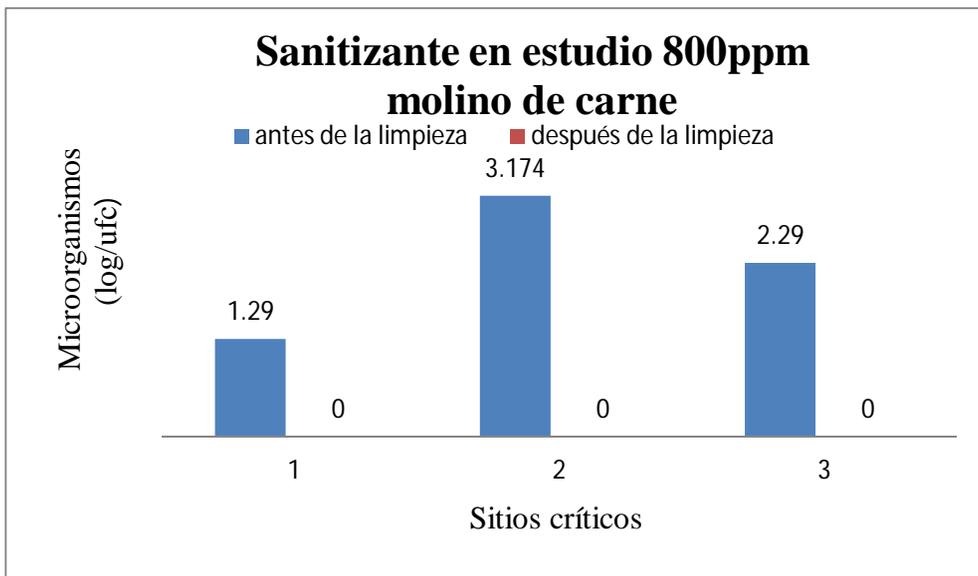


Grafico 3. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante en estudio en el molino de carne

Como se observa en el grafico 3 cuando se aumento la concentración del sanitizante en estudio a 800 ppm no hubo crecimiento después de la limpieza y sanitización. Lo cual se confirmó con otros estudios realizados por Cloete (2003), que a bajas concentraciones del sanitizante, actúa como bacteriostático y solo son bactericidas a concentraciones más altas con el fin de ejercer su acción antibacteriana.

La comparación de los resultados antes y después de la higienización del molino de carne en ambos sanitizantes, mostraron una reducción de microorganismos en los sitios más contaminados, esto confirmó la necesidad de un proceso de limpieza y sanitización más profundo.

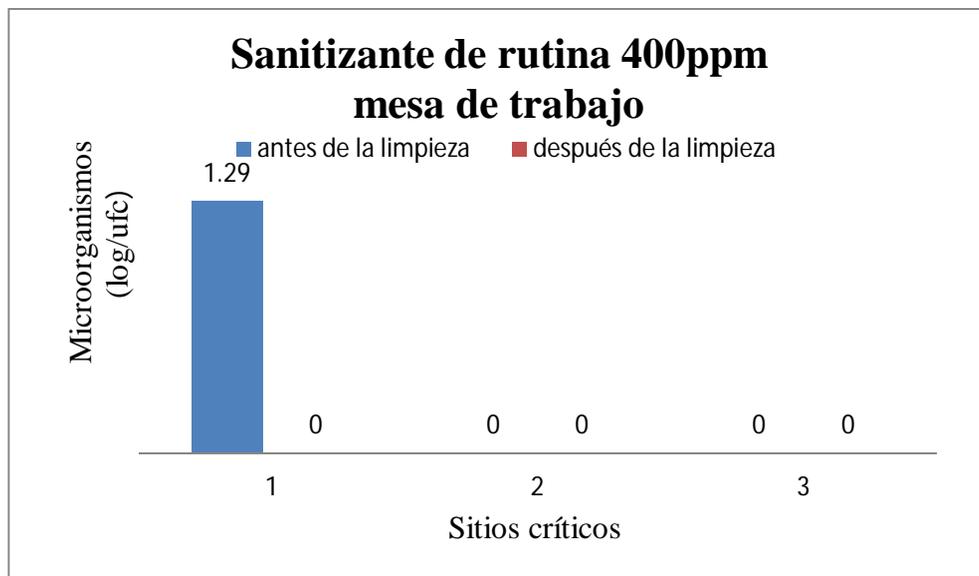


Grafico 4. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante de rutina en la mesa de trabajo

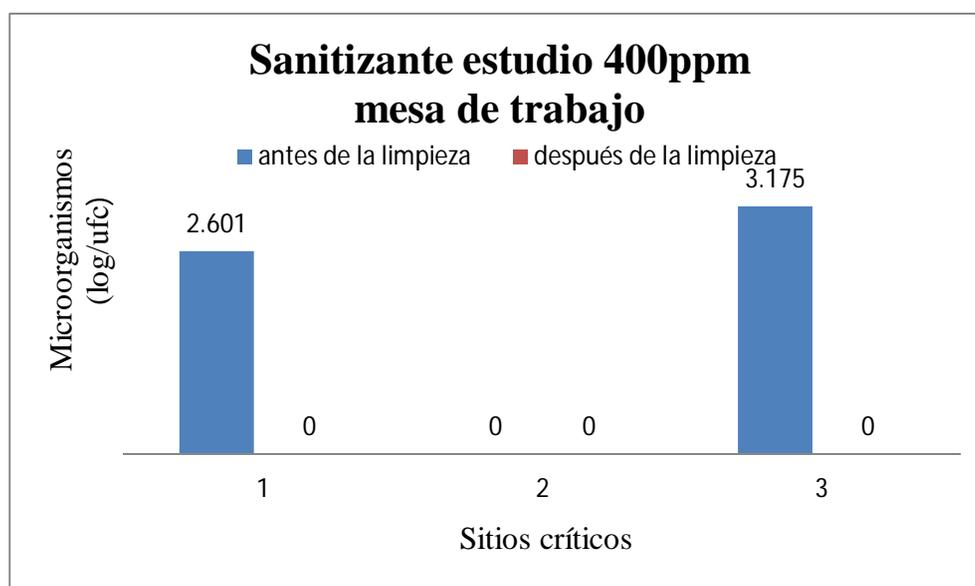


Grafico 5. Microorganismos encontrados antes y después del uso del sanitizante de estudio en la mesa de trabajo

En los gráficos 4 y 5 se demostró que la mesa de trabajo fue el equipo con menor carga microbiana donde ambos sanitizantes actuaron como bactericidas también se comprobó por ausencia de microorganismos después de la neutralización.

3.6.Verificación de la ausencia de toxicidad del neutralizante (Caldo Lethen)

La neutralización implicó el enfrentamiento de una suspensión bacteriana con el caldo letheen que fue capaz de neutralizar o inhibir la acción de los componentes activos del sanitizante. En estudios realizados por Díaz *et. al* (2008), aplicó tres criterios para el estudio de neutralización:

- 1) El neutralizante debe inhibir efectivamente la acción de la solución biocida.
- 2) El neutralizante no debe ser por si mismo toxico para los microorganismos de ensayo.
- 3) El neutralizante y el agente activo no se deben combinar para formar un compuesto toxico.

Se consideraron estos criterios en la ausencia de toxicidad del neutralizante. La eficacia y la toxicidad del neutralizante fue demostrada con *Klebsiella spp.*, como se observa en la figura 27, el neutralizante permitió ampliamente el crecimiento del microorganismo evaluado y no presentó efectos negativos que pudieran ocasionar inhibición de los mismos.

La eficacia o capacidad del neutralizante para inhibir la acción del biocida sobre los microorganismos se demostró comparando el número de microorganismos recuperados a partir del neutralizante en presencia y ausencia del biocida. Esta comparación evitó confundir el efecto toxico del neutralizante con una inadecuada inhibición del biocida.



Figura 27. Ausencia de toxicidad del neutralizante hacia el microorganismo en estudio

CONCLUSIONES

Se concluye lo siguiente:

- ⊕ El sanitizante en estudio tuvo efecto bactericida en concentraciones: de 800ppm durante 15 minutos y en 200-300ppm durante 30 minutos frente a *Klebsiella* spp., por lo tanto, logró reducir 6 ciclos logarítmicos en la prueba de la mínima concentración inhibitoria.
- ⊕ Se demostraron los efectos antimicrobianos del sanitizante en estudio en la eliminación de biopelículas jóvenes: 6, 12 y 24 horas de edad en concentraciones: 600 y 2800ppm respectivamente en un tiempo de contacto de 15 minutos, sin embargo, para biopelículas maduras: 3 y 5 días se necesitaron altas concentraciones de sanitizante: 3000 y 4000ppm y tiempos prolongados de mas de 1 hora, lo que indicó que se requiere mayor tiempo de contacto con el sanitizante.
- ⊕ Por consiguiente, se demostró que el tiempo de contacto es uno de los factores críticos para asegurar la sanitización.
- ⊕ Después de la limpieza y sanitización en el taller de cárnicos con la aplicación del sanitizante en estudio a 400ppm durante 15 minutos de contacto con equipos como: molino y mesa de trabajo, se evidenció el crecimiento de microorganismos en los puntos de riesgo seleccionados, por ello, al aumentar la concentración a 800ppm durante 15 minutos de acción se consiguió la eliminación de microorganismos presentes.
- ⊕ El sanitizante en estudio y el de rutina del taller, consiguieron una eliminación media de microorganismos de $2.10 \log_{10}$ en los puntos seleccionados como críticos en el molino. Así como también ambos sanitizantes resultaron eficaces en la inhibición de microorganismos en la mesa de trabajo teniendo la ventaja de ser una superficie plana y de mejor acceso a la limpieza y sanitización.
- ⊕ De acuerdo a los resultados que se obtuvieron durante la experimentación se demostró la eficacia del sanitizante en estudio por ello podría ser un producto alternativo para la sanitización en la industria de alimentos siempre que se sigan estrictamente las concentraciones y tiempos adecuados, dependiendo de la carga microbiana que se desea eliminar.

RECOMENDACIONES

1. El personal que este en contacto con alimentos debe estar capacitado de acuerdo a la forma en la cual se debe realizar el proceso de limpieza y sanitización de equipos (concentración de los agentes sanitizantes, tiempo de exposición, temperatura, enjuague y secado de las superficies).
2. Se deben tomar medidas sanitarias específicas, para evitar que las superficies que estén en contacto directo con el alimento, dentro de una planta de procesos, puedan tener formación de biopelículas.
3. Se sugiere como medida de prevención, mantener las superficies de contacto directo, como bandas y mesas de corte principalmente, lo más lisas posibles, para no ayudar a la fijación de microorganismos.
4. Se recomienda restregado manual exhaustivo y uniforme de todas las superficies de contacto directo con el alimento y eventualmente las de no contacto directo.
5. Programar limpiezas ácidas continuas, alternas con alcalinas, dado que los detergentes ácidos disuelven fácilmente el contenido de polisacáridos de las biopelículas, facilitando la posterior penetración del sanitizante.
6. Las concentraciones de los sanitizantes generalmente deben ser aumentadas, previo al análisis de efectividad del mismo, frente a las bacterias que se quieran eliminar.
7. Buenos procedimientos de limpieza y sanitización, pre-operativos y operativos, pueden prevenir la formación de biopelículas en las superficies de contacto directo con el alimento.

ANEXO 1

FICHA TÉCNICA DEL SANITIZANTE EN ESTUDIO



Bioxital LIQUIDO V02 L es un producto natural complejo compuesto de derivados de cítricos utilizado como efectivo agente antimicrobiano (bacteriostático y bactericida) y antioxidante.

La acción antimicrobiana y antioxidante del producto resulta del efecto sinérgico de los bioflavonoides y los ácidos orgánicos presentes en el producto. Los resultados de su efectividad como agente bacteriostático y bactericida representan una gran utilidad en una amplia gama de usos en donde se requiere un efectivo control del crecimiento microbiano.

Composición:

Debido a la característica natural del producto, la composición de sus elementos es variable dependiendo del tipo de cítricos utilizados (origen y características particulares de éstas y las cosechas que componen las materias primas). Los rangos de composición se establecen en la siguiente tabla descriptiva:

- Compuestos Orgánicos

(Bioflavonoides cítricos, ácido ascórbico y ascorbato, polifenoles cítricos, carbohidratos, ácido cítrico, pectina, biomasa, agua)..... 50 %

- Vehículo inerte (Glicerina) 50 %

Estructura Química de los Principales componentes de bioxital LIQUIDO V02 L

A) Bioflavonoide Glucosídico - "Naringina" ($C_{27} H_{32} O_{14}$) de "Toronja"

Materias Primas de bioxital LIQUIDO V02 L

- Ⓒ Cítrico de Toronja (Citrus Paradisi)
- Ⓒ Cítrico de Bergamota (Citrus Aurantium)
- Ⓒ Cítrico de Naranja Dulce (Citrus Sinensis)
- Ⓒ Cítrico de Mandarina (Citrus Reticulata)

- Ⓢ Ácidos Orgánicos
- Ⓢ Glicerina Vegetal

Características y propiedades físicas:

- Ⓢ Aspecto: Líquido cristalino viscoso.
- Ⓢ Densidad (g/ml): 1,160 ($\pm 5\%$).
- Ⓢ pH: 2.0 - 3.2
- Ⓢ Solubilidad: Agua, Alcohol y Glicerina.
- Ⓢ Acidez (cantidad de producto (mg) neutralizado por 1 ml of NaOH 1N): 1300 ($\pm 15\%$).
- Ⓢ Nitrógeno (Método Kjeldahl): 0,62% ($\pm 15\%$).
- Ⓢ Corrosividad: A 2000 PPM es similar a la del agua.
- Ⓢ pH para uso en mezclas: Usar en rangos de pH de 3 a 9.

Características organolépticas:

- Ⓢ Color: apariencia a miel cristalina, con el tiempo se va oscureciendo sin embargo su eficacia no se ve afectada.
- Ⓢ Olor: Semejanza con notas cítricas.
- Ⓢ Sabor: Notas amargas y astringentes.

Vida de anaquel: 3 años a partir de fecha de fabricación.

Almacenamiento: Lugar fresco y seco (asegurase de mantener envase cerrado).

Estabilidad: El tiempo es un factor para que el producto pueda sufrir cambios en color – oscurecimiento – sin que esto afecte su efectividad. El producto es estable en rangos de temperaturas que van de 4 °C a 40 °C, sobre 120°C su estabilidad es reducida.

El producto es incompatible con productos aniónicos.

Precauciones de uso: Utilice equipo de protección personal (lentes, guantes y cofia). En caso de contacto con piel y ojos lave profusamente con agua limpia.

Biodegradabilidad: Atendiendo a las características y origen naturales de sus componentes el producto es biodegradable.

Espectro bacteriostático y fungistático de bioxitral LIQUIDO V02 L:

Bacterias

Salmonella cholerae suis, Salmonella typhi, Salmonella anatum, Salmonella enteritidis, Salmonella gallinarum, Escherichia-coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Streptococcus faecium, Micrococcus spp, Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, Clostridium perfringens, Clostridium sulfireductores, Pseudomonas aeruginosa, Shigella dysenteriae.

Hongos

Candida albicans, Penicillium spp, Penicillium funiculosum, Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, Mycosphaerella musicola, Mycosphaerella fijensis, Fusarium solani, Fusarium spp, Fusarium graminearum, Rhizoctonia solani, Alternaria solani, Phoma insidiosa, Colletotrichum lindemuthianum, Monilinia spp, Sclerotium rolfsii, Drechslera sorokiniana, Phyllosticta maytis, Nigrospora oryzae.

Propiedades Biológicas de bioxitral LIQUIDO V02 L

- ④ Es 100% ecológico y biodegradable.
- ④ Es no tóxico para animales y plantas.
- ④ No es corrosivo y volátil.
- ④ Tiene acción microbioestática extendida, funcionando contra muchas sepas patogénicas de bacterias y hongos.
- ④ Contiene antioxidantes naturales (Ácido ascórbico, Bioflavonoides, Ácido cítrico) con altos niveles de biodisponibilidad y tiene un excelente sinergismo y estabilidad.

ANEXO 2

DIFERENCIACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Movilidad	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmento	-	d ^b	-	d ^b	d ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en medio con KCN	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+
Citrato como fuente de C	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	-	d	-
Gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	d	-	-
Malonato	d	d	-	d	d	+	+	.	+	-	d	+	-	+
Carbohidratos: gas de la glucosa	+	d	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+	d	-
ácido de:														
adonitol	-	d	-	+	d	+	+	+	+	.	.	+	+	+
arabinoa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	+	+
dulcitol	-	-	-	-	d	d	d	+	+	-	-	-	d	-
glicerol	+	+	+	d	d	+	+	+	+	.	.	+	+	+
inositol	-	d	+	d	-	+	+	+	+	.	.	+	+	d
lactosa	-	-	d	+	d	+	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)	-
maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rafinosa	-	-	d	+	+	+	+	+	+	.	.	+	+	+
ramnosa	+	-	-	-	+	+	+	+	+	.	.	+	+	d
salicín	-	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	+	+
sorbitol	d	+	d	d	d	+	+	+	+	.	.	+	+	+
sacarosa	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
xilosa	d	(d)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Prueba del MR	-	d	d	d	-	-	-	-	+	+	d	d	+	+
Prueba de VP ^d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	d	-	-
Hidrólisis de la escualina	-	d	d	+	-	+	+	d	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la gelatina	-	+	+	+	(+)	d	(d)	+	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	w/-	d	d	d	-/w	+	+	+	+	+	-	d	-
H ₂ S del FTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deshidrolasa de la arginina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilasa de la lisina	+	+	d	d	-	+	+	+	+	+	+	d	d	-
Descarboxilasa de la ornitina	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
DNasa	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

31 Hafnia alvai; <i>Enterobacter alvei</i>	35 <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Cloaca cloacae</i> ; <i>Aerobacter cloacae</i>	39 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>sensu stricto</i>) neumobacilo de Friedländer
32 <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Erythrobacillus prodigiosus</i> ;	36 <i>Enterobacter aerogenes</i> ; (NO <i>Aerobacter aerogenes</i> Beijerinck)	40 <i>Klebsiella atlantae</i> n.sp.; <i>K. edwardsii</i> var. <i>atlantae</i>
33 <i>Serratia liquefaciens</i> ; <i>Enterobacter liquefaciens</i> ; <i>Acetobacter liquefaciens</i>	37 <i>Klebsiella aerogenes</i> ; <i>K. pneumoniae</i>	41 <i>Klebsiella edwardsii</i> ; <i>K. edwardsii</i> var. <i>edwardsii</i>
34 <i>Serratia rubidaea</i> ; <i>Serratia</i> biotipo II	38 <i>Klebsiella oxytoca</i>	42 <i>Klebsiella</i> no denominada (Bascomb et al.)
		43 <i>Klebsiella ozaenae</i>
		44 <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>

Símbolo	Significado y equivalente descriptivo
+	85-100% de las cepas son positivas (por lo general, todas; la mayor parte, muchas)
d	16-84% de las cepas son positivas (en algunas, muchas)
-	0-15% de las cepas son positivas (no, en ninguna, en unas, algunas)
()	Reacción retardada en una prueba o crecimiento tardío
(d)	Reacciones diferentes por cepas diferentes; las reacciones positivas son tardías
(w)	Reacción tardía y débil
w/-	Reacciones diferentes por cepas diferentes; las positivas son débiles o el crecimiento es escaso
.	No conocida

ANEXO 3

FICHA TECNICA DEL SANITIZANTE DE RUTINA DE UN TALLER DE CÁRNICOS

MICRODYNA

Sanitizante, algicida y germicida cuaternario de amplio espectro

APLICACIONES

MICRODYNA es un algicida y germicida recomendado para evitar el desarrollo de microorganismos en las industrias cerveceras, embotelladoras de gaseosas y otras bebidas, enlatadoras, lecheras, industrias avícolas, ganaderas y otras donde se procesan alimentos.

CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	BENEFICIOS
Poderoso sanitizante, germicida y algicida de amplio espectro.	Máximo poder germicida aún contra bacterias Gram (-).	Se obtienen equipos mejor saneados.
Producto concentrado.	Capacidad germicida alta, aun con menos producto.	Mejor calidad del producto final.
Alta estabilidad.	Buena actividad a temperaturas altas.	Ahorro económico por consumo de producto.
Elimina malos olores.	Se elimina el efecto de la degradación orgánica.	Proceso de limpieza con mejor calidad.
No tóxico, ni irritante.	Producto seguro: no produce vapores, ni olores peligrosos.	Equipos microbiológicamente confiables en el proceso productivo.
No corrosivo.	Producto confiable en su uso.	Seguridad total para el usuario.
Producto de espuma controlada.	A diferencia de otros productos de base cuaternario, se recomienda para ser usado en sistemas C.I.P., sin tenerse espuma objetable.	Seguridad para ser usado en todas las superficies lavables.
Funciona en aguas de dureza alta (hasta ± 250 p.p.m).	No provoca cavitación en equipos de bombeo.	Alta eficiencia en el proceso de sanitización.
Biodegradable.	Su actividad microbicida no es afectada en aguas duras.	Confianza en los resultados del proceso de

	Cumple con las normas oficiales biodegradabilidad	limpieza. Equipos de bombeo con operación adecuada. Resultados confiables aun sin tener tratamiento de suavizado en el agua. Un problema menos con las reglamentaciones oficiales.
--	---	---

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Apariencia	Líquido transparente
Color	Ligeramente amarillo
Olor	Característico
Solubilidad	100 % en agua
Espuma en aplicación	Moderada
pH (1% H ₂ O)	9.0
Densidad	1 ± 0.03 g/mL
Humectancia	Excelente
Activo germicida	8 % mínimo

Nota: Las propiedades aquí expresadas no son las especificaciones del producto.

CONCENTRACIONES DE ACTIVO MICRODYNA	DOSIS	APLICACIÓN
200ppm	2mL/L	Saneamiento de equipo en plantas de alimentos, por inmersión, aspersión y/o recirculación, previa limpieza y enjuague. Desinfección de paredes, pisos, lavabos, baños, etc.
400ppm	4mL/L	
800ppm	8mL/L	Desinfección de superficies porosas como tajo de corte, transportadores de hule en empacadoras y enlatadoras, etc. Deodorizar botes de basura y áreas inaccesibles en plantas alimenticias, por atomización ó nebulización, para el control de malos olores.
800ppm	8mL/L	

ANEXO 4

Formulación para neutralizar un sanitizante en 1 litro de agua

Tioglicolato de sodio	= 1 gramos
Tiosulfato de sodio	= 6 gramos
Bisulfito de sodio	= 2.5 gramos
Polisorbato 80	= 5.0 gramos
Lecitina de soya	= 7.0 gramos
H ₂ O	= 1L

La formulación se ajustó para 100mL de agua.

Procedimiento

1. En 100mL de agua destilada estéril, se adicionó 1.25mL de sanitizante. Se agitó durante 30 segundos.
2. Se agregó 1ml de microorganismo (bacteria seleccionada) en 20mL del sanitizante diluido y se puso en contacto durante 15 minutos.
3. Después se agregó 1mL de la mezcla anterior en un tubo que contenía 9mL de neutralizante se agitó y se dejó reposar 15 minutos.
4. Se realizaron las diluciones decimales hasta 10^{-6} , siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la figura 19.
5. Se sembraron 20 μ L en agar cuenta estándar neutralizado para el análisis microbiológico y se incubó a 37°C/24-48 horas.
6. Se realizó el mismo procedimiento descrito pero sin neutralizante y en su lugar se ocupó 9mL SSF al igual que el medio agar cuenta estándar sin neutralizante.

GLOSARIO

Agar: Es un polisacárido extraído del alga marina japonesa (algas rojas) y utilizado como un agente solidificante en los medios de cultivo biológicos.

Agente antimicrobiano: Es un compuesto químico, natural o sintético, que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos.

Antiséptico: Agentes antimicrobianos que son suficientemente poco tóxicos como para ser aplicados a los tejidos vivos.

BHI: Caldo nutritivo infusión cerebro corazón por sus siglas en inglés.

Biocida: Sustancias activas y preparados que contiene una o más sustancias activas, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier microorganismo.

Cápsula: Describe una capa de polisacárido y también se utiliza el término glicocalix.

Citoplasma: Contenido gelatinoso de una célula no incluyendo el núcleo.

DET's: Pruebas de efectividad de los desinfectantes.

Espora: Corpúsculo inactivo y resistente, forma de reposo o reproducción, que puede originar otro individuo vegetativo en condiciones favorables.

Fuerza electrostática: Atracción o repulsión de las cargas eléctricas en equilibrio.

Fimbrias: Son considerablemente más cortas que los flagelos y más abundantes. Pueden ser químicamente muy semejantes a los flagelos, pero no todos los organismos tienen fimbria y la capacidad para producirlas es un carácter hereditario. Permiten a los organismos adherirse a las superficies inertes.

Flagelos bacterianos: Son apéndices largos y delgados libres por uno de sus extremos y unidos a la célula por el otro.

Glicocálix: Material polisacárido que se extiende alrededor de la célula.

Gram negativa: Un tipo de célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas.

Gram positiva: Tipo de célula procariótica cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Hidrofílica: Porción de la molécula soluble, que se enlaza mejor y más fuerte con la molécula de agua.

Hidrofóbica: Porción de la molécula insoluble, suelen ser grasas naturales, aceites, fracciones de petróleo, polímeros sintéticos o alcoholes sintéticos.

Higienización (sanitización y desinfección): Tratamiento de superficies que resulta eficaz para destruir las células vegetativas de bacterias patógenas y para reducir substancialmente la carga de otros microorganismos.

Lipopolisacárido (LPS): Lípido que contiene polisacárido y proteína y que es el compuesto mayoritario en la pared celular de las Bacterias Gram negativas.

Membrana citoplasmática: Barrera con permeabilidad selectiva que envuelve al citoplasma y lo separa del entorno.

Micotoxinas: Sustancias venenosas producidas por los mohos.

Morbilidad: Es la porción de personas que enferman en un sitio y tiempo determinado.

Nitrosaminas: Son compuestos orgánicos que generalmente se originan debido a la reacción de una amina secundaria con nitritos en un medio muy ácido.

Pared celular: Envoltura protectora rígida que encierra a las células bacterianas, hongos y plantas celulares.

Patógeno: Cualquier microorganismo capaz de producir enfermedad.

Peligro: Pueden afectar la salud del consumidor por ingesta de alimentos, pueden ser: biológicos, químicos y físicos.

Prueba del MR: Prueba de rojo de metilo, es un indicador de pH.

Quimiotaxis: Movimiento de un organismo hacia (positivo) o alejándose (negativo) de un gradiente de un compuesto químico.

Se considera como un sistema de respuesta sensorial que dirige la función flagelar y que se regula químicamente por proteínas sensoras que se sitúan en la membrana, se denominan quimiorreceptores, capaces de captar el gradiente químico. Diversas sustancias químicas muestran propiedades de atracción o repulsión para una bacteria determinada.

Riesgo: Es la probabilidad de que se presente un efecto adverso a la salud del consumidor y la severidad del efecto como consecuencia de uno o varios peligros en un alimento.

Sanitizante: Sustancia química o desinfectante que es utilizado específicamente en superficies que están en contacto con los alimentos.

Saponificación: Reacción de álcalis con grasas o aceites, formando jabón.

Sitio crítico: Sitio o punto en el proceso del alimento donde existe una alta probabilidad de que un control inapropiado puede provocar, permitir o contribuir a un peligro o a la descomposición o deterioro del alimento final.

Tensión superficial: Tensión en la capa superficial de una fase, dirigida hacia su interior, debida a las atracciones de las moléculas de la superficie y las que se encuentran bajo esta superficie.

Toxina: Sustancia química producida por organismos vivos que es venenosa para personas y animales.

TSA: Medio de agar soya tripticasa.

Tween 80: Polisorbato 80, es un líquido ámbar, tensoactivo hidrofílico.

®: Marca registrada.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. AOAC Official Method 955.15. 2006. Testing Disinfectants. Use Dilution Method. AOAC International. 6.2.04.
2. Bessem E. (1998). The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 177-183.
3. Brock T. D. (2006). *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid España, pp. 55-102.
4. Carpenter A. J. (1989). *Limpieza y desinfección en mataderos e industrias cárnicas*. American meat institute. USA.
5. Chapman J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51: 133-138.
6. Charalambia E., Belessi A., Gounadaki A. S., Psomas N. A. y Skandamis N. P. (2010). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 30: 1-7.
7. Cloete T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51: 277-282.
8. Cowan S. T. y Steel K.J. (1985). *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica*, 2ª edición. Compañía Editorial Continental. México, pp. 156-157.
9. Cramer M. M. (2006). *Food Plant Sanitation*. Ed. Taylor & Francis Group. USA, pp. 95-101.
10. Denyer S. P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 7: 227-245.
11. Denyer S. P. y Stewart A. B. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41: 261-268.
12. Espigares E., Bueno A., Fernández-Crehuet M. y Espigares M. (2003). Efficacy of some neutralizers in suspensión tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection*. 55: 137-140.

13. Forero Vargas, A. R. y Piedrahita Navarrete D.C. (2008). Análisis y evaluación de los procesos de limpieza manual de equipos de manufactura en una industria nutracéutica. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título Microbiólogo (a) Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Florida-USA, pp. 1-207.
14. Forsythe S. J. y Hayes P. R. (2003). Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. Ed. Acribia, S. A. 2ª edición. Zaragoza España, pp. 381-386.
15. Fuster I. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar contaminaciones cruzadas. Memoria para acceder al grado de doctorado ciencias de los alimentos del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos; Barcelona España, pp. 1-182.
16. González G. S., Ruiz V. R. y Hernández B. E. (2003). Guía de Microscopia Electrónica. Ed. FES-C UNAM, pp. 25-27.
17. Hans P. B., Hua H. W. y Meredith E. A. (2007). Biofilms in the food environment. Blackwell Publishing, IFTPRESS. USA, pp. 3-15.
18. Heinzl M. (1998). Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 225-234.
19. Holah J. T., Lavaud A., Peters W., Dye K. A. (1998). Future techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 273-279.
20. Hood S.K. y Zottola E.A. (1995). Biofilms in food processing. Butterworth Heinemann. 1: 9-18.
21. Hyginov C. (2001). Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección, de aplicación en empresas del sector alimentario. Ed. Acribia. Zaragoza España, pp. 54.
22. Ibusquiza S. P., Herrera J.J., Cabo M. L. (2010). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *International Journal Food Microbiology*, 30: 1-8.
23. Jessen B. and Lammert L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 265-269.
24. Katsuyama Allen M. (1995). Principles of food processing sanitation. 2ª edición. Ed. The food processors institute. Washington, DC, pp. 121-164.

25. Kumar G. C. y Anand S. K. (1998). Significance of microbial biofilm in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42: 9-27.
26. Langsrud S. et. al (2003). Bacterial disinfectant resistance-a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51: 283-290.
27. Leveau J. Y. y Bouix M. (2002). Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. Ed. AMY Mundi-prensa. pp. 400-402.
28. Marín J. C., Navarro P. N. y Santos A. N. (2008). Evaluación del método dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la norma técnica colombiana 5473 de 2007. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título Microbiólogo (a) Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D. C. pp. 79.
29. Marriott N. G. (2003). Principios de higiene alimentaria. Ed. Acribia. 2ª ed. Zaragoza España, pp. 24-25.
30. Meyer B. (2006). Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene?. *International Journal of Food Microbiology*. 112: 275-279.
31. Miles A. A., Misra S. S. y Inwin J. P. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene* 38 (6): 732-749.
32. Moreno G. B. (2006). Higiene e inspección de carnes I. Ed. Díaz de santos. 2ª ed. Madrid España, pp. 84.
33. Morrison T. R. (1987). Química orgánica. Person educación. 5ª ed. New York, pp. 1246-1249.
34. Pasanen P., Kalliokoski P. y Pasanen A. (1996). The effectiveness of some disinfectants and detergents against microbial activity. *Building and environment*. 3: 281-287.
35. Puig-Durán F. J. (2002). Ingeniería, autocontrol y auditoría de la higiene en la industria alimentaria. Ed. Mundi-Prensa. Madrid España, pp. 64-101.
36. Ramírez E. N. A. (2006). Limpieza y desinfección en la industria de alimentos para la eliminación superficial (biopelícula). Tesis para obtener el título de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
37. Reinhard O. (1998). The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41: 201-208.

38. Reybrouck G. (1998). The testing of disinfectants, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41: 269-272.
39. Romanova N. A., Gawande P. V., Brovko L. Y., Griffiths M. W. (2007). Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 71: 231-237.
40. Salgar B. R. (2004). Biopelículas o Biofilms en la Industria Alimentaria. *Mundo Alimentario*. pp. 30-31.
41. Sánchez J.A. et. al. (2003). Diseño del plan de limpieza y desinfección en un matadero de porcino. Ed. Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba, pp. 22-48.
42. Scheffler R. (2009). Maximizing sanitation efforts in food processing: the importance of conveyor hygiene. *Food Science & Technology*. 20: S40-S43.
43. Simoes M. et. al. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*. 43: 573-583.
44. Singh R., Debarati P. y Rakesh K. J. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *TRENDS in Microbiology*. 14: 388-396.
45. Surman S. B. et. al. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 25: 57-70.
46. Trienekens J. and Zuurbier P. (2008). Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *International journal of production economics*. 113: 107-122.
47. Vera R. (2001). Temas de construcción I. Ed. Club Universitario. 2ª edición. San Vicente España, pp. 20 y 29.
48. Wildbrett G. (2000). Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Ed. Acribia. Zaragoza España, pp. 364.
49. Zottola A. E. y Sasahara C. K. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry- Should they be a concern?. *International Journal of Food Microbiology*. 23: 125-148.

Referencia de NMX

- © NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis – determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas. Norma Mexicana.

Memoria de congreso

- ④ Gutiérrez M. P. (2002). APPCC en la Industria Agrolimentaria (Plan de Limpieza y desinfección). Congreso en la Universidad de Ingeniería Técnica Agrícola.
- ④ Amaral F. D. (2011). Perspectivas industriales para el control de la contaminación microbiológica y reducción de los riesgos. Congreso Nacional de Buenas Prácticas de Higiene en la Producción de Alimentos; junio 16 y 17; pp. 74-78. México, D. F.