

2091



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESINFECTANTES COMERCIALES. UN ESTUDIO COMPARATIVO DE SU APLICACION EN HORTALIZAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA DE ALIMENTOS PRESENTA: MARTHA ESTELA ACEVEDO VILLALOBOS



MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

1998.

265295



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**JUARADO ASIGNADO:**

Presidente: Prof. Marco A. León Félix  
Vocal: Profa. Aurora Irma Ortegón Ávila  
Secretario: Prof. Miguel Angel Hidalgo Torres  
1er. Suplente: Prof. Juan Diego Ortiz Palma  
2o. Suplente: Profa. Martha Giles Gómez.

**Sitio donde se desarrollo el tema:**

American Quality Lab

Laboratorios 4A y 4B de la Facultad de Química, UNAM

Asesor:



Prof. Marco Antonio León Félix

Sustentante:



Martha Estela Acevedo Villalobos

## **AGRADECIMIENTOS**

---

**A tí Señor,**  
*que eres la luz que  
ilumina y guía mi vida.*

---

---

**A LA UNAM,**  
*por ser mi albergue  
académico y profesional.*

---

---

**A tí Marco,**  
*por todas tus enseñanzas,  
por toda la experiencia  
profesional que he adquirido  
a tu lado y por tu amistad.*

---

---

**A los profesores Aurora  
Ortegón y Miguel Hidalgo,**  
*por su apoyo incondicional  
para la realización de esta  
tesis y por su hospitalidad  
en AQL.*

---

## **DEDICATORIAS**

---

**A tí MAMÁ,** que compartiste conmigo mis desvelos y seguiste muy de cerca mi carrera. Tu sabes que esta tesis es tuya.

---

---

**A tí PAPÁ,** por tu apoyo y tu indudable ejemplo de profesionalismo y dedicación.

---

---

**A ustedes MIS HERMANOS,** Eduardo, Roberto y Pily porque han estado presentes durante toda mi vida e igualmente me han apoyado.

---

---

A ti mi amor, porque te encuentras en cada uno de mis mayores anhelos  
**Gracias Arnulfo.**

---

# INDICE

<i>Tema</i>	<i>Pag.</i>
1.OBJETIVOS	1
1.1. Objetivo general	1
1.2.Objetivos particulares	2
2.RESUMEN Y JUSTIFICACIÓN	3
3.HIPÓTESIS	5
4.INTRODUCCIÓN	6
5.ANTECEDENTES	9
5.1.El papel de las hortalizas en la dieta humana	9
5.2.Contaminación de origen de las hortalizas	14
5.3.Manejo de las hortalizas en la operación de servicio de alimentos	16
5.4.Microorganismos indicadores de contaminación de alimentos	18
5.4.1.Mesofílicos aerobios	19
5.4.2.Coliformes	20
5.4.3.Coliformes fecales	22
5.4.4.Estreptococos	24
5.5.Diferentes definiciones del término "desinfección" "Desinfectantes" vs "Sanitizantes"	25
5.6.Métodos de desinfección	29
5.7.Parámetros que afectan la reactividad de un desinfectante	31
5.8. Métodos analíticos de evaluación de agentes germicidas	34
6.DESINFECTANTES COMUNMENTE UTILIZADOS	37
6.1.Cloro	38
6.2.Dióxido de cloro	48
6.3.Yodo	52

6.4. Compuestos de amonio cuaternario	56
6.5. Plata coloidal	60
6.6. Desinfectantes orgánicos	65
7. METODOLOGÍA	67
7.1. Preparación y dilución de la muestra	68
7.2. Condiciones experimentales y Desinfectantes evaluados	70
7.3. Evaluación de microorganismos aerobios mesófilos	
Método de recuento en placa	71
7.3.1. Recuento estándar en placa: Técnica de vertido	72
7.4. Determinación de microorganismos coliformes fecales	77
7.4.1. Recuento de coliformes fecales: Técnica del Número más Probable	77
7.5. Medios de cultivo utilizados	79
8. RESULTADOS	80
9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	89
9.1. Análisis estadístico de resultados	89
9.1.1. Cálculos para los resultados de microorganismos mesófilos aerobios	91
9.1.2. Cálculos para los resultados de microorganismos coliformes fecales	94
9.2. Discusión de resultados estadísticos	97
9.3. Discusiones adicionales	101
10. COSTOS DE APLICACIÓN	103
11. CONCLUSIONES	106
12. BIBLIOGRAFÍA	108

# **1. OBJETIVOS**

## **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la eficiencia comparativa de cuatro diferentes desinfectantes comerciales aplicados a hortalizas con base en su poder bactericida.

Orientar sobre los criterios para la elección de un agente desinfectante para hortalizas, con base en los resultados que se obtengan y a la información que se presenta sobre efectos colaterales del uso de cada uno de los productos y su costo de aplicación

## 1.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ↳ Determinar la eficiencia comparativa de cuatro desinfectantes comerciales aplicados a lechuga, berros y cilantro con base en su poder bactericida.
- ↳ Verificar que las condiciones de desinfección señaladas por el fabricante para la aplicación de cada uno de los desinfectantes son las correctas para obtener cuentas microbianas posteriores a la desinfección de hortalizas que cumplan con las recomendaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana correspondiente a las Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos (NOM-093-SSA1-1994) para el caso específico de ensaladas verdes crudas.
- ↳ Evaluar la aplicabilidad de las recomendaciones citadas en la Norma de Higiene y Sanidad correspondiente.
- ↳ Presentar información actualizada sobre las principales características de estos desinfectantes, así como los efectos colaterales de su uso en la salud del consumidor
- ↳ Estimar costos de aplicación.

## **2. RESUMEN Y JUSTIFICACIÓN**

En los últimos cuatro años, dada la globalización del mercado de los alimentos, la Secretaría de Salud en su Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios ha puesto especial interés en el área de Higiene y Sanidad tanto en el procesamiento como en el servicio de los alimentos. Así, hace dos años inició la vigencia de las Normas 093 y 120- SSA-1994 en las cuales se abarcan diferentes puntos referentes a las Prácticas de Higiene y Sanidad que deben llevarse a cabo en los establecimientos dedicados al manejo de alimentos. Las visitas de verificación sanitaria a los establecimientos donde se manipulan alimentos es un tema de mucha importancia actualmente en el área de Legislación Sanitaria.

Dentro de las Prácticas de Higiene y Sanidad, los procesos de limpieza y desinfección cobran especial importancia y por ello se encuentran en el mercado una amplia gama de productos químicos para la desinfección tanto de superficies vivas e inertes, como de frutas y hortalizas crudas que se destinan directamente al consumo humano ya que son productos que, debido a su forma de producción, contienen altas cargas microbianas que repercuten en su vida de anaquel y además pueden contener microorganismos patógenos para el consumidor. La NOM-093-SSA1-1994 (Bienes y servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos) posee en el cuerpo de la misma norma un apéndice informativo cuyo

contenido establece cuentas microbianas recomendables para ciertos alimentos, dentro de los cuales se encuentran las ensaladas verdes crudas.

Tomando lo anterior como base, el proyecto de tesis pretende evaluar comparativamente cuatro desinfectantes comerciales cuyos principios activos son representativos de los más comúnmente utilizados para dicho fin.

La evaluación comparativa consiste en evaluar experimentalmente el poder de reducción de carga microbiana inicial de la hortaliza mediante la determinación de cuenta estándar de microorganismos mesófilos aerobios y coliformes fecales (que son los que se especifican en la norma correspondiente) antes y después del proceso de lavado y desinfección de las hortalizas para verificar en primera instancia que todos los desinfectantes evaluados reducen las cuentas microbianas a niveles que se encuentran dentro de las recomendaciones que la norma establece y en segundo lugar comparar los resultados que se obtienen con cada desinfectante en comparación con los otros tres. La tesis se complementa con información bibliográfica acerca de las características generales, la posible toxicidad y los costos de aplicación de cada producto.

### **3. HIPÓTESIS**

Los desinfectantes comerciales sujetos a comparación actúan satisfactoriamente bajo las condiciones de concentración y tiempo establecidas por el fabricante en la etiqueta de cada producto de manera que al ser aplicados a las hortalizas, éstas presentarán cargas microbianas que se encuentren dentro de las recomendaciones establecidas en el apéndice informativo B de la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994 (Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos) correspondientes a ensaladas verdes crudas.

De la misma forma, las condiciones de uso señaladas en los envases para la aplicación de los desinfectantes, no deben significar una toxicidad importante para el consumidor.

## 4. INTRODUCCIÓN

Durante la producción, elaboración, transformación y almacenamiento de los productos vegetales tiene lugar un incremento o una reducción de la flora contaminante original y de aquella que se adquirió durante el transporte, por contacto con aparatos, a partir de los manipuladores de alimentos o por la adición de productos complementarios. En todo momento debe evitarse la suciedad y contaminación mediante medidas higiénicas, hay que tener en cuenta que el aire y el agua constituyen normalmente las principales fuentes de contaminación.

Como resultado de la actividad microbiana se producen en los alimentos diferentes transformaciones químicas a veces también físicas, que generalmente determinan una pérdida de calidad, del sabor y de consistencia y que en ocasiones alteran totalmente el alimento inutilizándolo como tal.

Los microorganismos productores de infecciones e intoxicaciones alimentarias tienen particular interés. La falta de higiene puede ser causa del desarrollo en muchos alimentos de tales gérmenes con la consiguiente producción de sustancias metabólicas tóxicas, cuya ingestión puede vehicular microorganismos patógenos para el hombre capaces de producir graves enfermedades infecciosas.

El control de las alteraciones posteriores a la cosecha de las hortalizas , así como la eliminación de la flora patógena de las mismas (para que puedan ser consumidas en fresco sin que represente un peligro) por medio de desinfectantes, se ha convertido en práctica habitual en la comercialización de estos productos ya que proporcionan a éstos calidad sanitaria y alargan su vida de anaquel.

Dadas estas ventajas, existe una amplia gama de desinfectantes comerciales con principios activos diferentes que son empleados para diversos fines en las grandes industrias de alimentos, en hogares y en restaurantes para la preparación de ensaladas crudas.

Sin embargo, algunos de los desinfectantes aplicados a hortalizas que van a ser consumidas en fresco, aunque destruyen los microorganismos, modifican en parte el color, alteran la textura e imparten al producto un sabor extraño. Por otro lado debe recordarse que muchos desinfectantes son tóxicos y sus residuos al ingerirlos con el alimento, atacan la salud del consumidor. El empleo de estas sustancias depende también de factores económicos.

En adición a lo anterior, debe mencionarse que algunos desinfectantes comerciales no eliminan suficientemente los microorganismos presentes en la hortaliza a las condiciones de concentración y tiempo que establece el fabricante, por lo que se debe profundizar en el estudio del poder germicida de este tipo de productos.

Por tanto, es necesario establecer comparaciones entre desinfectantes comerciales a manera de evaluarlos en cuanto a su poder germicida, así como obtener información bibliográfica de los posibles efectos de su uso en la salud

del consumo y evaluar su costo de aplicación. La presente tesis coadyuva a la selección de desinfectantes comerciales con base en las características antes expuestas.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. EL PAPEL DE LAS HORTALIZAS EN LA DIETA HUMANA.

Las verduras u hortalizas en general, son de poco valor nutritivo por la gran cantidad de agua que contienen y por su pobreza en proteínas y carbohidratos. En cambio, son altamente *remineralizadoras* por las sales que llevan. Estos alimentos, así como las frutas, son muy ricos en vitaminas, sobre todo si se ingieren en crudo, porque muchas de ellas se alteran o se destruyen por la acción del calor.

No obstante su escaso contenido calorimétrico, las hortalizas son de inmenso valor en la alimentación, sobre todo las hojas VERDES de la mayoría de ellas, que algunas personas desprecian y tiran aprovechando sólo las hojas más blancas. Por el contrario, deben comerse preferentemente las hojas más verdes (lechuga, escarola, col) e incluso algunas hojas exteriores de otras verduras (zanahoria, nabo, coliflor) siempre que sea posible y desde luego EN CRUDO (en ensaladas, triturados o batidos).

El color verde es debido a las CLOROFILA (proceso nutritivo de las plantas por influjo de la luz del sol). Esto confiere a las hojas verdes varias virtudes o propiedades para la nutrición del hombre, entre ellas las siguientes: contribuyen a la regeneración sanguínea y de los glóbulos rojos mejor que el hierro, ayudan a la asimilación de las proteínas, tienen una acción reguladora de la nutrición y

de la tensión arterial y además influyen en el equilibrio ácido-base del organismo.(11)

Las hojas más verdes contienen además bastantes vitaminas (A,C, ácido fólico) y abundan también en sales minerales. Todo esto, por supuesto, cuando se comen en crudo y lo más frescas o recientes posibles. La siguiente tabla presenta el valor calorimétrico y composición de algunas hortalizas. (11)(30)

**TABLA 1**  
**VALOR CALORIMÉTRICO Y COMPOSICIÓN DE ALGUNAS HORTALIZAS**  
Composición por 100 gramos

HORTALIZA	AGUA	GRASAS	PROTEINAS	H. DE CARBONO	SALES	CAL/Kg	TIEMPO DE DIGESTIÓN
Alcachofas	84	3	0.2	12	1.7	550	2
Calabaza	95	0.8	0.1	3.5	0.5	150	2
Cebolla	89	1.4	0.2	9	0.6	400	2.5
Col	92	1.6	0.1	5.8	0.5	250	2.5
Espinaca	92	2.2	0.3	4	1.8	230	2.5
Lechuga	95	1.2	0.2	3	0.9	180	2.5
Papas	78	2	0.1	19	1	800	2.5
Pimiento	93	1.2	0.2	5	1.5	240	3
Zanahoria	88	1.2	0.2	9	0.9	400	3

Por ello, en la cocina, para utilizar estos alimentos deben limpiarse con cuidado, quitando sólo las partes en mal estado, dañadas o leñosas y lavando la hortalizas cuidadosamente al chorro de agua fría. Las zanahorias, nabos y rábanos se lavan también así, pero frotándolas al mismo tiempo con un cepillo. Luego deben ser sometidas a un proceso de desinfección que las haga inocuas al consumo humano.

TABLA 2

**CONTENIDO VITAMÍNICO DE ALGUNAS VERDURAS**

<u>NOMBRE</u>	Retinol (mcg)	Acido ascórbico (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	Piridoxina (mg)	Acido fólico (mcg)	Cobalamina (mcg)
Apio	10	8	0.02	0.04	0.4	0.03	12	0
Berro	161	51	0.13	0.2	1.5	0.13	200	0
Cilantro	384	11	0.12	0.06	1	*	*	*
Col blanca	2	38	0.1	0.06	0.6	0.1	57	*
Espinaca	320	40	0.1	0.16	0.5	0.18	140	0
Lechuga orejona	44	6	0.14	0.05	0.3	0.06	34	*
Lechuga romana	44	7	0.05	0.03	0.3	*	136	0
Rábano chico	0	22	0.03	0.06	0.4	0.1	*	0

TABLA 3  
**CONTENIDO DE MINERALES DE ALGUNAS VERDURAS**

NOMBRE	Calcio (mg)	Hierro (mg)	Magnesio (mg)	Sodio (mg)	Potasio (mg)	Zinc (mg)
Apio	52	1.4	12	88	284	0.17
Berro	155	206	20	41	330	0.15
Cilantro	108	2.3	26	28	542	*
Col blanca	38	1.4	13	20	233	0.18
Espinaca	66	4.4	39	130	130	0.5
Lechuga orejona	25	0.6	11	9	264	0.5
Lechuga romana	16	0.4	8	11	290	0.5
Rábano chico	24	0.4	16	21	227	*

## 5.2. CONTAMINACIÓN DE ORIGEN DE LAS HORTALIZAS

Las frutas recolectadas del suelo o cerca de él, son propicias a la heterogénea flora de aquel, así como a los microorganismos aerobios. En general, el pH de las hortalizas está próximo al neutro, de modo que las bacterias y los hongos son lesivos.

Muchas de las principales afirmaciones hechas a propósito de la microbiología de las frutas, son válidas también para las verduras. Mientras que en su interior los tejidos vegetales se mantienen, en general, libres de gérmenes, en su superficie se adhieren numerosos microorganismos que llegan allí por contacto con el suelo, aire, agua y animales. La microflora de las verduras está formada ante todo por microorganismos de los siguientes géneros:

<b>BACTERIA</b>	<b>HONGOS</b>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Sclerotinia</i>
	<i>Rhizoctonia</i>

Las verduras crecen casi exclusivamente en contacto inmediato con el suelo, jugando un papel importante las contaminaciones con tierra, incluyendo aquí bacterias esporuladas como *Clostridium* o *Bacillus*. Con el polvo y con la lluvia los microorganismos del suelo llegan también indirectamente a las hortalizas por lo que las partes externas de la planta están mucho más cargadas microbiológicamente que el interior.(3)(24)

Las huertas regadas con aguas sucias constituyen un gran peligro. Pueden servir de vehículo de microorganismos intestinales como *Salmonella typhi*. Junto a estreptococos y enterobacterias, también pueden llevar a las hortalizas huevos de helmintos que producen auténticas epidemias. La transmisión de parásitos por hortalizas de consumo crudo, como la lechuga, constituyen un gran problema. Ello se debe al riego con aguas fecales lo cual está totalmente prohibido. (3)

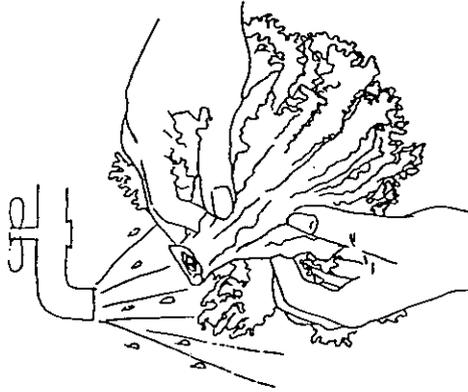
### **5.3. MANEJO DE LAS HORTALIZAS EN LA OPERACIÓN DE SERVICIO DE ALIMENTOS.**

Con la fruta y numerosas hortalizas, el lavado se emplea en la preparación que precede al envasado, congelación o al consumo del producto en crudo. El lavado suprime suciedad, disminuye la carga microbiana y elimina algunos insecticidas residuales.

Las hortalizas que se consumen en fresco, además del lavado, requieren de un proceso de desinfección con el fin de preservarlas por tiempos más largos y de que no representen un riesgo a la salud del consumidor. (12)

La Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1997 cuyo título es: "Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos", posee un apéndice informativo (B) en el que se establecen recomendaciones sobre cuentas microbianas de determinado tipo de alimentos y platillos listos para servirse y consumirse. Entre estas recomendaciones encontramos las correspondientes a ensaladas verdes crudas y los conteos máximos recomendables que aparecen son: mesófilos aerobios 150,000 UFC/g y coliformes fecales: 100 NMP/g.(36)

## PROCEDIMIENTO CORRECTO PARA EL LAVADO Y DESINFECCIÓN DE HORTALIZAS



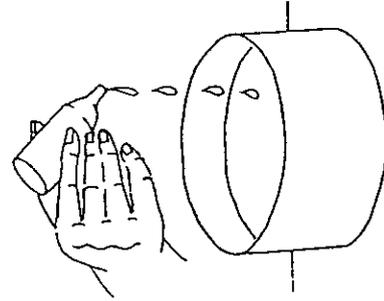
Poner la hortaliza bajo el chorro de agua



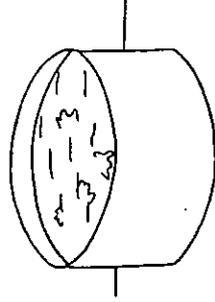
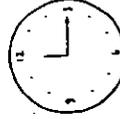
Lavar perfectamente hoja por hoja



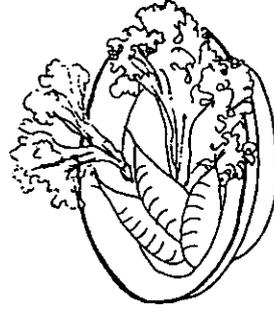
Eliminar el exceso de agua



Preparar la solución desinfectante según lo indicado en la etiqueta



Sumergir la hortaliza y esperar el tiempo indicado por el fabricante del producto para que se lleve a cabo la desinfección



Escurrir y servir al gusto

#### **5.4. MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS**

Desde siempre, los organismos indicadores han sido usados para determinar alguna condición microbiológica objetable de la comida, tal como, contaminación fecal, la presencia de patógenos potenciales, la proliferación potencial de los microorganismos en los alimentos, así como las condiciones sanitarias durante el procesamiento, almacenamiento o transporte de alimentos. Tompkin (1983) estableció que la razón para usar indicadores es monitorear los materiales crudos, condiciones de proceso y productos en varias etapas del proceso y distribución para prevenir los problemas microbiológicos potenciales.

Los microorganismos indicadores presentan las siguientes características:

- 1) Se encuentran como flora normal en la fuente de contaminación, independientemente de que haya o no microorganismos patógenos.
- 2) Son más resistentes y sobreviven en el agua más tiempo que los patógenos.
- 3) Su detección en el laboratorio es más rápida, fácil y confiable.

Durante los tratamientos de proceso de los alimentos, el microorganismo indicador debe comportarse de una manera similar a los patógenos, si éste fuese más estable, podría persistir mucho tiempo después de que los patógenos hayan sido destruidos.

Muchos grupos de microorganismos han sido sugeridos como organismos indicadores de contaminación fecal incluyendo bacterias, virus y protozoarios. En general, los virus y los protozoarios son más difíciles de enumerar que las bacterias. Bacterias tales como los coliformes, *Escherichia coli*, enterobacterias, enterococos, pseudomonas, clostridios, estafilococos, hongos y levaduras y la cuenta aeróbica en placa han sido sugeridos como organismos indicadores. (2)

Es necesario conocer la fuente usual, la asociación con patógenos entéricos, métodos para la enumeración, condiciones de desarrollo, sobrevivencia durante el almacenamiento y procesamiento y el significado de estos microorganismos en los alimentos o en un alimento en particular.

Entre los microorganismos indicadores de contaminación podemos agrupar en forma general a las bacterias coliformes, los microorganismos mesófilos aerobios, los hongos y levaduras y los estreptococos, entre otros.

#### **5.4.1. MESOFÍLICOS AEROBIOS**

El número de microorganismos aerobios mesófilos ("recuento en placa") encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad de los alimentos más comúnmente utilizados. Los mesófilos aerobios reflejan la exposición de la muestra a la contaminación en general, la existencia de condiciones favorables para la multiplicación del microorganismo y la presencia de materia orgánica. La flora aerobia mesófila resulta útil en muchos alimentos por diversos motivos, ya que, por ejemplo, indica si la limpieza y

desinfección y el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado de forma adecuada.

#### **5.4.2. COLIFORMES**

Como resultado del uso exitoso de los coliformes como indicadores en agua, han sido empleados como indicadores de posible contaminación fecal de los alimentos.

El grupo coliforme incluyen todos los bacilos gram negativos no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con formación de gas a 35°C en 48 hrs. Con respecto a la técnica de filtro de membrana, una definición alternativa de los coliformes es que son todos los organismos que producen colonias sobre agar eosina azul de metileno con un brillo metálico color verde en 24 hrs. incubando de 35 a 37°C.

El grupo coliforme incluye los géneros y especies *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. Hay pequeñas cantidades de otras especies que fermentan la lactosa y que pueden ser incluidos en la determinación de coliformes.

#### **Fuentes de contaminación.**

Los coliformes son comúnmente habitantes del tracto intestinal de animales (incluyendo el hombre) sin embargo las bacterias de este grupo son tanto de origen fecal como no fecal.

Estos organismos pueden encontrarse en grandes cantidades en el suelo contaminado con materia fecal. Bajo ciertas condiciones tienden a morir en el suelo pero con nutrientes apropiados y humedad pueden incrementar su número. El polvo del suelo puede diseminar los coliformes en la atmósfera. La lluvia acarrea la contaminación superficial del suelo a los ríos y lagos.

Los coliformes son encontrados en todo tipo de plantas. *Klebsiella* predomina en muestras obtenidas de granjas y ambientes de cultivo. Muchos de los vegetales frescos poseen cuentas de coliformes de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g.

Los coliformes incluyen tipos psicotróficos capaces de multiplicarse de 3 a  $10^\circ\text{C}$  o temperaturas de refrigeración. Crecen bien en presencia de carbohidratos y proteínas.

Los miembros del grupo coliforme pueden persistir en agua, suelo o en alimentos por largos períodos de tiempo.

#### Significado de los coliformes.

Existen aspectos buenos y malos sobre utilizar a los coliformes como organismos indicadores. Desde que los miembros de este grupo se han encontrado en el intestino de los humanos y de los animales, su presencia podría deberse a contaminación fecal y los patógenos entéricos podrían estar presentes.

Desafortunadamente, como algunos miembros no tienen origen fecal, la presencia de esos miembros en los alimentos podrían no indicar contaminación fecal o patógenos entéricos potenciales. Sin embargo, se puede orientar este

predicamento diciendo que los coliformes no fecales dan un margen de seguridad extra.

Debido a que los coliformes pueden multiplicarse fuera del cuerpo de animales, su presencia en cantidades elevadas en un producto alimenticio podría no ser indicativo de contaminación original, pero sí de una inapropiada manipulación, la cual promovió la multiplicación de los organismos.

Si un patógeno entérico está presente, un buen microorganismo indicador de contaminación fecal debe estar presente (2)(42)

#### **5.4.3. COLIFORMES FECALES.**

Como respuesta a la crítica de los coliformes no fecales como organismos indicadores, se ha sugerido el determinar únicamente los coliformes fecales. En 1904, Eijkman describió que los coliformes intestinales producen gas en caldo de lactosa incubado a  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  y los coliformes de origen no fecal no.

Los coliformes fecales pueden ser definidos como organismo gram negativos, no esporulados, facultativos que fermentan la lactosa a  $44.5^{\circ}\text{C}$ . Los coliformes fecales consisten principalmente en *E. coli*, pero pocos miembros de los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* pueden producir gas en caldo lactosa a  $44.5^{\circ}\text{C}$ .

### Fuentes de contaminación.

Los coliformes fecales son relativamente específicos de la materia fecal de animales de sangre caliente. Los coliformes fecales fueron reportados en productos frescos. También los efluentes tanto de plantas procesadoras de papa como de frutas y vegetales contenían coliformes fecales. Estos organismos, pues, pueden ser encontrados en animales y plantas o en alimentos derivados de los mismos, así como en suelos y aguas contaminadas.

### Crecimiento y sobrevivencia.

A pesar de que los coliformes fecales son asociados principalmente con el contenido intestinal y los desechos de los humanos y animales de sangre caliente, ellos pueden multiplicarse en ambientes adecuados fuera de los intestinos. Bagley y Seidler (1977) reportaron que 49% de los *K. pneumoniae* crecieron en caldo EC a 44.5°C, y 16% fueron coliformes fecales positivos.

### Significado de los coliformes fecales.

Los coliformes fecales están estrechamente más relacionados con la contaminación fecal que los coliformes totales.

Los organismos pueden estar presentes en una superficie de trabajo sanitizada inapropiadamente en una planta procesadora. En este caso, su presencia podría reflejar la calidad de la sanitización y no la contaminación directa del producto. (2)(42)

#### **5.4.4. ESTREPROCOCOS**

Los Streptococos de origen fecal son más abundantes que los coliformes en el tracto intestinal y heces de los animales, pero sobreviven menos que los coliformes porque en agua prácticamente no se multiplican, por lo tanto si predominan en el agua indica contaminación fecal proveniente de animales o contaminación relativamente reciente.

Si relacionamos el número de coliformes con el número de Streptococos de origen fecal, obtendremos la procedencia de la contaminación, esto es si la relación es mayor de 1 es de origen humano y si es menor a 1 es de origen animal.

## **5.5. DIFERENTES DEFINICIONES DEL TÉRMINO "DESINFECCIÓN" "DESINFECTANTES" vs "SANITIZANTES"**

La Norma Oficial Mexicana correspondiente a las Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se expenden en establecimientos fijos define DESINFECCIÓN como la reducción del número de microorganismos presentes en una superficie o alimento vegetal, a un nivel que no de lugar a contaminación nociva mediante agentes químicos, métodos físicos o ambos. Así pues, los agentes químicos que son capaces de cumplir con esta misión son llamados DESINFECTANTES. (36)

El Códex Alimentarius en su Código Internacional Recomendado de Prácticas Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969) establece en su apartado correspondiente a definiciones que la DESINFECCIÓN es la reducción sin menoscabo de la calidad del alimento y mediante agentes químicos y/o métodos físicos higiénicamente satisfactorios, del número de microorganismos a un nivel que no dé lugar a contaminación nociva del alimento. Con respecto al término LIMPIEZA establece que se refiere a la eliminación de tierra, residuos de alimentos, polvo, grasa u otra materia objetable.(6)

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha definido tres categorías de tratamientos antimicrobianos para superficies basados en su nivel de efectividad:

1.-Un ESTERILIZANTE es un agente que destruye o elimina todas las formas de vida, incluyendo formas vegetativas, esporas bacterianas, hongos y virus. Los esterilizantes incluyen el dióxido de etileno, glutaraldehído y ácido peroxiacético. El calor es usado también para esterilizar, tanto en seco como usando vapor en máquinas llamadas autoclaves. Este tratamiento predomina en la industria médica y en los laboratorios.

2.-Un DESINFECTANTE es un agente que matará el 100% de los organismos que pueden ocasionar infecciones, tales como hongos o bacterias y no necesariamente matará esporas bacterianas sobre superficies inanimadas. La desinfección es un proceso menos letal que la esterilización. Los productos desinfectantes según la EPA han sido divididos dentro de dos grandes categorías: desinfectantes para hospital usadas en instrumentos médicos y dentales, así como en paredes, pisos y camas; y la segunda categoría son los desinfectantes generales que son usados en casas, albercas y para la desinfección de aguas.

3.-Un SANITIZANTE es una sustancia que reduce la contaminación microbiana sobre una superficie a niveles que son consideradas como seguros para la salud pública.

Así como las otras categorías, el término "Sanitizante" es regulado por la EPA y requiere resultados de análisis de laboratorio para ser aprobados y utilizados.

Los sanitizantes se clasifican como:

*Sanitizantes de superficies que entren en contacto con los alimentos que no requieren enjuague.* Esta categoría incluye: sanitizantes de enjuague para equipo y utensilios usados en las plantas procesadoras de alimentos y bebidas, así como establecimientos de servicio de alimentos.

*Sanitizantes de superficies que no entran en contacto con alimentos.* Esta categoría incluye sanitizantes de aire, aditivos para lavado de ropa y sanitizantes de baño.

Existen especificaciones de la EPA para cada una de estas dos categorías.(41)

Además de las definiciones establecidas por organismos gubernamentales y normas internacionales, autores de diversos artículos relacionados con el tema, dan sus propias definiciones:

Los **SANITIZANTES** son aquellos agentes químicos que tienen la aptitud de reducir a niveles insignificantes la tasa de patógenos y demás microorganismos contaminantes, pudiendo, en algunos casos, llegar a eliminarlos por entero. También se denominan saneadores o agentes higienizantes que se aplican en la etapa de la limpieza microbiológica de las superficies.

Aunque los sanitizantes son productos que tienen acción desinfectante, esta denominación no es apropiada. La denominación desinfectante debe reservarse para los productos farmacéuticos que se aplican a los humanos o a los animales en las heridas para reducir una infección. En el caso de las superficies de los

equipo, de las paredes, de piso, de los materiales de envasado o de los ambientes, o algunos productos animales o vegetales, no es correcto decir que se infectan, sino que se contaminan y por lo tanto los sanitizantes o saneadores son, propiamente, descontaminantes.(31)

## 5.6. METODOS DE DESINFECCIÓN

Aunque la desinfección da lugar a la reducción del número de microorganismos vivos, generalmente no mata las esporas bacterianas. Una desinfección efectiva no mata necesariamente todos los microorganismos, pero reduce su número a un nivel al que razonablemente puede suponerse que no perjudica a la salud. Ningún procedimiento de desinfección puede dar unos resultados plenamente satisfactorios, a menos que a su aplicación le preceda una limpieza completa.

Para la eliminación de los microorganismos contaminantes se pueden distinguir tres métodos:

- 1.Tratamiento con altas temperaturas
- 2.Tratamientos con algunos tipos de radiación
- 3.Tratamientos con un agente químico sanitizante.

Los agentes químicos sanitizantes en solución son importantes cuando por razones técnicas o de costo no es posible el uso de altas temperaturas o radiaciones para eliminar la contaminación microbiana.

Los agentes químicos sanitizantes se pueden encontrar en los tres estados físicos: sólidos, líquidos o gaseosos, pero el uso continuado de algunos de ellos puede dar lugar a la generación de microorganismos resistentes.

Los desinfectantes deben seleccionarse de acuerdo con los microorganismos que han de eliminarse, el tipo de alimento que se elabora y el material de las superficies que entran en contacto con el alimento y, cuando sea apropiado los criterios que se mencionan adelante para la aplicación de un desinfectante en particular. La selección depende también del tipo de agua disponible y el método de limpieza empleado.(6)

Por ejemplo, se reporta que los compuestos cuaternarios de amonio son menos eficaces sobre bacterias gram negativas que sobre las gram positivas y se mencionan que en realidad, permiten la sobrevivencia de algunas bacterias coliformes y pseudomonádáceas, incluso cuando se usan a la concentración máxima permitida, sin efectuar una aclaración final con agua, lo cual no debe omitirse por su toxicidad.(31)

## **5.7. PARÁMETROS QUE AFECTAN LA EFECTIVIDAD DE UN DESINFECTANTE.**

La acción microbicida de los sanitizantes líquidos, o sea en solución, dependen de las condiciones de uso:

- concentración del principio activo
- tiempo de contacto
- temperatura
- pH
- dureza del agua
- clase y cantidad de materia orgánica presente
- facilidad y uniformidad de aplicación
- características de la suspensión o de la superficie
- tipos de microorganismos a destruir
- tasa o grado de desarrollo de los mismos.

Los factores que se indican a continuación afectan a la eficiencia de los desinfectantes:

*CONCENTRACIÓN Y TIEMPO:* Todos los desinfectantes químicos necesitan un tiempo mínimo de contacto para que sean eficaces. Este tiempo de contacto mínimo puede variar de acuerdo al principio activo.

*TEMPERATURA DE LA SOLUCIÓN:* En general, cuando más alta sea la temperatura, más efectivo será la desinfección. Es preferible usar, por tanto, una solución desinfectante tibia o caliente que una fría. Sin embargo, hay

algunas limitaciones en cuanto a las temperaturas que hay que aplicar, por lo que habrá que seguir las instrucciones del fabricante, ya que éstas consideran el principio activo del producto y su termoestabilidad. A temperaturas superiores a 43°C (110° F) los yodóforos liberan yodo, lo que puede manchar los materiales. La acción corrosiva del cloro aumenta cuando se usan soluciones calientes de hipoclorito.

*INACTIVACIÓN DEBIDA A LA SUCIEDAD:* La presencia de suciedad y otras materias de sedimentación reducen la eficiencia de todos los desinfectantes químicos. Cuando hay mucha suciedad, los desinfectantes no surtirán efecto alguno. Por lo tanto, la desinfección con sustancias químicas deberá efectuarse después de un proceso de limpieza o en combinación con el mismo.

El pH, la dureza del agua y el tipo de microorganismos a destruir son factores que afectan de diferente forma la desinfección dependiendo del tipo de desinfectante de que se trate.(6)

Las condiciones físicas y químicas de los sanitizantes influyen en la reactividad del principio activo frente a los microorganismos y esto puede ser en forma positiva o negativa.

La reactividad del principio activo de los sanitizantes es el sustento que determina el grado de la potencia microbicida. La potencia microbicida y la reactividad de un sanitizante son dos conceptos relacionados pero diferentes.

La reactividad es la aptitud para eliminar microorganismos, mediante mecanismos particulares para cada sanitizante; lo que les confiere diferencias importantes y significativas relativas a su forma de actuar, o sea que es un concepto cualitativo.

La potencia microbicida informa acerca de la concentración y tiempo de contacto que requiere un sanitizante para ser efectivo y por tanto es un concepto cuantitativo. La relación entre ambos conceptos está en que la mayor potencia microbicida se obtiene de una forma mejor de reactividad.(26)

En otras palabras, la reactividad de un desinfectante está dada por la molécula de su principio activo y la forma en que ésta actúa sobre los microorganismos para destruirlos. Esta forma de destrucción puede estar dada por reacciones de oxidación de materiales celulares, combinación con sustancias indispensables para el metabolismo celular, bloqueo enzimático, disolución y destrucción de membrana celular o mutación de material genético. Por eso se dice que es un concepto cualitativo. Obviamente, mientras más reactiva sea la molécula del principio activo de un desinfectante para atacar las células microbianas, la cantidad (concentración) de ésta que se requerirá para eliminar una cierta cantidad de microorganismos y el tiempo que necesitará para actuar será menor, y esto se traduciría en una mayor potencia microbicida.

## **5.8. MÉTODOS ANALÍTICOS DE EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS GERMICIDAS**

Existen varias pruebas de laboratorio para evaluar el poder germicida de los agentes químicos frente a los microorganismos. Estas pruebas miden el grado de destrucción microbiana en condiciones preestablecidas, considerando tres factores fundamentalmente:

- ↳ Microorganismos
- ↳ Dosis recomendada de la sustancia química
- ↳ Condiciones de aplicación

Dentro de los métodos analíticos para evaluación de desinfectantes, son tres los que destacan:

### **COEFICIENTE DE FENOL**

Este procedimiento se aplica al ensayo de desinfectantes miscibles en agua y que ejercen su acción microbiana de modo semejante al fenol; el ensayo se realiza como sigue:

A una serie de diluciones del desinfectante que se ensaya (5 ml / tubo) se añaden 0.5 ml de un cultivo en caldo de 24 hrs del organismo testigo. Se colocan a continuación todos los tubos, junto con otro que contiene como agente germicida el fenol en una concentración de 5% p/v (AOAC), en un baño de agua a 20°C. A intervalos de 5, 10 y 15 minutos se hacen subcultivos, pasando una asada de cada solución a tubos con medio esterilizado. Se incuban todos los tubos y se observa el crecimiento de cada uno. La máxima

dilución del desinfectante que mata al organismo testigo en 10 minutos, pero no en 5, se divide por la máxima dilución de fenol que logre el mismo efecto.

### **CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA**

Es una técnica de diluciones del agente germicida en agar que se emplea básicamente para pruebas de susceptibilidad a antibióticos y permite conocer la *concentración mínima inhibitoria* del agente en estudio para un microorganismo determinado. Para llevar a cabo esta prueba se preparan diluciones de la sustancia germicida a evaluar. A matraces con medio fundido mantenido a 45°C se les agrega las cantidades necesarias de las diluciones del agente para obtener las concentraciones de prueba, se vierten en cajas de petri estériles y se dejan solidificar. Las diferentes diluciones se inoculan por punto o por estría y se incuban en las condiciones óptimas del microorganismo de prueba.

Al examinar las placas pueden registrarse semicuantitativamente los diferentes resultados, pero el dato más importante es la concentración mínima que inhibe por completo el desarrollo. La confiabilidad de esta técnica puede ser muy alta si todas las condiciones están estandarizadas.

### **DIFUSIÓN EN AGAR**

Consiste en colocar discos de papel filtro impregnados con las sustancias en estudio sobre una placa inoculada con el microorganismo problema. Lo más importante es que exista un halo de inhibición, pero también se considera que el diámetro del halo es proporcional a la susceptibilidad del microorganismo y a la concentración del agente, lo que le permite aplicar la técnica con fines analíticos. (29)(25)

Cada uno de estos métodos aportan información valiosa sobre el poder germicida de diferentes sustancias químicas que deseemos evaluar, sin embargo, considerando que existen diversos factores que pueden afectar esta capacidad y que las condiciones normales en las que se aplican los desinfectantes comerciales en hortalizas no están estandarizadas, resulta interesante evaluarlos tal como se usan cotidianamente y directamente sobre estos alimentos vegetales que presentan una gran variedad de microorganismos y que a veces pueden significar por si mismos una fuente de inhibición.

## **6. DESINFECTANTES COMUNEMENTE UTILIZADOS**

En los Estados Unidos, existen ocho clases generales de sanitizantes aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para utilizarse como sanitizantes para superficies que tengan contacto con los alimentos que no necesitan enjuague:

- ⇒ Cloro
- ⇒ Dióxido de cloro o mezcla de especies de oxígeno
- ⇒ Yodóforos
- ⇒ Compuestos cuaternarios de amonio
- ⇒ Sanitizantes ácidos-aniónicos
- ⇒ Sanitizantes de ácidos carboxílicos
- ⇒ Compuestos de peroxiácidos
- ⇒ Fenólicos(41)

En México, los sanitizantes en solución, más comúnmente usados son: los compuestos de cloro, los compuestos de yodo, las soluciones metálicas y las sales cuaternarias de amonio. A continuación se presentan las propiedades físicas y químicas más relevantes de ellos: (41)

## 6.1. CLORO

Los desinfectantes más utilizados son los que contienen cloro. La eficiencia del cloro como desinfectante viene dada por seis factores:

- ☞ Tipo y concentración del compuesto de cloro utilizado
- ☞ pH
- ☞ temperatura
- ☞ período de contacto
- ☞ tipos de organismos
- ☞ presencia de material orgánico.

Los compuestos de cloro son utilizados en varias fases del tratamiento de los alimentos. Se añaden al agua de lavado y transporte hidráulico de las materias primas que van a ser tratadas, al agua de limpieza y desinfección de equipo de manipulación del producto alimentario y al agua que se utiliza para el enfriamiento de las latas esterilizadas por calor.

La cloración en el interior de la planta se realiza por inyección de cloro gaseoso o de hipoclorito de sodio líquido en la entrada de agua a la planta por medio de un distribuidor automático o por medio de la dosificación manual del desinfectante en las cisternas y/o tanques de almacenamiento.(47)

El cloro disponible activo actúa frente a los microorganismos por combinación, pero se combina sin discriminación con el material protéico ya sea de microorganismos o de alimentos, por lo que hay que agregar los compuestos de

cloro hasta la satisfacción de las dos demandas, punto que se conoce como punto de ruptura y que se reconoce por cierta cantidad remanente de cloro activo, es decir, una cantidad de cloro residual disponible de 2 a 20 mg/l. Este cloro libre disponible se encuentra en forma de ácido hipocloroso y de iones hipoclorosos. El cloro combinado residual es cloro que ha reaccionado con aminas (cloraminas). El cloro total incluye el cloro libre y el cloro combinado.(31)

La desinfección con soluciones cloradas asegura una acción bactericida del cloro sobre el equipo de preparación del alimento. El uso de rociadores de agua clorada en puntos escogidos disminuye o elimina la acumulación de lodos microbianos y de olores anómalos en las plantas industriales. La carga microbiana total de un producto acabado tiende a ser más baja en las plantas que disponen de un sistema incorporado de cloración, no obstante esta medida no puede sustituir las demás prácticas sanitarias necesarias en la planta.

Sin duda, los agentes a base de cloro más ampliamente utilizados en el campo del proceso de los alimentos son los hipocloritos.

Los hipocloritos son efectivos en diluciones relativamente elevadas y contra un amplio espectro de bacterias y esporas bacterianas, así como hongos, levaduras y algunos virus. En general, son considerados como más efectivos contra las bacterias gramnegativas que contra las gram positivas.(47)

A concentraciones moderadamente fuertes, los hipocloritos pueden irritar la piel y producir un olor inadmisibles, y en algunos casos introducir sabores inaceptables a los alimentos expuestos a estos desinfectantes. La presencia de compuestos orgánicos y oxidantes reduce la eficiencia de los hipocloritos.

Debido a su elevado potencial corrosivo, no deberían utilizarse a altas temperaturas ni dejarse en contacto con las superficies de la maquinaria, durante periodos demasiado largos. Se sabe que las formas inorgánicas son más corrosivas que las orgánicas y pueden afectar adversamente a plásticos y gomas.(47)

Los compuestos a base de cloro son efectivos a bajas temperaturas y no son sensibles a ella como otros sanitizantes. Tienen la ventaja de ser relativamente baratos y a veces se prefieren porque no hacen espuma. No tienen un efecto antimicrobiano residual, lo cual puede considerarse como una desventaja.

El cloro es inestable y se disipa fácilmente de las soluciones. Además de la presencia de materiales orgánicos, pierde actividad en presencia de luz, aire y metales.

Debido a que los productos de cloro se degradan con el tiempo, las soluciones se necesitan preparar más frecuentemente que si se utilizaran otros sanitizantes y debe estarse monitoreando y ajustando la concentración continuamente.(41)

La forma de acción como desinfectante de los hipocloritos se describe a continuación:

El hipoclorito de sodio reacciona con el agua para formar ácido hipocloroso e hidróxido de sodio:



La solución es, pues, alcalina, y el ácido hipocloroso forma por ionización iones hidrógeno y iones hipoclorosos:



El ácido hipocloroso (HOCl) y el ion hipocloroso (OCl<sup>-</sup>) poseen propiedades germicidas. En solución ácida, el ácido hipocloroso tiende a permanecer en la forma HOCl, que es la forma más bactericida del cloro. De ahí que la eficiencia bactericida de las soluciones de cloro sea más elevada en soluciones ácidas que en soluciones alcalinas. Ésta además aumenta gradualmente con la temperatura hasta un punto en que se empieza a liberar gas cloro.

Todos los productos clorados, independientemente del tipo que sea: cloro elemental, hipocloritos u organoclorados, forman ácido hipocloroso (HClO) en solución. La cantidad de HOCl que se forma depende del pH de la solución, mientras más bajo sea, la cantidad de HOCl será mayor. Sin embargo, cuando el pH decrece a valores menos a 4, se incrementará la formación de gas cloro, Cl<sub>2</sub> el cual es tóxico y corrosivo. El cloro es mucho más estable a pH mayores pero es mucho menos efectivo.

El cloro no es afectado por las sales de las aguas duras, a menos que éstas causen una subida en el pH de la solución. El factor que tiene mayor efecto en la efectividad es el pH de la solución, por eso algunos productos son formulados agregando buffers de pH que lo mantengan entre 6 y 7,5.(31)(41)

Con respecto al mecanismo de acción germicida del los compuestos a base de cloro se tiene lo siguiente:

El cloro es un agente fuertemente electrofílico y oxidante y puede reaccionar con los ácidos nucleicos así como con las proteínas. El mecanismo de su acción para matar o inactivar microorganismos depende de varias variables. Las velocidades de difusión dentro de las células y la reacción con los componentes celulares son importantes variables y dependen de las condiciones fisiológicas del organismo, la concentración y naturaleza del cloro activo (pH) y la temperatura. El ácido hipocloroso, la forma más activa, puede fácilmente atravesar la membrana celular debido a su tamaño molecular tan pequeño y su neutralidad eléctrica. En general, en orden descendiente de actividad germicida las moléculas de cloro activo podrían mencionarse como sigue: cloro gas, HOCl, OCl<sup>-</sup>, dicloramina, monocloramina y cloraminas orgánicas. Estas últimas y otras especies orgánicas que contienen cloro prácticamente no tienen efecto microbicida, sin embargo se sabe que las cloraminas inorgánicas si son activas contra las bacterias.

Se cree que la respiración bacteriana toma lugar en la superficie celular, con azúcares simples y compuestos relacionados en la parte exterior de la pared celular y enzimas y coenzimas en la parte interna. Los agentes biocidas oxidantes como los hipocloritos pueden reaccionar con estas enzimas y coenzimas causando la disrupción del proceso respiratorio. Recientes estudios que involucran reacciones del cloro dentro de la célula sugieren que la acción bactericida resulta también de la inhibición de varias enzimas por combinación con sus grupos sulfhidrilo y otras enzimas y aminoácidos susceptibles a la

oxidación. En estudios con *Escherichia coli*, la inhibición de la oxidación de la glucosa fue observada paralelamente al porcentaje de bacterias destruidas. Se concluyó pues, que la muerte celular resulta de la inhibición de la aldosa y trifosfatasa dehidrogenasa, las cuales son enzimas asociadas con el metabolismo de la glucosa. La supresión de la actividad de la glutamato descarboxilasa por cloro fue observada por Skidal'skaya.(4)

Según Rosenkrantz (1973) el NaOCl es capaz de reaccionar también con el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células vivas. Esta sustancia química causa mutaciones de *Salmonella thiphimurium* por oxidación de partes de pirimidina y purina.

El efecto del cloro sobre las esporas de *Clostridium* y *Bacillus* fue investigado por Wyatt y Waites (1975), quienes descubrieron que el cloro rompe la corteza exterior de la spora y extrae la proteína al combinarse con ella con lo cual se inactiva el mecanismo de la germinación, mientras que en las esporas que permanecen capaces de germinar se produce suficiente daño para impedir su proliferación. La resistencia térmica de las esporas disminuye con el tratamiento clorado. Así, el tratamiento de las esporas de *B. cereus* con una solución al 0.25% de NaOCl a 20°C durante 19.5 minutos produce una pérdida de viabilidad del 99% (Kulikovsky y Cols. 1975). Estos observadores notaron que las esporas perdían iones calcio, ácido dipicolínico, ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico. El efecto principal era la degradación de la capa exterior de la spora con la consiguiente disrupción de las barreras impermeables normales.

Por lo general, las esporas de *Bacillus* son más resistentes a la acción del cloro que las de *Clostridium*.

Más recientemente, se encontró que el cloro afecta el ADN y RNA viral, así como otros componentes proteicos. Dependiendo de las condiciones de clorinación pueden darse reacciones colaterales a la oxidación de grupos sulfhidrido incluyendo reacciones de sustitución en los anillos de tirosina e histidina, oxidación de triptofano y bajo condiciones ácidas, desdoblamiento de péptidos. La gran resistencia de ciertos virus al cloro libre en comparación a la de las bacterias entéricas ha sido atribuida al daño a las enzimas. Datos sobre inactivación de virus por calor y por algunos agentes químicos indican que la inactivación involucra la desnaturalización de sus cápsides proteicas mientras que el ácido nucleico central permanece inafectado. La inactivación a través de la desnaturalización de la cubierta proteica no necesariamente completa la destrucción del virus ya que el ácido nucleico podría ser aún infeccioso. Se ha demostrado que la desnaturalización proteica es más difícil de llevarse a cabo que la destrucción de grupos tion y de otros componentes por agentes oxidantes. Esto explica en parte por qué para eliminar virus se necesitan concentraciones de al menos 20 y 70 veces más altas de HOCl y I<sub>2</sub> respectivamente de las que se requieren para eliminar bacterias. La gran resistencia de los virus al cloro y otros agentes químicos podrían también ser función de los sitios sensibles, las bacterias son más grandes y probablemente poseen mayor cantidad de sitios sensibles a los desinfectantes que los virus. Sin embargo, aunque la resistencia de los virus hacia el cloro varía enormemente, existen datos que sugieren que muchos virus entéricos son considerablemente más resistentes al cloro que las bacterias.(4)

Para la desinfección de equipo las agencias reguladoras suelen aconsejar una concentración de cloro de 100 a 200 mg/l con un tiempo de tratamiento de 2 minutos. Una solución de 200 mg/l de hipoclorito (concentración máxima permitida por la FDA para desinfección de superficies de contacto con alimentos) puesta en circulación durante 2-5 minutos en las tuberías de la planta industrial suele dar resultados satisfactorios para la desinfección de las tuberías en la misma planta. Los alambiques y depósitos cerrados pueden ser desinfectados por aspersión de una solución de cloro (200 mg/l). Los tanques y depósitos abiertos pueden ser desinfectados por aspersión del desinfectante bajo presión de las superficies interiores.

El uso del cloro ha sido muy criticado por sus reacciones con los compuestos orgánicos y el consiguiente potencial mutagénico y carcinogénico resultante.

Un artículo publicado en el National Enquirer de los Estados Unidos afirma que: El agua con cloro consumida por más de 100 millones de Norteamericanos todos los días, es una de las causas mayores de cáncer en los Estados Unidos según reconocidos investigadores.... "Aquellos quienes toman agua en la que el cloro ha sido incluido corren el 44% de riesgo de morir de cierto tipo de cáncer, a diferencia de aquellos que usan agua sin cloro, de acuerdo al nuevo estudio del gobierno de los Estados Unidos..."

La Revista también describe que el cloro se hace mortal cuando se mezcla con material orgánico en agua y produce un material químico llamado cloroformo conocido como causante de cáncer. En 1975 el EPA reportó que el agua para beber en 18 ciudades se encontraron con cloroformo y las siguientes pruebas

llevadas por el National Cancer Institute demostraron que el cloroformo causa cáncer en pruebas hechas en animales de laboratorio. La misma EPA sugirió un límite de 100 partes por billón de cloroformo en el agua aunque éste aún puede ser muy alto.

Ya que los compuestos a base de cloro se utilizan en la desinfección de agua y de alimentos de consumo directo como las hortalizas en fresco, es imprescindible eliminar el cloro residual de los mismos, debido al sabor y olor inadecuados, que adquieren al ser tratados.(47)

Además, existe mucha controversia sobre el impacto ambiental como resultado de la formación de subproductos organoclorados potencialmente tóxicos. Esto es debido al hallazgo de que el cloro reacciona con materiales orgánicos naturalmente presentes en el agua (principalmente ácidos orgánicos), lo cual resulta en la formación de compuestos trihalometanos carcinogénicos suspendidos. (THM's).(41)

### **6.1.1. TIPOS DE DESINFECTANTES A BASE DE CLORO**

El hipoclorito de sodio es el más utilizado como sanitizante por su bajo precio. Los hipocloritos comerciales disponibles son soluciones de hipoclorito de sodio ( $\text{NaHClO}$ ) que contienen de 5 a 12% de cloro activo.

Las soluciones comerciales de hipoclorito de sodio, durante el transporte y almacenamiento, pierden por evaporación el cloro disponible, por tanto son

difíciles de manejar y dosificar, las diluciones que se preparan para su aplicación no son confiables en cuanto al contenido real de cloro activo.

Se pueden superar algunas desventajas usando sales más estables de cloro, pero resultan más costosas.

El fosfato trisódico clorado (CTSP) tiene una forma cristalina estable que se disuelve fácilmente en agua para dar soluciones buffer de hipoclorito que no son corrosivas. El fosfato trisódico clorado y bromado da soluciones con buena acción bactericida.

El hipoclorito de calcio, en polvo o granulado, es explosivo al 70-80% pero ya se desarrolló un polvo con 65% de cloro activo no explosivo. Si no se sabe usar, puede provocar incrustaciones en las tuberías y el equipo cerrado.

Otros compuestos son los orgánicos clorados, que tienen potencia similar a las soluciones de hipoclorito: la Cloramina T, el Halazone, la Succicloramida, el ácido dicloroisocianúrico y su sal de sodio, y el ácido tricloroisocianúrico. Además de estos compuestos, se han utilizado igualmente mezclas de cloro y bromo y el dióxido de cloro como agentes desinfectantes.(31)

## 6.2. DIOXIDO DE CLORO

El dióxido de cloro es un gas soluble en agua y no forma ácido hipocloroso como sucede con otros sanitizantes a base de cloro. Es un químico fuertemente oxidante, se reporta que es 2.5 veces más fuerte que el cloro.

La solución concentrada de dióxido de cloro es un sanitizante de amplio espectro que se ha usado con éxito en la prevención de contaminaciones e infecciones en áreas estériles de laboratorios farmacéuticos, hoteles, hospitales, supermercados; en toda la industria de los alimentos tiene aplicaciones en el lavado de equipo, la limpieza microbiológica, en recepción de materias primas, en las áreas limpias, en toda la planta y también adicionados al producto alimenticio, por ejemplo en la purificación del agua o para la desinfección de frutas y hortalizas.

El empleo en alimentos ha sido aprobado en los Estados Unidos de Norteamérica y en otros países. Su uso es internacional.

En México fue aprobado por la SSA en decreto publicado en el Diario Oficial de la Federación el 15 de febrero de 1958.

Se dice que es un sanitizante de amplio espectro porque su reactividad para eliminar microorganismos específicos en suspensión (líquida o en el ambiente) o en superficies (equipos, pisos, paredes, utensilios) abarca: bacterias, esporas, microbios resistentes, hongos, levaduras, algas, limos, tómulas, virus,

huevoillos de *Ascaris lumbricoides*, quistes de amibas, bacterias halófilas y termófilas.(31)

Puede afirmarse que destruye toda clase de microorganismos. Su gran reactividad y por tanto su potencia microbicida es debida a las propiedades físicas y químicas de su molécula, que reúne la acción propia del cloro y la acción oxidante del oxígeno, con la particularidad muy relevante de que el dióxido de cloro tiene un mecanismo de actividad diferente a los compuestos que liberan cloro, la molécula de dióxido de cloro estabilizada en solución no reacciona con la materia orgánica en forma indiscriminada, ni se desperdicia ni se consume en esta forma, solo actúa directamente sobre los microorganismos y precisamente penetra a través de su membrana celular, disparándose su efecto por acción de los metabolitos ácidos que la célula excreta en la superficie y en esa forma se efectúa la ruptura de la molécula de dióxido de cloro, liberando simultáneamente el cloro y el oxígeno, sumando sus acciones microbicidas directamente sobre los microorganismos y por su efecto residual, esto mismo se repite a medida del ingreso y desarrollo de los microorganismos contaminantes.

Por estas razones se considera al dióxido de cloro como un agente microbicida superior, no solo en comparación con los compuestos que liberan cloro, sino en relación con los demás sanitizantes. El dióxido de cloro no se combina con materia orgánica ni inorgánica, por tanto la solución estabilizada no pierde su contenido en  $\text{ClO}_2$  y se puede dosificar a las diluciones que se necesiten con seguridad. No origina olores ni sabores.

La solución estabilizada al 10% de dióxido de cloro es menos corrosiva al acero inoxidable que una solución de hipoclorito y tiene acción residual. Se presume que tiene 260% más poder microbicida que el cloro. Es menos sensible al pH actuando entre pH 6 a 10, en efecto en cierto grado, su efectividad se incrementa con el incremento de pH. Es de fácil manejo y se puede aplicar en todas las formas: por enjuague, por rociado y por inmersión, no desprende gases ni vapores, es soluble en agua en todas las proporciones, no afecta las propiedades organolépticas de olor y sabor de los alimentos ni afecta el valor nutricional de los mismos, actúa aún en agua duras (300 ppm Ca) y es altamente estable durante largos períodos, si se conserva a temperatura menor de 50°C.(31)

Actúa también como desodorante porque destruye los malos olores en su origen.

Es económico por su gran efectividad a bajas concentraciones y por su permanencia residual. No requiere que se enjuaguen las superficies después de su aplicación. Una propiedad importante es que las soluciones de dióxido de cloro disuelven incrustaciones inorgánicas y orgánicas de tuberías.(31)

En cuanto a concentraciones, el dióxido de cloro es primeramente utilizado para desinfección de agua potable a nivel que no exceda 1 ppm. Las concentraciones en que normalmente se aplica el dióxido de cloro son de 1-10 ppm.

El dióxido de cloro es utilizado también en la desinfección de frutas y hortalizas en concentraciones mayores a 1 ppm y para controlar microorganismos en las aguas de proceso utilizadas en la producción y manejo de aves en una concentración superior a las 3 ppm de dióxido de cloro disponible.

La principal desventaja de el dióxido de cloro son los riesgos de seguridad. Es una molécula altamente inestable que puede explotar cuando se concentra demasiado.

El dióxido de cloro puede considerarse como altamente tóxico para los trabajadores: 10 veces más tóxico que el cloro gas, con un TLV (Threshold Limit Value) de 0.1 ppm comparado con 1 ppm para el cloro gas. El TLV es el valor de límite de exposición para los trabajadores por un periodo mayor de 8 horas.

El dióxido de cloro es sensible tanto a la temperatura como a la luz, se descompone rápidamente en presencia de luz y a una temperatura superior a los 30°C (>86°F), con rápida descomposición a temperaturas mayores de los 50°C (122°F). Como conclusión, la utilización del dióxido de cloro debe ser cuidadosamente controlada para asegurar la concentración adecuada con la exposición mínima del personal.

Subproductos tales como los potencialmente tóxicos trihalometanos, que pueden ser formados con el uso de cloro, no son producidos con el uso de dióxido de cloro. Sin embargo, el dióxido de cloro puede reaccionar con el ion bromuro formando bromato el cual es carcinogénico y se piensa que también pueden formarse cloratos.

Otra desventaja es el alto costo de un generador de dióxido de cloro.(41)

### 6.3. YODO

El yodo presenta propiedades germicidas indiscutibles contra una gran variedad de microorganismos. No obstante, su corrosividad, toxicidad, inestabilidad y baja hidrosolubilidad, amén de otras características inadmisibles, reducen su aplicación en las plantas industriales de alimentos.

Los compuestos activos de yodo más usados, son los yodóforos. Los yodóforos son compuestos que contienen yodo disuelto en un agente surfactante y un ácido. El surfactante provee de un medio estable para el yodo, actúa como su portador y contribuye a su solubilización. En su forma diluida, éste agente superficial controla la liberación del yodo y también ayuda en la penetración dentro de los suelos orgánicos. El agente superficial activo puede ser no iónico, catiónico o aniónico, pero algunos tipos no iónicos son los preferidos.(47)

El yodo actúa por combinación con las proteínas de las células vegetativas, pero igual que el cloro también se combina con los residuos de material protéico de cualquier origen. Sin embargo, la reacción con la materia orgánica es menos marcada que la de los hipocloritos y el poder germicida es reducido por el almidón.

En combinación con el yodóforo, el yodo mantiene sus propiedades germicidas incluso a nivel más elevado, además de que el olor característico del yodo es eliminado. A la dilución recomendada, la solución yodófora presenta un bello color ámbar, que va palideciendo a medida que se va usando la solución. La

concentración de las soluciones son fácilmente determinadas por métodos comunes y el color ámbar es un indicador obvio de la presencia de yodo activo.

Aunque tienen un pH de acción más amplio que el cloro, al igual que con los hipocloritos, los yodóforos presentan mayor actividad bactericida a pH ácidos. Generalmente son más efectivos en un rango de pH de 2 a 5, pero también sanitizan en pH's ligeramente alcalinos, dependiendo de las condiciones de la formulación. En ocasiones, son añadidas al desinfectante soluciones tampón de ácido fosfórico para mantener el pH entre 4.0 y 5.0.

Son menos corrosivos que el cloro cuando se usan abajo de 120°C, y su actividad no se pierde rápidamente como el cloro en presencia de materia orgánica. Esto especialmente a valores de pH bajos. Los yodóforos concentrados también tienen una larga vida de anaquel (una ventaja más sobre el cloro).

Los yodóforos presentan buena estabilidad, larga vida de anaquel y son menos irritantes que los hipocloritos. El elevado grado de actividad superficial les da un buen poder de penetración y de difusión y asegura además un rápido drenaje. Impide también la formación de películas de minerales puesto que éstos son solubilizados por el carácter ácido de los yodóforos.

La temperatura es un factor importante en el caso de los yodóforos. La eficiencia de éstos es adversamente afectada por bajas temperaturas. Este efecto puede remediarse aumentando las concentraciones o ampliando el tiempo de contacto. Tampoco se pueden utilizar a temperaturas superiores a los 43.3°C puesto que se produce sublimación del yodo, con la consiguiente

pérdida de eficiencia. El vapor es muy corrosivo para el equipo, incluyendo el acero inoxidable. (47)(41)

A pesar de sus buenas propiedades germicidas, los yodóforos son menos efectivos que los hipocloritos contra las esporas bacterianas y los bacteriófagos. Estos sanitizantes son considerados por algunos autores específicamente activos contra hongos y levaduras aunque se ha visto que en la práctica tienen buena actividad bactericida, incluso a veces mejor que los hipocloritos. Si se toma en cuenta que ambos agentes basan su poder germicida en sus propiedades oxidantes, lo anterior resultaría controversial ya que sus mecanismos de acción contra los microorganismos son similares y estas diferencias solo podrían atribuirse a factores externos tales como su estabilidad y comportamiento frente a la materia orgánica.

Pueden ser usados con limpiadores ácidos, y son capaces de eliminar los depósitos sólidos de leche en los intercambiadores de calor utilizados para la pasteurización.

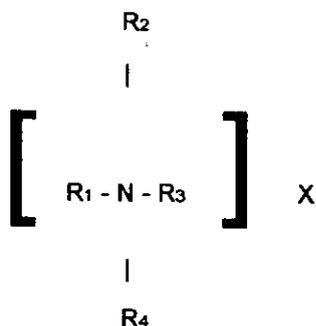
Los yodóforos están aprobados por la FDA como sanitizantes de no enjuague a una concentración máxima de 25 ppm de yodo titulable. Generalmente a esta concentración no se producen defectos de coloración o manchas ni son irritantes.

A mayor concentración, los yodóforos pueden causar problemas de impartición de olor, sabor, color y manchas o decoloración de las superficies y equipo sobre las que se aplican. Además pueden favorecer la oxidación y llegar a ser irritantes.

Como desventajas se pueden mencionar que presentan la posibilidad de formar espuma, son más caros que los hipocloritos y, dependiendo de la formulación, el yodóforo podría verse afectado por la dureza del agua.

#### 6.4. COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO.

Las sales de amonio cuaternario son algunas veces referidos como sanitizantes "quats" y presentan la fórmula general:



La R representa grupos orgánicos que van desde el metilo (CH<sub>3</sub>) hasta grupos alifáticos de cadena larga (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> a C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) y grupos fenilos. Para que exista poder germicida al menos un R debe ser un grupo alifático corriente o un grupo alifático de cadena larga de sustitución. La X representa un anión, tal como un haluro (Cl, Br), sulfato o acetato.

Existe una gran variedad de compuestos a base de amonio cuaternario disponibles, tales como el cloruro de benzalconio, quats duales y quats de cadenas gemelas. Como resultado de esto es difícil generalizar acerca de su actividad antimicrobiana y su influencia sobre las condiciones ambientales. La concentración máxima permitida por la FDA para su uso como sanitizante de superficies en contacto con los alimentos y de no enjuague es de 200 ppm del compuesto de amonio cuaternario activo.

Los compuestos amoniacales cuaternarios cuando se usan como agentes desinfectantes, presentan ventajas y desventajas a la vez. Éstas pueden ser, bacetriostáticas a baja concentración y bactericidas a alta concentración.

Estos compuestos pueden comportarse como detergentes debido a su actividad surfactante. Son activos contra una variedad de microorganismos incluyendo hongos y levaduras y se caracterizan por tener una actividad residual debido a que no se enjuaga. Esto resulta una ventaja cuando se usan estos productos para la sanitización ambiental pero una desventaja cuando son usados, por ejemplo en plantas de cultivos lácticos donde la acción antimicrobiana residual podrían afectar la actividad del cultivo.

Los quats son menos eficaces que los hipocloritos en la destrucción de las esporas bacterianas o las bacterias gramnegativas, incluidos los coliformes y los psicrótrofos, y tienen una actividad netamente más reducida contra los bacteriófagos. No obstante con la adición de determinados agentes secuestradores, se obtiene una actividad viricida netamente más elevada. En general, los quats son muy eficaces contra las bacterias grampositivas.

El efecto letal se atribuye a varias actividades, entre ellas, las reacciones con las membranas celulares, la desnaturalización de las proteínas celulares esenciales o la inactivación enzimática. Los efectos ejercidos sobre la membrana celular pueden ser atribuidos a la lisis de la membrana, a la inactivación enzimática de la membrana o a interferencias con el sistema de transporte.

Los microorganismos que aparecen por vía natural pueden ser más resistentes a los quats y otros desinfectantes que los cultivos de laboratorio. Algunas cepas de *Pseudomonas* y de *Xanthomonas* crecen a partir de determinados quats como una sola fuente de carbono (Dean-Raymond y Alexander 1977).(47)

La desventaja de su poca efectividad contra bacterias gram negativas puede ser contravenida usando concentraciones mayores de sanitizantes o aumentando el tiempo de contacto.

Son estables al calor y relativamente estables en presencia de materia orgánica. Muchos de estos sanitizantes tienen un pH neutro y son efectivos bajo una amplia gama de valores de pH. En muchos casos, la eficiencia máxima se determina en rangos de pH alcalinos. Sin embargo, investigaciones han indicado que el efecto del pH puede variar con las especies bacterianas, siendo las gram negativas más susceptibles a los quats en el rango de pH ácidos (pH 7 y menos), y las gram positivos en el rango alcalino (pH de 7 y arriba).

En general, este tipo de compuestos a concentraciones normales de uso tienen la ventaja de ser no tóxicos, relativamente inodoros, incoloros y no corrosivos.

Debido a que son moléculas catiónicas, los quats son incompatibles con jabones y detergentes aniónicos. Los limpiadores más comunes son aniónicos, por tanto, las superficies deben ser enjuagadas suficientemente entre la limpieza y la sanitización para prevenir la inactivación del sanitizante. También tienen poca tolerancia hacia las aguas duras, sin embargo esto puede ser mejorado por la adición de agentes quelantes tales como EDTA.

Los quats no son tan efectivos a baja temperaturas como los sanitizantes a base de cloro.

Cuando son usados en operaciones mecánicas, pueden causar problemas de formación de espuma.

Debido a que existen muchos sanitizantes a base de sales cuaternarias de amonio, es importante entender la aplicación para hacer la mejor elección. (31)

## 6.5. PLATA COLOIDAL

Es un hecho conocido desde hace ya muchos siglos que el cobre es bactericida, aunque sólo débilmente, y que ejerce una gran actividad algicida. En concentraciones muy reducidas, otros metales como el mercurio y la plata, también son muy efectivos en este aspecto.

En 1869, Raulin describió las propiedades oligodinámicas de la plata, y en 1863, Nageli, un botánico suizo, observó la desaparición de *Espirogiraes* de las aguas que contenían cantidades muy pequeñas de plata finamente dividida, precipitada de una de sus sales.

La plata es un metal blanco lustroso y blando, insoluble en el agua y en los álcalis. Su especial afinidad con el azufre y los elementos halógenos está perfectamente reconocida y la reacción de este metal con el azufre (que conduce a la formación de sulfuro de plata) y el yodo (para formar yoduro de plata) se emplea mucho en numerosas técnicas de valoración analítica. La plata se ioniza fácilmente por electrólisis, y esta propiedad constituye la base de algunos sistemas que la emplean en la desinfección de agua. Las dosificaciones pueden aumentarse o disminuirse variando el flujo de corriente, aunque las concentraciones empleadas en el tratamiento del agua se encuentran comprendidas entre 0.025 y 0.075 ppm.

Aparte de su aplicación en forma metálica por descomposición electrolítica, la plata puede aplicarse como solución de sus sales o por desorción de lechos filtrantes de arena revestida de plata, carbono, tejidos u otros materiales revestidos de plata que liberan el metal. El nitrato de plata cristalino,  $\text{AgNO}_3$ , que es una forma que se emplea a veces en relación con el tratamiento de agua, es extremadamente cáustica para la piel húmeda y las membranas mucosas. Los "Public Health Service Drinking Water Standards" limitan la concentración de plata en las aguas potables a 0.05 mg/l (0.05 ppm). (28)(43)

Existen estudios (Chang y Bazter) que demuestran que a una concentración de 97 ppm el ion  $\text{Ag}^+$  tiene incluso, una eficiencia quística en el caso de protozoarios(43)

Las formas solubles de la plata, envenenan la actividad enzimática al formar mercaptanos con los grupos sulfhidrilos. La reacción inicial es reversible pero después de un contacto prolongado o con concentraciones fuertes de éstas se forma una combinación irreversible que mata a los microorganismos. La plata coloidal actúa también sobre la superficie celular bacteriana y causa la muerte de la bacteria por alteraciones en la pared celular y la membrana citoplasmática, desintegrando el ADN de la misma. Algunos autores consideran que estos compuestos son más eficaces como agentes bacteriostáticos que como bactericidas aunque en realidad, cuando las soluciones de sales de plata coloidal estable se aplican, ejercen un inmediato efecto "bactericida" y germicida. Luego pequeñas cantidades de plata iónica derivan en una acción "bacteriostática" sostenida (o lo que es lo mismo, "acción residual"). Esta acción de la plata coloidal estable es común a muchos metales pesados y se llama

"oligodinámica". El efecto antiséptico de las sales de plata se reduce por las proteínas y por los cloruros presentes en el medio circundante.(29)(47).

Al evaluar los factores ambientales que podían condicionar la eficiencia de un producto norteamericano, Chamber et al, observaron que la relación del desinfectante a la acción bactericida parecía desviarse del esquema aceptado para los desinfectantes fenólicos y de halógenos en bastante mayor medida de lo que pudiera explicarse en razón a los errores experimentales de la técnica empleada, ya que dicha desviación era menor en algunas aguas ensayadas que en otras. Posteriormente, los mismos autores demostraron que la acción germicida de la plata está relacionada con la concentración de los iones de este metal, más que con la naturaleza física de la plata de la que dichos iones derivan (al contrario de lo que se señalaba en informes anteriores, que afirmaban que cuando la plata se añade como suspensión coloidal mediante lechos de filtro o dispositivos electrolíticos, tiene más acción germicida que una cantidad del metal aplicada en la forma de nitrato). Estos investigadores demostraron también que en presencia de neutralizantes ineficaces (tales como el tiosulfato sódico) la bacteriostasis puede confundirse con la acción bactericida.(43)

En un informe publicado por el Public Health Service de Estados Unidos en 1962 se observó que, debido a su costo relativamente elevado, características de absorción y bacteriostáticas, tiempo de reacción prolongado y otros factores, la plata no es un desinfectante demasiado útil en las aplicaciones a gran escala. El informe señalaba, no obstante, que pudiera ser útil en aplicaciones a pequeña escala y muy específicas (por ejemplo la desinfección de frutas y hortalizas).

Las características generales de los desinfectantes a base de plata coloidal se resumen a continuación:

Este tipo de principio activo se considera **NO VOLÁTIL**. Se considera que en este tipo de productos la presencia del principio activo no es transitoria ya que no se ve afectada por factores externos como la temperatura.

Su acción germicida abarca una amplia gama de gérmenes. Existen estudios que abalan que este tipo de desinfectantes son aptos para la eliminación de; bacterias, hongos, protozoarios como *Entamoeba histolítica* y *Giardia lamblia*, tanto en su forma de célula vegetativa, como en su forma latente o de quiste; incluso se afirma que pueden acabar con huevecillos de parásitos superiores como *Ascaris lumbricoides*.

Con respecto a la **TOXICIDAD** existe controversia. Mientras que algunos autores sostienen que estos productos no causan ningún perjuicio, ni a la salud de los humanos ni mucho menos a los productos que entran en contacto con él; otros afirman que los metales pesados suelen acumularse en algunas partes del cuerpo de los seres vivos que los consumen.

Este tipo de producto se consideran **ESTABLES** en el sentido de que no pierden sus características bacteriostáticas, aún al contrario las aumenta con el transcurso del tiempo. Por otro lado se consideran **NO CORROSIVO** a las superficies, ya sean metálicas, plásticas o pétreas.

Una ventaja que presenta la plata coloidal sobre otros desinfectantes como los hechos a base de cloro es que su efectividad no se ve mermada con la presencia de materia orgánica. La plata coloidal elimina una parte considerable de los gérmenes que contiene la materia orgánica, principalmente, aquellos que fomentan su putrefacción.

Por último, los desinfectantes a base de plata coloidal son insípidos y por lo tanto no imparte ningún sabor al agua ni a las hortalizas que desinfecta.(38)(39)

## **7. METODOLOGÍA**

**MUESTREO DE HORTALIZAS (lechuga, cilantro, berro)**



**PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**



**DIVISIÓN DE LA MUESTRA**



**SEPARACIÓN DE PARTES A EVALUAR:**

**\*SUCIA**

**\*LAVADA (UNICAMENTE CON AGUA)**

**\*LAVADA Y DESINFECTADA (DESINFECTANTE 1)**

**\*LAVADA Y DESINFECTADA (DESINFECTANTE 2)**

**\*LAVADA Y DESINFECTADA (DESINFECTANTE 3)**

**\*LAVADA Y DESINFECTADA (DESINFECTANTE 4)**



**DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS**



**DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES FECALES**

## 7.1.PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA

### MATERIAL Y APARATOS.

- Matraces de 250 ml de capacidad esterilizados
- Balanza de una capacidad inferior a 2.5 g y de una sensibilidad de 0.1 g
- Instrumentos para preparar las muestras: cuchillos, tenedores, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, todo ello previamente esterilizado
- Pipetas de 1 y 10 ml esterilizadas
- Tubos de ensaye de 20 ml de capacidad para las diluciones
- Agua peptonada al 1% para diluciones

### TÉCNICA

- ❖ Dado que los productos muestreados de diferentes fuentes (mercados, supermercados, central de abastos) están expuestos al aire libre y a un sinnúmero de fuentes de contaminación, la obtención de la muestra no requiere de precauciones estrictamente asépticas
- ❖ Las muestras deben llevarse inmediatamente al laboratorio dentro de una bolsa de plástico evitando la ruptura de la misma, así como que la muestra se dañara, humedeciera o contaminara por otros factores
- ❖ Comenzar a trabajar en el laboratorio tan pronto como sea posible. Refrigerar la muestra de 0 a 5°C siempre que esta no pueda ser analizada inmediatamente después de su llegada al laboratorio
- ❖ Pesar en los matraces que contienen el medio diluyente, con una precisión de 0.1 g, al menos 10 g **representativos** de la muestra total. El volumen del

diluyente debe ser igual a 9 veces la muestra. Así se obtiene una dilución  $10^{-1}$ .

- ❖ Agitar perfectamente los matraces a fin de obtener una buena dispersión de los microorganismos depositados en toda la superficie de la hortaliza
- ❖ Pipetear por duplicado alícuotas de 1 ml en tubos distintos conteniendo 9 ml de diluyente. Con cada una de las dos series de diluciones llevar a cabo los dos pasos siguientes
- ❖ Mezclar cuidadosamente cada una de las diluciones
- ❖ Transferir, con la misma pipeta, 1 ml a otro tubo de dilución, conteniendo 9 ml de diluyente y mezclar utilizando una nueva pipeta
- ❖ Repetir los dos pasos anteriores hasta obtener el número necesario de diluciones. La concentración disminuirá 10 veces en cada dilución sucesiva.(37)(38)

## **7.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES Y DESINFECTANTES EVALUADOS**

A continuación se especifican los principios activos de los desinfectantes evaluados y las condiciones que señala el proveedor para la utilización de cada uno de ellos y bajo las cuales se llevó a cabo la desinfección.

**DESINFECTANTE 1.**-Producto cuyo principio activo es el hipoclorito de sodio. Las condiciones fueron 15 gotas del producto por cada litro de agua por un tiempo de 30 minutos.

**DESINFECTANTE 2.**-Producto cuyo principio activo es un yodóforo. Las condiciones fueron 1 ml por cada litro de agua y un tiempo de desinfección de 15 minutos.

**DESINFECTANTE 3.**-Producto cuyo principio activo es plata coloidal. Se desinfectó en una solución preparada con 5 gotas del producto por cada litro de agua.

**DESINFECTANTE 4.**-Desinfectante orgánico. Producto elaborado a partir de semillas de cítricos y cuyo principio activo es una sal cuaternaria de amonio (Cloruro de benzalconio). Su poder germicida radica en la sinergia de los aceites esenciales y compuestos naturalmente contenidos en las semillas de los cítricos y la pequeña fracción adicionada de Cloruro de Benzalconio. Se preparó una solución de 2 ml por cada 10 litros del desinfectante y con esta fue tratada la hortaliza.

Todas las soluciones desinfectantes se prepararon con agua de la llava, la cual presentó una temperatura promedio de 21.5°C y un pH de 7.05.

*\*Por razones obvias, las marcas de los productos evaluados no se dan a conocer en la presente tesis.*

### **7.3. ENNUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFÍLICOS**

#### **MÉTODO DE RECUESTO EN PLACA**

El número de microorganismos aerobios mesófilos ("recuento en placa") encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad de los alimentos más comúnmente utilizado. La flora aerobia mesófila resulta útil en muchos alimentos por diversos motivos, ya que, por ejemplo, indica si la limpieza y desinfección y el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado de forma adecuada.

Los tres métodos utilizados habitualmente para el recuento de la flora aerobia mesófila son:

a) El método de recuento estándar en placa, también denominado método de recuento en placa de microorganismos aerobios o método de recuento en placa por vertido (revisado por Hartman y Huntsberger, 1961, Angelotti 1964).

b) El método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie (Reed y Reed, 1948; J. J. R. Campbell y Konowalchuk, 1948; Gaudy y col; 1963; D. S. Clark, 1967).

c) El método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie (Miles y Misra, 1938, Sharpe y Kilsby, 1971).

El método de recuento estándar en placa se utiliza en muchos países y casi de modo exclusivo en Norteamérica donde ha sido especialmente recomendado para productos lácteos. El método de recuento estándar en placa está tan arraigado y su exactitud y limitaciones se conocen tan bien, que la International Commission on Microbiological Specifications for Foods lo recomienda aún en casos de litigio.(14)

### **7.3.1. Recuento estándar en placa.**

#### **Recuento en placa por vertido.**

#### **MATERIAL Y APARATOS:**

Los señalados anteriormente para la preparación y dilución de las muestras de alimentos:

- Caja de petri desechables (90 x 15 mm)
- Pipetas bacteriológicas de 1, 5 y 10 ml
- Baño de agua o estufa para templar y mantener el medio fundido a 44-46°C
- Estufa de incubación, 35 +/- 2°C
- Contador de colonias
- Agar para recuento en placa

#### **TECNICA**

- ❖ Preparar la muestra de alimento por medio del procedimiento antes descrito.
- ❖ Pipetear por duplicado, en placas de Petri, alícuotas de 1 ml de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y una alícuota de 0.1 ml de la dilución  $10^{-5}$ , lo que supone la siembra por placa de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  g de alimento. se aconseja esta serie de diluciones en los casos en que se desconoce el

número aproximado de gérmenes presentes en el alimento, pero el rango de diluciones preparadas y sembradas pueden modificarse en función de la cifra de microorganismos esperada. De todos modos siempre deben sembrarse tres diluciones distintas.

- ❖ Fundir el agar para recuento en placa utilizando vapor o agua hirviendo y procurando que este tratamiento térmico no sea excesivamente prolongado.
- ❖ Templar el medio a 44-46°C y controlar cuidadosamente su temperatura para que al mezclarlo con la dilución del alimento no sean inactivados los gérmenes.
- ❖ Verter inmediatamente en las placas de petri 10-15 ml de medio fundido y templado. El período de tiempo transcurrido entre la realización de las diluciones y el vertido del medio no debe superar los 20 minutos y es preferible que sea inferior a 10 minutos.
- ❖ Acto seguido, mezclar el inóculo con el medio fundido, inclinando y girando las placas. La forma adecuada de llevar a cabo esta operación sería la siguiente: a) imprimir a la placa movimientos de vaivén 5 veces en otra dirección, b) hacerla girar 5 veces en sentido de las agujas del reloj, c) volver a imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y d) hacerla girar 5 veces en sentido contrario a las agujas del reloj.
- ❖ Con el fin de controlar la esterilidad, preparar una o varias placas conteniendo medio y el diluyente sin inocular. Transcurrido el período de incubación, el número de colonias presentes en estas placas no debe modificar el recuento en más de una unidad en la segunda cifra significativa
- ❖ Una vez solidificado el agar invertir las placas e incubarlas a 35 +/- 2°C durante 48 mas menos 3 horas.

- ❖ Calcular el recuento estándar en placa o el recuento estándar en placa estimado de acuerdo a las siguientes indicaciones:

*Cálculo del recuento estándar en placa.*

**(a)** Elegir las dos placas, correspondientes a una dilución, que presenten entre 30 y 300 colonias. Contar todas las colonias de cada placa utilizando el contador de colonias. Hallar la media aritmética de los dos valores y multiplicarla por el factor de dilución (la inversa de la dilución cuyas placas han sido seleccionadas), dar el valor obtenido como el recuento estándar en placa.

**(b)** Si una de las placas de la dilución elegida presenta algo menos de 30 colonias o algo más de 300 colonias, deben de contarse también todas las colonias de ambas y como en el caso anterior, hallar la media aritmética y multiplicarla por el factor de dilución. El valor obtenido se dará como el recuento estándar en placa.

**(c)** Cuando las placas de dos diluciones consecutivas presentan entre 30 y 300 colonias, deben hallarse los recuentos estándar en placa de cada dilución tal como se ha señalado anteriormente y se dará como resultado la media de los dos valores obtenidos, a no ser que uno de ellos sea superior al doble del otro, en cuyo caso se dará como recuento estándar en placa el valor más bajo.

*Cálculo del recuento estándar en placa estimado.*

**(a)** Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 colonias, el valor calculado se da como el recuento estándar en placa estimado y el cálculo del número de gérmenes presentes en el alimento se lleva a cabo en los distintos casos en la forma que se indica en los apartados (b), (c) y (d) a continuación:

**(b)** Si todas las placas presentan más de 300 colonias, dividir las dos placas, correspondientes a la dilución más elevada, en secciones radiales (2,4 u 8) y contar todas las colonias que se hallan en una o más secciones. Multiplicar el total de colonias obtenidas en cada caso por el factor adecuado, con el fin de conseguir una estimación del número total de colonias presentes en la placa. Hallar la media del valor estimado por las dos placas y multiplicar por el factor de dilución correspondiente. El valor obtenido se da como el recuento estándar en placa estimado.

**(c)** Si en las placas inoculadas con la dilución menos concentrada se encuentran más de 200 colonias en una sección correspondiente a la octava parte de la placa, multiplicar 1600 (procedente de  $200 \times 8$ ) por el factor de dilución y expresar el recuento estándar en placa estimado como superior ( $>$ ) al valor obtenido. En estos casos resulta aconsejable señalar entre paréntesis la dilución utilizada.

**(d)** Cuando no se encuentran colonias en las placas correspondientes a la dilución más concentrada, expresar el recuento estándar en placa estimado como inferior a ( $<$ ) 1 multiplicando por el factor de la dilución más concentrada.

## CÁLCULO Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cuando se dan los valores del recuento estándar en placa o del recuento estándar en placa estimado, deben utilizarse únicamente dos cifras significativas. Estas dos cifras corresponden a los dígitos primero y segundo (empezando por la izquierda) de la media de las colonias halladas o estimadas. Los dígitos restantes tienen que ser sustituidos por ceros.

## REPRODUCIBILIDAD Y ERROR PERSONAL

EL resultado obtenido al contar por segunda vez las colonias de una placa determinada debe presentar:

(i) Una diferencia máxima del 5% en el caso de que este recuento lo haya realizado la misma persona.

(ii) Una diferencia máxima del 10% en el caso de que este recuento lo haya realizado otra u otras personas.

Cuando la diferencia entre ambos supera estos límites, la razón puede achacarse a defectos visuales, a la dificultad de reconocer las colonias muy pequeñas o, lo que es más frecuente, a la incapacidad para diferenciar las colonias de las partículas más pequeñas. (14)(35)

## 7.4. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES FECALES

La metodología para la determinación de los coliformes, de los coliformes fecales y de *Escherichia coli* comprende tres pasos sucesivos de complejidad creciente.

En esta obra se dan tres métodos para la determinación de coliformes por la técnica de NMP. Cada uno de estos métodos ha sido utilizado en muchos laboratorios. El primero de ellos emplea el caldo lauril sulfato triptosa, seguido de la confirmación de los tubos positivos de gas en caldo E. C. con incubación a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ .(14)(47)

### 7.4.1. Recuento de coliformes fecales:

#### Técnica del Número Más Probable.

#### MATERIAL Y APARATOS

- Estufa de incubación  $35-37^{\circ}\text{C}$
- Baño de agua con agitación, equipado con un mecanismo de regulación térmica capaz de mantener una temperatura de  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ .
- Pipetas bacteriológicas de 1 ml
- Asa de inoculación, con alambre de nicrom o de platino-iridio
- Caldo lauril sulfato triptosa, volúmenes de 10 ml en tubos de 150 x 15 mm conteniendo tubos de fermentación de Durham invertidos
- Caldo E.C., volúmenes de 10 ml en tubos de 150 x 15 m conteniendo tubos de fermentación de Durham invertidos.

## TECNICA

- ❖ Para hacer las diluciones pueden utilizarse los blancos de dilución o frascos de diluyentes sobrantes del método de recuento en placa. (Importante: una vez hechas las diluciones del alimento, debe procurarse que transcurra el menor tiempo posible hasta que se realizan las siembras, pues así se evitan la multiplicación o la muerte de los microorganismos suspendidos en el diluyente).
- ❖ Pipetear 1 ml de cada una de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  del homogenizado del alimento en tubos de caldo lauril sulfato triptosa, utilizando tres tubos por cada dilución.
- ❖ Incubar los tubos a  $35-37^{\circ}\text{C}$  durante 24 y 48 horas.
- ❖ Pasadas las 24 primeras horas, anotar los tubos que muestren producción de gas. Volver a la estufa los negativos para su incubación durante 24 horas más.
- ❖ Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas.
- ❖ Tomar los tubos de caldo lauril sulfato triptosa gas positivos
- ❖ Inocular un asa de caldo de cada uno de los cultivos seleccionados en tubos de caldo E. C.
- ❖ Incubar los tubos de caldo E.C. a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  y ver si son positivos de formación de gas a las 24 y a las 48 horas.
- ❖ Se presume que los tubos de caldo E. C. que presenten gas son también positivos de organismos coliformes de origen fecal.
- ❖ Para obtener el NMP, proceder de la siguiente forma:
- ❖ Ver en cada una de las diluciones el número de tubos en los que se confirmó la presencia de coliformes fecales. Buscar en la tabla del NMP y anotar el NMP que corresponda al número de tubos positivos de cada dilución. (39)

## 7.5. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

### CALDO E. C.

Triptosa o tripticase	20.0 g
Lactosa	5.00 g
Sales biliares núm. 3	1.50 g
Fosfato dipotásico	4.00 g
Fosfato monopotásico	1.50 g
Cloruro sódico	5.00 g

### CALDO LAURIL SULFATO

Triptosa, triptona o tripticase	20.0 g
Lactosa	5.00 g
Fosfato potásico monohidrogenado	2.75 g
Fosfato potásico dihidrogenado	2.75 g
Cloruro sódico	5.00 g
Lauril sulfato de sodio	0.10 g

### AGAR PARA CUENTA ESTÁNDAR

Triptona	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Agar	15.0 g

*\*Todos los medio están referidos a 1 litro de agua(35)(39)*

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## 8. RESULTADOS

### MUESTRA: LECHUGA

#### Primera determinación

MUESTRA	MESÓFILOS	%	COLIFORMES	%
	AEROBIOS		FECALES	
	(UFC/g)	REDUCCIÓN	(NMP/g)	REDUCCIÓN
sucia	32 000 000		40	
limpia	1 000 000	96.87	9	77.5
cloro	7 200	99.98	9	77.5
yodóforo	4 600	99.98	<3	92.5
plata coloidal	170 000	99.47	4	90
Desinf. orgánico	6 600	99.98	<3	92.5

#### Segunda determinación

MUESTRA	MESÓFILOS	%	COLIFORMES	%
	AEROBIOS		FECALES	
	(UFC/g)	REDUCCIÓN	(NMP/g)	REDUCCIÓN
sucia	23 000 000		>1 100	
limpia	240 000	98.52	75	93.18
cloro	21 000	99.91	14	98.72
yodóforo	15 000	99.93	4	99.64
plata coloidal	12 000	99.95	39	96.45
Desinf. orgánico	3 400	99.98	<3	99.72

\*CUENTAS REDONDEADAS A DOS CIFRAS SIGNIFICATIVAS

**MUESTRA: BERROS**

## Primera determinación

MUESTRA	MESÓFILOS	% REDUCCIÓN	COLIFORMES	% REDUCCIÓN
	AEROBIOS (UFC/g)		FECALIS (NMP/g)	
sucia	1 600 000		460	
limpia	1 000 000	37.5	43	90.65
cloro	10 000	99.37	9	98.04
yodóforo	1 900	99.88	4	99.13
plata coloidal	160 000	90	28	93.91
Desinf. orgánico	34 000	97.87	23	95

## Segunda determinación

MUESTRA	MESÓFILOS	% REDUCCIÓN	COLIFORMES	% REDUCCIÓN
	AEROBIOS (UFC/g)		FECALIS (NMP/g)	
sucia	5 600 000		1 100	
limpia	400 000	92.86	20	98.18
cloro	59 000	98.95	15	98.63
yodóforo	15 000	99.73	4	99.63
plata coloidal	100 000	98.21	15	98.63
Desinf. orgánico	26 000	99.54	7	99.36

\*CUENTAS REDONDEADAS A DOS CIFRAS SIGNIFICATIVAS

**MUESTRA: CILANTRO**

## Primera determinación

MUESTRA	MESÓFILOS	% REDUCCIÓN	COLIFORMES	% REDUCCIÓN
	AEROBIOS (UFC/g)		FECALIS (NMP/g)	
sucia	1 300 000		150	
limpia	320 000	75.38	20	86.66
cloro	170 000	86.92	9	94
yodóforo	32 000	97.54	7	95.33
plata coloidal	260 000	80	43	71.33
Desinf. orgánico	170 000	86.92	4	97.33

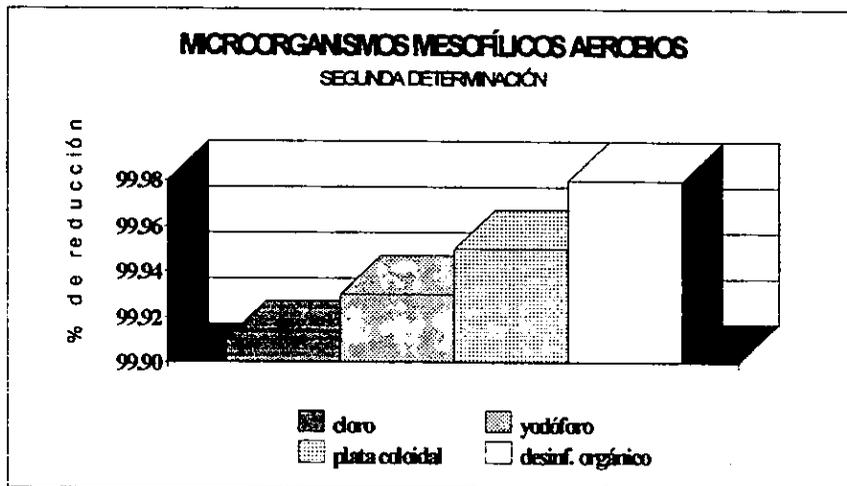
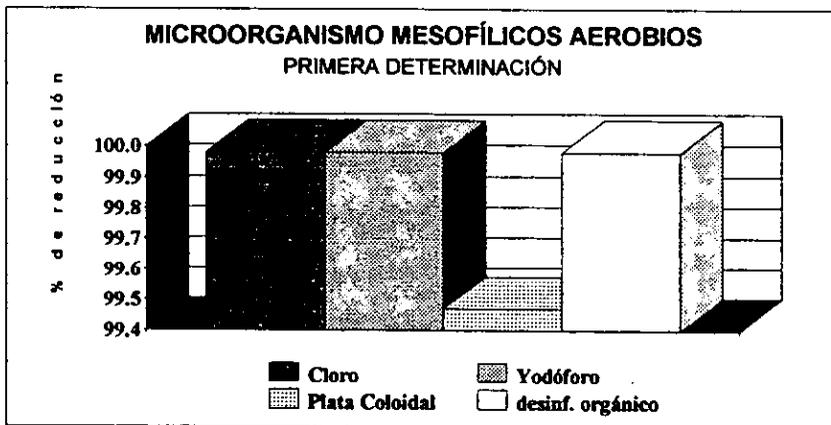
## Segunda determinación

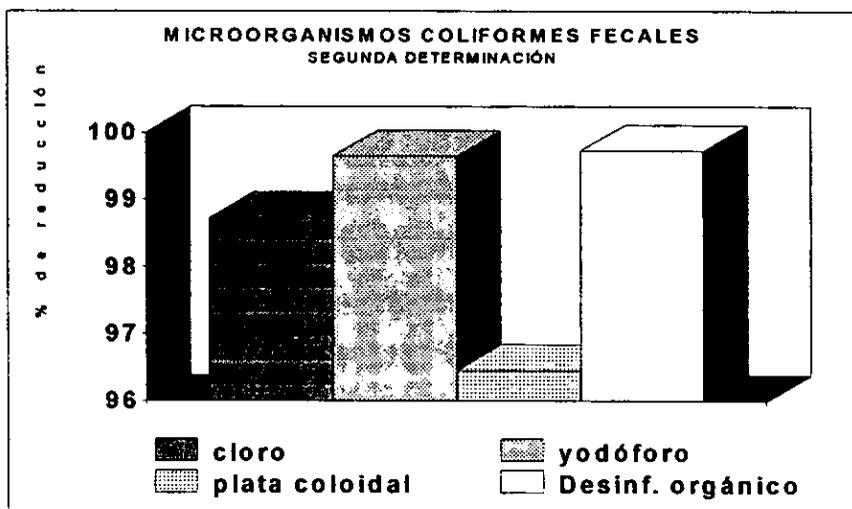
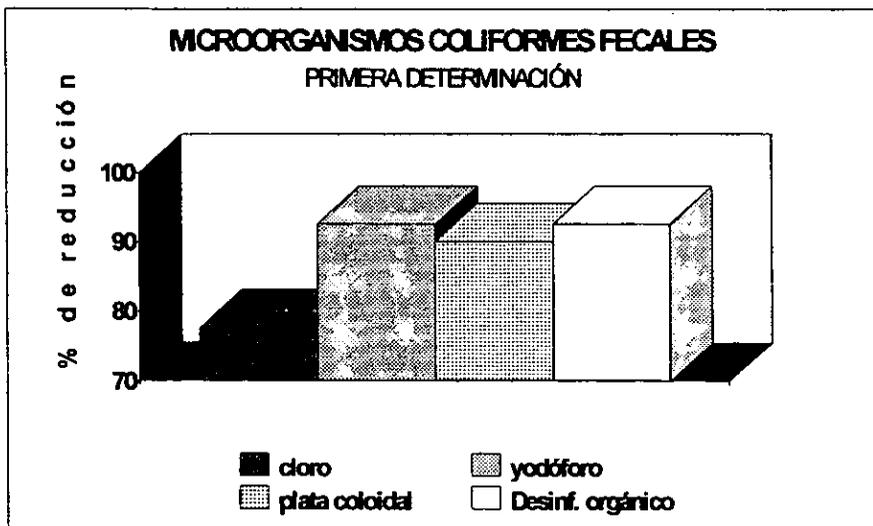
MUESTRA	MESÓFILOS	% REDUCCIÓN	COLIFORMES	% REDUCCIÓN
	AEROBIOS (UFC/g)		FECALIS (NMP/g)	
sucia	1 800 000		1 100	
limpia	1 000 000	44.44	460	58.18
cloro	100 00	94.44	43	96.09
yodóforo	49 000	97.28	4	99.63
plata coloidal	290 000	83.89	43	96.09
Desinf. orgánico	210 000	88.33	43	96.09

\*CUENTAS REDONDEADAS A DOS CIFRAS SIGNIFICATIVAS

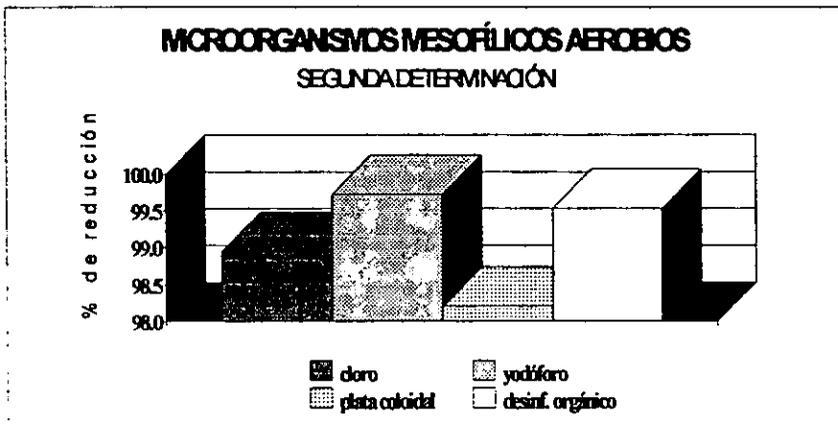
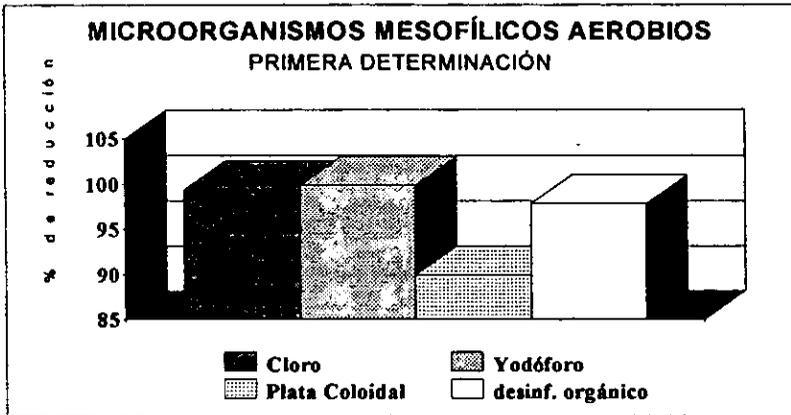
## GRAFICOS DE RESULTADOS

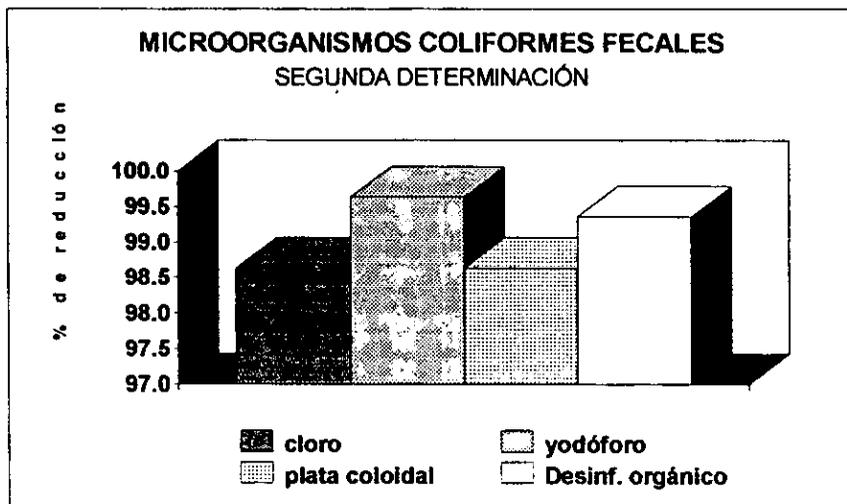
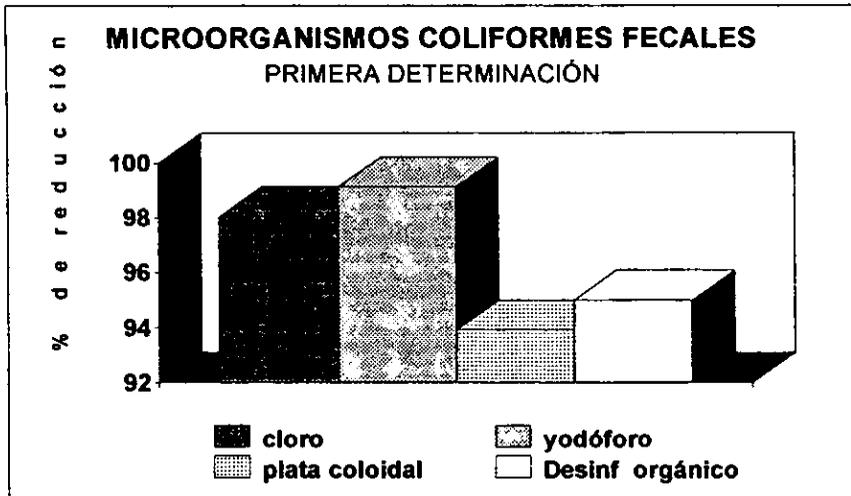
MUESTRA: LECHUGA



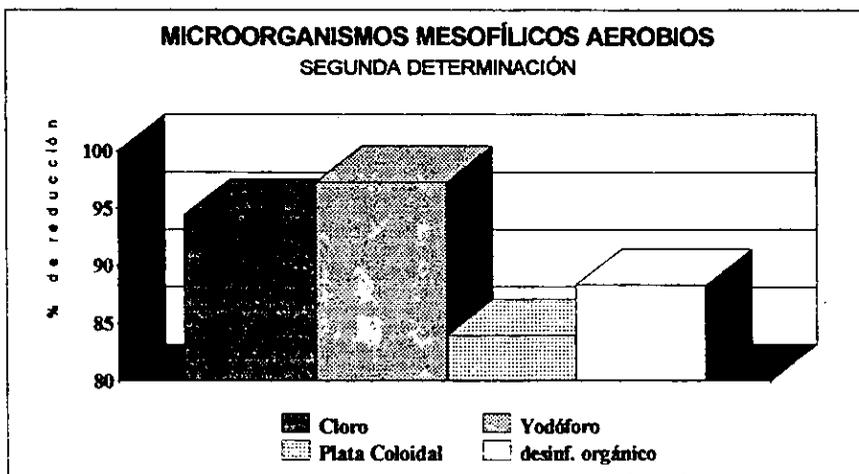
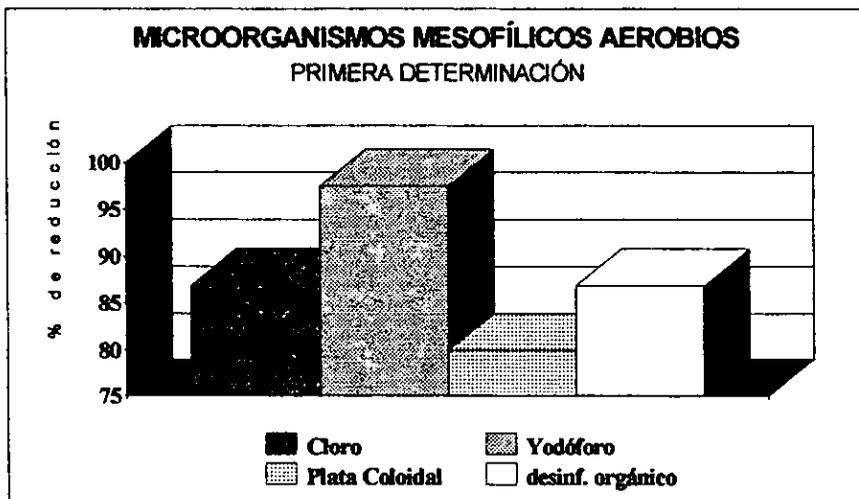


**MUESTRA: BERROS**

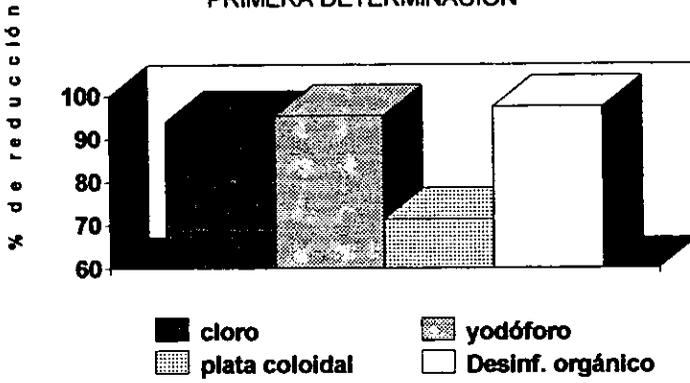




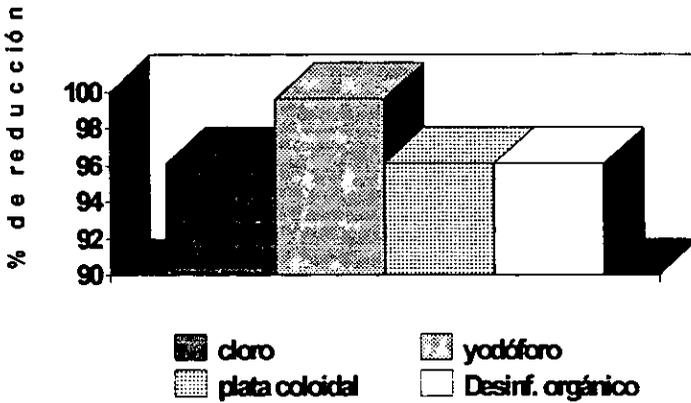
MUESTRA: CILANTRO



### MICROORGANISMOS COLIFORMES FECALES PRIMERA DETERMINACIÓN



### MICROORGANISMOS COLIFORMES FECALES SEGUNDA DETERMINACIÓN



## **9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **9.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS**

Análisis de varianza para un diseño aleatorio por bloques completos

Los datos obtenidos corresponden perfectamente a un diseño aleatorio por bloques completos en el que solo existe un factor -el tipo de desinfectante utilizado-.

Debido a que se realizaron dos corridas experimentales, tenemos 3 cálculos (uno por cada hortaliza) del porcentaje de reducción en carga microbiana (tanto de microorganismos mesofílicos aerobios como de coliformes fecales) usando cada uno de los desinfectantes evaluados; se tienen 12 ensayos en cada corrida en donde un solo factor -el tipo de desinfectante-, el cual se considera como un factor completamente aleatorio dado que el orden en que se tomaron las unidades experimentales fue aleatorio.

Tomando en cuenta cada una de las hortalizas evaluadas como un bloque y cada uno de los desinfectantes como un tratamiento, para el análisis estadístico de resultados se usará una análisis de varianza para un diseño aleatorio por bloques completos.

El modelo estadístico para este diseño es

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \{ i = 1, 2, \dots, a \quad \text{y} \quad j = 1, 2, \dots, b$$

en donde  $\mu$  es una media general,  $\tau_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo bloque y  $\varepsilon_{ij}$  es el término correspondiente al error aleatorio.

Se desea probar la igualdad de las medias de tratamiento. Así, la hipótesis nula de interés

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_a$$

$$H_i: \text{al menos una } \mu_i \neq \mu_j$$

y el cuadro de análisis de varianza para este tipo de diseños experimentales se obtiene con la aplicación de las siguientes fórmulas:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Tratamientos	$\sum \frac{y_{i.}^2}{b} - \frac{y_{..}^2}{N}$	a-1	$\frac{SS_{\text{Tratamientos}}}{a-1}$	$\frac{SS_{\text{Tratamientos}}}{MSE}$
Bloques	$\sum \frac{y_{.j}^2}{a} - \frac{y_{..}^2}{N}$	b-1	$\frac{SS_{\text{Bloques}}}{b-1}$	$\frac{SS_{\text{Bloques}}}{MSE}$
Error	SS $\varepsilon$ (por diferencia)	(a-1)(b-1)	$\frac{SS_{\varepsilon}}{(a-1)(b-1)}$	
Total	$\sum \sum Y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N}$	N-1		

### 9.1.1.CÁLCULOS PARA LOS RESULTADOS DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS AEROBIOS

Tomando en cuenta los porcentajes de reducción de carga microbiana en cuanto a microorganismos mesofílicos aerobios, tenemos los siguientes datos para las primeras determinaciones:

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	yi.	yi.
1	99.98	99.37	86.92	286.27	95.423333
2	99.98	99.88	97.54	297.4	99.133333
3	99.47	90	80	269.47	89.823333
4	99.98	97.87	86.92	284.77	94.923333
y.j	399.41	387.12	351.38		
y.j	99.8525	96.78	87.845		1137.91

$$a = \text{tratamientos} = 4$$

$$b = \text{bloques} = 3$$

$$N = 12$$

$$SS_T = 108435.45 - 107903.26 = 532.19$$

$$SS_{\text{Tratamiento}} = \frac{(286.27)^2 + (297.4)^2 + (269.47)^2 + (284.77)^2}{3} - 107903.26 = 131.84$$

$$SS_{\text{Bloques}} = \frac{(399.41)^2 + (387.12)^2 + (351.38)^2}{4} - 107903.26 = 311.27$$

$$SS_E = 532.19 - 131.84 - 311.27 = 89.08$$

#### CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Tratamientos	131.84	3	43.95	2.96
Bloques	311.27	2	155.63	10.48
Error	89.08	6	14.85	
Total	532.19	11		

$$F_{0.05,3,6} = 4.76$$

$$F_{0.01,3,6} = 9.78$$

$$F_{0.05,2,6} = 5.14$$

$$F_{0.01,2,6} = 10.92$$

$F_o$  (tratamientos) <  $F_{crítica}$ (tanto con 0.05 como con 0.01)

Por tanto, **no se puede rechazar la hipótesis nula**

$F_o$  (bloques) <  $F_{crítica}$ (tanto con 0.05 como con 0.01)

Por tanto, **no se puede rechazar la hipótesis nula**

Tomando en cuenta los porcentajes de reducción de carga microbiana en cuanto a microorganismos mesofílicos aerobios, tenemos los siguientes datos para las segundas determinaciones:

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	$y_i$	$y_i$
1	99.91	98.95	94.44	293.3	97.766667
2	99.93	99.73	97.28	296.94	98.98
3	99.95	98.21	83.88	282.04	94.013333
4	99.98	99.54	88.33	287.85	95.95
$y_j$	399.77	396.43	363.93		
$y_j$	99.9425	99.1075	90.9825		1160.13

$$a = \text{tratamientos} = 4$$

$$b = \text{bloques} = 3$$

$$N = 12$$

$$SS_T = 112464.96 - 112158.47 = 306.49$$

$$SS_{\text{Tratamiento}} = \frac{(293.3)^2 + (296.94)^2 + (282.04)^2 + (287.85)^2}{3} - 112158.47 = 42.34$$

$$SS_{\text{Bloques}} = \frac{(399.77)^2 + (396.43)^2 + (363.93)^2}{4} - 112158.47 = 195.99$$

$$SS_E = 306.49 - 42.34 - 195.99 = 68.16$$

### CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Tratamientos	42.34	3	14.11	1.24
Bloques	195.99	2	97.99	8.62
Error	68.16	6	11.36	
Total	306.49	11		

$$F_{0.05,3,6} = 4.76$$

$$F_{0.05,2,6} = 5.14$$

$$F_{0.01,3,6} = 9.72$$

$$F_{0.01,2,6} = 10.92$$

Fo (tratamientos) < Fcritica(tanto con 0.05 como con 0.01)

**Por tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula**

Fo (bloques) < Fcritica(con 0.01)

**Por tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula**

Sin embargo, Fo (bloques) > Fcritica (0.05), lo que demostraría que **hay diferencia significativa entre los bloques (hortalizas)**

### 9.1.2. CÁLCULOS PARA LOS RESULTADOS DE MICROORGANISMOS COLIFORMES FECALES

Tomando en cuenta los porcentajes de reducción de carga microbiana en cuanto a microorganismos coliformes fecales, tenemos los siguientes datos para las primeras determinaciones:

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	<i>y<sub>i</sub></i>	<i>y<sub>i</sub></i>
1	77.5	98.04	94	269.54	89.846667
2	92.5	99.13	95.33	286.96	95.653333
3	90	93.91	71.33	255.24	85.08
4	92.5	95	97.33	284.83	94.943333
<i>y<sub>j</sub></i>	352.5	386.08	357.99		
<i>y<sub>j</sub></i>	88.125	96.52	89.4975		1096.57

a=tratamientos=4

b=bloques=3

N=12

$$SS_T = 100986.34 - 100205.48 = 780.86$$

$$SS_{\text{Tratamiento}} = \frac{(269.54)^2 + (286.96)^2 + (255.24)^2 + (284.83)^2}{3} - 100205.48 = 218.99$$

$$SS_{\text{Bloques}} = \frac{(352.50)^2 + (386.08)^2 + (357.99)^2}{4} - 100208.48 = 162.23$$

$$SS_E = 780.86 - 218.99 - 162.23 = 399.64$$

#### CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F <sub>o</sub>
Tratamientos	218.99	3	72.99	1.095
Bloques	162.23	2	81.11	1.22
Error	399.64	6	66.61	
Total	780.86	11		

$$F_{0.05,3,6} = 4.76$$

$$F_{0.01,3,6} = 9.78$$

$$F_{0.05,2,6} = 5.14$$

$$F_{0.01,2,6} = 10.92$$

Fo (tratamientos) < Fcritica(tanto con 0.05 como con 0.01)

Por tanto, **no se puede rechazar la hipótesis nula**

Fo (bloques) < Fcritica(tanto con 0.05 como con 0.01)

Por tanto, **no se puede rechazar la hipótesis nula**

Tomando en cuenta los porcentajes de reducción de carga microbiana en cuanto a microorganismos coliformes fecales, tenemos los siguientes datos para las segundas determinaciones:

Tratamiento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	yi.	yi.
1	98.72	98.63	96.09	293.44	97.813333
2	99.64	99.63	99.63	298.9	99.633333
3	96.45	98.63	96.09	291.17	97.056667
4	99.72	99.36	96.09	295.17	98.39
y.j	394.53	396.25	387.9		
y.j	98.6325	99.0625	96.975		1178.68

$$a = \text{tratamientos} = 4$$

$$b = \text{bloques} = 3$$

$$N = 12$$

$$SS_T = 115800.75 - 115773.88 = 26.87$$

$$SS_{\text{Tratamiento}} = \frac{(293.44)^2 + (298.9)^2 + (296.17)^2 + (295.17)^2}{3} - 115773.88 = 10.63$$

$$SS_{\text{Bloques}} = \frac{(394.53)^2 + (396.25)^2 + (387.9)^2}{4} - 115773.88 = 9.72$$

$$SS_E = 26.87 - 10.63 - 9.72 = 6.52$$

### CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Tratamientos	10.63	3	3.54	3.25
Bloques	9.72	2	4.86	4.46
Error	6.52	6	1.09	
Total	26.87	11		

$$F_{0.05,3,6} = 4.76$$

$$F_{0.01,3,6} = 9.72$$

$$F_{0.05,2,6} = 5.14$$

$$F_{0.01,2,6} = 10.92$$

Fo (tratamientos) < Fcrítica (tanto con 0.05 como con 0.01)

Por tanto, **no se puede rechazar la hipótesis nula**

Fo (bloques) < Fcrítica (tanto con 0.05 como con 0.01)

Por tanto, **no se puede rechazar la hipótesis nula**

## 9.2.DISCUSIÓN DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Analizando los resultados estadísticos obtenidos, primeramente notamos que en ninguno de los cuatro análisis se demuestra que existe diferencia significativa entre las medias de tratamientos, es decir que no hay diferencia en la forma en que cada uno de los desinfectantes reduce la carga microbiana inicial en la hortaliza con respecto a los otros (hablando tanto de microorganismos mesofílicos aerobios como de microorganismo coliformes fecales).

Estos resultados podrían haberse esperado desde un principio ya que aplicando a una hortaliza un procedimiento de lavado, seguido de uno de desinfección se reduce en gran medida la cantidad de microorganismo presentes en su superficie, que como se muestra en los resultados, puede llegar a ser de decenas de millones hablando de microorganismos mesofílicos aerobios.

Además observando las cantidades de microorganismos mesofílicos aerobios finales (después de lavar y desinfectar la hortaliza), independientemente del desinfectante que se haya usado, son demasiado pequeñas comparadas con la cuenta inicial (antes de lavar y desinfectar), por lo que los porcentajes de reducción que se obtienen usando los diferentes desinfectantes son demasiado grandes (más del 95%) y las diferencias en que entre éstos existen no son significativas. En pocas palabras los cuatro desinfectantes reducen la cuenta microbiana más o menos en la misma proporción.

Con respecto a la diferencia entre bloques, es decir, entre hortalizas, se puede notar que en la segunda corrida parece haber diferencia significativa entre la media de bloques, lo que podría significar que los resultados obtenidos por los desinfectantes son diferentes en una hortaliza y otra. Sin embargo, los otros tres análisis estadísticos indican que no lo hay. Con respecto a esto se podría mencionar lo siguiente:

En el análisis estadístico de este tipo de diseños experimentales, resulta de interés la comparación entre las medias de bloques, porque si no hay gran diferencia entre ellas, el análisis por bloques quizá no sea necesario en experimentos futuros, sin embargo en el tipo de experimento que nos ocupa en el presente trabajo, en el que se deben realizar las determinaciones microbiológicas de una sola hortaliza con los cuatro desinfectantes al mismo tiempo, siempre deberemos hacerlo por bloques. La forma como se puede saber si existe diferencia entre bloques es comparando la estadística  $F_0 = MS_{\text{bloques}}/MSE$  con  $F_{\alpha, b-1, (a-1)(b-1)}$ . Sin embargo, debe recordarse que la aleatorización fue aplicada sólo a los tratamientos dentro de los bloques; en otras palabras, estos últimos representan una restricción para la aleatorización.

Con respecto a lo anterior, en la bibliografía se reporta que algunos autores como Box, Hunter y Hunter (1978) argumentan que la prueba F del análisis de varianza puede justificarse solamente con base en la aleatorización. Ellos concluyen que la prueba para comparar bloques no puede ser incluida bajo este argumento a consecuencia de la restricción de aleatorización. Por otra parte, Anderson y McLean (1974) argumentan que la restricción de aleatorización

impide que esta estadística pueda ser útil para comparar la media de bloques.(27)

Por tanto, como la comparación de las medias de los bloques queda en tela de juicio como una prueba F exacta, en general no es conveniente. Por eso, esta prueba se excluye de la tabla de análisis de varianza. Sin embargo, ciertamente el examen de la razón entre  $MS_{\text{bloques}}$  y  $MS_{\text{E}}$  puede ser un procedimiento aproximado para investigar el efecto de la variable bloque. Un valor grande de esta razón, implica que el factor bloque tiene un efecto grande y que la reducción de ruido obtenida al analizar por bloques probablemente fue útil al mejorar la precisión de las comparaciones entre las medias de tratamiento.

Entonces, no sería importante considerar la única ocasión (de los 4 análisis) en que apareció diferencia significativa entre bloques, ya que además solo se demuestra con una  $F_0$  con un nivel de significancia de 0.01 y no así con  $\alpha=0.05$ . Entonces, si debiéramos considerar que uno de cuatro análisis arroja una diferencia de bloques significativa, ésto solo significaría que el factor bloque tiene un efecto grande y que la reducción de ruido obtenida al analizar por bloques nos sirvió al mejorar la precisión de las comparaciones entre las medias de tratamiento.

Tomando en cuenta que el tipo de hortaliza podría significar una variación para la interpretación de los resultados dada su fuente de obtención y las condiciones de cultivo, sería interesante probar estadísticamente si hay interacciones entre los factores "tipo de desinfectante" y "tipo de hortalizas" en alguna de las determinaciones realizadas. Ésto podría analizarse como un diseño factorial de dos factores y realizar un análisis estadístico del Modelo de

Efectos Fijos, sin embargo, debe hacerse énfasis en que las situaciones experimentales que conducen al modelo aleatorio de bloques y al modelo factorial son muy diferentes. En el modelo factorial todos los ensayos experimentales realizados se realizan en orden aleatorio, mientras que en el modelo aleatorio por bloques, la aleatorización ocurre dentro de los bloques. Éstos representan una restricción a la aleatorización y, por lo tanto, la forma en que los datos son recopilados y la interpretación de los dos modelos es muy diferente.

Por tanto, el experimento llevado a cabo en la presente tesis es un diseño aleatorio por bloques completos ya que el único factor que se manejó en orden aleatorio fue el tipo de desinfectante y no el tipo de hortaliza. Es decir, tomando una sola hortaliza se llevó a cabo la aplicación a un mismo tiempo de los cuatro desinfectantes evaluados y la posterior determinación de cargas microbianas, ésto por la facilidad de manejar así las muestras en el laboratorio.

### 9.3.DISCUSIONES ADICIONALES

Aunque estadísticamente no existe diferencia significativa en la forma en que los diferentes desinfectantes reducen la carga microbiana en hortalizas por las razones que ya se señalaron anteriormente, es interesante discutir sobre las gráficas que reflejan los resultados, entre las cuales se observa un comportamiento repetitivo. En cuanto a microorganismos mesofílicos aerobios, el desinfectante que obtiene repetidamente los porcentajes de reducción mayores es el yodo, seguido siempre del desinfectante orgánico. El que muestra los menores porcentajes de reducción es el producto a base de plata coloidal. El cloro muestra un comportamiento irregular con respecto a los otros productos evaluados. Esto podría explicarse por el hecho de que de todos los desinfectantes evaluados, el cloro es el que sufre mayor alteración en presencia de materia orgánica la cual pudo haber quedado en la hortaliza después del lavado y ser ésta la razón por la cual se presentó este comportamiento no homogéneo en el caso del producto a base de hipoclorito de sodio.

Los mayores porcentajes de reducción de microorganismos coliformes fecales los presentan igualmente el yodo y el desinfectante orgánico. El cloro presenta un comportamiento igual al observado en las gráficas correspondientes a los microorganismos mesófilos aerobios. El desinfectante de plata coloidal presenta los porcentajes de reducción de coliformes fecales menores.

Con respecto a la concordancia entre las cuentas microbianas en las hortalizas sometidas a la desinfección y las recomendadas por la Secretaría de Salud tenemos los siguiente:

En la norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, en su apéndice informativo B, aparece una serie de especificaciones microbiológicas para diferentes alimentos, (estas especificaciones no son obligatorias sino recomendatorias). Dentro de estos alimentos se encuentran las ensaladas verdes crudas y se especifica que deben tener máximo 150,000 UFC/g de cuenta total de mesófilos aerobios y un máximo de 100 UFC/g de coliformes fecales.

Si observamos los resultados obtenidos, en absolutamente todas las corridas el número de microorganismos coliformes fecales se encuentra dentro de las recomendaciones citadas. Sin embargo en cuanto a microorganismos mesofílicos aerobios no es así. El desinfectante que repetidamente no revela resultados satisfactorios según este criterio es el producto a base de plata coloidal ya que en cuatro de las 6 corridas se obtiene una cuenta de mesófilos aerobios mayor a 150,000 UFC/g y debe hacerse notar que ésto es independientemente de la cuenta inicial de microorganismos mesofílicos aerobios de que se trate.

## 10. COSTOS DE APLICACIÓN

Sin duda, el mercado de los desinfectantes está claramente dividido en cuanto al sector del mercado que maneja cada fabricante. Algunos de estos productos están posicionados en el mercado de detalle, es decir, supermercados e hipermercados donde el ama de casa y el personal de los pequeños establecimientos dirigidos al servicio de alimentos, tales como fondas, loncherías, cocinas económicas y pequeños restaurantes, adquieren desinfectantes que usarán en el tratamiento de hortalizas que constituirán sus ensaladas frescas. Estos productos se encuentran en su mayoría en envases pequeños de no más de 30 ml y existe un claro dominio de la plata coloidal como el principio activo que más se presenta con distintas marcas en este sector de mercado.

El otro sector de mercado, que aunque podría pensarse que es más atractivo para los fabricantes se encuentra a la par del antes descrito, es aquel que constituyen las plantas procesadoras de alimentos y las grandes cadenas restauranteras y hoteleras. En las primeras, las compañías consumen grandes cantidades de desinfectantes, solo que aquí en su mayor parte estos productos están destinados a la desinfección de equipos y líneas de producción y la cantidad de principios activos que se manejan es muy grande.

Los restaurantes y hoteles destinan parte de los desinfectantes que manejan a su aplicación en hortalizas aunque en su mayor parte se ocupan también para desinfección de equipo, utensilios y loza.

## ANÁLISIS DE LOS COSTOS DE APLICACIÓN DE LOS DESINFECTANTES EVALUADOS

PRINCIPIO ACTIVO	MARCA	CONT NET COSTO (\$)	CONDICIONES DE APLICACIÓN	RENDIMIENTO (l de solución desinfectante)	Costo (\$ / l de solución)	
Hipoclorito de sodio	A	35 ml	6.6	15 gotas / l de agua por 30 minutos	46.6	0.14
Yodo	A	4 lt	237.4	1 ml / l de agua por 15 minutos	4000	0.08
Plata coloidal	A	25 ml	8.15	5 gotas / l de agua por 15 minutos	100	0.081
	B	30 ml	7.25	5-10 gotas/l de agua por 30 minutos	50 a 120	0.145 a 0.061
	C	25 ml	6.6	10 gotas / l de agua por 15 minutos	50 l	0.13
Desinfectante orgánico	A	1 l	225	2 ml / 10 l de agua por 15 minutos	5000	0.045

## 11. CONCLUSIONES

☞ El uso de desinfectantes en los establecimientos de servicio de alimentos y aún en las mismas casas para la preparación de ensaladas crudas es indispensable para que resulten inocuas ya que, dada su forma de producción, la mayoría de las hortalizas que las componen están contaminadas con microorganismos patógenos desde el momento de su adquisición.

☞ En las condiciones en que el manipulador de alimentos utiliza los desinfectantes para la preparación de ensaladas crudas y siguiendo las instrucciones del fabricante de los mismos, se tiene que:

- ☐ Estadísticamente, no existe diferencia significativa entre los % de reducción de carga microbiana obtenidos por los cuatro productos evaluados.
- ☐ El desinfectante cuyo principio activo es el hipoclorito de sodio presenta mayor variabilidad en su comportamiento con respecto a los demás en cuanto a su capacidad para disminuir carga microbiana originalmente presente en la hortaliza. El resto de los productos evaluados presentan un comportamiento homogéneo en todas las determinaciones.

- ❑ El producto que presenta en la mayoría de las determinaciones una mayor capacidad de reducir carga microbiana es el desinfectante a base de yodo.
  
- ❑ El desinfectante que se presenta más deficiente en cuanto a su poder germicida es el que tiene como principio activo la plata coloidal, ya que en la mayoría de las determinaciones presenta los menores porcentajes de reducción.
  
- ❑ En las hortalizas desinfectadas con todos los productos evaluados se obtienen cantidades de microorganismos coliformes fecales que se encuentran dentro de las recomendaciones de la NOM.-093-SSA1-1994.
  
- ❑ En cuanto a los microorganismos mesófilos aerobios, no en todos los casos se obtienen cuentas que cumplan con las recomendaciones citadas en la norma correspondiente , siendo el producto que en mayores ocasiones presenta este problema, el desinfectante a base de plata coloidal.

☞ Las afirmaciones hechas anteriormente pueden no ser ciertas en otras condiciones ya que los desinfectantes ven afectado su poder germicida por una serie de factores externos. La forma en que éste se ve afectado depende del principio activo del desinfectante que manejemos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams MR, Hartley AD, Cox LJ. *Factor affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads*. Food Microbiology, 1989, 6 (2), 69-77.
- 2) Banwart, George. (1989). *Basic Food Microbiology*, AVI Publishing Company, United States.
- 3) Banwart, George. (1990, 14a. Ed). *Microbiología Básica de los Alimentos*. Bellaterra, España.
- 4) Berg Gerald. (1978) *Indicators of viruses in water and Food*. Ann Arbor, United States.
- 5) Bryan Edward A, George P. Fulton. (1992). *Desinfection. Alternative for Safe Drinking Water*. Nostrand, United States.
- 6) Codex Alimentarius. *Código Internacional Recomendado de Prácticas. Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969)*
- 7) Cotrino V, Torres A. Echeverría C., Peña N. *Un nuevo enfoque para la evaluación de la potencia germicida de desinfectantes químicos aplicada al cloruro de benzalconio*. Facultad de Medicina y Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, 1976, 32 (3) 121-130.
- 8) De Chavez Miriam, et al. (1992, 2a. Ed.). *Tablas de uso Práctico del Valor Nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México*. Comisión Nacional de Alimentación, Instituto Mexicano Salvador Zubirán.
- 9) Denver Russel, Furr James, Maillard Jean. *Microbial Susceptibility and Resistance to Biocides*. ASM NEWS, 1998, 52 (4), 481-487.
- 10) Guthrie Rufus K. (1983, 2a Ed). *Food Sanitation*. AVI Publishing Company, United States.

- 11)Harvey Marilin Diamond. (1988). *La antidieta*. Uirano, España.
- 12)Internacional Commision on Microbiological Specifications for Foods. (1980). *Ecología Microbiana de los Alimentos*. Vol 1. Acribia, España.
- 13)International Commision on Microbiological Specifications for Foods. (1996) *Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional, Gran Bretaña.
- 14)International Commision on Microbiological Specifications for Foods. (1983, 2a Ed.). *Microorganismos de los alimentos,. Técnicas de Análisis microbiológico*. Vol 1. Acribia, España.
- 15)Internacional Commision on Microbiological Specifications for Foods. (1996). *Microorganisms in Food. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality*. Blackwell Scientific Publications, España.
- 16)Ito K. Seeger ML. *Effects of germicides on microorganisms in can cooling waters*. Journal of Food Production, 1980, 43 (6), 484-487.
- 17)Jones, Jonh I, Tropeano Edward. (1988). *Chlorinates Water Causes Cancer*. National Enquirer. United States.
- 18)Joseph, Frank; Foffi Rose. *Surface-adherent Growth of Listeria monocytogenes in Associated with Increased Resistance to Surfactant Sanitizers and Heat*. Journal of Food Protection, 1990, 53 (7), 550-554.
- 19)Joseph F. Frank, Revis A. N. Chmielewski. *Effectiveness of Sanitation Quaternary Ammonium Compound or Chlorine on Stainless Steel and Other Domestic Food-Preparation Surfaces*. Journal of Food Protection, 1997, 60, (1), 43-47.
- 20)Jowit Ronald. (1980). *Hygienic Design and Operation of Food Plant*. National College of Food Technology, Inglaterra.
- 21)Kivana, M. *Antibacterial Activities of Essential Oils from Turkish Spices and Citrus*. Flavour Fragrance Journal, 1980, 10 (1), 175-179.
- 22)Montgomery, Douglas C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México.

- 23) Mosley EB, Elliker PR, Hays H. *Destruction of food spoilage, indicator and pathogenic organisms by various germicides in solution and on a stainless steel surface.* Journal of Milk and Food Technology, 1979, 39 (12), 830-836.
- 24) Muller, G. (1991). *Microbiología de los Alimentos Vegetales*. Acribia, España.
- 25) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1984, 14a. Ed). United States.
- 26) Pedrero, L. D. Pángborn, R.M. (1989). *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos*. Alhambra, México.
- 27) Pelczar, M.J. (1984). *Elementos de Microbiología*. McGraw-Hill, México.
- 28) Procuraduría Federal del Consumidor, Coordinación de Investigación, Dirección Químico-Biológicas. (1996) *Estudio de Calidad de soluciones desinfectantes*. México.
- 29) Ramirez-Gama R.M., B.M. Luna, et al. (1992). *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química UNAM, México.
- 30) Remartinez, R. (1987). *Vitalidad y alimentación racional*. CYMYS, España.
- 31) Remes, Alfredo. *Los sanitizantes y su reactividad en la eliminación de microorganismos específicos en suspensión o en superficies.* Lácteos y Cárnicos, 1995, 10 (6), 12-15.
- 32) Richardson S.D., Thruston, A.D. *Chemical By-products of Chlorine and Alternative Desinfectants.* Food Technology, 1998, 52 (4), 58-61.
- 33) R. H. H. Wills, T. H. Lee, et. al. (1981). *Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas Post-recolección*. Acribia, España.
- 34) Secretaría de Salud. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y servicios. (1994). *Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad*. México D.F.
- 35) Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-092. Bienes y Servicios. Método para Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa*. México.
- 36) Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1. 1994, Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de Alimentos que se ofrecen en Establecimientos Fijos*. México.

**37)** Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.* México.

**38)** Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.* México.

**39)** Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable.* México.

**40)** Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes fecales. Técnica del Número Más Probable.* México.

**41)** Short course IFT. *Good Sanitation: Cornerstone of Food Quality and Safety.* NEW ORLEANS, 1996.

**42)** Taylor, Steve. *Foodborne Diseases.* (1990). Edited by Dean O. Cliver Food Research Institute. University of Wisconsin. United States.

**43)** The American Water Works Association, Inc. (1975). *Control de Calidad y Tratamiento del agua. Manual de abastecimientos públicos de aguas.* Instituto de Estudios de Administración Local. España.

**44)** Troller, John A. (1983). *Sanitation in Food Processing.* Academic Press INC. United States.

**45)** Villa R, Hernández R., Legoburo MB. *Bacterial decontamination of horchata de chufas by pretreatment of tubers.* Revista de Agriquímica y tecnología de Alimentos, 1970, 10 (1), 117-124.

**46)** Wilbur A. Gould, Ph. D. (1990). *CGMP's / Food Plant Sanitation.* CTI Publications, INC., United States.

**47)** Zinsser. (1971, 4a. Ed.). *Microbiología de Zinsser.* Hispanoamericana, México.