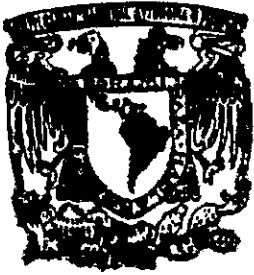


18
24j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

"APLICACION DE ONDAS DE CHOQUE A
Escherichia coli COMO ALTERNATIVA A LA
CONSERVACION DE ALIMENTOS"

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

CLAUDIA HERNANDEZ GALICIA

ASESOR DE TESIS: DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

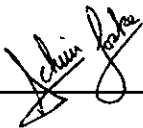
Presidente	Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal	Prof. Mercedes Palao Rincón
Secretario	Prof. Achim Max Loske Mehling
1er. Suplente	M en C. Blanca E. García Almendárez
2do. Suplente	Prof. Aurora Irma Ortegon Avila

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física de la UNAM, Juriquilla Querétaro.

Asesor:

Dr. Achim Max Loske Mehling



Supervisor técnico:

M en C. Blanca E. García Almendárez



Sustentante:

Claudia Hernández Galicia



DEDICATORIAS

A DIOS: *porque me permite gozar de su presencia.*

A TI PAPA Y MAMA: *por el cariño, apoyo, enseñanzas y principios que me inculcaron. A ti mamá, que te debo tanto, por todas las mañanas que te levantaste temprano para darme de desayunar y por tener siempre un espacio en tu corazón para mí. A ti papá por enseñarme las primeras letras y el valor de la vida.*

A MIS HERMANOS: *Kenia y Luis Felipe por la dicha de contar con sus palabras de aliento, apoyo y el cariño de estar juntos.*

A TI ABUELITA LUPITA: *por el cariño y cuidados que siempre me has brindado.*

A TI EDUARDO: *por contar con tu apoyo, cariño, paciencia y especialmente por compartir conmigo las alegrías y tristezas durante el transcurso de mi tesis. Te quiero mucho.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

*Gracias por el cariño y regaños que me brinda mi **Familia Paterna**, en especial a mi tía **Catalina** por su apoyo incondicional.*

*A la **UNAM**, por darme la oportunidad de realizar mis estudios, y a pesar de sus problemas que atraviesa siempre será la mejor.*

*Al **Dr. Achim M. Loske** por todas sus atenciones, tiempo e interés en la dirección de este trabajo. También quisiera expresar mi admiración por usted, no solo por su excelente labor como investigador, sino por su calidad humana. Así mismo, le agradezco a usted y a su equipo de trabajo por recibirme tan cálidamente en su laboratorio y hacerme sentir como en casa, por su apoyo en el estudio de las ondas de choque en alimentos y por su amistad.*

*Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento al **Dr. Fernando Prieto**, por la confianza depositada en mí, así como por su tiempo en la dirección y apoyo incondicional en la realización de esta tesis, pero sobre todo por su afecto.*

*Por otro lado, le agradezco al **Dr. Víctor Castaño** su valiosa cooperación y la oportunidad de continuar con el proyecto.*

*Asimismo quiero resaltar mi agradecimiento a la **M en C. Blanca E. García Almendárez** por su oportuna intervención y comentarios que contribuyeron a enriquecer este trabajo, así como por su tiempo y apoyo.*

*A los **miembros del jurado**, les doy las gracias por su tiempo en la lectura, corrección y crítica de este trabajo.*

*Agradezco también a toda la comunidad del Departamento de **Física Aplicada y Tecnología Avanzada** del Instituto de Física de la UNAM.*

*Y no por ser los últimos, son los menos importantes, un eterno agradecimiento a mis amigos y amigas: **Daniela, Elizabeth, Olga, Adrianita, Miriam, Gerardo, Adriana y Lourdes** por comprenderme y porque, a pesar de todo, siguen siendo mis amigos.*

*Y no me olvido de ustedes, mis compañeros y amigos del laboratorio por su paciencia, en especial a **Eduardo** por su apoyo incondicional en la elaboración de los diagramas y dibujos del presente trabajo, por la operación del Mexilit y por su valiosa ayuda en la parte microbiológica. A **Arturo** por su colaboración en el funcionamiento y mantenimiento del Mexilit.*

Por lo tanto, gracias por todos aquellos que siempre han creído y estado ahí para apoyarme.

Claudia Hernández Galicia.

PROLOGO

En virtud a mi interés desarrollé el presente trabajo en el Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM), a cargo de los doctores **Fernando E. Prieto** y **Achim M. Loske**, quienes generaron la idea de una posible técnica de conservación de alimentos por Ondas de Choque Débiles.

En este sentido debo resaltar que esta tesis es un proyecto multidisciplinario, por lo que menciono la importante asesoría en el área microbiológica de la M en C. **Blanca E. García Almendárez** de la División de Estudios de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ.

Claudia Hernández Galicia.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
1. LA FISICA DE LAS ONDAS DE CHOQUE DEBILES	3
1.1 ¿QUE ES UNA ONDA DE CHOQUE DEBIL?	3
1.2 DIFERENTES METODOS QUE EXISTEN PARA GENERAR LAS ONDAS DE CHOQUES DEBILES	8
1.2.1 METODO ELECTROHIDRAULICO	8
1.2.2 METODO POR MICROEXPLOSIVOS	12
1.2.3 METODO CON ELEMENTOS PIEZOELECTRICOS	13
1.2.4 METODO POR RAYO LASER	14
1.2.5 METODO ELECTROMAGNETICO	14
1.3 DESARROLLO HISTORICO DE LAS ONDAS DE CHOQUE	15
1.4 APLICACIONES DE LAS ONDAS DE CHOQUE DEBILES	17
2. CONSERVACION DE LOS ALIMENTOS	18
2.1 ¿QUE ES CONSERVAR UN ALIMENTO?	18
2.1.1 CAUSAS PRINCIPALES DE ALTERACION	19
2.2 DESARROLLO HISTORICO DE LA CONSERVACION DE LOS ALIMENTOS	21

	Pág.
2.3 METODOS DE CONSERVACION	25
2.3.1 PROCEDIMIENTOS QUIMICOS	25
2.3.2 PROCEDIMIENTOS FISICOS	29
2.3.3 PROCEDIMIENTOS BIOLOGICOS	34
3. POSIBLE APLICACION DE LAS ONDAS DE CHOQUE EN ALIMENTOS	35
3.1 PULSOS DE PRESION EN ALIMENTOS	35
3.2 GENERADOR EXPERIMENTAL DE ONDAS DE CHOQUE	36
3.3 OBJETIVOS	39
4. METODOS Y MATERIAL	40
4.1 METODOLOGIA	41
4.1.1 INFORMACION ESPECIFICA DE LA CEPA	41
4.1.2 PREPARACION DE LA MUESTRA DE <i>E.coli</i>	41
4.1.3 CONDICIONES DE TRABAJO PARA EL MEXILIT II Plus	44
4.1.4 MEDICION DE PRESIONES	46
4.2 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	47
4.2.1 MATERIAL EN GENERAL	47
4.2.2 SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	48
4.2.3 MATERIAL BIOLOGICO	48
4.2.4 EQUIPO	48

	Pág.
5. RESULTADOS Y DISCUSION	49
5.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>E.coli</i> ATCC 10536	49
5.1.1 CURVA DE CRECIMIENTO TURBIDIMETRICA DE E.coli ATCC 10536	49
5.1.2 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA POBLACION VIABLE DE <i>E.coli</i> ATCC 10536	52
5.2 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE <i>E.coli</i>	54
5.2.1 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE <i>E.coli</i> EN VIALES LLENADOS AL 75% DE SU CAPACIDAD	54
5.2.2 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE <i>E.coli</i> EN VIALES LLENADOS AL 100% DE SU CAPACIDAD	56
5.2.3 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE <i>E.coli</i> EN VIALES PROTEGIDOS DE LA LUZ ULTRAVIOLETA	59
5.2.4 RESULTADOS DE LA MEDICION DE PRESIONES	62
6. CONCLUSIONES	64
7. BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUCCION

Desde los inicios, la humanidad ha sustentado una lucha continua contra el hambre, que es y seguirá siendo uno de los principales problemas que le compete. Sin embargo, la importancia del desarrollo de la ciencia y la tecnología de los alimentos fue reconocida recientemente, y apenas hace unos 20 años se manifiesta en todo el mundo una verdadera preocupación por la implantación de nuevas metodologías para la producción, el procesamiento y la conservación de productos alimenticios.² Por lo tanto, la tendencia de los consumidores a exigir alimentos que conserven al máximo sus características organolépticas y nutritivas tiene como consecuencia un creciente interés por tecnologías alternativas de conservación al tratamiento térmico.

Por tal razón, la principal motivación que me ha llevado a la realización de esta tesis es probar las **ondas de choque débiles** como un nuevo método alternativo en la conservación de alimentos. Para ello se requiere de la integración de diferentes disciplinas, en este caso, en conjunto con un grupo de físicos tratamos de mostrar los efectos que producen las ondas de choques en un microorganismo seleccionado y el por qué podría ser considerado como un nuevo método alternativo de conservación de alimentos.

Cabe mencionar que el Dr. A. M. Loské y el Dr. F. E. Prieto, investigadores del Instituto de Física de la UNAM, generaron la idea de una posible técnica de conservación de alimentos por ondas de choque débiles.^{31, 43}

En 1987 se inició en el Instituto de Física de la UNAM el proyecto de Choques Débiles (CHD), que dio origen a la fundación del Laboratorio de Choques Débiles en el año 1988. Una de las principales motivaciones para la creación de este laboratorio fueron las aplicaciones médicas de las ondas de choque a la desintegración de cálculos renales y/o biliares sin cirugía, mismas que se han desarrollado durante los últimos veinte años, principalmente en Europa y en los

Estados Unidos. El laboratorio cuenta actualmente con un generador de ondas de choque experimental denominado MEXILIT II Plus. En todo el mundo son tres o cuatro las instituciones de investigación que disponen de un equipo experimental comparable al de este laboratorio.²⁹

Como se explicará en el capítulo 3, el MEXILIT II Plus es un generador de ondas de choque por rompimiento eléctrico entre dos electrodos inmersos en agua. Para concentrar las ondas en una región determinada, se usa un reflector metálico de forma semielipsoide. Los objetos que se desean exponer a estas ondas deben estar parcialmente sumergidos en agua, para obtener un acoplamiento acústico adecuado. Debido a ello, el aparato consiste de una gran tina, dentro de la cual se generan las ondas de choque. En la parte superior se encuentra una grúa móvil, la cual sirve para colocar en el sitio adecuado el objeto que se somete a las ondas de choque. Debajo de la tina se encuentran los componentes electrónicos necesarios para generar las descargas eléctricas.²⁶

El objetivo principal de este trabajo es evaluar en forma microbiológica los efectos que sobre el microorganismo *Escherichia coli*, causan las ondas de choque, la luz ultravioleta y la cavitación (efecto secundario) que se generan al producir dichas ondas. Para ello se efectuaron pruebas sobre suspensiones bacterianas con y sin protección a la luz ultravioleta y también sobre suspensiones bacterianas selladas en las cuales disminuye el efecto de cavitación por reflexión de las ondas en la interfase suspensión – aire.

Los resultados obtenidos son de gran importancia, ya que se podría proponer algún sistema que genere ondas de choque para aplicación en alimentos y al mismo tiempo desarrollar nuevas teorías sobre el efecto que producen las ondas de choque sobre otros microorganismos. Además se dará la pauta para futuros protocolos de investigación, proponiendo que diversos alimentos puedan ser tratados por estas ondas de choque y que en un futuro esta tecnología pueda ser implantada como una alternativa para la conservación de alimentos.

CAPITULO 1

LA FISICA DE LAS ONDAS DE CHOQUE DEBILES

La historia del hombre durante los últimos ciento cincuenta años nos presenta un cambio radical en su nivel de vida; son muchos los conocimientos que el ser humano ha logrado acumular y aplicar para su beneficio. Uno de esos avances es el empleo de las ondas de choque débiles en medicina, motivo por el cual en este capítulo se describirá el concepto de onda de choque, las diferentes maneras que existen para generarlas, así como su desarrollo histórico y sus aplicaciones.

1.1 ¿QUÉ ES UNA ONDA DE CHOQUE DEBIL?

Para entender lo que es una onda de choque es importante comprender el concepto de onda con sus características más importantes y la relación que se tiene con las ondas sonoras.

Imaginemos que pudiéramos ver una onda: la observaríamos tal como aparece en la *figura 1.1*, describiendo ondulaciones, donde los puntos más altos se llaman **CRESTAS** de la onda, y los puntos más bajos son los **VALLES** de la onda. De tales ondulaciones depende lo que se llama **FRECUENCIA**, que es el número de ondulaciones por segundo. La **LONGITUD DE ONDA** es la distancia entre dos puntos, situados en una misma posición, de dos ondulaciones consecutivas y la **AMPLITUD DE ONDA** es la altura de la onda.⁵

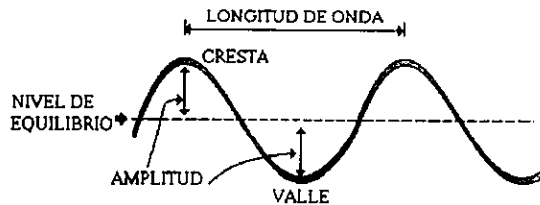


Figura 1.1 Representación de una onda transversal.

El movimiento ondulatorio está íntimamente relacionado con el sonoro. Los sonidos se producen cuando la materia vibra por lo que el sonido viaja, o recorre una distancia en forma de ondas.

La velocidad del sonido varía de acuerdo al medio en el que se propaga y a la temperatura, presión y densidad de este medio. El sonido viaja a través de los cuerpos sólidos, en general, más deprisa que a través de los líquidos y de los gases. La velocidad de propagación del sonido es proporcional a la densidad e inversamente proporcional a la temperatura. Dependiendo de la densidad, la velocidad del sonido a través del aire tiene un valor de aproximadamente **1200 Km por hora**. En los términos científicos actuales a esta velocidad se le da el nombre de **MACH - 1**.

Los aviones supersónicos son aquéllos que rebasan la velocidad MACH-1, o velocidad sónica. Cuando un avión supersónico llega a duplicar la velocidad del sonido, se dice que alcanza MACH-2; las velocidades superiores a MACH-3 reciben el nombre de **hipersónicas** o **ultrasónicas**.

Un avión en vuelo produce sonidos (ruidos). Cuando viaja a velocidades inferiores a MACH-1, las ondas sonoras que origina lo rodean. Como no supera la velocidad del ruido producido por sus motores, también se formarán ondas sonoras por delante del aparato (*figura 1.2 A*).

Si el avión acelera y alcanza la velocidad MACH-1; es decir, la del sonido, o sónica, entonces la velocidad de la nave es la misma que la del sonido que produce, no formándose ondas sonoras por delante del avión, pero frente al avión se acumulan ondas fuertemente comprimidas, que constituyen lo que se llama **BARRERA DEL SONIDO** (*figura 1.2 B*).

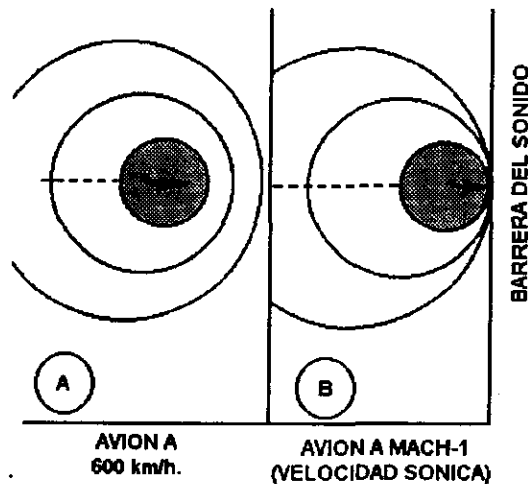


Figura 1.2 Superando la velocidad del sonido.

Al superar la barrera del sonido (MACH – 1), el avión se abre paso entre las ondas acumuladas y deja atrás las ondas sonoras que él mismo ha producido. Se dice entonces que el avión **ROMPE LA BARRERA DEL SONIDO**. Cuando tal cosa

sucede, se forman barreras de aire fuertemente comprimidas, que se extienden desde la proa y desde la cola del avión, en forma de dos enormes conos. A tales barreras se les da el nombre de **FRENTES** u **ONDAS DE CHOQUE** (figura 1.3). Entre las mismas quedan aprisionadas las ondas sonoras acumuladas, producidas por el aparato en vuelo. En los **frentes de choque** ocurre un cambio violento y repentino de la presión del aire. Esto ocasiona dos estampidos muy fuertes, que se suceden rápidamente: el primero corresponde a la onda de choque de la proa; el segundo se debe a la onda de choque de la cola. A tales estampidos se les da el nombre de explosiones sónicas.¹⁴

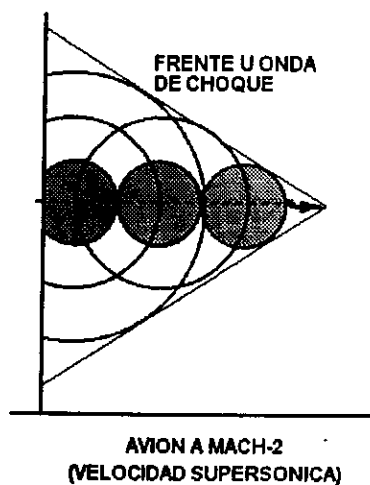


Figura 1.3 Representación de una *onda de choque*.

De acuerdo con lo mostrado en las figuras 1.2 y 1.3, se puede decir que una **onda de choque es: una región muy densa en energía sonora. Es una onda que requiere de un medio gaseoso, líquido o sólido para poder originarse y propagarse, hace vibrar la materia y necesita de ella para poder dispersarse.** Algunas características de una onda de choque es que transporta energía y de acuerdo a ésta, puede sentirse en mayor o menor grado su paso a través del cuerpo, además frecuentemente llega a oírse con intensidad considerable.^{5, 14}

En definición, **una onda de choque débil** es una discontinuidad de presión inferior a aproximadamente 2Kbar (de ahí la palabra débil), que avanza por un medio líquido, sólido o gaseoso. Este tipo de ondas, consta de regiones de presión positiva llamadas **compresiones** y de presión negativa (por debajo de la presión de equilibrio) conocidas como **enrrecimientos o rarefacciones** (figura 1.4).^{26, 30}

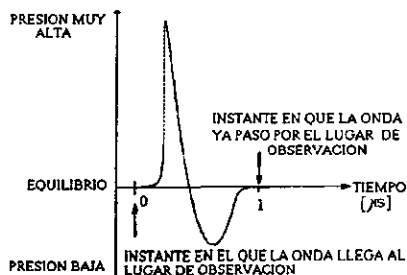


Figura 1.4 Gráfica de las variaciones de presión que se dan al paso de una onda de choque.

Algunos de los efectos que originan las ondas de choque débiles al pasar por la materia, son: cambios de conductividad, polarización eléctrica, efectos termoeléctricos, efectos ópticos, cavitación (formación de burbujas) y fracturas. Además son capaces de destruir células y las células que llegan a sobrevivir a esta agresión continúan con su reproducción y vida normal.²⁸ De aquí surgió la idea de que una aplicación con ondas de choque puede ser considerada como un método alternativo en la conservación de alimentos. Esto se explicará más adelante.

En rigor el término onda de choque no es adecuado, ya que únicamente se trata de un pulso de presión y no de una oscilación, como en el caso mostrado en la figura 1.1. Debido a ello frecuentemente se usa el término frente de choque.

1.2 DIFERENTES METODOS QUE EXISTEN PARA GENERAR ONDAS DE CHOQUE DEBILES

Una onda de choque débil en agua puede generarse de diferentes maneras:

- Por rompimiento eléctrico en agua, conocido como método ELECTROHIDRAULICO.
- Detonando un MICROEXPLOSIVO.
- Excitando una serie de cristales PIEZOELECTRICOS.
- Concentrando la energía de un rayo LASER sobre una región muy pequeña dentro del agua.
- Generando un movimiento brusco de una membrana sumergida en un fluido (agua), conocido como método ELECTROMAGNETICO.

A continuación se dará una breve descripción de cada método.

1.2.1 METODO ELECTROHIDRAULICO

Este método fue desarrollado en Alemania y consiste en aplicar alto voltaje a dos electrodos sumergidos en agua, creándose con esto una descarga eléctrica y consecuentemente un plasma (canal de agua evaporada) a una presión y temperatura muy elevadas. Las partículas que pueden encontrarse en el plasma son: moléculas de agua, de oxígeno, de hidrógeno, de ozono y átomos de los metales que forman a los electrodos, entre otras.²⁶ Este canal de plasma que se forma entre los electrodos se expande súbitamente comportándose como un pistón que comprime el agua.²⁸ Su velocidad de expansión es sumamente grande, dando lugar a una onda de choque esférica, que se propaga a través del medio con una velocidad mayor que la velocidad del sonido en el agua. Para ejemplificar este método obsérvese la *figura 1.5*, donde en la primera imagen se crea el rompimiento eléctrico debido a la gran diferencia de potencial que existe entre los electrodos. Posteriormente se forma un canal cilíndrico de plasma donde la velocidad de expansión es mayor a la velocidad del sonido en el agua. En la tercera imagen, puede observarse la onda de choque viajando a una velocidad

mayor a la del sonido y la burbuja de plasma que aún se encuentra en expansión, pero con una velocidad menor que la de la onda misma. Finalmente, la burbuja se colapsa y la onda de choque se propaga esféricamente por el agua. La presión P_2 en el frente de onda es mucho mayor que la presión P_1 fuera y dentro de la burbuja. Una vez formado el canal, éste aumentará su tamaño hasta el instante en que la presión del agua lo haga colapsarse, esto es, la presión interna del gas decrece hasta que la capa de agua comprimida se separa de la burbuja. La discontinuidad de presión generada (onda de choque) se propaga a través del medio.^{26, 28, 30}

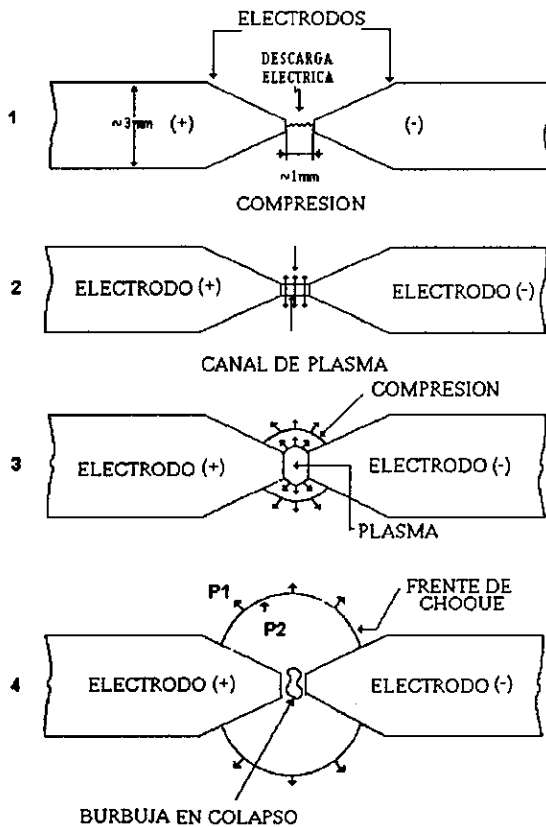


Figura 1.5 Generación de una onda de choque con descargas eléctricas en agua.

La trayectoria que sigue el pulso de compresión, frecuentemente es dirigida hacia otra región mediante reflectores de tipo parabólico o elíptico según sea el caso.

Los reflectores son sólidos de revolución truncados, hechos de acero inoxidable, cuyas paredes internas tienen forma elíptica o parabólica (figura 1.6). Estos reflectores son usados para concentrar la máxima cantidad de energía liberada por la descarga eléctrica en el agua. El frente de choque originado se produce en el foco 1 (F_1) de una sección del elipsoide. Posteriormente se refleja hacia el foco 2 (F_2) del elipsoide, lugar en el cual se dará la máxima concentración de energía. Es en ese punto, donde deberá situarse el objeto que se desea destruir (figura 1.6A). Dependiendo de la energía, en algunos casos la onda de choque puede formarse incluso antes de la reflexión.^{26, 27, 43}

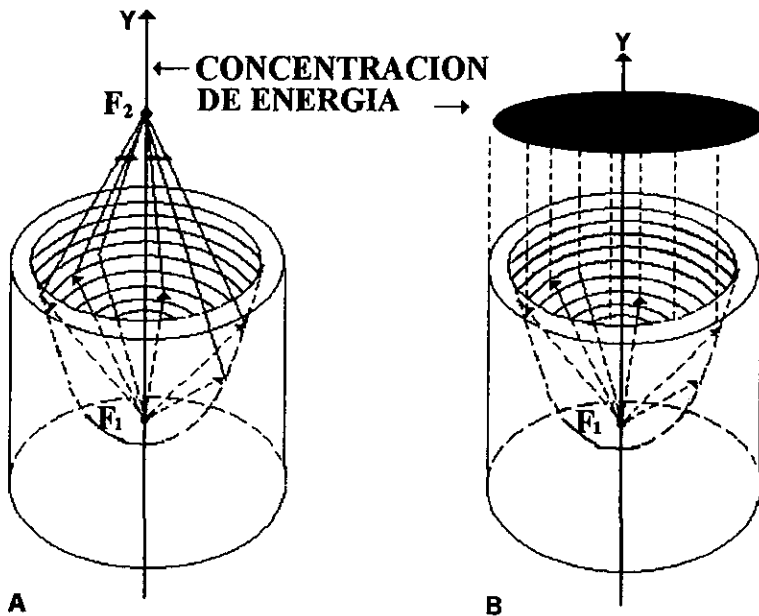


Figura 1.6 Concentración de una onda de choque usando reflector A. elíptico y B. parabólico.

Como ya se explico, existen litotriptores electrohidráulicos que generan ondas de choque por medio de descargas eléctricas de alto voltaje entre dos electrodos inmersos. Las principales ventajas de estos equipos son el bajo costo del generador, su diseño relativamente sencillo, el hecho de que produce una onda de choque con un tiempo de ascenso muy corto, además que el indice de tratamientos secundarios es muy bajo (*figura 1.7*). Las desventajas son, el inevitable desgaste de los electrodos y la variación de presión entre una onda de choque y otra, pero a pesar de estas desventajas han tenido una gran aceptación y éxito desde hace más de 17 años.³⁰

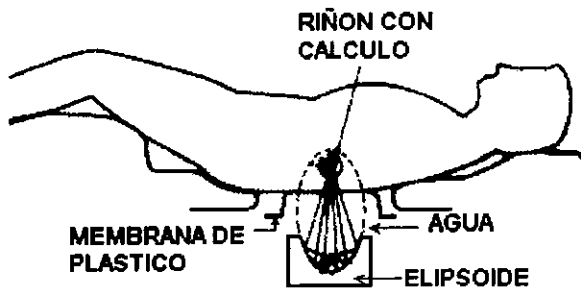


Figura 1.7 Litotriptor extracorporal electrohidráulico.

1.2.2 METODO POR MICROEXPLOSIVOS

Este método fue creado en Japón a partir de 1977. Su principio es similar al método descrito anteriormente. Aquí la onda de choque esférica no se produce por una descarga eléctrica, sino por la explosión de un microexplosivo en agua, formando un plasma similar al que se forma en el electrohidráulico. Al igual que en el método anterior, los generadores microexplosivos usan reflectores elípticos para concentrar las ondas de choque sobre el objeto a tratar (*figura 1.8*).²⁶

Este método no es de uso común, por ser lento al estar reemplazando la carga explosiva después de cada onda de choque generada, de modo que para un tratamiento se requieren varios cientos de microexplosivos. Además se tiene el peligro que representa almacenar grandes cantidades de ellos.

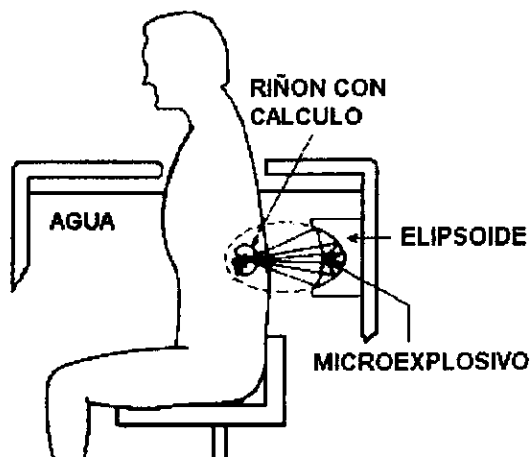


Figura 1.8 Litotriptor extracorporeo que genera ondas de choque por microexplosivos.

1.2.3 METODO CON ELEMENTOS PIEZOELECTRICOS

Fue desarrollado en Alemania alrededor de 1980 y consiste en un cristal piezoeléctrico, generalmente de bario, que es capaz de aumentar o disminuir bruscamente su tamaño, cuando se le aplica alto voltaje. Para generar la onda de choque, cientos de cristales piezoeléctricos se montan sobre una superficie cóncava (cascarón esférico) y reciben un pulso de alto voltaje, que origina su expansión y una consecuente compresión del agua circundante, de tal forma que una gran cantidad de la energía generada por cada uno de ellos incida sobre el objeto a tratar (*figura 1.9*).^{26, 30} Al igual que en los métodos anteriores, se requiere aplicar cientos de ondas de choque para pulverizar un cálculo renal.

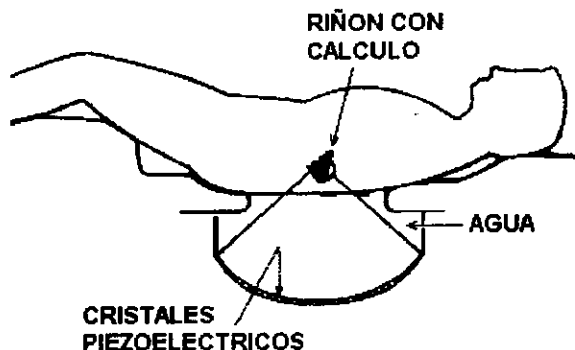


Figura 1.9 Litotriptor extracorporal que genera ondas de choque por un sistema piezoeléctrico.

1.2.4 METODO POR MEDIO DE RAYO LASER

Este método es similar al electrohidráulico y al de microexplosivos; la única diferencia es que ahora la burbuja se forma por la elevada temperatura que se produce con el láser. El equipo no utiliza altos voltajes ni explosivos, pero debido a que el agua debe tener casi un 100% de pureza este método no se ha comercializado.²⁶

1.2.5 METODO ELECTROMAGNETICO

Este método genera ondas de choque planas, aplicando alto voltaje a una bobina que funciona como un electroimán, rechazando a una membrana metálica y generando con ello ondas de compresión planas dentro del agua. Una lente acústica bicóncava (análoga a una lente óptica) es la encargada de concentrar la energía en el objeto a tratar (*figura 1.10*).^{26,30}

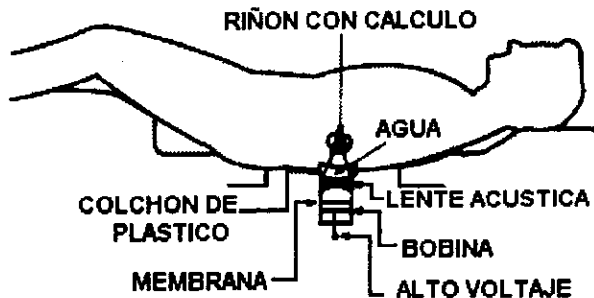


Figura 1.10 Litotriptor extracorporeo que genera ondas de choque por el sistema electromagnético.

Las ondas de choque al usarse adecuadamente, se pueden obtener beneficios a favor de la humanidad.

1.3 DESARROLLO HISTORICO DE LAS ONDAS DE CHOQUE

El gran impacto que han tenido las ondas de choque, son las aplicaciones médicas que se han desarrollado durante los últimos veinte años, principalmente en Alemania, Estados Unidos, Japón, Inglaterra, Francia, Italia y China. Se trata de la LITOTRIPSIA EXTRACORPORAL por ondas de choque, que es una técnica *no invasiva* para el tratamiento de cálculos renales, biliares y salivales. Otra importante aplicación en estos últimos diez años, es en ORTOPEDIA. Para comprender el enorme avance que han tenido estos tratamientos, a continuación se hará una breve reseña histórica (*tabla 1*).²⁶

Posiblemente el cálculo urinario más antiguo del que se tiene noticia es el que descubrió E. Smith en una tumba prehistórica de Egipto, en 1901. La litiasis como enfermedad data desde la antigüedad egipcia (algunos siglos antes de la era cristiana). Pasaron bastantes años para que la tecnología diera un cambio casi total al tratamiento quirúrgico clásico de la litiasis renal, ureteral y vesical, pasando de invasiva, endoscópica, ureteroscopía o endourología, hasta llegar al tratamiento totalmente no invasivo, como lo es la litotripsia extracorporal por ondas de choque. Desde el primer tratamiento efectuado en Alemania el 7 de febrero de 1980, miles de pacientes en todo el mundo han sido beneficiados con este avance tecnológico. Actualmente existen alrededor de 20 compañías que ofrecen litotriptores, es decir, aparatos que pulverizan cálculos renales y/o biliares con ondas de choque. En 1986 se inició el estudio experimental de la aplicación de las ondas de choque al tratamiento de fracturas en ratas, conejos y perros, pero fue hasta 1992 que se realizó con éxito el primer tratamiento en humanos usando el equipo *OssaTron* fabricado por la compañía *High Medical Technologies* (Suiza) en conjunto con la *Universidad de Bochum* (Alemania). Hasta la fecha se han usado seis modelos de generadores de ondas de choque en ortopedia.

Tabla 1. Desarrollo histórico de las ondas de choque.

1950	Yutkin propuso en Rusia la idea de desintegrar cálculos atrapados en el uretero con un dispositivo denominado YPAT-1 que usaba ondas de choque electrohidráulicas.
1959	V.Goldberg fue el primero en usar el método electrohidráulico para desintegrar cálculos renales en forma invasiva.
1970	E.Häusler de la Universidad de Saarland en Saarbrücken, Alemania, fue el primero en proponer la desintegración de cálculos renales en forma no invasiva con ondas de choque.
1971	E.Häusler (físico) y Ziegler (urólogo), fueron los primeros en publicar investigaciones relacionadas con el rompimiento de cálculos renales sin cirugía.
1972	W.Hepp publicó un trabajo referente a las pruebas iniciales de desintegración extracorporal de cálculos renales con ondas de choque.
1974-1980	Watanabe y sus colaboradores realizaron en Japón pruebas de litotripsia con microexplosivos. Kurtze y Riedlinger de la Universidad de Karlsruhe, Alemania inventaron el sistema piezoeléctrico. En la clínica urológica de Munich, Alemania en colaboración con la compañía DORNIER se desarrolló el primer litotriptor electrohidráulico, marcando una nueva era para la urología y nefrología.
1980-1982	Se inaugura el primer centro de litotripsia en Munich, Alemania. Se realizan con éxito 200 tratamientos con el litotriptor HM-1 de la compañía DORNIER. Se realiza el primer tratamiento clínico con litotripsia usando microexplosivos, en Japón.
1983-1984	Se crea una segunda versión del litotriptor DORNIER, denominado HM-2, realizando 1000 tratamientos en el centro de litotripsia de Munich, Alemania. Se instalaron seis centros de litotripsia en Estados Unidos y un centro en Japón.
1985-1986	La compañía WOLF realiza el primer tratamiento usando un litotriptor piezoeléctrico. La compañía SIEMENS saca al mercado un equipo que funciona con un sistema electromagnético. Es tratado el primer paciente para desintegrar un cálculo biliar. Se comenzó con el estudio experimental de la aplicación de ondas de choque al tratamiento de fracturas en ratas, conejos y perros.
1991-1992	Fueron reportados los primeros resultados clínicos en humanos, de la aplicación de las ondas de choque al tratamiento de fracturas. Se realizó con éxito el primer tratamiento con el equipo que desarrolló la compañía suiza HMT (High Medical Technologies) en conjunto con la Universidad de Bochum, Alemania.

1.4 APLICACIONES DE LAS ONDAS DE CHOQUE DEBILES

Las ondas de choques débiles, tienen gran aplicación en la medicina. Una de ellas es la litotripsia extracorporal. Paralelamente se realizan investigaciones sumamente interesantes, por ejemplo: la aplicación de estas ondas a tumores malignos, encontrándose que inhiben hasta cierto grado su crecimiento. Otras posibles aplicaciones son la desintegración de calcificaciones en articulaciones, el tratamiento de conductos arteriales obstruidos y la aplicación a huesos con crecimiento acelerado.^{26, 28}

Desde el punto de vista físico, el empleo de estas ondas ha tenido y tiene gran importancia, por ejemplo, en la Ecogoniometría para su uso en la navegación marítima y determinación de profundidades en el mar. Otro tema de gran interés, son los fenómenos de cavitación y microjets que se presentan como consecuencia del paso de una onda de choque.²⁶

En un futuro, es muy probable que se desarrollen nuevas aplicaciones de las ondas de choque débiles en medicina, biología, química y física.

Recientemente se han llevado a cabo estudios experimentales para investigar el efecto que producen las ondas de choque débiles sobre ciertos microorganismos.^{21, 31} La finalidad es establecer una cinética de muerte que demuestre estadísticamente el efecto de este tratamiento en algunos microorganismos. En función de los resultados que se obtengan, dar la pauta para nuevos protocolos en la aplicación de estas ondas a algunos alimentos y comprobar si este método cumple con las características necesarias para poder ser considerado en un futuro, como un método alternativo en el campo de la conservación de alimentos.

La interacción de las ondas de choque con la materia abre un campo sumamente interesante, en el cuál aún hay mucho por hacer.

CAPITULO 2

CONSERVACION DE LOS ALIMENTOS

La conservación de los alimentos consiste en mantener al máximo su calidad, luchando para ello contra un conjunto de mecanismos de alteración. Es por consiguiente la composición del alimento quien determina que método es él más apropiado para su conservación.

En este capítulo se definirá: qué es conservar un alimento, su desarrollo histórico y los métodos que existen de conservación hasta el momento.

2.1 ¿QUE ES CONSERVAR UN ALIMENTO?

La gran mayoría de los alimentos pasan por una fase de almacenamiento, ya sea como materia prima o como producto terminado, y es necesario evitar durante esta fase su alteración por microorganismos o procesos fisicoquímicos, con el fin de conservar al máximo sus características nutritivas y sensoriales.

La conservación de alimentos es por tanto, tomar las medidas necesarias para evitar la descomposición y prolongar su duración durante esta fase. Para esto existen diferentes métodos que proporcionan un amplio margen de tiempo de conservación que incluye desde los de corta hasta los de amplia duración.^{11, 17, 19}

2.1.1 CAUSAS PRINCIPALES DE ALTERACION

Existen en general, dos causas principales de alteración en los alimentos.

A) ALTERACION POR PROCESOS FISICOQUIMICOS

Las reacciones de Maillard: son reacciones de oscurecimiento no enzimático que requieren de un azúcar reductor (pentosas, hexosas, aldosas) y un grupo amino libre proveniente de un aminoácido o de una proteína. Al reaccionar dan como resultado las melanoidinas (polímeros pardos y amargos) coloreadas que van desde amarillo claro hasta café oscuro, o incluso negro. Este tipo de reacción es deseable por ejemplo, en productos horneados (costra del pan); sin embargo, es indeseable en otros productos, como en las leches evaporadas, azucaradas y en algunos jugos concentrados.^{2, 10}

La desnaturalización de las proteínas: es un fenómeno que modifica la organización estructural de las proteínas, en donde pierden sus estructuras cuaternaria y secundaria. Los principales agentes desnaturalizantes son el calor, el alcohol, la acetona, los ácidos, los rayos ultravioleta, etc.²

Las oxidaciones no enzimáticas: este tipo de reacciones producen alteración en lípidos y por lo general en ácidos grasos insaturados (auto-oxidación) generando productos rancios, por ejemplo en mantequilla.¹⁰

Reacciones enzimáticas: En los procesos de conservación es necesario inactivar a las enzimas para poder mantener en buen estado al alimento. La mayor parte de enzimas asociadas a la alteración de alimentos son peroxidadas, lipoxigenasas, catalasas, etcétera; por ejemplo, cuando se activan las pectinesterasas y poligalacturonasas durante la maduración de los frutos provocan ablandamiento y con ello frutos con vida de anaquel corta. Para evitar esto, es necesario inactivarlas.¹⁷

B) ALTERACION POR MICROORGANISMOS

Estas alteraciones son debido a las actividades metabólicas de los microorganismos sobre el alimento.

Los microorganismos, que generalmente causan alteración en los alimentos son las bacterias, las levaduras y los mohos. Por ejemplo, las naranjas y muchos cítricos presentan a menudo un moho verde, el *Penicillium digitatum*, las manzanas pueden ser atacadas por *Penicillium expansum* y las fresas son propensas a la descomposición por *Botrytis sp.* Por otro lado, en función de sus requerimientos nutricionales y ambientales el microorganismo crecerá en diversos alimentos. Por ejemplo, bajo condiciones salinas crecerán los microorganismos *halófilos*, afectando por lo general alimentos marinos, mientras que en medios azucarados crecerán los *osmófilos*, apareciendo en jaleas y jugos concentrados.^{11, 17}

Muchos hongos y bacterias producen esporas que son resistentes a la esterilización y a los conservadores, motivando con esto a la ciencia a buscar nuevas alternativas a los métodos ya existentes.

2.2 DESARROLLO HISTORICO DE LA CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

La historia de la conservación de los alimentos se remonta al hombre primitivo y a su necesidad de sobrevivir. La primera cita bibliográfica que se tiene de la conservación es en la Biblia (1. Libro de Moisés, capítulo 41, versículo 35) donde se menciona que el faraón ordenó a José en los 7 años de abundancia que conservara la quinta parte de la cosecha en graneros para no carecer de alimento durante los 7 años de escasez. Esta conservación fue el primer almacenamiento que utilizó el dióxido de carbono producido en la respiración y que actuó como protector para el deterioro microbiano. Con el transcurso del tiempo esta conservación natural de los alimentos fue haciéndose cada vez más difícil, por lo que se fueron desarrollando nuevas técnicas, como por ejemplo, el desecado y salado. En los relatos antiguos mencionan que los alimentos consumidos por los marinos y las gentes que vivían en tierra firme durante el invierno eran carne y pescados desecados o salados; también se inició el uso de algunos conservadores, como el alcohol, el humo, ácido acético, láctico, que perduraron aproximadamente dos mil años. La necesidad de conservar los alimentos se hizo cada vez más urgente, la humanidad se volvió más exigente, ya no se conformaba con los conservadores empleados hasta entonces, debido a que alteraban profundamente las propiedades nutricionales y la estructura de los alimentos. Fue de ahí donde el progreso de la química influyó en la conservación de los alimentos; se empezó a pensar en qué principios se basaban los procedimientos de conservación empleados hasta entonces. Por tal razón desde hace unos 100 años aumentó el interés por el desarrollo y la investigación en la conservación.^{7,11,17,19}

El comienzo de la industrialización dio lugar a nuevas técnicas de gran importancia en la conservación de los alimentos, por ejemplo, la congelación y la refrigeración.

A continuación se relacionan algunas de las fechas con los acontecimientos más significativos en la historia de la conservación de los alimentos (tabla 2):

Tabla 2. Desarrollo histórico de la conservación de los alimentos.

1782	Un químico sueco puso en práctica el enlatado del vinagre.
1810	En Francia, Appert patentó la conservación de los alimentos mediante enlatado. Peter Durand obtuvo una patente británica para conservar alimentos en "recipientes de vidrio, de hojalata o de otros metales". Más tarde, la patente fue adquirida por Hall, Gamble y Donkin, posiblemente procedente de Appert.
1813	Donkin, Hall y Gamble introdujeron la práctica de la incubación de los alimentos enlatados después de su tratamiento. Se cree que en torno de este año se implantó el uso de SO ₂ como conservador de carnes.
1825	Fue concedida una patente de los EE.UU. a T.Kenset y a E.Dagget para conservar alimentos en botes de hojalata.
1835	En Inglaterra, se concedió una patente a Newton para fabricar leche condensada.
1837	Winslow fue el primero en enlatar el maíz separado del carozo.
1839	A L.A. Fastier le fue concedida una patente francesa para utilizar una solución de salmuera con el fin de elevar la temperatura de ebullición del agua.
1840	Se enlataron por primera vez el pescado y el azúcar.
1841	S. Goldner y J. Wertheimer obtuvieron patentes británicas para soluciones de salmuera basadas en el método de Fastier.
1842	En Inglaterra, se concedió una patente a H. Benjamin para congelar alimentos por inmersión en una salmuera de hielo y sal.
1843	En Maine, I. Winslow fue quien primero intentó la esterilización mediante vapor de agua.
1845	S. Elliot introdujo el enlatado en Australia.
1853	R. Chevalier y Appert obtuvieron una patente para esterilizar alimentos en autoclave.

Continuación de la tabla 2	
1854	Pasteur inició sus investigaciones con el vino. El calentamiento para eliminar los microorganismos indeseables fue utilizado a escala comercial en 1867-1868.
1855	En Inglaterra, Grimwade fue quien primero fabricó leche en polvo.
1856	En los EE.UU., le fue concedida una patente a Borden para fabricar leche condensada no azucarada.
1861	Salomon introdujo el uso de las soluciones en salmuera.
1865	En los EE.UU. se inició a escala comercial la congelación artificial del pescado. En 1889 se utilizó en la congelación de huevos.
1874	Se inició el primer uso extensivo del hielo en el transporte de carne por vía marítima. Se pusieron en uso las calderas de vapor a presión o autoclaves.
1878	Procedente de Australia, llegó en buenas condiciones a Inglaterra el primer cargamento de carne congelada.
1880	En Alemania se inició la pasteurización de la leche.
1882	Krukowitsch fue quien primero observó el efecto letal del ozono sobre las bacterias causantes de alteración.
1886	Un americano, A.F. Swann, ideó un procedimiento mecánico para desecar frutas y hortalizas.
1890	En los EE.UU se inició la pasteurización comercial de la leche. En Chicago se empezó a utilizar la refrigeración mecánica para conservar las frutas.
1895	Russell realizó el primer estudio del enlatado.
1907	Metchnikoff y sus colaboradores aislaron y dieron nombre a una de las bacterias del yogur, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .
1908	En los EE.UU se autorizó el empleo del benzoato sódico como conservador en determinados alimentos.
1916	En Alemania, R. Plank, E. Ehrenbaum y K. Reuter consiguieron la congelación rápida de alimentos.
1917	Se concedió una patente a Franks para la conservación de frutas y hortalizas en atmósfera de CO ₂ .
1920	Bigelow y Esty publicaron el primer estudio sistemático de la termoresistencia de las esporas a temperaturas superiores a 212°F.

Continuación de la tabla 2	
1928	En Europa, se utilizó por primera vez; a escala comercial, el almacenamiento de manzanas en atmósfera controlada.
1929	Una patente expedida en Francia propuso el uso de la radiación de alta energía para el tratamiento de alimentos.
1943	En los EE.UU., B. E. Proctor fue quien primero aplicó el uso de la radiación ionizante para conservar la carne de las hamburguesas.
1950	Se generalizó el uso del concepto del valor D.
1954	En Inglaterra se patentó el antibiótico nisina para ser utilizado en un determinado queso tratado industrialmente para controlar los defectos debidos a clostridios.
1955	Se autorizó el uso del ácido sórbico como conservador en alimentos.
1967	En los EE.UU., se ideó y diseñó la primera instalación comercial para irradiar alimentos.
1970 –1990	Se estudian nuevos métodos de conservación denominados tratamientos físicos no térmicos, por ejemplo altas presiones hidrostáticas y campos magnéticos.

Los descubrimientos de procedimientos eficaces en la conservación de alimentos, como el salado, la conservación por bajas temperaturas, etcétera, han representado etapas clave en la historia de la humanidad. Hoy día se continua con el desarrollo y la investigación de nuevas tecnologías en la conservación, con el fin de proporcionar alimentos de mejor calidad.^{11, 19}

2.3 METODOS DE CONSERVACION

Los métodos de conservación que existen hasta el momento tienen el objetivo de la destrucción total de los microorganismos, de impedir su reproducción una vez iniciada o de evitar algún proceso fisicoquímico, de forma que se mantengan las características aceptables de calidad nutritiva y sensorial.^{17, 20}

La composición del alimento es quien determina el procedimiento que se debe emplear para su conservación.

Dentro de los procedimientos de conservación en alimentos, se distinguen tres grupos⁹:

- Conservación por **procedimientos químicos** (conservadores).
- Conservación por **procedimientos físicos** (esterilización, pasteurización, refrigeración, congelación, irradiaciones, altas presiones, etcétera).
- Conservación por **procedimientos biológicos** (bacteriocinas).

2.3.1 PROCEDIMIENTOS QUIMICOS

El fundamento de este procedimiento es la adición de una sustancia química al alimento, mas o menos concreta que frene el desarrollo de los microorganismos; a estas sustancias se les da el nombre de **conservadores**.

Los conservadores son sustancias que se emplean por su acción antimicrobiana, donde actúan como fungistáticos o bacteriostáticos (que inhiben la multiplicación de hongos o bacterias) y se deben añadir en dosis pequeñas cuando el microorganismo se encuentre en la fase inicial de crecimiento.^{20, 33, 42}

Los conservadores se pueden clasificar en **antimicrobianos**, **protectores de reacciones de degradación y específicos**.⁹

A) CONSERVADORES ANTIMICROBIANOS^{9, 19, 33, 42}

Acido benzoico: es poco soluble en agua, por tal razón, en alimentos se utiliza en forma de sales (*benzoato de sodio o potasio*). Estas sales son muy solubles en agua (50g/100ml), tienen actividad antimicrobiana que reside en la parte no disociada de la molécula por la que actúan a un pH bajo (2.5 a 4); inhiben generalmente bacterias y levaduras, por tal motivo este conservador es muy empleado en alimentos ácidos como jarabes, refrescos, jugos, jaleas. Su nivel de dosis es de 0.01 a 0.1%; dosis más elevadas pueden presentar sabores desagradables similares a pimienta.

Parabenos: son algunos ésteres del ácido benzoico que se usan para conservar alimentos, conocidos como *parabenos* (heptilparabeno, metilparabeno, propilparabeno). Estos ésteres son muy similares a los benzoatos, con la diferencia de que estos son menos sensibles al pH, por lo que pueden ser usados en alimentos cerca de la neutralidad.

Acido sórbico: en forma de su sal sódica o potásica, tienen actividad antimicrobiana, inhibiendo principalmente mohos y levaduras, siendo menos efectivo para bacterias. Es utilizado por ejemplo, en la industria de quesos, panificación, confitería y en ocasiones para prolongar la vida de anaquel en carnes frescas. Este conservador no presenta toxicidad, debido a que es metabolizado en el organismo a CO₂ y H₂O.

Propionatos: es un ácido orgánico, que junto con sus sales cálcica y sódica ejerce actividad antimicrobiana, similar al benzoato y sorbato, inhibiendo principalmente a mohos, siendo menos efectivo para levaduras y bacterias. Se usa en alimentos menos ácidos, como por ejemplo, pan, pasteles y algunos quesos.

Dióxido de azufre y sulfitos: tienen actividad antimicrobiana que inhibe generalmente bacterias, pero además actúa como protector para evitar alteraciones de oscurecimiento no enzimático (reacciones de Maillard). Se emplea en frutas desecadas, vinos, pero no está permitido en carnes debido a que el ion *bisulfito* reacciona rápidamente, destruyendo a la tiamina de la carne.

Nitritos y nitratos: son empleados en el curado de la carne, actúan como inhibidor de *Clostridium botulinum* y son los responsables del color y el sabor característico. Es importante mencionar, que su uso está estrictamente reglamentado debido a que la interacción de estos nitritos con los aminoácidos del alimento forman las nitrosaminas, que son poderosos agentes cancerígenos; pero a pesar de esto, no se ha prohibido, debido a que no se ha encontrado algún otro compuesto que proporcione esta seguridad antibotulínica.

Cloruro de sodio: es el primer conservador de actividad antimicrobiana que fue utilizado, debido a la capacidad que tiene de reducir la actividad acuosa en los alimentos.

Azúcares: por ejemplo la sacarosa, ejerce su efecto conservador a mayores concentraciones que la sal, son empleados en la elaboración de conservas, bombones, leches condensadas, etcétera.

B) CONSERVADORES PROTECTORES DE REACCIONES DE DEGRADACION

Antioxidantes: son sustancias que se agregan a los productos alimenticios para impedir o retardar la oxidación y el enranciamiento de los lípidos; estos antioxidantes deben ser solubles en grasas y no transmitir olor ni gusto alguno. Algunos ejemplos de los *antioxidantes* mas empleados en alimentos son: ^{9,36}

Butilhidroxianisol BHA: es efectivo como protector para alimentos grasos, por ejemplo, se usa en la elaboración de mantequilla y margarinas.

Butilhidroxitolueno BHT: es muy soluble en grasas y es empleado en los envoltorios para mantequilla, en galletas y en turrone.

Acido ascorbico: que es usado en carnes, bebidas y en la elaboración de saborizantes.

Tocofenoles: es usado en aceites vegetales.

C) CONSERVADORES ESPECIFICOS

Antibióticos: son metabolitos secundarios producidos por microorganismos que inhiben o destruyen a otros microorganismos. El uso de los antibióticos en alimentos es poco popular, sin embargo, los que se llegan a utilizar, son muy efectivos, por ejemplo:

Natamicina: conocido también como primaricina, es muy eficaz frente a levaduras y mohos, pero no frente a bacterias. Fue aislada de *Streptomyces natalensis*. Un gran número de investigadores ha demostrado la eficiencia de la natamicina frente al ácido sórbico, dando resultados satisfactorios para el antibiótico. ¹⁹

2.3.2 PROCEDIMIENTOS FISICOS

A) METODOS TERMICOS

Bajas temperaturas: Mediante la acción de bajas temperaturas sobre los alimentos, se consigue reducir o eliminar las actividades microbianas o enzimáticas. Existen dos métodos importantes:

Refrigeración: en este método se manejan temperaturas de enfriamiento comprendidas de 0° a 15°C, donde generalmente el agua contenida en los alimentos no llega a congelarse. La finalidad de este método es detener el curso de los procesos de alteración que reducen la calidad de los alimentos.⁹

Congelación: en este método se manejan temperaturas menores a 0°C y existen dos procedimientos básicos para realizar la congelación de los alimentos:

- La *congelación lenta* en donde el agua retenida del alimento se congela, formando cristales grandes. La temperatura deseada se consigue en un tiempo comprendido entre 3 y 72 horas.
- La *congelación rápida* actualmente se conoce como "ultracongelación", y se realiza en solo unos minutos (máximo 120 min). El agua retenida forma cristales pequeños, que respetan en gran medida la estructura original de los alimentos.

La velocidad de congelamiento es un factor determinante en la formación y localización de los cristales de hielo, de tal manera, que el congelamiento lento es más dañino que el rápido, debido a que en la congelación lenta se forman cristales de hielo de gran tamaño dañando la membrana, pared celular y estructuras internas del alimento provocando la deshidratación y desnaturalización de las proteínas, hasta el punto de que el alimento una vez descongelado pierde calidad sensorial y nutritiva, mientras que en la congelación rápida al congelarse el agua

presente en el interior de la célula forma cristales pequeños y de esta forma preserva la estructura celular del producto congelado.

Desde el punto de vista de la conservación de alimentos, la refrigeración y la congelación no son métodos para eliminar microorganismos, sino únicamente evitan que crezcan más.^{13, 19, 34}

Altas temperaturas: se emplean temperaturas superiores a la temperatura ambiente y hasta el momento existen dos procesos:

Pasteurización: se lleva a cabo en sistemas continuos de intercambiadores de calor, manejando temperaturas de 63°C a 100°C a diferentes tiempos dependiendo del producto, provocando de esta forma la destrucción de todos los microorganismos que producen enfermedades (por ejemplo, la pasteurización de la leche), o bien la destrucción o reducción de microorganismos que alteran determinados alimentos, como es el caso de la pasteurización del vinagre. El escaldado es un tratamiento térmico que se emplea en frutas y hortalizas con el fin de inactivar las enzimas naturales.⁴¹

Esterilización: es el tratamiento térmico más fuerte ya que significa la destrucción completa de los microorganismos. Se lleva a cabo por:

- *Calor húmedo:* es la formación de calor en forma de vapor saturado a presión. Se basa en que, cuando el ambiente se encuentra húmedo se favorece la penetración del calor a la célula ocasionando una coagulación de proteínas. Para efectuar este proceso se utiliza un aparato denominado autoclave.

- *Calor seco:* este método se fundamenta en que en una atmósfera seca, el calor ocasiona la oxidación de los componentes celulares vitales, aquí se usa un aparato denominado horno. Es importante mencionar que las temperaturas elevadas pueden causar diversos daños a la célula del alimento, que van desde la inactivación de algunas enzimas hasta la desnaturalización de algunas proteínas, provocando el deterioro de los alimentos afectando de forma irreversible su valor nutritivo y sensorial.^{9, 11, 41}

B) METODOS POR IRRADIACION Y MICROONDAS

La irradiación de los alimentos como el calentamiento por microondas emplean energía radiante que producen su efecto al ser absorbidas por el alimento. Existen varias formas de energía radiante que pertenecen al espectro electromagnético y difieren en cuanto a su longitud de onda, frecuencia y fuerza de penetración.^{19, 37, 41}

Algunas de estas formas de energía radiante se emplean en grado limitado para la conservación de alimentos. Por ejemplo:

Luz ultravioleta: dentro de una escala de 2000 a 2800 angstroms, se utiliza para inactivar los microorganismos en la superficie de los alimentos. El factor que limita su aplicación es el bajo grado de penetración de la luz en el alimento, lo cual restringe su utilización a alimentos líquidos.

Rayos X: tienen una mayor fuerza de penetración que la luz ultravioleta pero no se les puede dirigir, lo que sería causa de un bajo grado de efectividad. Por esto las aplicaciones de los rayos X en los alimentos han sido hasta ahora de carácter experimental.

Irradiación.- en la conservación de los alimentos se utilizan radiaciones ionizantes. A estas se les escoge por su fuerza de penetración y porque no producen ninguna radioactividad en los alimentos tratados, ni producen ningún grado importante de calor en los alimentos, por lo que en ocasiones se emplea el término *esterilización en frío*. Para la irradiación de alimentos conviene emplear emisiones que tengan una gran fuerza de penetración que inactive a los microorganismos y a las enzimas de la superficie y del interior del alimento. Por otra parte, no conviene emplear emisiones de alta energía debido a que se desdoblarían las estructuras atómicas en el alimento y lo volverían radioactivo. Por lo tanto para la conservación de los alimentos se emplean los rayos gamma y los rayos beta.^{25, 41}

Rayos gamma: es la forma de radiación más barata para conservar alimentos, ya que los elementos que la producen son subproductos de la fisión atómica o desperdicios atómicos. Tienen un excelente poder de penetración.

Rayos beta: son un flujo de electrones emitidos por sustancias radioactivas. Los rayos catódicos son los mismos, excepto que son emitidos por el cátodo de un tubo al vacío. Entre las fuentes comerciales de estos rayos, están los generadores de Van de Graaf y los aceleradores lineales. Parece ser que estos últimos se adaptan mejor para ser utilizados en la conservación de alimentos.

MICROONDAS: a diferencia de las radiaciones ionizantes, la energía de microondas se aplica a los alimentos por sus propiedades de calentamiento. Las microondas son ondas electromagnéticas de energía radiante que generan calor penetrando a los trozos del alimento uniformemente hasta una profundidad de varios centímetros. Los usos actuales del calentamiento por microondas en la industria alimentaria son muy diversos, por ejemplo, se emplean en procesos de horneado, de deshidratación, escaldado, liofilización, descongelación, etc.^{19, 41}

C) METODOS NO TERMICOS

Durante recientes años, se han estado estudiando varios tratamientos físicos no térmicos, tales como las altas presiones hidrostáticas, campos formados por pulsos eléctricos de alto voltaje y campos formados por oscilaciones magnéticas. Estos nuevos procesos en estudio muestran ser atractivos, interesantes y prometedoras herramientas en la conservación de alimentos.

Altas presiones hidrostáticas: Se manejan presiones de 300 a 1000 MPa. La transferencia de estas presiones es instantánea y uniforme en el alimento. Puede ser aplicado a temperatura ambiente o moderada. Este tipo de presiones solo afecta enlaces no covalentes, por lo tanto hay buena retención de color, nutrientes y sabor. Por otro lado, afecta la estructura molecular en las proteínas, los carbohidratos, enlaces de hidrógeno, iónicos e hidrofóbicos. En función a la inactivación microbiana, afecta la permeabilidad de membrana. Japón fue el primer país en aplicar estas presiones en jugos y sacarlos al mercado.^{8,9,15,16,22,23}

Campos formados por pulsos eléctricos de alto voltaje: La aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje sobre ciertos microorganismos causa un efecto letal al microorganismo debido a que hay un daño celular en la membrana. Este daño esta en función de la intensidad del campo eléctrico, del tiempo del tratamiento y de la naturaleza del microorganismo.^{8,9,32}

Campos formados por oscilaciones magnéticas: Los campos magnéticos pueden afectar el crecimiento y la reproducción de los microorganismos. Estos campos asocian suficiente energía dentro de los dipolos de las moléculas biológicas de la célula, rompiendo enlaces de DNA o proteínas esenciales para la supervivencia y reproducción del microorganismo, creando con esto su destrucción. Aún existen dificultades en la técnica y en el mecanismo de inactivación, por lo que se requiere de mas investigación.^{8,9}

2.3.2 PROCEDIMIENTOS BIOLÓGICOS

La conservación de alimentos por medios naturales va tomando un mayor predominio sobre la utilización de sustancias químicas, debido a las tendencias del consumidor actual. La utilización de las bacteriocinas puede ser un método seguro y natural de preservación de la frescura en los alimentos.⁹

Dado el status GRAS (generalmente reconocidas como segura) las bacterias ácido lácticas (BAL), han sido ampliamente estudiadas, en la conservación de alimentos. Se ha denominado bioconservación al uso de BAL, productos metabólicos o ambos para mejorar o asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos. La BAL producen en forma natural una serie de agentes antimicrobianos: ácidos orgánicos (láctico, acético), peróxido de hidrogeno, diacetilo y **bacteriocinas**.³⁹

El término de bacteriocina se introdujo por primera vez en 1953 por Jacob para referirse a proteínas antibacterianas de alta especificidad. La definición actual es que son de naturaleza proteica y no son letales para las células que las producen. Son biológicamente activas y poseen propiedades antimicrobianas que resultan esenciales para la sobrevivencia de los microorganismos productores, ya que les da una ventaja competitiva sobre otras especies.¹⁸

Existen diversos microorganismos productores de bacteriocinas, por ejemplo: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Listeria*, etc.

La bioconservación comprende varias aplicaciones en alimentos por ejemplo: el uso de bacteriocinas purificadas añadidas directamente al alimento, la adición de productos que han sido previamente fermentados y como ingredientes se incluye una serie de agentes antimicrobianos incluyendo bacteriocinas.

CAPITULO 3

POSIBLE APLICACION DE LAS ONDAS DE CHOQUE EN ALIMENTOS

La tendencia de los consumidores a exigir alimentos que conserven al máximo sus características organolépticas y nutritivas, tiene como consecuencia un creciente interés por buscar tecnologías alternativas al tratamiento térmico.

3.1 PULSOS DE PRESION EN ALIMENTOS

Como se mencionó en el capítulo anterior, la aplicación de altas presiones hidrostáticas constantes (300 a 1000 MPa) por un lapso relativamente largo de tiempo son conocidas como *presiones estáticas* y son una de las metodologías desarrolladas actualmente. Uno de los efectos que provocan estas presiones son la inactivación de ciertos microorganismos. Es importante señalar que los resultados que se han llevado a cabo, lo demuestran como un método alternativo en la conservación de los alimentos, pero existen algunos inconvenientes tales como: la resistencia que ponen algunos microorganismos a este tipo de presiones, así como la alteración de estructuras moleculares en proteínas, carbohidratos, enlaces de hidrógeno, iónicos e hidrofóbicos.^{6,9}

En 1988 se fundó el Laboratorio de Ondas de Choque Débiles en el Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México a raíz de la importancia que tienen las aplicaciones médicas, conocidas como Litotripsia Extracorporal. Hace aproximadamente cuatro años, en dicho laboratorio surgió la idea de emplear las ondas de choque débiles como un posible método de conservación, debido al conocimiento que se tiene del daño celular que provocan estas ondas. Este tipo de ondas de choque débiles se conocen como *presiones dinámicas*. A

diferencia de las presiones estáticas, estas ondas son pulsos de presión (del orden de 150 MPa) en **muy** corto tiempo (microsegundos).^{29, 30, 31}

Para evaluar esta posibilidad, se utilizó una bacteria con características conocidas y en un medio que permitiera la observación del efecto de las ondas de choque débiles.

3.2 GENERADOR EXPERIMENTAL DE ONDAS DE CHOQUE

La finalidad del Laboratorio de Choques Débiles es la investigación relacionada con la aplicación de ondas de choques débiles a medicina, química y física. Por tal motivo se diseñaron y construyeron los generadores de ondas de choque experimentales, denominados **MEXILIT I**, **MEXILIT II** Y **MEXILIT II Plus**. El primero de ellos estuvo en operación desde 1989 hasta 1995. El MEXILIT II comenzó a operar en 1996. A este equipo le hicieron algunas mejoras en su diseño por lo que se transformó en el MEXILIT II Plus; que se utilizó en la parte experimental de esta tesis.

El **MEXILIT II Plus** fue fabricado en un 95% en el **Instituto de Física** de la **UNAM**. Este equipo consiste en una tina de pruebas sobre una base de acero, con dos pequeñas grúas móviles de precisión montadas sobre ella. Debajo de la tina se encuentra el circuito de descarga con los condensadores y un interruptor de chispa enfriado por aire. La tina de pruebas es un recipiente de fibra de vidrio con dimensiones internas de 120 x 80 x 60 cm, con cuatro ventanas de vidrio, una en cada lado de la tina. Las dos pequeñas grúas móviles de precisión son para sujetar adecuadamente los objetos que se desean exponer a las ondas. Cada grúa consiste en dos carros con ruedas de nylon que se desplazan horizontalmente sobre rieles redondos de acero inoxidable (*figuras 3.1*).^{26,30}

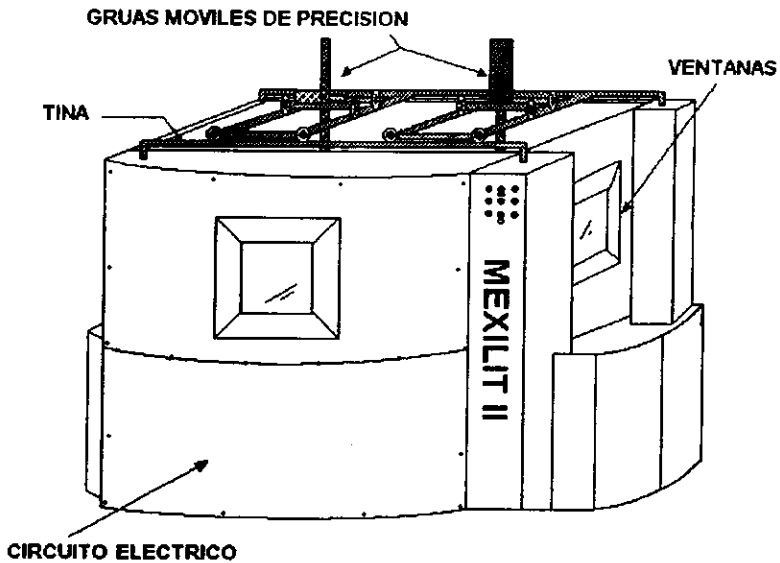


Figura 3.1 Esquema del generador de ondas de choque experimental MEXILIT II Plus.

Como ya se mencionó en el capítulo 1, para poder concentrar la energía de las ondas de choque, se requiere de reflectores elípticos o parabólicos de acero inoxidable con diferentes geometrías. En nuestro caso se utilizó un reflector elíptico (figura 3.2).



Figura 3.2 Fotografía de los reflectores usados en el MEXILIT II Plus.

Además de un reflector, para concentrar la energía, también se requiere de una bujía para producir las descargas eléctricas y con ello generar las ondas de choque. Esta bujía está formada por dos electrodos de una aleación de tungsteno con torio, puntiagudos. La bujía se introduce a presión en el fondo de la tina, de manera que el espacio entre electrodos quede situado exactamente en el o uno de los focos del reflector parabólico o elíptico instalada (figura 3.3).^{26, 27, 30}

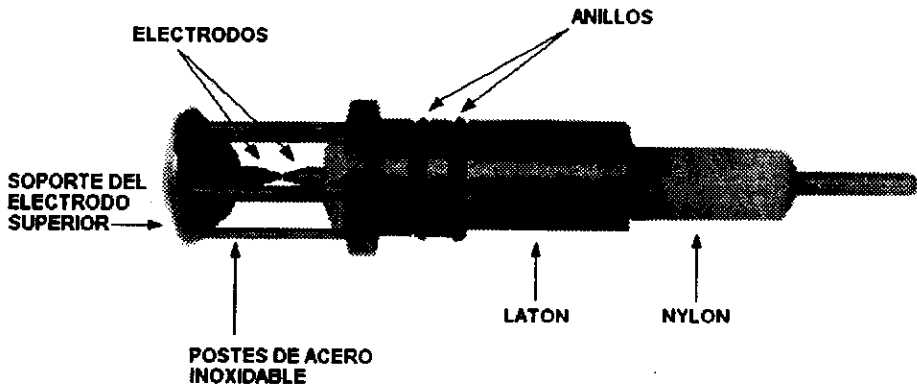


Figura 3.4 Fotografía de una de las bujías que usa el MEXILIT II Plus.

Una de las partes más importantes del **MEXILIT II Plus** es su circuito eléctrico. La energía eléctrica almacenada es del orden de las decenas o incluso centenas de Joules. Los principales elementos del sistema eléctrico son una *fente de alto voltaje*, un *oscilador* y *transmisor óptico*, un *convertidor optoelectrónico* con fuente de alto voltaje, un *disparador* y uno o varios *condensadores*.³⁰

Todas estas características hacen del **MEXILIT II Plus** un equipo experimental versátil y completo. Actualmente se aplica al estudio de diferentes campos, como por ejemplo, al estudio del daño causado por las ondas de choque a tejidos y órganos; al estudio de posibles aplicaciones novedosas en ortopedia, a la mejora de los equipos clínicos de litotripsia extracorporal existentes y al estudio de la interacción de las ondas de choque a nivel celular. Los resultados obtenidos son de gran importancia para poder obtener posibles aplicaciones.

3.3 OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- **Desarrollar hipótesis relacionadas con el efecto de las ondas de choque débiles sobre una enterobacteria muy difundida en los alimentos y en la naturaleza.**
- **Realizar estudios con este microorganismo para determinar si el efecto letal o de reducción microbiana se debe a la radiación ultravioleta, que se produce al generar las ondas o se debe mas bien a la cavitación (formación de burbujas) y en menor grado a la onda de choque en sí.**
- **Con base en los resultados, evaluar la posibilidad de que las ondas de choque puedan usarse en un futuro como método de conservación de cierto tipo de alimentos.**

CAPITULO 4

METODOS Y MATERIAL

Este proyecto se basó en el hecho de que en el Laboratorio de Choques Débiles del IFUNAM se han obtenido evidencias de que existe un descenso de la población de *Escherichia coli* al aplicar ondas de choque débiles. Se pretendió establecer las bases y las condiciones para la continuidad de esta investigación.

Por lo tanto, la metodología que se siguió en este trabajo, fue la siguiente:

1. Búsqueda bibliográfica acerca del microorganismo a tratar y estudio referente a las ondas de choque débiles.
2. Establecer el método que permita estandarizar la concentración de inóculos y poder efectuar una cuantificación estándar del microorganismo, para ello se realizaron las curvas de crecimiento necesarias para el microorganismo.
3. Determinar el número de ondas de choque que se aplicará al microorganismo, en función de los resultados previamente obtenidos en el mencionado laboratorio y de los datos obtenidos de la bibliografía consultada.
4. Establecer parámetros de ajuste (voltaje, capacitancia, etc.) para MEXILIT II Plus y someter al microorganismo a la acción de las ondas de choque generadas por él.
5. Evaluar los resultados obtenidos, compararlos con resultados previos y analizar los posibles fenómenos involucrados en la reducción de la población microbiana observada.

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 INFORMACION DE LA CEPA

Nombre: *Escherichia coli* ATCC 10536 (American Type Culture Collections)

Medio de cultivo: Agar nutritivo

Tiempo de incubación: 24 hrs

Temperatura de incubación: 37°C

Características de las colonias:

Forma: redondas

Superficie: lisa, húmeda.

Color: blanco

Consistencia: suave

Pigmento: no produce.

Se eligió *Escherichia coli* ATCC 10536 por ser una bacteria de la cual se posee un conocimiento extenso, es de fácil manejo y además por tratarse de un microorganismo de importancia en los alimentos.^{1,4}

4.1.2 PREPARACION DE LA MUESTRA DE *E.coli* PARA SER SOMETIDA A LAS ONDAS DE CHOQUE

Se partió de un cultivo puro de *Escherichia coli* (ATCC 10536) que fue activado en caldo nutritivo por un tiempo de 34 hrs a 37°C. Posteriormente del medio activado se tomó 0.1% de inóculo y se agregó a dos matraces que contenían 50 ml del mismo medio; estos fueron incubados a 37°C por 10 hrs, donde después se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 623 nm. Estos valores de absorbancia deben estar comprendidos entre 0.19 a 0.24. Finalmente, el contenido de los matraces se centrifugaron a 3000 r.p.m. por un tiempo de 15

minutos, con la finalidad de separar a las células. Las células fueron lavadas de dos a tres veces con solución salina isotónica y posteriormente resuspendidas. Al contenido que se resuspendió se le midió nuevamente la absorbancia y se ajustó a una absorbancia de 0.30 a 0.31. De este contenido ajustado se tomó una alícuota de 15 ml y se transfirió a un matraz que contenía 135 ml de solución isotónica donde finalmente se mezclaron y se tomaron alícuotas con viales de polipropileno. Finalmente de todos estos viales unos fueron sometidos a las ondas de choque y otros sirvieron de control, donde la cuantificación de la población de viables se realizó por el método de dilución y vaciado en placa, obteniendo una población aproximada de 10^6 a 10^7 UFC/ml.³

Para ejemplificar el método obsérvese el diagrama 4.1

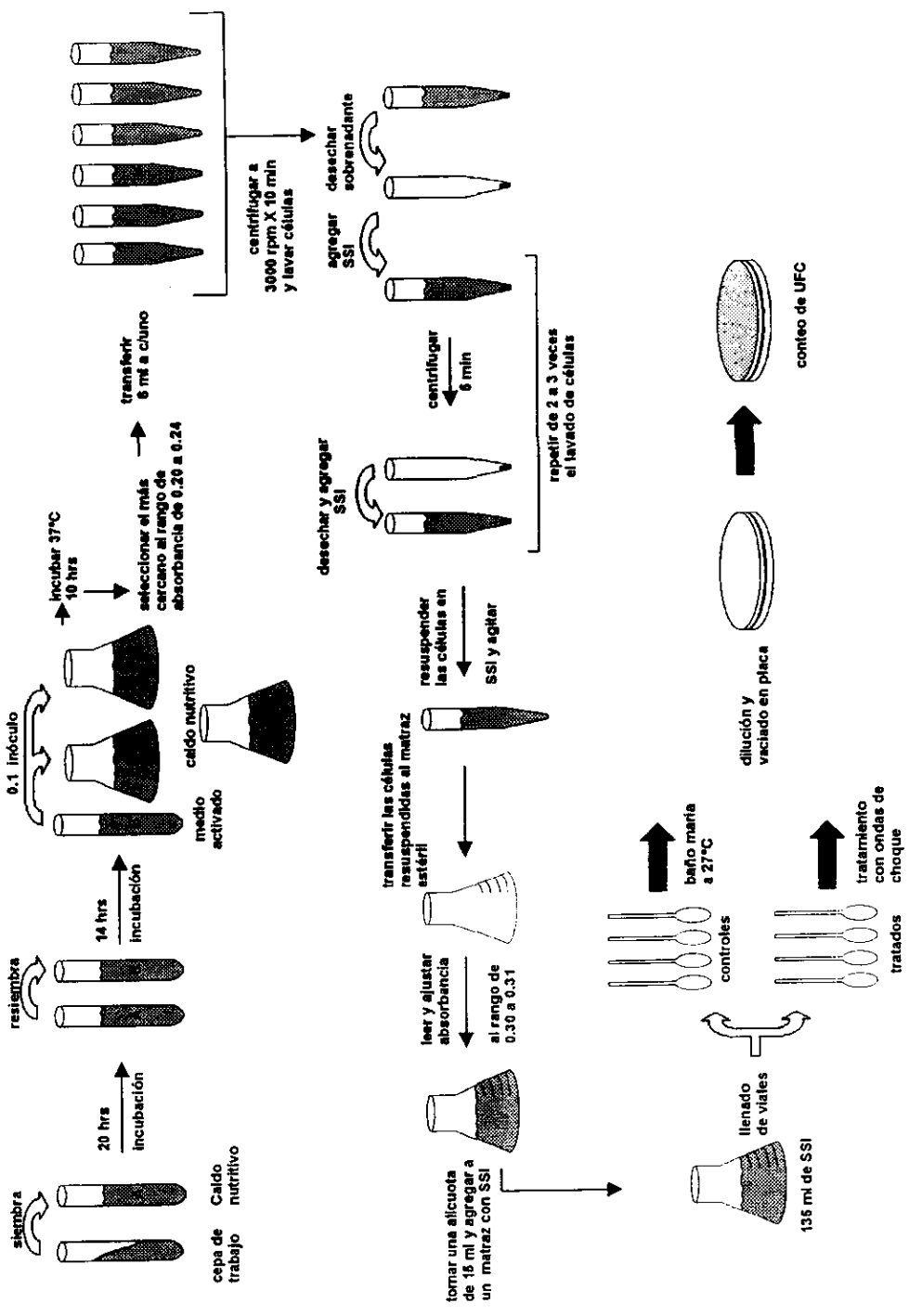


Diagrama 4.1 Preparación de la muestra de *E. coli*.

4.1.3 CONDICIONES DE TRABAJO PARA EL MEXILIT II Plus

Se realizaron nueve experimentos para probar el efecto de las ondas de choque sobre una suspensión de *E.coli*:

- En tres experimentos los viales se llenaron a un 75% de su capacidad y sin protección a la luz ultravioleta.
- En otros tres experimentos los viales se llenaron al 100% de su capacidad y sin protección a la luz ultravioleta.
- Y en los últimos tres experimentos, los viales se llenaron al 75% de su capacidad y con protección a la luz ultravioleta.

Los nueve experimentos se realizaron en el mexilit bajo los siguientes parametros:

REFLECTOR: Elíptico E-4 (semieje mayor =139.1 mm, semieje menor =78.0 mm, profundidad = 124.1 mm)

VOLTAJE: 20 KV

FRECUENCIA: Una descarga cada 2.5 segundos

CAPACITANCIA: 80nF

CONDUCTIVIDAD DEL AGUA: 570 microsiemens/cm

TEMPERATURA DEL AGUA: 27°C

CALENTAMIENTO DE BUJÍA: 200 descargas a 18 KV

Véase figura 4.2, A, B, C y D

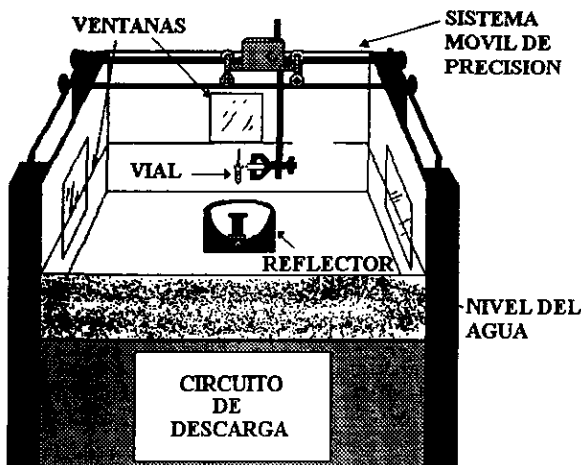


Figura 4.2A Esquema del MEXILIT II Plus con el vial.

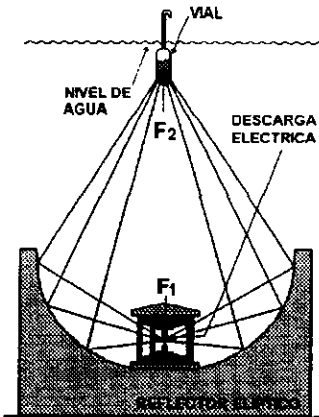


Figura 4.2B Esquema que muestra el reflector, la bujía, unos cuantos rayos perpendiculares al frente de la onda y un vial llenado con suspensión de *E. coli* al 75% de su capacidad.

Figura 4.2C Esquema que muestra el reflector, la bujía, unos cuantos rayos perpendiculares al frente de la onda y un vial llenado con suspensión de *E. coli* al 100% de su capacidad.

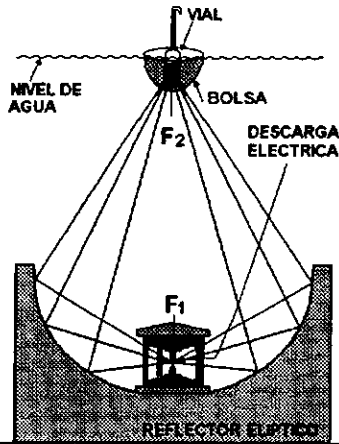
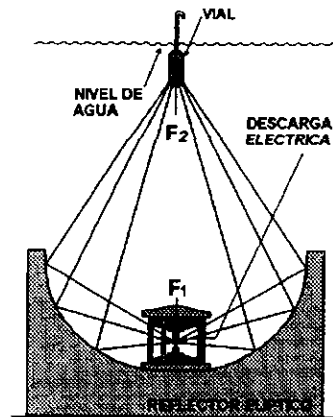


Figura 4.2D Esquema que muestra el reflector, la bujía, unos cuantos rayos perpendiculares al frente de la onda y un vial llenado con suspensión de *E. coli* al 75% de su capacidad, colocado dentro de una bolsa negra de polietileno.

4.1.4 MEDICION DE PRESIONES

Se colocó un transductor de presión de fluoruro de polivinilideno con forma de aguja, marca *Imotec GmbH*, Würselen, Alemania, con su punta en el segundo foco (F2) del reflector (E4) usado en los experimentos descritos en esta tesis. El transductor se conectó directamente a uno de los canales de entrada de un osciloscopio marca Tektronix, modelo 2430 A. Uno de los canales externos del osciloscopio se conectó a una pequeña antena para captar la radiación emitida por la descarga eléctrica en el instante de generarse la onda de choque y disparar de esta manera el osciloscopio.²⁶

El MEXILIT II Plus se ajustó de la siguiente manera:

Voltaje: 20 kV

Capacitancia: 80 nF

Conductividad del agua: 570 microsiemens/cm

Temperatura del agua: 27°C

Las bujías se calentaron durante 200 descargas de 18 kV a una frecuencia de descarga de 1 descarga cada 2.5 segundos.

El osciloscopio se ajustó de la siguiente manera:

Ganancia: 10 mV/Div

Base de tiempo: 50 microsegundos/Div

Trigger: *single sequence*

Para medir la posible atenuación de la presión, debido a la presencia de la bolsa negra de polietileno, misma que se usa como protección contra la luz ultravioleta en una parte del experimento, se hicieron 34 mediciones de presión con el transductor descubierto y 34 mediciones con el transductor cubierto por la bolsa mencionada.

4.2 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

4.2.1 MATERIAL

- ✓ Algodón
- ✓ Asas microbiológicas
- ✓ Bolsas negras de polietileno.
- ✓ Cajas de petri estériles desechables
- ✓ Cinta indicadora para autoclave
- ✓ Cronómetro
- ✓ Espátula
- ✓ Gasas
- ✓ Gradillas
- ✓ Jeringas estériles desechables
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 ml
- ✓ Matraces aforados de 500 y 1000 ml
- ✓ Mecheros tipo Bunsen y Fisher
- ✓ Micropipetas de 1000 y 200 microlitros
- ✓ Pipetas estériles de 1, 5y 10 ml
- ✓ Pipetas de 4 ml estériles de polipropileno desechables.
- ✓ Pipeteros
- ✓ Puntas para micropipetas
- ✓ Termómetros
- ✓ Transductor de presión de fluoruro de polivinilideno marca Imotec GmbH, Würselen Alemania
- ✓ Tubos de ensaye de 20 x 150 mm con rosca y tapón
- ✓ Tubos de ensaye de 16 x 150 y 13 x 100 mm sin rosca y sin tapón
- ✓ Tubos de vidrio para centrifuga
- ✓ Sujetador universal de tres dedos
- ✓ Vasos de precipitados de 250, 500 y 1000 ml
- ✓ Vidrios de reloj

4.2.2 SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

- ✓ Agar nutritivo estéril
- ✓ Agar para cuenta en placa estéril
- ✓ Caldo nutritivo estéril
- ✓ Solución de cloruro de sodio al 20%
- ✓ Solución salina isotónica estéril (SSI)

4.2.3 MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Cepa de *Escherichia coli* ATCC 10536 obtenida del cepario de la facultad de Química de la UNAM.
- ✓ Cultivo de *Escherichia coli* ATCC 10536 (en caldo nutritivo)

4.2.4 EQUIPO

- ✓ Agitador de tubos VORTEX
- ✓ Agitador y barra magnéticos BELLCO GLASS
- ✓ Autoclave HIRAYAMA
- ✓ Balanza analítica SARTORIUS
- ✓ Baño de agua de temperatura controlada PRECITHERM PFV LAKESIDE
- ✓ Campana de flujo laminar ALDER
- ✓ Centrífuga HAMILTON BELL
- ✓ Fotómetro LAKESIDE MANNHEIM
- ✓ Generador de ondas de choque MEXILIT II Plus
- ✓ Horno VWR
- ✓ Incubadora con control térmico BOEKEL
- ✓ Microscopio óptico OLYMPUS
- ✓ Osciloscopio TEKTRONIX
- ✓ Refrigerador GOLDSTAR

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE *E.Coli* ATCC 10536

El establecimiento de la curva de crecimiento nos permite detectar en qué condiciones se puede obtener un cultivo en las diferentes fases.

Por tal razón se realizaron dos curvas de crecimiento: por turbidimetría y por población de microorganismos viables.

5.1.1 CURVA DE CRECIMIENTO POR TURBIDIMETRIA DE *E.Coli*

Por definición la medición turbidimétrica para la evaluación de una población microbiana es expresada en función de la densidad óptica⁴⁵:

$$\text{Turbidez} = \log (I_0 / I) = (T C L / 2.303) = \text{Absorbancia aparente}$$

I_0 = intensidad de la luz incidente

I = intensidad de la luz después de la atenuación

C = concentración de las partículas suspendidas (biomasa)

T = coeficiente de turbidimetría

L = longitud de la celda

En muchos casos la longitud del haz y T son constantes, por lo que existe una relación constante en la medición turbidimétrica con la concentración de la población microbiana⁴⁵.

En la gráfica 5.1 se muestra la curva de crecimiento de *E.coli* obtenida por la técnica de turbidimetría. La desventaja de este método es que las mediciones pueden verse afectadas por la presencia de burbujas de aire, causadas por la fermentación de carbohidratos como en el caso de los coliformes. *E.coli* es un microorganismo que produce gas durante su fermentación; por tal razón no se pudieron observar con claridad las tres primeras fases de la curva, que son la fase de adaptación, la logarítmica y la estacionaria. Ya que esta técnica no pudo diferenciar células viables o muertas no se identifica el declive de la población de *E.coli* (fase de muerte).

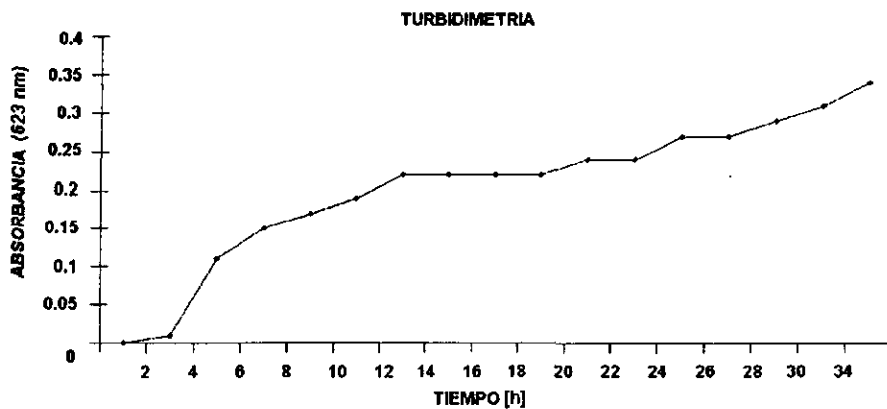
Cuando una población microbiana se expone a un agente antimicrobiano (físico o químico) es necesario definir la edad (etapa de la curva de crecimiento) del cultivo a tratar. En este caso, utilizamos a *E.coli* en la etapa logarítmica de la curva, ya que en esta fase la población es homogénea. Dado que todo su metabolismo está concentrado en el proceso de duplicación, en esta fase existe una mayor sensibilidad del microorganismo a agentes externos, como por ejemplo en nuestro caso al efecto de las ondas de choque.

Por lo tanto la elaboración experimental de esta curva, nos indicó el tiempo de incubación que se requería para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo, por lo que se trabajó con un tiempo de 10 horas de incubación y con un rango de absorbancia de 0.19 a 0.24 a 623 nm (gráfica 5.1).

Tiempo (hrs)	Absorbancia
0	0
1	0.001
2	0.01
4	0.11
6	0.15
8	0.17
10	0.19
12	0.22
14	0.22

Tiempo (hrs)	Absorbancia
16	0.22
18	0.22
20	0.24
22	0.24
24	0.27
26	0.27
28	0.29
30	0.31
34	0.34

Tabla correspondiente al gráfico 5.1.



Gráfica 5.1 Curva de crecimiento de *E.coli* ATCC 10536, en caldo nutritivo a 37°C de incubación.

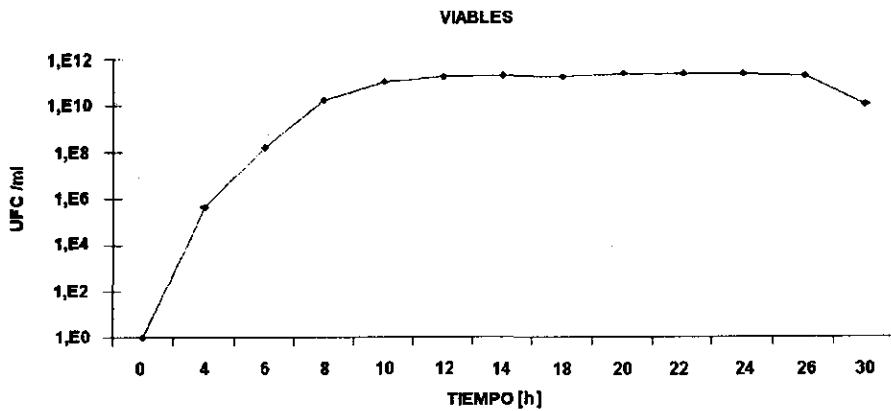
5.1.2 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA POBLACION VIABLE DE *E.COLI*

La cuantificación de la población de microorganismos se basa en la medida del crecimiento mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias. Esta cuantificación puede realizarse mediante extensión por superficie (ES) ó vaciado en placa (VP)⁴⁵. Para esta curva se empleó la técnica de vaciado en placa con la finalidad de poder cuantificar la población viable en la fase logarítmica y de esta forma poder ajustarla a una población constante.

En la gráfica 5.2 se observa que en un tiempo de 10 hrs de incubación se obtiene una población de *E.coli* de 1.12×10^{11} UFC/ml. Mediante diluciones se ajustó a 1×10^6 UFC/ml. La razón por la que la población fue ajustada es que este valor (1×10^6 UFC/ml) es considerado como límite de riesgo en alimentos contaminados por *E. coli*.

Tiempo (hr)	UFC / ml
0	0
4	4.40×10^5
6	1.54×10^8
8	1.68×10^{10}
10	1.12×10^{11}
12	1.70×10^{11}
14	1.97×10^{11}
18	1.76×10^{11}
20	2.50×10^{11}
22	2.51×10^{11}
24	2.52×10^{11}
26	2.07×10^{11}
30	1.12×10^{10}

Tabla correspondiente del gráfico 5.2.



Gráfica 5.2 Curva de crecimiento de la población viable de *E.coli* ATCC 10536 en caldo nutritivo a 37°C de incubación.

5.2 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE *E. coli*

5.2.1 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE *E.coli* EN VIALES LLENADOS AL 75%

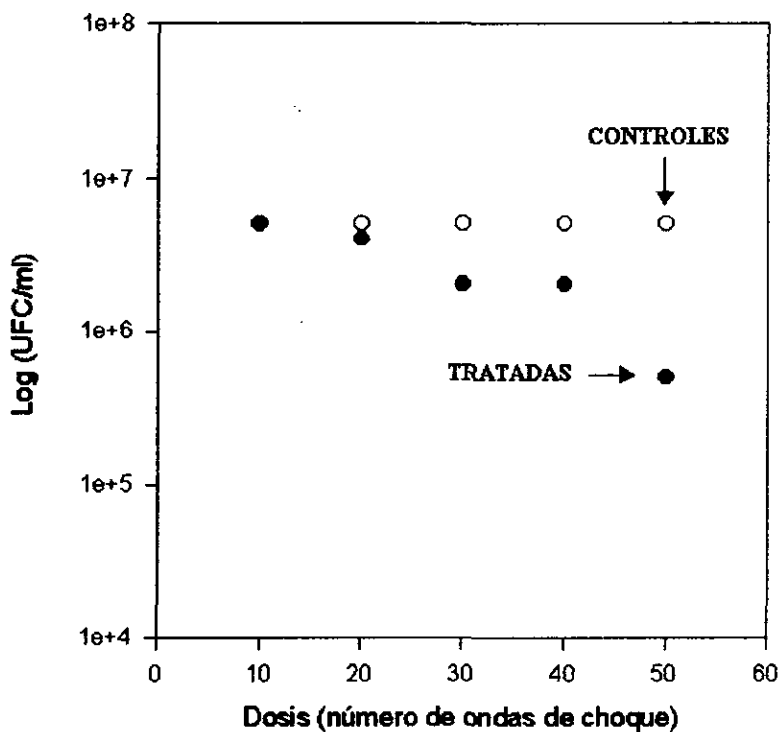
El efecto de las ondas de choque sobre *E.coli*, que se observa en la gráfica 5.3, indica que no hay un descenso significativo de la población de *E.coli* en viales llenados al 75% de su capacidad en las primeras 40 ondas de choque, pero a 50 ondas se observa un descenso en comparación con los controles. Podría suponerse que, a la energía usada, 40 ondas de choque no es una dosis adecuada para poder disminuir la población por abajo del límite de riesgo en alimentos y que a partir de 50 ondas de choque empieza a observarse un descenso notable.

Uno de los motivos por los cuales se espera que los efectos de las presiones dinámicas (ondas de choque) sean diferentes a los efectos causados sobre *E.coli* con presiones estáticas es que, en el caso de las ondas de choque no hay una distribución homogénea de presión dentro de la suspensión y dentro de las bacterias, sino únicamente gradientes de presión muy pronunciados.

La aplicación de ondas de choque débiles sobre una suspensión de *E.coli* ATCC 10536 sin protección, con los viales llenados al 75 % de su capacidad, a la energía y en las condiciones anteriormente descritas, origina una disminución de microorganismos a partir de 50 ondas de choque. Se puede esperar que a un mayor número de ondas de choque (dosis mayor) exista una reducción importante de la población microbiana.

DOSIS O NUMERO DE ONDAS DE CHOQUE APLICADAS	TRATADAS (UFC)	CONTROLES (UFC)
10	$7 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$
20	$5 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$
30	$4 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$
40	$2 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$
50	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^6$

* Los resultados obtenidos en esta tabla son el promedio de tres experimentos realizados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.



Gráfica 5.3 Efecto de las ondas de choque sobre *E. coli* en viales llenados al 75% de su capacidad.

5.2.2 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE *E.coli* EN VIALES LLENADOS AL 100%

Para obtener los resultados que se muestran en la gráfica 5.4, los viales fueron llenados en su totalidad para probar la posible influencia de la cavitación en la muerte celular. Se observa que el descenso en función de los controles se da a partir de 50 ondas de choque.

Al mantener la presión dentro de un medio estática, no se produce la cavitación. La cavitación se produce con las presiones dinámicas por el cambio súbito de una presión positiva a negativa, entendiéndose por "negativa" aquella en la cual su valor es menor a la presión de equilibrio. La cavitación depende de la presión (hidrostática) a la cual se encuentra el medio, de la temperatura, de la presencia de una interfase (por ejemplo suspensión - aire) y de la presencia de microburbujas existentes en la suspensión. Si la suspensión tiene más burbujas o microburbujas, se producirá más cavitación y por lo tanto se espera un mayor daño a las bacterias.

El posible efecto bactericida de las ondas de choque sobre algunos microorganismos puede deberse a la cavitación, es decir a "microjets" expulsados al colapsarse las diminutas burbujas, a aceleraciones muy fuertes, a colisiones entre microorganismos, a esfuerzos cortantes y a la formación de radicales libres. Todos estos efectos están en función de la suspensión.

Se suponía que, debido a la interfase que había en los viales llenados al 75%, las ondas de choque que se reflejarían en esta interfase, producirían cavitación. Por lo mencionado, inicialmente se esperaba un menor descenso de población microbiana en viales llenados al 100% de su capacidad con respecto a los viales al 75% de llenado. Al aplicar las ondas de choque débiles sobre una suspensión de *E.coli* ATCC 10536, con viales, sin protección contra luz ultravioleta, llenados al 100% de su capacidad, a la energía y en las condiciones anteriormente descritas,

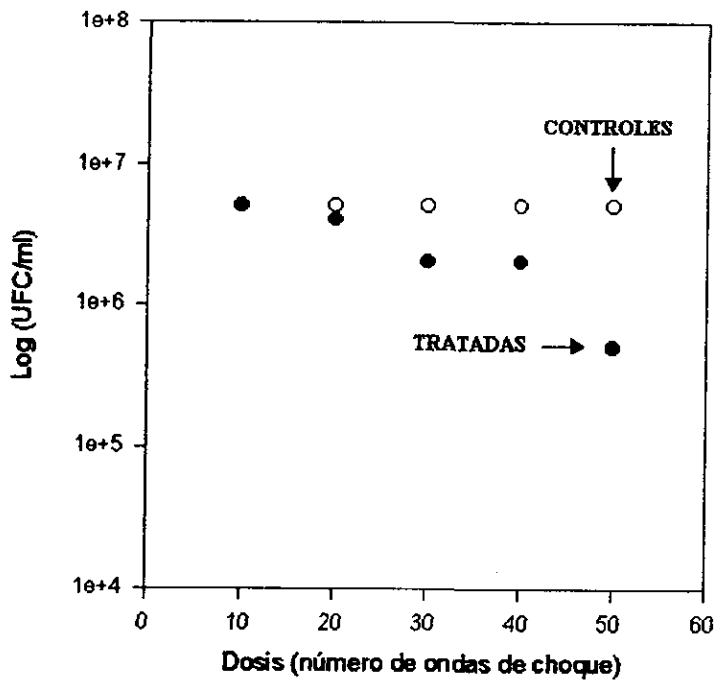
se origina una disminución similar a la observada con los viales llenados al 75%. No se detectó una diferencia significativa entre los dos casos. Es posible que a mayor número de ondas de choque y modificando la técnica de llenado total, así como el nivel de agua dentro de la tina del MEXILIT, sea posible determinar la contribución de la cavitación en la muerte de las bacterias.

Nuestra hipótesis inicial en relación al llenado parcial de los viales coincide, en cierta forma, con los resultados de Steinbach et al. 1992⁴⁴, en los cuales se reporta que hubo una muerte mayor en tubos con interfase que en tubos sin interfase, es decir totalmente llenos. Obviamente esto no es directamente comparable con nuestro caso, ya que ellos estaban trabajando con células de tumores malignos.

Usando un generador muy diferente al nuestro (no genera luz UV) y con una presión mucho más baja (con duración mucho mayor), Ohshima et al. 1991³⁶ encontraron que *E.coli* es difícil de destruir con ondas de choque y que el efecto bactericida se hacía notar cuando inyectaban microburbujas en la suspensión, por lo que, uno de los experimentos que se deben probar más adelante, es someter suspensiones aireadas a ondas de choque y comparar los resultados con los de suspensiones no aireadas.

DOSIS O NUMERO DE ONDAS DE CHOQUE APLICADAS	TRATADAS (UFC)	CONTROLES (UFC)
10	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
20	$4 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
30	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
40	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
50	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^6$

* Los resultados obtenidos en esta tabla son el promedio de tres experimentos realizados bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente.



Gráfica 5.4 Efecto de las ondas de choque sobre *E. coli* en viales llenados al 100% de su capacidad.

5.2.3 EFECTO DE LAS ONDAS DE CHOQUE SOBRE *E.coli* EN VIALES PROTEGIDOS DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

En la gráfica 5.5, los viales fueron protegidos de la luz ultravioleta con una bolsa negra de polietileno y como se observa, no hay descenso significativo de la población con respecto a los controles.

La presión de la onda de choque registrada en el segundo foco del reflector elíptico es similar a la que se reporta para litotriptores electrohidráulicos. Las variaciones de presión entre una y otra descarga eléctrica también son características para este tipo de equipos. Según las mediciones de presión realizadas, la bolsa de polietileno, usada como protección a la luz ultravioleta en una parte de los experimentos reportados en esta tesis, no atenúa las ondas de choque, es decir, es transparente a ellas.

En el caso del MEXILIT II Plus la luz ultravioleta que se genera tiene un espectro muy amplio, con un máximo entre 55 y 150 nm. Este máximo no corresponde a la longitud de onda generalmente considerada como la más letal para microorganismos (240 – 280 nm), sin embargo, el espectro generado por dicho aparato tiene también una componente importante en este intervalo de longitudes de onda.

La aplicación de las ondas de choque débiles sobre una suspensión de *E.coli* ATCC 10536 con protección al paso de la luz ultravioleta generada al producirse la onda de choque, con los viales llenados a un 75% de su capacidad y a la energía y en las condiciones anteriormente descritas, no mostró un descenso significativo de la población, por lo que se podría suponer que la muerte del microorganismo es debida a la luz ultravioleta y no a las ondas de choque débiles. Para poder afirmar esto con certeza, se tendría que ver si sucede lo mismo a una dosis mayor, es decir, a un mayor número de ondas de choque o a una mayor energía. Tomando en cuenta que la luz UV es atenuada considerablemente por el agua y también por

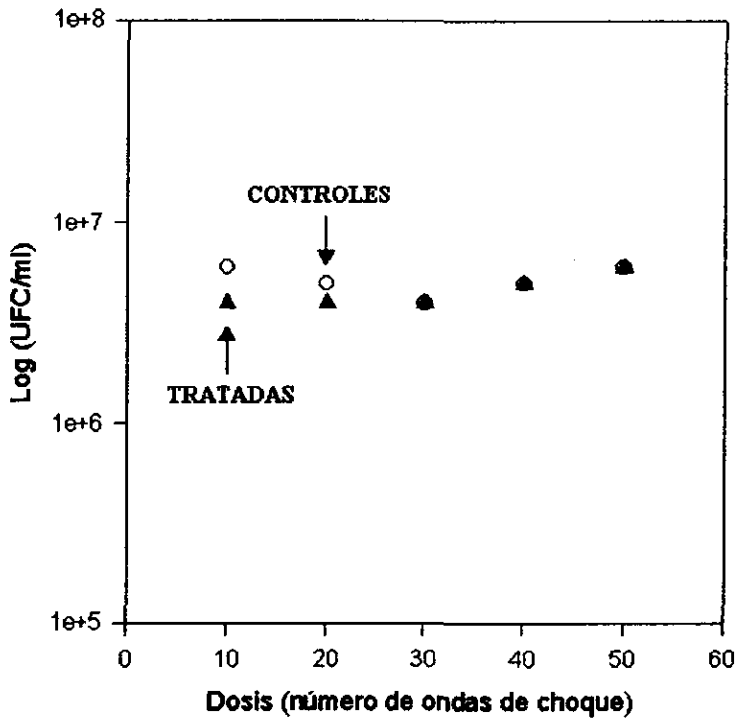
el vial (aunque no tenga la bolsa negra), un experimento que se tendría que hacer es someter los mismos microorganismos únicamente a la luz UV pulsada y no, a ondas de choque. Para ello podría repetirse el experimento igual, pero sin meterle agua a la tina del MEXILIT. De esa manera a la suspensión le llega la luz, pero no se producen ondas de choque en agua. La descarga eléctrica en aire puede producir una onda de compresión que se propaga esféricamente, sin embargo, su presión sería muy pequeña comparada con la que se genera en agua a la misma energía inicial. Esto se debe a que el aire es fácilmente comprensible (densidad baja). Además de esto, en aire el vial de polietileno actúa como una barrera para este tipo de ondas mecánicas.

Kerfoot et al.²¹ usaron un litotriptor marca Dornier modelo HM3 (generador electrohidráulico similar al MEXILIT II plus) a 20 kV. Estas condiciones son iguales en nuestro caso, pero con una frecuencia de repetición diferente (100 descargas por minuto) y con una aplicación de 4000 ondas. Después lo repitieron a 120 descargas por minuto, pero con un generador piezoeléctrico 2300 (no genera UV) en el nivel de energía número 4. No mencionan a qué presión equivale eso. Ellos concluyen que las ondas de choque no tienen un efecto bactericida significativo sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. En este artículo faltan varios detalles en relación al método. Lo interesante es que no encontraron diferencia entre ondas de choque con luz UV (HM3) y ondas de choque sin UV (piezoeléctrico). La continuación de los estudios presentados en esta tesis permitirá aclarar estas discrepancias.

Berens et al. 1991¹² expusieron células tumorales humanas a ondas de choque generadas con un generador electrohidráulico, demostrando que la muerte celular no se debe a la luz UV.

DOSIS O NUMERO DE ONDAS DE CHOQUE APLICADAS	TRATADAS (UFC)	CONTROLES (UFC)
10	$4 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$
20	$4 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
30	$4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$
40	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
50	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$

* Los resultados obtenidos en esta tabla son el promedio de tres experimentos que se realizaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.



Gráfica 5.5 Efecto de las ondas de choque sobre *E. coli* en viales llenados al 75% de su capacidad y protegidos de la luz ultravioleta.

5.2.4 RESULTADOS DE LA MEDICION DE PRESIONES

La presión del pulso positivo de la onda de choque reflejada, registrada con el transductor no cubierto fue de 59 ± 20 mV. Con el transductor cubierto con la bolsa negra de polietileno se obtuvo un valor de 60 ± 15 mV. La diferencia entre estos dos valores no es significativa. Las presiones se expresan en unidades de voltaje debido a que se trata de lecturas de voltaje tomadas directamente de la pantalla del osciloscopio. Haciendo la conversión a unidades de presión, resultan presiones de aproximadamente 200 bar/div en el segundo foco.

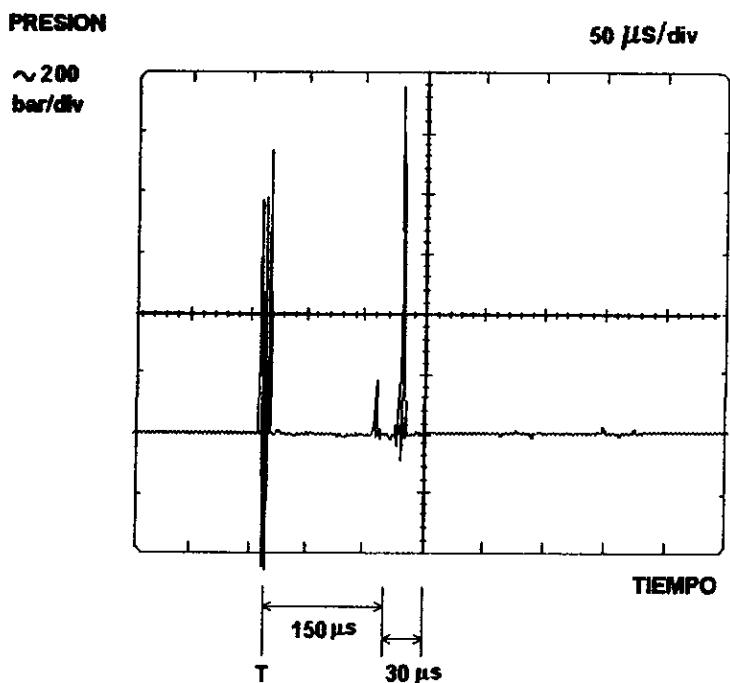


Figura 5.6 Perfil de la variación de presión en una onda de choque generada con el Mexilit II plus.

En la figura 5.6, se muestra una gráfica representativa de las variaciones de presión registradas con el transductor de fluoruro de polivinilideno colocado en el segundo foco del reflector elíptico usado. Puede observarse el instante en el cual se dispara el osciloscopio, registrándose la descarga eléctrica. Después de aproximadamente 150 microsegundos se puede ver a la onda de choque que viajó directamente desde los electrodos hacia el transductor de presión y aproximadamente 30 microsegundos después, la onda de choque reflejada.

Mediciones de presión, previamente realizadas en el Laboratorio de Choques Débiles del IFUNAM, revelaron que los viales usados en este estudio atenúan la presión de las ondas de choque en un 20%, es decir, la presión de la onda disminuye en un 20% al pasar del agua hacia la suspensión, a través del vial.²⁴ Debido a que en las tres situaciones diferentes (viales llenados al 75%, viales llenados al 100% y viales llenados al 75% con protección a la luz ultravioleta) siempre se usó el mismo tipo de vial, este hecho no altera las conclusiones del presente trabajo.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- Se puede concluir que, con la energía usada, para un número de ondas de choque bajo no hay diferencia entre los viales llenados al 100% de su capacidad y los viales llenados al 75%.
- La dosis que se empleó para probar el efecto de la luz UV, se demuestra que ella es la única responsable de la muerte de las bacterias.
- Se fijaron los parámetros, métodos, material y los equipos de trabajo para el estudio del presente trabajo. Al inicio todo esto no es obvio, sobre todo, tomando en cuenta que el tipo de fenómeno que se está estudiando es nuevo a nivel mundial. Por otro lado, se debe considerar que hacer un experimento de este tipo es caro y sobre todo, requiere de mucho tiempo. Por tal motivo, para esta tesis, solamente se realizaron tres y experimentos de cada tipo.
- Por el momento no se puede afirmar si el efecto de las ondas de choque débiles, generadas en las condiciones descritas, sobre *E.coli* ATCC 10536 sea debido a la luz ultravioleta, a la cavitación o a las ondas mismas, sin embargo, se propusieron y probaron los métodos y los parámetros que deberán seguirse en el futuro. Generalmente esto es más tardado e igualmente valioso que la obtención de conclusiones definitivas. En base a los resultados de esta tesis, en el Laboratorio de Choques del Instituto de Física, se realizarán estudios posteriores para llegar a una conclusión más contundente y así contemplar a las ondas de choque, o sus efectos secundarios, como un método alternativo a la conservación de alimentos y, de esta forma, proporcionar un bienestar al progreso de la humanidad.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

1. Atlas, Ronald M. *Microbiology Fundamentals and Applications*. 2ª. Ed. New York. McMillan. 1993. pp. 87- 111.
2. Badui S. *Química de los alimentos*. Alhambra Mexicana. 1993. pp. 11-119.
3. BSI *British Standard International*. Parte 1. ISO 4833: 1991. pp. 2195-2204.
4. Brock T., Madigan M. *Microbiología*. 6ª ed. México. Prentice Hall Hispanoamericana. 1993. pp. 327-369.
5. Buche F. *Fundamentos de Física*. Mc Graw Hill. 1988. pp. 377-423.
6. Butz P., Heinisch O., Tauscher B. *Hydrostatic high pressure applied to food sterilization III: application to spices and spice mixtures*. High Pressure Research. 1994; 12: 239-243.
7. Coultate T.P. *Alimentos, química de sus componentes*. Acribia Zaragoza España. 1984. pp. 178-187.
8. Dallas G., Hoover. *Minimally Processed Fruits and Vegetables: Reducing Microbial Load by Nonthermal Physical Treatments*. Food Technology. 1997; 51(6): 66-71.
9. Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington D.C. 1997. pp. 497-543.

10. Fennema O.R. *Química de los alimentos*. Acribia Zaragoza España. 1988. pp. 710-737.
11. Frazier W.C., Westhoff., *Microbiología de los alimentos*. Acribia Zaragoza España. 1985. pp. 89-95.
12. Berens ME, Welander CE, Griffin AS, McCullough DL (1989) Effect of acoustic shock waves on clonogenic growth and drug sensitivity of human tumor cells in vitro. *J. Urol.* 142: 1090.
13. Gruda Z., Postolski J. *Tecnología de la congelación de los alimentos*. Acribia Zaragoza España. 1998. pp. 1-40.
14. Halliday D., Resnik R. *Fundamentos de Física*. CECSA. 1987. pp. 315-359.
15. Hermelstein N.H. *High-Pressure Pasteurization of Juice*. Food Technology. 1999; 53(4): 86-90.
16. Hermelstein N.H. *High-Pressure Processing Begings*. Food Technology. 1998; 52(6): 104-108.
17. Holdsworth S.D. *Conservación de Frutas y Hortalizas*. Acribia Zaragoza España. 1988. pp. 1-15.
18. Ibarra J. *Influencia de las condiciones de crecimiento en la producción de la Bacteriocina generada por Lactobacillus plantarum BAL-1 aislada de Kefir*. UAQ. Tesis maestría. 1999. pp. 1-124.
19. Jay J.M. *Microbiología Moderna de los alimentos*. Acribia Zaragoza España. 1994. Pp. 299-438.

20. Kyzlink V. *Principles of food preservation*. Elsevier New York. 1990. pp. 210-545.
21. Kerfoot W.W., Beshai A.Z., Carson C.C. *The effect of isolated high-energy shock wave treatments on subsequent bacterial growth*. Urological Research. 20: 183.
22. Knorr D. *Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality*. Food Technology. 1993; 47(6): 156-161.
23. Lechowich R. *Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method*. Food Technology. 1993; 47(6): 170-171.
24. Libro de registro de experimentos del Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física de la UNAM número 2, página 138, experimento 181, 28 de octubre de 1997.
25. Loaharanu P. *Status and prospects of food irradiation*. Food Technology. 1994; 48(5): 124-131.
26. Loske A.M. *Generación de ondas de choque en agua por rompimiento eléctrico*. UNAM. Tesis de maestría. 1990. pp. 1-100.
27. Loske A.M. *Interacción de ondas de choque débiles en agua con la materia: diseño de electrodos y reflectores novedosos para litriptores electrohidráulicos*. Instituto de Física. UNAM. Tesis doctorado. 1992-1994.
28. Loske A.M., Prieto F.E. *Generador de ondas de choque en agua Mexilit I*. Ciencia y Desarrollo. 1991. 17(101): 82-89.

29. Loske A.M., Prieto F.E. *Las ondas de choque en la litotripsia extracorporal*. Rev. Fac. Med. UNAM. 1990; 33(2): 113-120.
30. Loske A.M., Prieto F.E. *Fundamentos técnicos de litotripsia extracorporal*. 1ª ed. México. JGH Editores. 1999. pp. 1-167.
31. Loske A.M., Prieto F.E., Zavala M.L., Santana A.D., Armenta E. *Repeated application of shock waves as a possible method for food preservation*. Shock Waves. 1999; 9: 49-55.
32. Martín O., Ahang Q., Castro A.J., Barbosa-Cánovas G.V., Swanson B.G. *Revisión: Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos. Microbiología e ingeniería del proceso*. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 1994; 34(1): 1-34.
33. Madrid A. *Los aditivos en los alimentos*. Mundi-Prensa, Libros Madrid España. 1993. pp. 15-36.
34. Madrid A., Gomez J., Santiago F., Madrid J. *Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos*. IRAGRA. 1996. pp. 1-15.
35. Michaels E, Fowler JE, Mariano M. *Bacteriuria following extracorporeal shock wave lithotripsy of infection stones*. J. Urol. 1988; 140:254
36. Multon J.L. *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. Acribia Zaragoza España. 1990. pp. 127-227.
37. Murano E. *Irradiation of fresh meats*. Food Technology. 1995; 49(12): 52-54.

38. Ohshima T, Tanaka S, Teshima K. *Effects of shock wave on microorganisms: An evaluation method of the effects*. In: Takayama K (ed) Shock Waves. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1991; pp. 1215-1219.
39. Peña L.R. *Actividad Bacteriocinogenica contra listeria monocitogenes scott a de una cepa de Pediococcus 6s, aislada de Kefir*. UAQ. Tesis maestría. 1996. pp. 1-94.
40. Pode D, Lenkovsky Z, Shapiro A, Pfau A (1988) Can extracorporeal shock wave lithotripsy eradicate persistent urinary infections associated with infection stones? *J. Urol.* 140:257
41. Potter N. *Ciencia de los alimentos*. Centro regional de ayuda Técnica CONAFRUT. 1973. pp. 169-358.
42. Russell N.J., Gould G.W. *Food preservatives*. Van Nostrand reinhold, New York. 1997. pp. 13-21.
43. Santana A.D., Zavala M.L. *Ondas de choque débiles, un nuevo enfoque en la esterilización*. UNAM. Tesis de licenciatura. 1998. pp. 8-78.
44. Steinbach P, Hofstaedter F, Nicolai H, Rössler W, Weland W. *In vitro investigations on cellular damage induced by high energy shock waves*. Ultrasound Med. Biol. 1992; 18(8): 691.
45. Ison A.P. y Matthew G.B. *Measurement of biomasa*. Cap.5. Applied Microbial Physiology. Rhodes, DMS. Stanburs D.R. Oxford. pp. 103-120.

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