



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**ESTUDIO DE LA EFICACIA BACTERICIDA Y  
BACTERIOSTÁTICA DE PRODUCTOS QUÍMICOS  
EMBEBIDOS EN MATERIALES**

Fabio Fontecha Umaña

**Tesis Doctoral**

Memoria presentada al *Departament de Ciència Animal i dels  
Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de  
Barcelona*

Para optar el grado de doctor en

**Ciencia de los alimentos**

Trabajo dirigido por José Juan Rodríguez Jerez

**Facultad de Veterinaria**

Bellaterra, Septiembre de 2014



JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular del área de nutrición y bromatología del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada **“Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales”**, presentada por Fabio Fontecha Umaña para optar el grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Bellaterra, a 29 de septiembre de 2014.

José Juan Rodríguez Jerez



## **Agradecimientos**

Este trabajo se ha realizado gracias al apoyo y financiación de la *Fundació per als Estudis de Prevenció i Seguretat Integral (FEPSI)*.

Al Dr. José Juan Rodríguez Jerez por la confianza y por la oportunidad de permitirme trabajar en su grupo de investigación, por todo el apoyo y enseñanza durante estos años.

A mis compañeros de viaje, de infinitas partes del mundo, a los integrantes de la APB, que compartieron conmigo gratos momentos en el laboratorio y en la vida diaria, y aunque muchos ya hayan tenido que partir hacia otros rumbos siempre los tendré en mis buenos recuerdos como un gran grupo. A la nueva generación de doctorandos que con sus preguntas hacen que el espíritu investigativo no se detenga y busquemos nuevas alternativas de desarrollo. A Dolors, por hacer del laboratorio un sitio agradable de trabajo, por escucharme y ayudarme en el aprendizaje del català.

A todo el profesorado del departamento y en especial a Manoli por sus aportaciones y ayuda incondicional en el laboratorio.

A mi familia, que aunque ausentes, siempre fueron y son parte importante de mis triunfos y derrotas, porque sin su apoyo no habría llegado a esta etapa de mi vida.

A mi novia, ahora mi esposa. A ti Natàlia, por compartir conmigo todo este camino, por estar a mi lado siempre, por tu amor y por tu comprensión, así como por tu apoyo.



## Resumen

Las superficies que entran en contacto con alimentos, tanto a nivel de industrias alimentarias como en los hogares, son una de las principales vías de contaminación, ya que son colonizadas por microorganismos patógenos capaces de formar biofilms, convirtiéndose en reservorios que pueden estar implicados en contaminaciones cruzadas. En este sentido, se hace necesario aplicar tratamientos a las superficies que entran en contacto con alimentos, ya sea de forma química, física o enzimática, para disminuir la adherencia, colonización o el crecimiento de microorganismos patógenos asegurando, de este modo, las características de los productos elaborados dentro de un plan de aseguramiento de la calidad. La incorporación de agentes biocidas, dentro de matrices poliméricas, es uno de los métodos más empleados para lograr inhibir o eliminar microorganismos patógenos y la posible formación de biofilms.

En este estudio, en primera estancia, se evaluaron superficies duras de poliéster tratadas con agentes biocidas metálicos (nanopartículas de plata y nanopartículas de zinc) a diferentes concentraciones, para determinar su efectividad antimicrobiana, ensayadas con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Como resultado se obtuvo una mayor eficacia de las superficies tratadas con nanopartículas de plata y un incremento en dicha eficacia, al mezclar los dos agentes metálicos.

En un segundo trabajo se evaluó la efectividad antifúngica y antibacteriana, como también su actividad en el tiempo (durabilidad), de superficies de caucho flexible y caucho rígido tratadas con agentes biocidas metálicos, con diferente composición, y en estado libre como

encapsulado. Se ensayaron con *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotti*, *Chaetomyum globosum* y *Gliocadium virens*; como con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos demostraron que los agentes biocidas en estado encapsulado son efectivos y su acción a través del tiempo se mantiene, mientras que los otros biocidas van perdiendo su efectividad en forma gradual.

En tercera estancia se evaluó la formación de biofilms y la eficacia biocida de superficies duras de poliéster tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, ensayadas con *Listeria monocytogenes*. Como resultado obtuvimos que las superficies tratadas disminuyen la posibilidad de formación de biofilms, al igual que disminuyen el crecimiento bacteriano.



## **Abstract**

Surfaces in contact with food, both in food industries and houses, are one of the main causes of contamination. This is because they may be colonized by pathogenic microorganisms capable of forming biofilms, and may become reservoirs that can be involved in cross-contamination. Therefore, it is necessary to treat surfaces in contact with food. The treatment can be chemical, physical or enzymatic, and may reduce the adhesion, colonization or growth of pathogens. In this way, it would be possible to assure the characteristics of products made under a plan of quality assurance. The use of biocidal agents incorporated within polymer matrices, is one of the most common methods for inhibition or elimination of pathogenic microorganisms and, in consequence, the possible formation of biofilms.

In this study, hard surfaces treated with metallic polyester biocides (silver nanoparticles and zinc nanoparticles) at different concentrations were evaluated for antimicrobial effectiveness, tested with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Results revealed higher efficacy in surfaces treated with silver and even better when the two metallic components are mixed.

A second goal of the study was to evaluate antifungal and antibacterial effectiveness, as well as their activity over time (durability), in flexible rubber surfaces and rigid rubber surfaces that had been treated previously with metallic biocides of different composition. At the same time, the free state and the encapsulation state were compared. They were tested with *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotti*, *Chaetomyum globosum* and *Gliocadium virens*, as well as with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results showed that biocides are effective in the encapsulated state

and that action is maintained over time, while the other biocides lose their effectiveness gradually.

Finally, formation of biofilms and the biocidal efficacy of polyester hard surfaces treated with various concentrations of silver nanoparticles tested with *Listeria monocytogenes* was evaluated. In conclusion, treating surfaces decreases the formation of biofilms and diminishes bacterial growth.

## Tabla de contenido

<b>I. Introducción</b> .....	13
<b>II. Objetivos</b> .....	14
<b>III. Revisión bibliográfica</b> .....	14
1. Importancia de la seguridad alimentaria.....	15
2. Toxiinfecciones y enfermedades transmitidas por alimentos .....	15
3. Implicación de la contaminación cruzada en las ETAs .....	17
4. Implicaciones de la contaminación fúngica en ambientes de procesado de alimentos.....	22
5. Superficies alimentarias .....	24
5.1. Superficies higiénicas.....	25
5.2. Ángulo de contacto .....	27
6. Operaciones sanitarias en la industria de alimentos .....	29
6.1. Limpieza .....	31
6.2. Desinfección .....	33
6.2.1. <i>Propiedades de los desinfectantes</i> .....	35
6.2.2. <i>Tipos de desinfectantes</i> .....	35
6.3. Limpieza y desinfección de superficies duras .....	41
6.4. Importancia del secado .....	42
7. Adherencia bacteriana en la industria de alimentos.....	43
7.1. Propiedades físico-químicas de las bacterias.....	44
7.2. Formación del biofilm.....	45
7.2.1. <i>Disposición de la superficie</i> .....	46
7.2.2. <i>Fijación bacteriana a la superficie</i> .....	47
7.2.3. <i>Formación de microcolonias</i> .....	47
7.2.4. <i>Producción de EPS y formación del biofilm</i> .....	47

7.2.5.	<i>Separación y disgregación del biofilm</i> .....	48
7.3.	Implicación de la formación de biofilm.....	49
7.3.1.	<i>Estudio de biofilms sobre superficies de contacto</i>	
	<i>alimentario</i> .....	49
7.4.	Factores que afectan la adhesión.....	51
7.5.	Prevención y erradicación de biofilm .....	51
8.	Sistemas de detección para el control microbiológico e higiénico de superficies .....	54
8.1.	Métodos clásicos .....	54
8.1.2.	<i>Hisopos o esponjas</i> .....	54
8.1.3.	<i>Placas de contacto</i> .....	55
8.1.4.	<i>Extracción de microorganismos de fracciones de superficies</i> .....	55
8.2.	Métodos rápidos.....	56
8.2.5.	<i>Microscopía de epifluorescencia directa</i> .....	56
8.2.6.	<i>Sistema automatizado TEMPO</i> .....	59
9.	Resistencia bacteriana .....	63
9.1.	Mecanismos de resistencia bacteriana intrínsecos .....	64
10.	Nuevos enfoques para reducir la carga microbiana en las superficies.....	66
10.1.	Agentes antimicrobianos .....	67
10.1.1.	<i>Sistemas orgánicos</i> .....	69
10.1.2.	<i>Sistemas inorgánicos</i> .....	71
10.2.	Nanotecnología de los biocidas.....	72
10.2.1.	<i>Nanocompuestos o nanomateriales</i> .....	73
10.3.	Clasificación de superficies antimicrobianas según su modo de acción.....	74

10.3.1. Superficies que repelen los microorganismos.....	75
10.3.2. Superficies de contacto activo.....	76
10.3.3. Superficies que liberan biocidas.....	77
11. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de plata.....	79
11.1. Mecanismos de acción de la plata.....	80
11.2. Toxicidad de la plata.....	81
12. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de zinc.....	82
12.1. Mecanismos de acción del zinc.....	84
13. Durabilidad de las superficies biocidas.....	84
14. Bases legales del uso de productos biocidas.....	86
14.1. Bases legales de las superficies en contacto con alimentos..	87
<b>IV. Estudio de la eficacia bactericida de productos químicos embebidos en superficies duras de poliéster.....</b>	<b>91</b>
1. Materiales y métodos.....	93
1.1. Superficies de estudio.....	93
1.2. Cepas bacterianas y suspensión bacteriana de ensayo.....	94
1.3. Ajuste de la concentración de la suspensión bacteriana de ensayo.....	95
1.4. Verificación del tratamiento previo óptimo de las superficies de prueba.....	96
1.5. Inoculación de las muestras de ensayo.....	97
1.6. Elección del modelo de recuperación.....	97
1.7. Validación del sistema de lectura del equipo TEMPO.....	98
1.8. Validación del modelo de recuperación.....	99
1.9. Evaluación de las superficies duras de poliéster con propiedades antimicrobianas.....	100
1.10. Análisis estadístico.....	102

2. Resultados y discusión .....	102
2.1. Estandarización de la concentración de la suspensión bacteriana de ensayo .....	102
2.2. Verificación del tratamiento previo óptimo de las superficies de prueba.....	103
2.3. Elección del modelo de recuperación .....	105
2.4. Validación del modelo de recuperación .....	106
2.5. Estandarización de lectura del equipo TEMPO .....	107
2.6. Eficacia antimicrobiana de los diferentes tipos de superficie biocida	107
<b>V. Propiedades antimicrobianas y antifúngicas de .....</b>	<b>119</b>
1. Materiales y métodos.....	121
1.1. Preparación de las superficies de estudio .....	121
1.2. Cepas fúngicas.....	122
1.3. Suspensión de esporas para ensayo.....	123
1.4. Inoculación de las superficies de estudio con SEE .....	124
1.5. Evaluación del crecimiento.....	125
1.6. Evaluación de las superficies estudiadas .....	125
1.7. Ensayo para determinar la eficacia antibacteriana.....	126
1.8. Ensayo para determinar la eficacia antibacteriana de los tipos de superficies biocida a través del tiempo .....	126
1.9. Análisis estadístico .....	127
2. Resultados y discusión .....	128
2.1. Suspensión de esporas y bacterias para ensayo.....	128
2.2. Efecto fungistático de los tipos de superficies con biocidas .	128
2.3. Eficacia antibacteriana de los tipos de superficies biocida ...	133

2.4. Eficacia de los tipos de superficies biocida a lo largo del tiempo.....	137
2.4.1. <i>Efecto fungistático de las superficies biocidas bajo tratamientos de durabilidad</i> .....	137
2.4.2. <i>Eficacia antibacteriana de las superficies biocida bajo tratamientos de durabilidad</i> .....	139
<b>VI. Eficacia de superficies antibacterianas de contacto</b> .....	145
1. Materiales y métodos.....	147
1.1. Superficies de ensayo .....	147
1.2. Cepa bacteriana y preparación del inóculo .....	148
1.3. Formación del biofilm.....	148
1.4. Evaluación de la estructura del biofilm por DEM.....	149
1.5. Validación de la técnica DEM con el recuento en placa .....	150
1.6. Recuento bacteriano por cultivo .....	150
1.7. Análisis estadístico .....	150
2. Resultados y discusión .....	151
2.1. Curva de calibración para el recuento de <i>L. monocytogenes</i> .....	151
2.2. Recuento bacteriano por cultivo y evaluación de la estructura del biofilm por DEM .....	152
<b>VII. Conclusiones</b> .....	159
<b>VIII. Referencias bibliográficas</b> .....	165

## Abreviaturas y acrónimos

AND	Ácido Desoxirribonucleico
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AFNOR	Asociación Francesa de Normalización
AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i> (Péptidos Antimicrobianos)
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de cultivos tipo)
ATP	Adenosina Trifosfato
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
BPW	<i>Buffered Peptone Water</i> (Agua de Peptona Tamponada)
CaO	Óxido de calcio
CCUG	Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centro para la prevención y el control de enfermedades)
CIP	<i>Cleaning In Place</i> (limpieza <i>in-situ</i> )
CSLM	<i>Confocal Scanning Laser Microscopy</i> (microscopía láser de escaneo confocal)
Cu	Cobre
DEM	<i>Direct Epifluorescence Microscopy</i> (microscopía de epifluorescencia directa)



ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
EPS	Extracellular Polymeric Substances (Sustancias Poliméricas Extracelulares)
ECDC	<i>European Center for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeo para la prevención y control de enfermedades)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ETAs	Enfermedad de Transmisión por Alimentos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura)
FDA	<i>Food Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos)
HCIO	Ácido hipocloroso
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> (Comisión internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos)
MEA	<i>Malt Extract Agar</i> (Agar de Extracto de Malta)
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (Concentración Mínima Inhibitoria)
MgO	Óxido de magnesio
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente)
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Disease</i> (Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas)
NMP	Número Más Probable
OBPA	Oxybisfenoxarsina
OIT	Isotiazolinona

OMS	Organización Mundial de la Salud
PEG	Polietilenglicol
PI	<i>Propidium Iodide</i> (Ioduro de Propidio)
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i> (Cloruro de Poli-Vinilo)
QACs	<i>Quaternary Ammonium Compounds</i> (Compuestos de Amonio Cuaternario)
$R_a$	Rugosidad media
RID	Recuperación por Irrigación Directa
RP	Recuperación por agitación con perlas
RH	Recuperación con hisopo
RODAC	Replicate Organisms Detection and Counting (Detección y Recuento de Microorganismos)
SBE	Suspensión Bacteriana para Ensayo
SEE	Suspensión de Esporas para Ensayo
TiO <sub>2</sub>	Óxido de titanio
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i> (Agar Tripticasa de Soja)
TSAYE	<i>TSA with Yeast Extract</i> (TSA con Extracto de Levadura)
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Tripticasa de Soja)
TSS	<i>Triptone Salt Solution</i> (Solución Salina Triptona)
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UMcF	Unidades MacFarland
UV	Ultravioleta
ZnO	Óxido de zinc
ZPT	Zinc pyrithione

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Distribución de los sectores implicados en brotes verificados de origen alimentario. Datos del 2007 donde están incluidos 2.025 brotes sucedidos en 19 países miembros de la Unión Europea .....	20
<b>Figura 2.</b> Indica un ambiente en el cual una gota de un Fluido 2 (agua) está en contacto con una Superficie sólida, todo inmerso en un Fluido 1 (aire). En este sistema el ángulo de contacto se denota con la letra griega $\theta$ , que está dado por el fluido 2 con respecto a la superficie sólida. ....	25
<b>Figura 3.</b> Ángulo de contacto sobre diferentes superficies. 3A) superficie de silicona catalogada como hidrofóbica. 3B) superficie dura de poliéster catalogada como hidrofílica. ....	26
<b>Figura 4.</b> Etapas de la formación de biofilms .....	44
<b>Figura 5.</b> Funcionamiento del microscopio de epifluorescencia. ....	58
<b>Figura 6.</b> Estaciones del sistema TEMPO. ....	61
<b>Figura 7.</b> Representación de la migración del biocida impregnado en una matriz hacia la superficie inhibiendo la adhesión y formación de biofilms.....	109
<b>Figura 8.</b> Comparación de eficacia antimicrobiana, contra — <i>E. coli</i> y — <i>S. aureus</i> ; respecto a sus diferentes concentraciones en los tipos de superficie biocida ▲ NpAg + NpZnO, ■ NpAg y ◆ NpZnO. ....	115
<b>Figura 9.</b> Efecto fungistático de los tipos de superficies biocida de caucho flexible. ....	129

<b>Figura 10.</b> Tipos de superficie biocida de caucho flexible 10A) superficie biocida tipo BOeC. 10B) superficie biocida tipo BOC. 10C) superficie biocida tipo B. ....	130
<b>Figura 11.</b> Efecto fungistático de los tipos de superficies biocida de caucho rígido. ....	132
<b>Figura 12.</b> Superficies de caucho rígido 12A) superficie biocida tipo B2O. 12B) superficie biocida tipo B3Oe.....	132
<b>Figura 13.</b> Eficacia antibacteriana de las superficies biocidas de caucho rígido. Los valores medios no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ....	133
<b>Figura 14.</b> Eficacia antibacteriana de las superficies biocidas de caucho flexible. Los valores medios no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). ....	134
<b>Figura 15.</b> Tipos de superficie biocida después de 350 ciclos de lavado a 90°C. 15A) superficie de caucho rígido B3Oe. 15B) superficie de caucho flexible BOeC. 15C) superficie de caucho flexible BOC.....	138
<b>Figura 16.</b> Efecto de la encapsulación del biocida sobre la migración hacia la superficie.....	142
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración de DEM para el recuento de <i>L. monocytogenes</i> .....	152
<b>Figura 18.</b> Superficies de estudio 18A) acero inoxidable, 18B) dura de poliéster sin biocida y 18C) dura de poliéster con 800 ppm de Ag, inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> después de 72 h de incubación en condiciones de humedad. Imágenes DEM a 20X con tinción vital <i>BacLight</i> <sup>TM</sup> .....	156

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Brotes de origen alimentario causados por contaminación cruzada con implicación de superficies de trabajo .....	18
<b>Tabla 2.</b> Principales tipos desinfectantes y su mecanismo de acción.....	37
<b>Tabla 3.</b> Criterios microbiológicos para hisopados ambientales de superficies en contacto con alimentos. ....	42
<b>Tabla 4.</b> Criterios y fluoróforos utilizados para evaluar la viabilidad de los microorganismos.....	60
<b>Tabla 5.</b> Mecanismos de resistencia intrínseca en bacterias hacia los antisépticos y desinfectantes. ....	64
<b>Tabla 6.</b> Tipos de nanopartículas biocidas y su concentración utilizados en el tratamiento de superficies duras de poliéster.....	93
<b>Tabla 7.</b> Resultados de los recuentos según el tratamiento aplicado a las superficies de estudio.....	103
<b>Tabla 8.</b> Recuentos de los diferentes modelos de recuperación. ...	105
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la comparación de lecturas entre el equipo TEMPO y recuento en placa de Petri. ....	107
<b>Tabla 10.</b> Actividad de nanopartículas de plata de amplio espectro contra bacterias. ....	108
<b>Tabla 11.</b> Eficacia antibacteriana de superficies duras de poliéster. ....	110
<b>Tabla 12.</b> Agotamiento del biocida evaluado por inmersión. ....	117
<b>Tabla 13.</b> Agotamiento de biocida evaluado por reiteración de inoculación. ....	117

<b>Tabla 14.</b> Compuestos biocidas y su concentración utilizados en el tratamiento de las superficies de caucho flexible.....	121
<b>Tabla 15.</b> Compuesto biocida y su concentración utilizada en el tratamiento de las superficies de caucho rígido.....	122
<b>Tabla 16.</b> Valoración de la intensidad de crecimiento fúngico.....	125
<b>Tabla 17.</b> Valoración del efecto fungistático del material. ....	125
<b>Tabla 18.</b> Intensidad de crecimiento fúngico de las superficies biocida bajo tratamientos de durabilidad.....	138
<b>Tabla 19.</b> Comparación de la eficacia bactericida de las superficies biocida para cada uno de los tratamientos de durabilidad.....	140
<b>Tabla 20.</b> Comparación de la eficacia bactericida de cada uno de los tipos de superficies biocida después del tratamiento de durabilidad. ....	141
<b>Tabla 21.</b> Evaluación del crecimiento y formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> .....	153

## **I. Introducción**





Las enfermedades de transmisión por alimentos constituyen un gran problema a nivel mundial, tanto en lo referente al perjuicio para las personas, como a los costes económicos que originan (OMS, 2007). Para el año 2010, la European Food Safety Authority (EFSA) y el Center for Disease Control and prevention (CDC) (2012), documentaron un total de 5.262 brotes de enfermedades de origen alimentario en la Unión Europea (UE), causados principalmente por *Salmonella* y *Campylobacter*.

En los ambientes de procesado de alimentos los microorganismos tienden a adherirse a superficies, en condiciones de humedad, temperatura y nutrientes, favoreciendo la colonización, crecimiento y formación de una matriz polimérica denominada biofilm (Carpertier y Cerf, 1993; Maukonen y cols., 2003). Tales biofilms son una fuente potencialmente continua de contaminación para los alimentos que entran en contacto con las superficies contaminadas, causando enfermedades asociadas a los alimentos o el deterioro del mismo. La higiene de las superficies, por lo tanto, afecta la calidad e inocuidad del producto alimenticio. (Gibson y cols., 1999; Sinde y Carballo, 2000; Joseph y cols., 2001). Los biofilms son particularmente difíciles de erradicar, debido a la adhesión del microorganismo a la superficie. La formación y resistencia del biofilm se ven influenciadas por varios factores relacionados con las características estructurales y fisiológicas de la célula, la naturaleza y temperatura de los fluidos en los cuales se encuentra suspendida y las propiedades físicas y químicas de la materia en contacto, tales como geometría, porosidad, rugosidad, composición e hidrofobicidad, temperatura y tiempo de adhesión (Foschino y cols., 2003). Los biofilms son drásticamente más resistentes a los antibióticos, biocidas y las fuerzas hidrodinámicas de cizallamiento (Glinel, 2012), incluso pueden persistir a las prácticas de higiene rutinarias, si estas no se realizan correctamente.

Las superficies comúnmente utilizadas en la industria de alimentos incluyen plástico, caucho, vidrio, cemento y acero inoxidable. De dichos materiales, el acero inoxidable, es el más ampliamente utilizado (Holah y Thorpe, 1990; Van Houdt y Michiels, 2010). Las superficies que tienden a facilitar la retención de microorganismos son indeseables, debido a que su presencia, suponen una transferencia potencial desde un sustrato inerte a otro tipo de sustrato, cuyo resultado podría dar lugar a la multiplicación y contaminación de la superficie implicada (Verran, 2002). Las superficies son una de las vías de contaminación de alimentos más frecuentes, tanto en la industria alimentaria como en la restauración colectiva o el hogar (Kusumaningrum y cols., 2003; CDC 2013). Es por ello que la contaminación cruzada juega un papel importante en la transmisión de patógenos a productos frescos. Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud en el año 1995 (OMS, 2000), en el ámbito europeo, determinó que el 25% de los brotes de toxiinfecciones alimentarias fueron asociados a contaminaciones cruzadas; donde intervenían, como factores determinantes, prácticas higiénicas ineficientes, superficies contaminadas y la falta de higiene de los manipuladores. Esto aumenta el peligro de contaminaciones cruzadas, con el consiguiente riesgo para la salud pública (Humphrey y cols., 1994; De Cesare y cols., 2003; Reij y Den Aantrekker, 2004; Tood y cols., 2010).

La vigilancia y control de la contaminación microbiana de las superficies está en auge, cumpliendo en parte con el aseguramiento de la calidad y la debida notificación de brotes alimentarios, en cuyas vías de contaminación se han visto implicadas superficies, equipos y/o utensilios contaminados que entran en contacto directo con el alimento (Reij y Den Aantrekker, 2004). La topografía y características de los biofilms en los ambientes de procesado de alimentos y el desarrollo de un plan de saneamiento, debe ser

considerado en el sistema APPCC. Así, al mantener un sistema APPCC actualizado, con la evaluación de biofilms en las planta de alimentos, proporcionará una información más clara de la contaminación y ayudará en el desarrollo de sistemas de procesado libres de biofilms en la industria de los alimentos (Shi y Zhu, 2009). Las instalaciones para el procesado de alimentos deben ser construidas con barreras que impidan la proliferación de organismos patógenos, principalmente donde existen múltiples fuentes potenciales de contaminación, en especial con los elementos que entran en contacto directo con los productos elaborados o sus ingredientes, como bandas transportadoras, equipos, utensilios y superficies de contacto (Todd y cols., 2010).

Recientemente, una cantidad significativa de investigaciones fundamentales y aplicadas han sido direccionadas hacia la ingeniería química y/o enzimática de las superficies, para impedir la proliferación de patógenos transmisibles (Adamopoulos y cols., 2007). Para hacer frente a la necesidad, cada vez mayor, de prevenir la formación de biofilms sobre las superficies en situaciones cotidianas e industriales, han sido desarrolladas diferentes estrategias para conferir actividad antimicrobiana (Jayakumar y cols., 2001; Shi y cols., 2004). El uso de desinfectantes convencionales o los antibióticos, es limitado por la toxicidad de sus residuos, ya que son líquidos y gases de bajo peso molecular (Cen y cols., 2003). Generalmente existen dos tipos de agentes antibacterianos, los orgánicos y los inorgánicos. Los agentes antibacterianos orgánicos están representados por antibióticos y complejos compuestos orgánicos. Se ha estudiado las modificaciones inorgánicas, tales como sales metálicas, óxidos de Ag, Cu, Ti. Estos últimos proporcionan la ventaja clave de mejorar la seguridad y estabilidad, en comparación con los compuestos orgánicos (Liu y cols., 2007).

Los biocidas son agentes antimicrobianos que poseen efectos, tanto bactericidas como bacteriostáticos, estos son utilizados en gran variedad de plásticos y materiales poliméricos, ya sea depositando una capa protectora bactericida (basados en la inmovilización o liberación de sustancias) (Glinel y cols., 2012) como dentro de la misma matriz polimérica (Nichols, 2005; Cao y cols., 2009). Los materiales que no son antimicrobianos por si mismos, requieren modificaciones. Alternativamente los materiales pueden ser impregnados con agentes antimicrobianos, como antibióticos, compuestos de amonio cuaternario, iones de plata o yodo, que se liberan gradualmente a través del tiempo en la solución que la rodea, eliminando los microorganismos (Tiller y cols., 2001). En las últimas décadas, se han utilizado biocidas de bajo peso molecular, como el clorhidrato de fenol, derivados de isotiazolona, que liberan cloro N-halaminas, así como las sales y complejos de metales (normalmente Zn y Ag) (Seyfriedsberger y cols., 2006).

Las nanopartículas de plata (NpAg) tienen una fuerte actividad antibacteriana contra muchas clases de bacterias, aún en bajas concentraciones. Sin embargo, su aglomeración y compatibilidad con matrices orgánicas pueden implicar el deterioro de sus propiedades mecánicas y disminuir sus propiedades antibacterianas, lo que limita su uso eficiente en materiales antibacterianos (Cheng y cols., 2006). Los materiales antisépticos basados en plata pueden estar relacionados con la propensión mucho menor para inducir la resistencia microbiana a los antibióticos. Al mismo tiempo, su baja toxicidad humana, en comparación con otros iones de metales pesados, han hecho que su presencia se haya generalizado (Ruan y cols., 2009). Las nanopartículas de zinc (NpZn) se utilizan más extensamente en la rutina diaria. Aparte de la prevención de la degradación y el deterioro microbiano de materiales de fabricación de partida, tales como plásticos, polímeros y látex, las nanopartículas de

zinc son usadas para prevenir el crecimiento de bacterias, hongos, mohos y algas. Esto los hace muy interesantes para prevenir varios tipos de deterioros, como decoloración, manchas, olores y otros (Sun y cols., 2006).



## **II. Objetivos**





Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Objetivo General:

Evaluar la eficacia bactericida y bacteriostática de superficies tratadas con diferentes agentes biocidas

2. Objetivos específicos:

- Establecer, para el estudio, un tipo de tratamiento previo óptimo de las superficies a evaluar, con el fin de eliminar la microbiota acompañante.
- Desarrollar una técnica estandarizada para evaluar la efectividad bactericida y/o bacteriostática en las superficies muestra de estudio.
- Evaluar la capacidad antifúngica de productos químicos embebidos en materiales poliméricos, tales como caucho flexible y rígido.
- Desarrollar una técnica estandarizada para evaluar la efectividad antifúngica en las superficies de estudio.
- Determinar la estimación del efecto biocida, en el tiempo, en las superficies estudiadas.
- Comparar el crecimiento microbiano en superficies de acero inoxidable y superficies duras de poliéster, embebidas con compuestos de plata a diferentes concentraciones.
- Evaluar mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM) la formación de biofilms sobre superficies duras de poliéster, embebidas con compuestos de plata.



### **III. Revisión Bibliográfica**



## **1. Importancia de la seguridad alimentaria**

La seguridad alimentaria es cada vez más importante en el área de la salud pública y, por ello, todos los gobiernos a nivel mundial están intensificando sus esfuerzos para adaptarla a la gran variabilidad de peligros existentes. Los problemas de seguridad alimentaria están en constante cambio, ya sea por la aparición de agentes patógenos emergentes, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, como por los cambios en el estilo de vida, economía, hábitos alimenticios y edad de la población, entre otros (OMS, 2002; Forsythe, 2010; Nyachuba, 2010).

La globalización ha traído consigo grandes riesgos para la salud, ya que la producción intensiva de alimentos, la expansión mundial de su comercialización, el nivel de concentración de consumidores de alimentos preparados o que comen en colectividades, hacen, que frente a un brote de enfermedad de origen alimentario, esta se disemine y, de no tener un adecuado programa de vigilancia, necesario para su control, el número de afectados sea mayor (FAO y OMS, 2002).

## **2. Toxiinfecciones y enfermedades transmitidas por alimentos**

Las toxiinfecciones y las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), comprenden un amplio grupo de enfermedades causadas por bacterias patógenas, parásitos, contaminantes químicos y biotoxinas; además de las reacciones individuales del cuerpo humano a los microorganismos (OMS, 2006<sup>a</sup>; NIAID, 2007).

Las ETAs constituyen un gran problema a nivel mundial, tanto en lo referente al perjuicio para las personas, como a los costes económicos que originan. La tarea de estimar, con cierta precisión, la frecuencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos, implica un esfuerzo enorme ya que, en la mayoría de los países, no se emplea un buen sistema de registro. Se estima que casi un 70 por ciento de los aproximadamente 1.500 millones de casos de diarrea que se dan en el mundo al año, son causados directamente por la contaminación biológica o química de los alimentos. Algunas estimaciones indican, que tan solo en los Estados Unidos de América (EE.UU), las ETAs han causado 76 millones de casos, 350.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes al año (OMS, 2007).

Para el año 2010, la Autoridad en Seguridad Alimentaria Europea (European Food Safety Authority -EFSA-) y el Centro Europeo de Control de Enfermedades (European Center of Disease Control – ECDC-) (2012), documentaron un total de 5.262 brotes de enfermedades de origen alimentario en la Unión Europea, causados principalmente por *Salmonella* y *Campylobacter*, afectando a 43.473 personas, de los cuales, 4.695 fueron hospitalizadas y 25 murieron. Los alimentos más frecuentemente involucrados en estos brotes fueron los huevos, comidas mixtas o de bufés, vegetales y sus subproductos. Así, las principales bacterias transmitidas por alimentos fueron *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp. y *Listeria* spp, siendo la enfermedad más frecuente la salmonelosis, a pesar del descenso significativo de los casos registrados en los últimos años.

La mayoría de las ETAs son esporádicas. Si el número de afectados es pequeño, normalmente de tipo familiar, no se suelen recoger en las estadísticas oficiales. Sin embargo, cuando se llegan a afectar un segmento masivo de la población, se genera una alarma, a veces desproporcionada. Por ejemplo, en 1994, un brote de salmonelosis en

los EE.UU, debido a la contaminación de la base para la producción de helado, afectó a 224.000 personas (OMS, 2007). Desde la década de 1990, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* son las principales bacterias transmitidas por los alimentos, microorganismos que han persistido en la cabecera de la lista en el siglo XXI (OMS, 2007; Newell y cols., 2010). Más recientemente ha habido una creciente preocupación por *Listeria monocytogenes*.

### **3. Implicación de la contaminación cruzada en las ETAs**

La transferencia bacteriana conocida como “contaminación cruzada” es un término general que hace referencia a la contaminación directa o indirecta, por parte de microorganismos, desde una matriz contaminada (ya sean alimentos, superficies de trabajo u operarios, entre otras) a otra matriz no contaminada. Por otro lado, el término recontaminación hace referencia a la contaminación de los alimentos después de haber sido sometidos a tratamiento higienizante (Carrasco y cols., 2012).

La contaminación cruzada juega un papel importante en la transmisión de patógenos a productos frescos. Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud en el año 1995 (OMS, 2000), en el ámbito europeo, determinó que el 25% de los brotes de toxiinfecciones alimentarias fueron asociados a contaminaciones cruzadas; donde intervenían, como factores determinantes, prácticas higiénicas ineficientes, superficies contaminadas y la falta de higiene de los manipuladores. La vigilancia y control de la contaminación microbiana de las superficies está en auge, cumpliendo en parte con el aseguramiento de la calidad y la debida notificación de brotes alimentarios, en cuyas vías de contaminación se han visto implicadas

superficies, equipos y/o utensilios contaminados que entran en contacto directo con el alimento (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Brotes de origen alimentario causados por contaminación cruzada con implicación de superficies de trabajo (Modificado de Reij y Den Aantrekker, 2004).

Patógeno	Alimento implicado	Vía de contaminación	Referencia
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Yogur aromatizado	Bomba utilizada anteriormente para leche sin pasteurizar	Morgan y cols., 1993
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mantequilla	Medio ambiente de proceso	Lyytikainen y cols., 2000
	Carne cocida	Máquina de corte	Lunden y cols., 2002
	Salchichas	Medio ambiente	Anonymous, 1999
<i>Salmonella</i> Agona	Cereales para el desayuno	Equipos y medio ambiente de proceso	Breuer, 1999
<i>Salmonella</i> Berta	Queso suave	Cubos de maduración de queso empleados anteriormente para carcasas de pollo	Ellis y cols., 1998
<i>Salmonella enterica</i>	Crema de helado	Cisterna para transportar crema de helado empleado anteriormente para huevo crudo	Hennessy y cols., 1996
<i>Salmonella typhimurium</i>	Lonchas de jamón cocido	Recipientes utilizados anteriormente para el curado de carne de cerdo cruda	Llewellyn y cols., 1998
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Leche pasteurizada	Contaminación post-proceso desde el medio ambiente	Ackers y cols., 2000

Los patógenos, con bajas dosis infectivas, pueden estar presentes en las manos de un alto número de manipuladores de alimentos y, si se

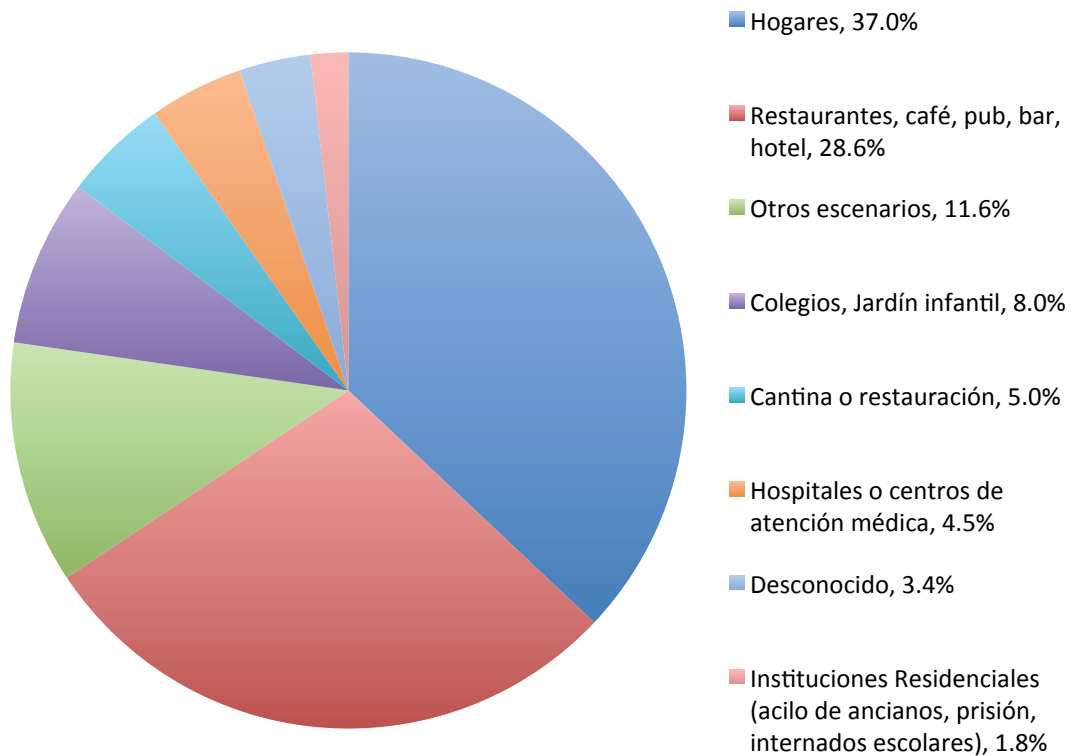


suma un bajo nivel de barreras, estos pueden ser fácilmente transferibles a superficies alimentarias, donde podrían sobrevivir durante largos periodos de tiempo. En condiciones adecuadas, incluso podrían seguir siendo viables después de la limpieza y desinfección, convirtiendo a las superficies en una importante fuente de contaminación. Esto aumenta el peligro de contaminaciones cruzadas, con el consiguiente riesgo para la salud pública (Humphrey y cols., 1994; De Cesare y cols., 2003; Reij y Den Aantrekker, 2004; Tood y cols., 2010).

Hay muchos ejemplos de enfermedades de transmisión alimentaria en las que las superficies han estado implicadas en la transmisión de patógenos. Entre otros, podemos destacar el brote ocurrido en el noroeste de la costa del Pacífico en los EE.UU. en 1993. Algunos manipuladores de carne cruda trabajaban muy cerca de ensaladas frescas, lo que supuso una contaminación cruzada entre diferentes elementos de la barra de las ensaladas, causando un brote por *E. coli* O157:H7 (Jackson y cols., 2000). De una forma similar, en 2007, una sola lechuga estuvo implicada en un brote por campylobacteriosis, en Dinamarca. Este brote se originó a partir de pollo contaminado por el patógeno, que a su vez contaminó la lechuga de forma cruzada durante su elaboración (Andersen, 2007).

Las superficies son una de las vías de contaminación de alimentos más frecuentes, tanto en la industria alimentaria, la restauración colectiva como en el hogar (Kusumaningrum y cols., 2003; CDC 2013). El origen de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa se concentra en los hogares, ocupando el primer puesto, con un 37%. La causa principal se debe a la inadecuada manipulación y preparación de los alimentos, algo que coincide con el segundo origen de las ETA: restaurantes, cafés y bares, con un 28% y que, en su gran mayoría, han sido causados por *Salmonella*. Por tanto, de nuevo las contaminaciones cruzadas ocupan siempre un

lugar destacado a prevenir (**Figura 1**) (Anderson y cols., 2004; Kusumaningrum y cols., 2004; EFSA, 2009). No obstante, este tipo de causa suele estar subestimada, puesto que no hay técnicas específicas para su detección. Para garantizar la prevención adecuada, un tema clave a tener en cuenta es la educación de los



**Figura 1.** Distribución de los sectores implicados en brotes verificados de origen alimentario. Datos del 2007 donde están incluidos 2.025 brotes sucedidos en 19 países miembros de la Unión Europea (EFSA, 2009).

consumidores con respecto a la seguridad de los alimentos. El riesgo de prácticas inseguras en la manipulación de alimentos y la falta de higiene son factores imposibles de controlar si no existe el concepto, previamente aprendido, en los consumidores (van Asselt y cols., 2009; Carrasco y cols., 2012).

Además de los mismos consumidores, los platos preparados son una de las principales fuentes de riesgo de las ETAs, ya que pueden estar

involucrados en eventos de contaminación cruzada debido, no sólo a los manipuladores de alimentos, sino también a los utensilios, equipos y superficies, que frecuentemente son empleados en diferentes procesos (tablas cortadoras, cortadoras eléctricas con cuchillas de acero inoxidable, mesas o encimeras donde se manipula el alimento, entre otros) (EFSA, 2009).

Gorman y cols., (2002) realizaron un estudio, en la República de Irlanda, sobre la incidencia potencial de patógenos alimentarios y su implicación en la contaminación cruzada, en cocinas domésticas, durante la preparación de pollo asado. Identificaron la capacidad de los microorganismos causantes de las ETAs para diseminarse desde los alimentos contaminados crudos, hacia las manos y superficies de contacto en las cocinas domésticas, obteniendo como resultado que el microorganismo implicado con mayor frecuencia en la contaminación cruzada era *Staphylococcus aureus* (19,7%), seguido por *Salmonella* (16,6%).

Las instalaciones para el procesado de alimentos deben ser construidas con barreras que impidan la proliferación de organismos patógenos, principalmente donde existen múltiples fuentes potenciales de contaminación, en especial con los elementos que entran en contacto directo con los productos elaborados o sus ingredientes, como bandas transportadoras, equipos, utensilios y superficies de contacto (Todd y cols., 2010). Por otra parte, la importancia de la comercialización de los alimentos podría enfatizarse en el manejo de la seguridad y prevención de la contaminación cruzada, durante la red de transporte y distribución en la cadena de producción (Anónimo, 2001; 2003). El desarrollo del transporte en contenedores ha tenido gran impacto en la comercialización de alimentos. De estos, más del 90% tienen refrigeración incorporada y son utilizados, tanto para transporte de alimentos como otros productos que lo necesiten. La legislación vigente y los estándares de

calidad exigen, que los equipos de transporte de alimentos, sean contruidos permitiendo una apropiada limpieza y desinfección, mientras que los materiales utilizados en el interior (revestimientos interiores, probables superficies de contacto) deben ser impermeables, no tóxicos, de fácil limpieza y resistencia a la corrosión, astillado o descamado (Anónimo, 2003; 2005a).

En otro ámbito como es el de los materiales de construcción, las bacterias pueden degradar superficies poliméricas, utilizando sus componentes como fuente de alimento, llegando a producir tinciones de las superficies, picaduras y malos olores. Los polímeros también pueden proveer una superficie de crecimiento y proliferación de organismos patógenos (Eversdijk y cols., 2012). Por estos motivos, se están estudiando diferentes formas de prevenir el crecimiento de microorganismos en los materiales de construcción. En cuanto a los sistemas de ventilación, hay que poner un énfasis especial en la calidad de aire interior, por el aumento de la preocupación asociada a sus posibles efectos nocivos sobre la salud (Cowan y cols., 2003).

#### **4. Implicaciones de la contaminación fúngica en ambientes de procesado de alimentos**

Los hongos representan un creciente problema en nuestra sociedad actual como organismos contaminantes, debido a sus esporas fúngicas, que están muy bien adaptadas para ser diseminadas por el aire desde reservorios, como sistemas de ventilación, alfombras, cuartos de baño, paredes o superficies, entre otros (Gots y cols., 2003; Singh, 2005). Es así como han llegado a ser la cuarta causa más común de septicemia en pacientes hospitalizados, cuya infección es propagada por equipos y/o dispositivos médicos (Paulo y cols., 2010).

El desarrollo de nichos ecológicos y producción de gran número de esporas, previamente a su diseminación, suele llevarse a cabo en ambientes creados por el ser humano, como las superficies alimentarias, los lavaplatos, las cafeteras o los refrigeradores, donde se adaptan a microclimas. Estos se forman gracias a la condensación de humedad, formada en ambientes cerrados. Más aún, existen hongos capaces de soportar condiciones extremas (organismos extremófilos) como la temperatura, la presión o elevadas concentraciones de solutos (Singh, 2005; Nichols, 2005; Zalar y cols., 2011).

Los hongos pueden afectar adversamente la salud humana a través de tres procesos: alergia, infección y toxicidad (Jarvis, 2002; Fischer y Dott, 2003; Singh, 2005). Solo un número limitado de géneros de hongos son reconocidos como patógenos para el ser humano, entre ellos *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* (Singh, 2005).

La toxicidad, hace referencia a las sustancias químicas altamente tóxicas producidas por los mohos denominadas micotoxinas (metabolitos secundarios) capaces de tener efectos tóxicos agudos, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, inmunotóxicos y estrogénicos en humanos y animales. Las micotoxinas son producidas principalmente por la estructura micelial de los mohos, bajo condiciones específicas. Sin embargo, se pueden encontrar también presentes en las esporas (D´mello y Macdonald, 1997; Van Egmond y cols., 2007; Reddy y cols., 2010).

La contaminación fúngica del aire tiene cada vez más importancia, desde el punto de vista de los riesgos para la salud, que se originan por las mismas esporas o por sus metabolitos microbianos (Fischer y Dott, 2003). Además, se considera un problema de especial relevancia, por constituir una enfermedad ocupacional o riesgo

laboral, en las industrias de elaboración de productos crudos curados (jamón, salchichón y quesos) (Palmas y Meloni, 1997; Boisnault y cols., 2005), produciendo afecciones respiratorias e incluso alergias causadas por esporas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* (Palmas y Meloni, 1997).

La aplicación de temperaturas de refrigeración es un factor limitante del desarrollo de la alteración bacteriana de los alimentos, especialmente durante su comercialización. Sin embargo, numerosos géneros fúngicos pueden crecer a temperaturas de refrigeración. Por este motivo, *Cladosporem herbarum* es la especie que generalmente se observa en las paredes de las cámaras de refrigeración, después de su limpieza y desinfección regular (Moss, 1999).

## **5. Superficies alimentarias**

Las superficies o materiales en contacto con alimentos son todos aquellos objetos destinados a entrar en contacto directo o indirecto con los productos alimenticios. Entre ellos encontramos el vidrio, papel, metales, plásticos, maderas, envases, mesas de proceso y utensilios de cocina (Hui, 2003; AECOSAN, 2014).

Es de esperar que sobre las superficies alimentarias, los microorganismos propios de los alimentos, del personal de trabajo y del medioambiente (algunos con potencial patogénico), estén presentes a lo largo de la cadena alimentaria (Verran, 2008).

La tendencia de las superficies a facilitar la retención de microorganismos es indeseable porque su presencia supone una biotransferencia potencial. Esta hace relación a la habilidad de ser transferidas desde un sustrato inerte a otro tipo de sustrato, cuyo

resultado podría dar lugar a la multiplicación y contaminación de la superficie implicada (Verran, 2002).

Las superficies con muchos defectos de dimensión y distribución (perforaciones, pozos, grietas, soldaduras, articulaciones, uniones o poros) poseen poca facilidad de limpieza, convirtiéndolos en más propensos a permanecer con suciedad y, por ende, un reservorio de microorganismos, debido a la cantidad de sitios de retención (Taylor y cols., 1998). Varios factores muestran la influencia de la retención de microorganismos sobre superficies orgánicas e inorgánicas: topografía (Verran y cols., 2010; Whitehead y Verran, 2006), presencia de varios residuos de alimento y química general de la superficie (Bernbom y cols., 2009; Whitehead y cols., 2006; Verran y cols., 2010b), el tipo de material involucrado (Teixeira y cols., 2008) y las propiedades de la superficie del microorganismo involucrado (Liu y cols., 2007).

### ***5.1. Superficies higiénicas***

Uno de los argumentos decisivos cuando se escogen materiales para líneas de procesamiento o equipos, junto con sus propiedades mecánicas y anticorrosivas, es la de poseer condiciones higiénicas, tales como rugosidad de la superficie, alta limpiabilidad (facilidad de limpieza), desinfectabilidad, humectabilidad (determinada por la hidrofobicidad) y la vulnerabilidad al desgaste. Todo ello influenciará la capacidad de las células para adherirse a una superficie en particular (Van Houdt y Michiels, 2010). Los materiales comúnmente utilizados en la industria de alimentos incluyen plástico, caucho, vidrio, cemento y acero inoxidable. De dichos materiales, el acero inoxidable, es el más ampliamente utilizado para la construcción de equipos y utensilios, demostrando ser altamente higiénico (Holah y Thorpe, 1990; Van Houdt y Michiels, 2010).

Las superficies, para su limpieza, deben ser accesibles, planas, lisas y duras. El desgaste normal de las superficies alimentarias es inevitable, por lo tanto es necesario elegir una apropiada limpieza y desinfección para eliminar microorganismos y suciedad de las superficies en un determinado entorno industrial (Flint y cols., 1997). Para evaluar la naturaleza higiénica de una superficie, se utiliza el valor de la rugosidad media ( $R_a$ ). Se trata de un parámetro estadístico que describe el promedio de las ondulaciones con respecto a un eje central (Verran y cols., 2001; Whitehead, 2006). Parece por tanto obvio que la topografía juegue un papel importante en la limpiabilidad de las superficies, incluso en la adhesión bacteriana mediante los sitios de protección que alojaría los microorganismos, evitando el estrés por cizallamiento (Jullien y cols., 2002; Jones, 2009). Sin embargo, algunos estudios (Barnes y cols., 1999; Hüsmark y Rönner, 1993) han fracasado en demostrar la relación entre los valores de  $R_a$  y la adherencia bacteriana y/o la facilidad de limpieza de la superficie.

Dentro de la industria de alimentos, el valor de  $R_a$  debe ser inferior de  $0,8 \mu\text{m}$  (Flint y cols., 1997) y se utiliza para denotar una superficie higiénica. El desgaste y la abrasión pueden afectar el valor de la  $R_a$  de manera impredecible. Es importante entonces eliminar la suciedad de las superficies alimentarias, garantizando procesos eficaces de limpieza (Anónimo, 2010).

Las propiedades de las superficies alimentarias han sido tenidas en cuenta por las autoridades legisladoras en cuanto a la determinación de las especificaciones de topografía de la superficie. Por ello, cada país desarrolla y aplica su normativa. Por ejemplo, el "Standard US 3-A Sanitary Standard 01-07" (1990) de los EE.UU. especifica que las superficies que entran en contacto directo con los alimentos requieren un grado de acabado nº 4, con un valor de  $R_a$  inferior de

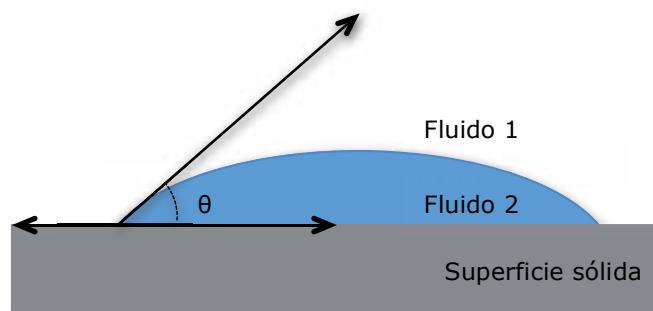


0,8  $\mu\text{m}$ , y deben estar libre de grietas y hendiduras (Frantsen y Mathiesen, 2009)

La Universidad Metropolitana de Michigan ha estado investigando sobre las propiedades de las superficies higiénicas, particularmente sobre el acero inoxidable, para observar como mejorar su diseño afectando así la retención de residuos de alimentos y el reservorio de microorganismos (Anónimo, 2010).

### 5.2. *Ángulo de contacto*

La influencia de la humectabilidad de la superficie sobre la higiene puede variar dependiendo de las cepas microbianas, sustratos y medios de suspensión (Hüsmark y Rönner, 1990; Flint y cols., 1997). La medida del ángulo de contacto, utilizando agua desionizada, es un método para definir la hidrofiliicidad o hidrofobicidad de un material, también denominado humectabilidad (**Figura 2**).

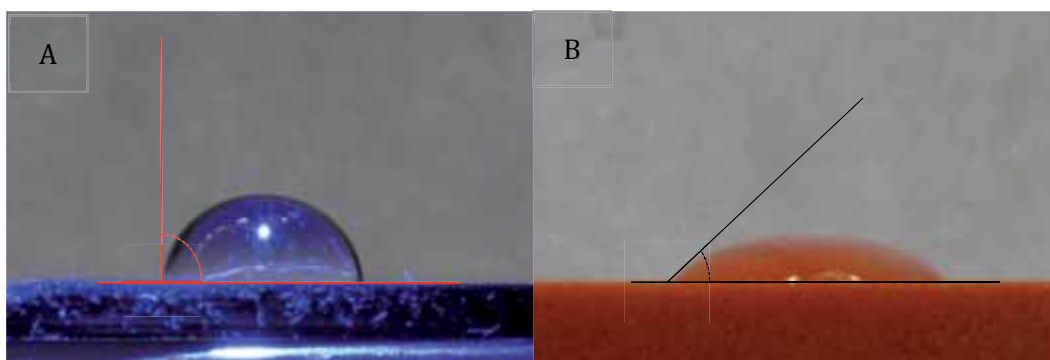


**Figura 2.** Indica un ambiente en el cual una gota de un Fluido 2 (agua) está en contacto con una Superficie sólida, todo inmerso en un Fluido 1 (aire) . En este sistema el ángulo de contacto se denota con la letra griega  $\theta$ , que está dado por el fluido 2 con respecto a la superficie sólida (Modificado de Neira y cols., 2007).

Para determinar el ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie se utilizan equipos de análisis de imagen, los cuales dejan caer una microgota desde una jeringa automática hacia la superficie de estudio, mientras tanto una cámara captura imágenes fijas o en movimiento, de dicha gota, y mediante un software analiza las

características de la imagen, resultando en la medida del ángulo de contacto.

Las superficies sobre las cuales se deja caer una gota de agua y esta muestra ángulo de contacto cerca de los  $90^\circ$  son definidas como hidrofóbicas (**Figura 3A**), mientras que aquellas con bajo ángulo de contacto se describen como hidrofílicas (**Figura 3B**). Si el ángulo de contacto está cerca de  $150^\circ$ , la superficie demostrará características de superhidrofobicidad, comúnmente se conoce como efecto lotus. El caso opuesto también puede ocurrir cuando se observa que casi no hay ángulo de contacto, y tales superficies de los materiales son definidas como superhidrofílicas (Wang y Jiang, 2007).



**Figura 3.** Ángulo de contacto sobre diferentes superficies. 3A) superficie de silicona catalogada como hidrofóbica. 3B) superficie dura de poliéster catalogada como hidrofílica.

Otro parámetro a tener en cuenta son las energías libres superficiales. Son muchos los estudios que han tratado este tema y la relación que implican estas energías respecto a la condición higiénica de las superficies (Jullien y cols., 2002). Por último, otra de las características relevantes de las superficies, en contacto directo con productos alimenticios, es la presencia de una película que mejora las propiedades de la superficie y, en consecuencia, afecta la adhesión bacteriana (Hüsmark y Rönner, 1990; Mettler y Carpentier, 1998).

La adhesión de las bacterias a las superficies es termodinámicamente favorable si la energía libre total de adhesión es negativa. Por lo tanto, si las superficies alimentarias tienen carga negativa, repelen las células microbianas porque su carga neta de superficie celular es negativa (Teixeira y cols., 2005; Jansen y Kohnen, 1995).

Una posible explicación, para demostrar cuantitativamente la relación entre las propiedades de las superficies y la frecuencia de adhesión, es la observación de que la energía libre de las superficies está más relacionada con las fuerzas de unión que con el número de bacterias adheridas por unidad de área de la superficie (Sinde y Carballo, 2000).

## **6. Operaciones sanitarias en la industria de alimentos**

Las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) se han establecido para controlar la calidad y seguridad alimentaria. Sin embargo, los biofilms microbianos no han sido específicamente destacados en el sistema APPCC. Por lo tanto, la topografía y características de los biofilms en los ambientes de procesado de alimentos y el desarrollo de un plan de saneamiento, debe ser considerado como pre-requisito en el sistema APPCC. Así, al mantener un sistema APPCC actualizado, con la evaluación de biofilms en las plantas de alimentos, se proporcionará una información más clara de la contaminación y ayudará en el desarrollo de sistemas de procesado libres de biofilms en la industria de los alimentos (Shi y Zhu, 2009).

La higiene debe contemplarse dentro de una perspectiva global, como una etapa básica del proceso productivo, considerada como un requisito previo del sistema APPCC. El propósito de la implementación de un sistema de higiene es eliminar cualquier microorganismo

patógeno y de alteración, sobre todas las superficies alimentarias (Hui, 2003). Este sistema debe basarse en un plan de acción con varias etapas, empleando un producto de limpieza y un agente desinfectante. Es así como algunos métodos físicos, tales como cepillos mecánicos; agentes químicos, como detergentes y enzimas biológicas, pueden aplicarse a un medioambiente industrial libre de biofilms (Kumar y Anand, 1998; Shi y Zhu, 2009).

Las etapas del plan de higiene son (Wildbrett, 2000; Anónimo, 2001):

- *Preparación del lugar:* correspondiente a las etapas preliminares que coinciden generalmente con las últimas operaciones de la fase de producción. Su objetivo es retirar todo aquello que pueda disminuir la accesibilidad o la eficacia de las etapas posteriores.
- *Prelavado:* Es una etapa de limpieza previa que se realiza con agua fría o caliente, según el tipo de suciedad y el tipo de producto limpiador a emplear. Se debe evitar la aplicación de sistemas de alta presión ya que podrían dispersar las partículas hacia otras áreas de proceso. Tiene como finalidad eliminar materiales alimenticios dejados en las líneas de producción, que pudieran ingresar posteriormente y deteriorar la calidad del producto alimenticio.
- *Limpieza:* Se realiza mediante la aplicación mecánica de un agente limpiador o detergente y su finalidad consiste en desprender y llevar en suspensión la suciedad adherida, visible o no, la cual podría favorecer el crecimiento de microorganismos.
- *Aclarado:* Empleo de agua limpia a baja presión para la eliminación, tanto de la suciedad en suspensión, como del producto de limpieza.

- *Desinfección*: Se aplica un agente desinfectante de forma manual o mecánica que reduce la microbiota remanente en las superficies y elimina los microorganismos patógenos.
- *Aclarado final*: Se utiliza agua potable para arrastrar los residuos de desinfectante empleados, evitando que se contaminen los alimentos.
- *Secado*: Se debe realizar en la medida de lo posible, ya que el agua, además de favorecer el crecimiento microbiano, puede servir de vehículo diseminador si existen microorganismos presentes. El objetivo principal consiste en limitar la recontaminación y/o el crecimiento microbiano.

Además, los procesos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria pueden tener otros propósitos (Lelieveld y cols., 2003):

- Incrementar la vida útil y prevenir el daño de los equipos y superficies.
- Proporcionar un ambiente de trabajo seguro y limpio para los empleados.
- Presentar una imagen favorable a las posibles visitas, demostrando así una buena gestión.

### **6.1. Limpieza**

La limpieza es la operación donde se elimina, de una determinada superficie, la suciedad visible o invisible que pueda presentar esta, previniendo la acumulación de residuos que lleguen a potenciar el crecimiento de microorganismos. La acción de separar la suciedad del

sustrato, poniéndolas en una solución o dispersión, se denomina detergencia (Leveau y Bouix, 2002). Esta operación se realiza mediante detergentes que se eligen teniendo en cuenta el tipo de alimento que se procesa y la suciedad que puede llegar a generar, las propiedades físico-químicas de las superficies donde se constituyen, así como el crecimiento microbiano sobre las superficies y equipos de proceso (Troller, 1993). Sin embargo, los productos de limpieza que se utilizan como control, son de especial importancia, ya que pueden convertirse en un peligro de contaminación para las mismas superficies (Davidson y cols., 1999).

Existen tres características fundamentales que debe tener un producto de limpieza:

- *Poder quelante*: capacidad de secuestrar los minerales e impedir que cristalicen, precipiten e incrusten en los materiales con los que contactan.
- *Poder desengrasante*: capacidad para dispersar y emulsionar grasas.
- *Poder dispersante*: capacidad de disgregar las partículas de la suciedad y mantenerlas en suspensión.

Es necesario e indispensable un tratamiento de limpieza conveniente para llevar a cabo una desinfección eficaz, debido a que algunos productos residuales podrían inactivar el agente desinfectante y los microorganismos sobrevivirían a dicho tratamiento (Mostert y cols., 2005).

La mayoría de los productos químicos limpiadores, empleados en la industria alimentaria, son los compuestos alcalinos, actuando como detergentes capaces de romper las proteínas, por la acción de los iones hidroxilo. A su vez saponifican las grasas y a altas

concentraciones pueden actuar como bactericidas (Lelieveld y cols., 2003). Además, pueden ser empleados en combinación con agentes secuestrantes (quelantes) y humectantes aniónicos (compatibles con limpiadores ácidos o alcalinos). Sin embargo, cuando se requiere eliminar residuos específicos sobre las superficies como las incrustaciones de capas de proteína, depósitos de minerales o incrustaciones lácticas, se hace necesario el empleo de detergentes ácidos (Wildbrett, 2000). Por otro lado, los agentes humectantes no iónicos son utilizados especialmente por su buen comportamiento para la eliminación de suciedad grasa por solubilización, emulsificación y su actividad antiespumante (Chmielewski y Frank, 2003; Bajpaid y Tyagi, 2007). Otro compuesto importante, tanto a nivel biológico como medioambiental, es el uso de enzimas, capaces de catalizar reacciones de hidrólisis de moléculas complejas (proteínas y lípidos, entre otros), generando estructuras simples y de fácil eliminación (Altmajer-Vaz, 2004).

## **6.2. Desinfección**

La desinfección es definida como el tratamiento de las superficies y equipos, utilizando medios físicos o químicos, para la eliminación total de patógenos y reducir la cantidad de microorganismos presentes a un nivel seguro y/o prevenir el desarrollo microbiano en la superficie durante el periodo de producción, evitando así su transferencia al consumidor (Holah, 1995; Lelieveld y cols., 2003; Mostert y cols., 2005). Para una adecuada desinfección, primero debe asegurarse el contacto directo de la solución desinfectante con los microorganismos. A este respecto, la finalidad de las operaciones de limpieza es hacer accesible los microorganismos a los productos desinfectantes (Wildbrett, 2000).

Hay que mencionar que la eficacia de un agente antimicrobiano se ve afectada por numerosos factores:

- *Sustancias interferentes*: la presencia de materia orgánica reduce el efecto de los desinfectantes, debido a la reacción química o estructural que pueda ocurrir (Holah, 1995).
- *Temperatura*: deben tener la capacidad de actuar en un rango de temperatura desde los 5°C a los 55°C, teniendo en cuenta que un aumento en la temperatura incrementa la actividad del compuesto químico (Holah, 1995; Herruzo, 2000).
- *Tamaño de la población*: a una mayor carga microbiana se requiere mayor concentración de desinfectante o mayor tiempo de contacto (Herruzo, 2000).
- *Composición de la población*: los microorganismos en función de su estructura celular, composición y fisiología, presentan diferencias en su susceptibilidad o su respuesta ante los antisépticos y desinfectantes (McDonnell y Russell, 1999).
- *Concentración*: a mayor concentración de desinfectante mayor es la muerte microbiana (Holah, 1995).
- *Tiempo de contacto*: la duración de la exposición, cuanto más tiempo, más organismos serán destruidos. El tiempo más usualmente elegido debe estar entorno a los 5 minutos, durante el cual deben ser capaces de asegurar un efecto biocida (Holah, 1995; Prescott, 2009).
- *Tipo de superficie*: La naturaleza, calidad y accesibilidad de las superficies alimentarias, así como, de los materiales determinan la aptitud para la limpieza y desinfección de los mismos (Anónimo, 2001).



### 6.2.1. *Propiedades de los desinfectantes*

Teniendo en cuenta la diversidad de microorganismos a eliminar y las distintas superficies donde deben actuar los desinfectantes, estos deben cumplir las siguientes propiedades para que su empleo sea eficaz y seguro (García, 1989; Wildbrett, 2000; Wirtanen y Salo, 2003):

1. No debe transmitir olores ni sabores extraños a los alimentos.
2. Baja toxicidad por inhalación o irritantes para la piel a la dosis de empleo.
3. No alterar las superficies a tratar (no corrosivo).
4. Amplia acción bactericida de efecto prolongado a las condiciones de uso (tiempo de contacto, temperatura, pH, grado de contaminación).
5. Estable frente a residuos orgánicos y aguas duras.
6. Solubles en agua garantizando su eliminación con el aclarado
7. No generar resistencia
8. Respetar el medio ambiente
9. Bajo coste

### 6.2.2. *Tipos de desinfectantes*

Existe una gran variedad de desinfectantes empleados en la industria de alimentos. Por lo general, estos productos pueden contener uno o varios principios activos. Además, contienen otras sustancias como álcalis, ácidos, inhibidores de la corrosión y formadores de complejos, que permiten mejorar sus propiedades de aplicación en la industria (Kiermeier y cols., 2000).

La **Tabla 2** muestra los diferentes mecanismos de acción de los principales desinfectantes aprobados para su uso en la industria alimentaria. Los productos comúnmente utilizados son los componentes que liberan cloro, los compuestos de yodo (yodóforos), los compuestos de amonio cuaternario (QACs), los alcoholes, los aldehídos, peroxígenos, los anfóteros, biguanidas, bisfenoles y metales pesados (Criquelion y cols., 2002; Lelieveld y cols., 2003; Stanfield, 2003; Wirtanen y Salo, 2003).

#### *a) Halógenos*

El cloro gaseoso, hipoclorito de sodio y los derivados clorados, en presencia de agua, producen ácido hipocloroso (HClO), que es el que les confiere la actividad desinfectante (Criquelion y cols., 2002; Leveau y Bouix, 2002) y es considerado el biocida más potente en mezcla acuosa (Johansson, 2007).

Poseen varios inconvenientes, como su riesgo de corrosión, sensibilidad a las materias orgánicas, inestabilidad ligada a la temperatura y al pH, con generación de compuestos perjudiciales para el medio ambiente (Criquelion y cols., 2002; Lelieveld y cols., 2003).

#### *b) Yodóforos*

En ellos se incluyen compuestos minerales (yoduro de potasio) y orgánicos (yodóforos). Son ampliamente utilizados para higienizar los equipos y superficies de procesamiento de alimentos (Monstert y cols., 2005). Su principal ventaja es su amplio espectro de actividad (bacterias, hongos y virus) y, como inconvenientes, se encuentran la coloración que produce sobre los materiales plásticos o sobre la piel, su inestabilidad ligada a la temperatura y su elevado coste.

**Tabla 2.** Principales tipos desinfectantes y su mecanismo de acción (Modificado de Denyer y Stewart, 1998; McDonnell y Russell, 1999; Wirtanen y Salo, 2003; Mostert, 2005).

Desinfectante	Objetivo	Modo de acción
Halógenos	ADN, proteínas, enzimas	Inhibición de la síntesis de ADN, oxidación de grupos tioles a disulfuros, sulfóxidos y disulfóxidos.
Yodóforos	Ácidos nucleicos, proteínas, membranas celulares	Altera las membranas celulares, precipita los ácidos nucleicos y actúa disminuyendo los requerimientos de oxígeno de microorganismos aerobios, posee poderosa actividad germicida.
QACs	Membrana citoplasmática	Daños generales en la membrana involucrando la bicapa fosfolipídica. En bajas concentraciones afecta la integridad de la membrana, a altas concentraciones causa coagulación del citoplasma. Inducción de fugas de aminoácidos.
Alcoholes	Membrana plasmática	Desnaturalización de proteínas.
Aldehídos	Pared celular y membrana celular	Entrecruzamiento de proteínas de la pared celular y la membrana externa.
Peroxígenos	Efectos sobre el ADN	Inhibición de síntesis de DNA por formación de radicales libres hidroxil (OH), los cuales oxidan los grupos tioles de enzimas y proteínas.
Derivados de Metales pesados	Interacción con grupos tiol	Enzimas vitales de membrana. Los iones de los metales actúan con los ácidos nucleicos. Ruptura de ADN.
Biguanidas	Membrana citoplasmática y plasmática	Interacción iónica con las membranas citoplasmática en bacterias y plasmática en levaduras.
Bisfenoles	Bicapa fosfolipídica	Interacción con las enzimas de la membrana citoplasmática, afectando la permeabilidad.
Anfóteros	Proteínas	Síntesis proteica con falsos aminoácidos.

El uso principal de estos compuestos es como antiséptico y sólo la forma yodófora es utilizada como desinfectante de superficies, ya que es más segura química y toxicológicamente (Criquelion y cols., 2002; Monstert y cols., 2005).

#### *c) Compuestos de amonio cuaternario*

Son principios activos de primer orden a nivel mundial, tanto en su uso como desinfectantes como antisépticos. Sus propiedades son aprovechadas en desinfección estática de materiales, desinfección de equipos, de superficies por pulverización y de tuberías (Criquelion y cols., 2002; Leveau y Bouix 2002). Dentro de sus ventajas cabe destacar su bajo riesgo de toxicidad, su estabilidad en amplios rangos de pH y temperatura y que no son corrosivos. Entre sus desventajas hay que destacar su alto poder espumante y su falta de acción contra virus (Criquelion y cols., 2002).

#### *d) Alcoholes*

Principalmente se utilizan el etanol y el isopropanol. Debido al elevado coste, poder disolvente y carácter volátil, son utilizados en pequeñas aplicaciones como en los puntos de difícil acceso de los equipos y limpieza rápida de superficies y balanzas (McDonnell y Russell, 1999; Monstert y cols., 2005). Tienen un amplio espectro de acción antimicrobiana contra células microbianas vegetativas, virus y hongos; pero no contra esporas bacterianas y su actividad fungicida es reducida (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002; Monstert y cols., 2005).

*e) Aldehídos*

Los más comúnmente utilizados son el formaldehído y el glutaraldehído. El formaldehído posee un espectro antimicrobiano bastante homogéneo solo a concentraciones elevadas. Presenta como ventajas que no es corrosivo, tiene una amplia actividad en desinfección por vía aérea, fácil de enjuagar y es económico. Como inconvenientes están su olor desagradable con poder lacrimógeno y los posibles riesgos tóxicos por inhalación (Criquelion y cols., 2002). Por otra parte el glutaraldehído es empleado en combinación con otros principios activos como el formaldehído y los amonios cuaternarios para la desinfección de tuberías, depósitos y equipos (Criquelion y cols., 2002; Leveau y Bouix., 2002).

*f) Peroxígenos*

El ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ozono son los principales agentes liberadores de oxígeno (agentes oxidantes), siendo el ácido peracético el de mayor eficiencia, en términos de actividad antimicrobiana. Se considera un desinfectante eficaz de amplio espectro (bacterias, hongos, virus y esporulados), no es espumante y se aclara fácilmente. Sus desventajas radican en la inestabilidad de la temperatura, sensibilidad a las materias orgánicas y sus vapores irritantes (Criquelion y cols., 2002). El peróxido de hidrógeno tiene actividad, particularmente frente a esporas. Es más activo sobre las bacterias Gram positivas que sobre las Gram negativas y aún más sobre bacterias anaerobias, no provistas de catalasa, que sobre bacterias aerobias (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002). El ozono posee un efecto sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, esporas bacterianas y fúngicas, pero su desventaja radica en su toxicidad, puesto que a concentraciones elevadas resulta

ser tóxico para los humanos, produciendo afecciones del tracto respiratorio (Guzel-Seydim y cols., 2004; Pascual y cols., 2007).

#### *g) Anfóteros*

Los anfóteros son conocidos por tener buenas propiedades detergentes y esterilizantes (Lelieveld y cols., 2003). Presentan actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, virus y esporas, a concentraciones de principio activo extremadamente débiles (Criquelion y cols., 2002; Lelieveld y cols., 2003). Como ventajas destacan la ausencia de olor, baja toxicidad y escasa sensibilidad a las materias orgánicas (Criquelion y cols., 2002).

#### *h) Biguanidas*

En este grupo podemos encontrar el clorhidrato de polihexametileno biguanida y la clorhexidina. El clorhidrato de polihexametileno biguanida, debido a su bajo espectro antimicrobiano, se asocia con otros principios activos y es empleado como desinfectante en general para la industria de alimentos, desinfección de circuitos de forma dinámica y más comúnmente en desinfección de piscinas (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002). La clorhexidina es una de las más empleadas como antiséptico, especialmente en el lavado de las manos. Presenta buena actividad frente a bacterias y levaduras, pero su eficacia se ve muy afectada por la presencia de materia orgánica (McDonnell y Russell, 1999; Monstert y cols., 2005).

#### *i) Bisfenol*

El triclosán y el hexaclorofenol son los más utilizados. El triclosán se aplica como capa antimicrobiana en material de embalaje y cintas

transportadoras (Mostert y cols., 2005). Se cree que su actividad se ejerce sobre la membrana citoplasmática, en una primera instancia, inhibiendo la toma de nutrientes esenciales, y luego produciendo la lisis y liberación de los componentes celulares (McDonnell y Russell, 1999). Los bisfenoles exhiben un amplio espectro, son activos contra bacterias, hongos, algas y esporoestáticos hacia esporas bacterianas; aunque tienen poca eficacia contra *Pseudomonas aeruginosa*. Son considerados desinfectantes de nivel intermedio (McDonnell y Russell, 1999; Johansson, 2007).

### ***6.3. Limpieza y desinfección de superficies duras***

La composición de los detergentes para el lavado de superficies duras difieren según las características de la superficie. Así, en presencia de residuos alimentarios, especialmente proteicos, las superficies en sistemas abiertos generalmente contienen detergentes espumantes en altas concentraciones y surfactantes orgánicos, como ingredientes principales (Lynn, 2009). En estos sistemas los desinfectantes son aplicados directamente al equipo, superficie o utensilio a desinfectar, durante un tiempo estipulado (Holah, 1995). En sistemas de limpieza cerrados, denominados "Cleaning In Place" (CIP), la eficacia se basa en que los residuos de tipo proteico generan espumas, que causan una disminución en la presión de lavado, y en la energía cinética de la aspersion o el flujo de agua. Para evitar este efecto, los detergentes tienen una composición, en su mayoría, inorgánica, los cuales están compuestos principalmente por coadyuvantes y tensioactivos con poder espumante limitado (Altmajer-Vaz 2004). En los sistemas CIP, los desinfectantes son distribuidos por gravedad o por bombas de flujo dentro de los equipos (Holah 1995). La **Tabla 3** muestra los criterios microbiológicos para el análisis de muestras ambientales, establecidos por el Servicio de Salud Pública de EE.UU.

y descritos por Little y Sagoo (2009), para determinar la calidad microbiológica de superficies en contacto con alimentos.

#### 6.4. Importancia del secado

El proceso de secado es de importancia crítica, ya que podría estar implicado en maximizar la reducción de las bacterias (Montville y cols., 2002). Después de las etapas de limpieza y desinfección es recomendable una buena ventilación y/o la aplicación de aire secante en las instalaciones de la industria, que permita el secado de equipos, líneas de procesado y superficies en general; para prevenir la proliferación de algún microorganismo viable remanente sobre las superficies (Wirtanen y Salo, 2003).

**Tabla 3.** Criterios microbiológicos para hisopados ambientales de superficies en contacto con alimentos (Little y Sagoo 2009).

Superficie	Microorganismo	Calidad microbiológica	
		Satisfactorio	Insatisfactorio
Hisopado de superficies de contacto higienizadas y listas para usar	Recuento de aerobios	<10 UFC cm <sup>2</sup> o hisopado	≥10 UFC cm <sup>2</sup> o hisopado ≥1
	Enterobacteriaceae	<1 UFC cm <sup>2</sup> o hisopado	UFC cm <sup>2</sup> o hisopado
	<i>E. coli</i>	No detectado	Detectado
Hisopado de superficies de contacto recién higienizadas y que están en uso	Recuento de aerobios	<10 <sup>3</sup> UFC cm <sup>2</sup> o hisopado	≥10 <sup>3</sup> UFC cm <sup>2</sup> o hisopado
	Enterobacteriaceae	<10 <sup>2</sup> UFC cm <sup>2</sup> o hisopado	≥10 <sup>2</sup> UFC cm <sup>2</sup> o hisopado
	<i>E. coli</i>	No detectado	Detectado

Varios estudios han demostrado que el secado de las superficies tiene un efecto bactericida, aunque la efectividad del proceso depende de la naturaleza del organismo y estado en que se encuentra, el tiempo de secado, condiciones de temperatura, suciedad y humedad (Hirai, 1991; Janning y cols., 1994; McEldowney y Fletcher, 1998). Aunque



se disminuya la proliferación de microorganismos, no obstante, algunas bacterias tolerantes y/o formadoras de esporas tienen la habilidad de permanecer en condiciones de sequedad durante un periodo de tiempo prolongado (Kusumaningrum y cols., 2003).

## **7. Adherencia bacteriana en la industria de alimentos**

Existen dos estados bacterianos que viven en medio ambientes naturales: el estado planctónico (flotan libremente) y sésil (adheridas). Existen varias teorías con respecto a la adhesión de los microorganismos. Mientras algunas se basan en las fuerzas de Lifshitz-Van der Waals, como también las fuerzas de atracción y repulsión; otras se inclinan por la teoría de la termodinámica, basada en la energía libre de adhesión, derivadas de las energías libres de superficie de la célula, y la superficie del sustrato. De otra parte, también se afirma que los apéndices de las superficies celulares o la excreción de adhesivos ayudan a la fijación, en mayor número, que las consideraciones estrictamente termodinámicas (Busscher y cols., 1997).

Los microorganismos tienden a adherirse a superficies vivas o inertes para colonizarlas, crecer y formar una matriz polimérica autoproducida, en la cual pueden confluír múltiples especies microbianas. A todo el conjunto se le denomina biofilm (Carpertier y Cerf, 1993). La capacidad para formar biofilms no parece restringirse a algunos grupos específicos de microorganismos y se considera, que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias pueden sobrevivir dentro de los biofilms (Donlan, 2002; Thomas y Nakaishi, 2006).

Los biofilms son necesarios para permitir a la bacteria persistir y resistir las condiciones adversas del medio, mientras que el modo de

crecimiento planctónico es importante para la propagación de bacterias. Los biofilms bacterianos infecciosos son particularmente problemáticos, debido a que las bacterias sésiles pueden soportar la respuesta inmune del hospedador y son drásticamente más resistentes a los antibióticos, biocidas y las fuerzas hidrodinámicas de cizallamiento que su contraparte, las células planctónicas (Glinel, 2012). La primera evidencia publicada sobre la existencia de un biofilm, fue la realizada por Duguid, Anderson y Campebell (1966), poniendo en evidencia la adhesión de *Salmonella* sobre superficies alimentarias. Desde entonces, se han publicado numerosos estudios que describen la habilidad de los microorganismos patógenos para formar biofilms, entre los que se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7 (Shi y Zhu, 2009).

### **7.1. Propiedades físico-químicas de las bacterias**

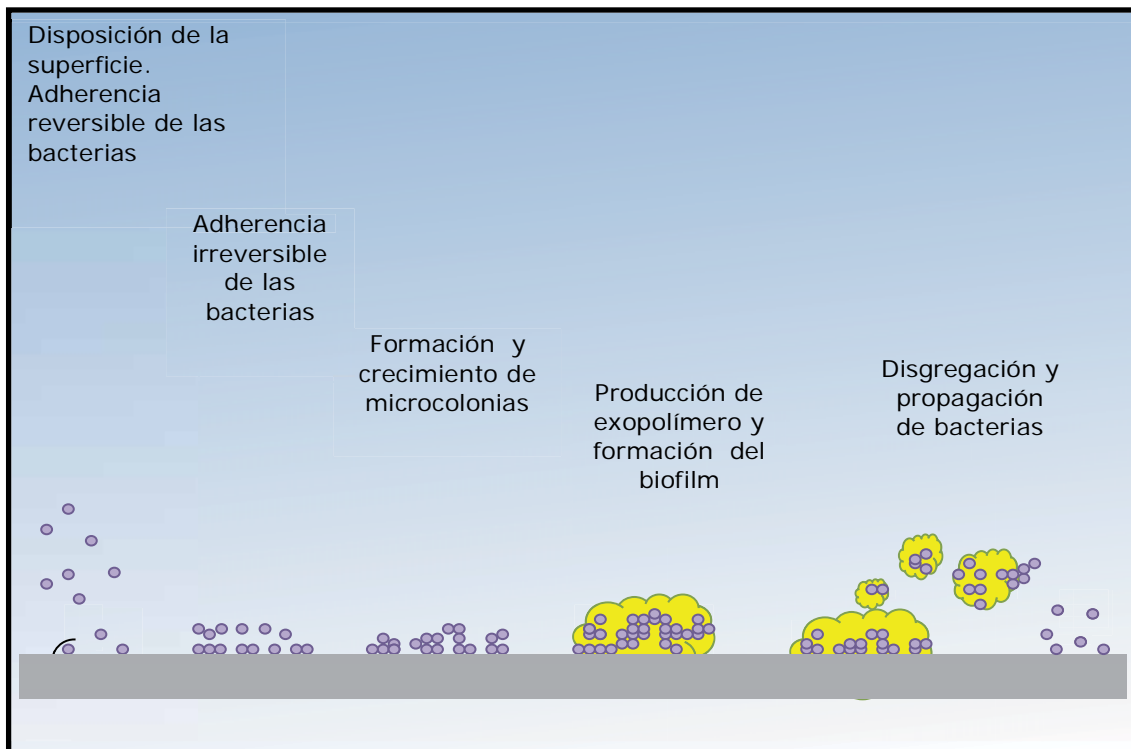
Las cargas negativas de las superficies bacterianas son contrarias a la adhesión bacteriana, debido a las fuerzas de repulsión electrostáticas. Estas mantienen a las células bacterianas a una corta distancia de la superficie. Sin embargo, la superficie de las células bacterianas poseen hidrofobicidad debido a las fimbrias, flagelos y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Por ello la importancia de los flagelos, para transportar las células a un sitio de fijación especial con la superficie, mientras que los pili y las fimbrias son importantes para la adhesión y colonización, probablemente porque ayudan a superar la barrera de repulsión electrostática (Shi y Zhu, 2009; Simões y cols., 2010). Las EPS confieren propiedades hidrofílicas a las células bacterianas y son un componente importante de la membrana externa bacteriana, la cual juega también un papel en la fijación inicial a la superficie (Shi y Zhu, 2009).

## 7.2. Formación del biofilm

El desarrollo de un biofilm puede ocurrir sobre casi todas las superficies y cualquier medio ambiente, en el que existan microorganismos viables presentes. En la mayoría de los casos, los microorganismos se adhieren a sustratos sólidos que pueden ser vivos o inanimados y/o a las formas inorgánica y orgánica, un requisito esencial para su supervivencia y reproducción normal (Kumar y Anand, 1998).

Algunos microorganismos patógenos pueden atacar, crecer y formar biofilms sobre superficies de alimentos, equipos y entornos alimentarios. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* forma biofilms en los drenajes de los suelos, tanques de almacenamiento, carretillas de mano, bandas transportadoras y otros materiales que están en contacto con los alimentos (Shi y Zhu, 2009). Así mismo, en la industria láctea y, en general, aquellas que trabajan con fluidos alimentarios, presentan un problema serio con respecto a la adhesión llamado "*biofouling*", que es la formación de depósitos (capa de células vivas y sus productos de descomposición) sobre una superficie de contacto con un medio líquido (Trachoo, 2003). La existencia de bacterias patógenas sobre los alimentos o superficies, que están en contacto con ellos, incrementa el riesgo de inseguridad alimentaria. Es por ello que el mecanismo de formación del biofilm, en las industrias alimentarias, se ha convertido en un punto importante en los últimos años (Shi y Zhu, 2009).

La formación del biofilm es un proceso dinámico y se muestra envuelto en varias etapas (**Figura 4**): Disposición de la superficie, adhesión celular, formación de microcolonias, producción de EPS y formación del biofilm, por último separación y dispersión del biofilm (Kumar y Anand, 1998).



**Figura 4.** Etapas de la formación de biofilms (Modificado Kumar y Anand, 1998).

### 7.2.1. Disposición de la superficie

En los entornos de procesamiento de alimentos, las bacterias, junto con otras moléculas orgánicas e inorgánicas, como por ejemplo las proteínas de la leche y de la carne, son adsorbidas por las superficies, formando un film, donde existe un incremento en el nivel de nutrientes remanentes sobre la superficie alimentaria haciéndola disponible a la adhesión bacteriana. Esta disposición también altera las propiedades físico-químicas de la superficie, energía libre de superficie, cambios en la hidrofobicidad y cargas electrostáticas, las cuales pueden también afectar la secuencia de eventos microbianos. A este respecto, la microtopografía de la superficie alimentaria es igualmente importante para favorecer la retención de bacterias, en particular, si la superficie se compone de canales profundos y hendiduras que atrapen las bacterias (Kumar y Anand, 1998). En cuanto a la adherencia de los microorganismos, actúan las fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas.

Durante este proceso los microorganismos se pueden eliminar de manera sencilla con una limpieza suave (Mittelman, 1998; Chmielewski y Frank, 2003).

#### *7.2.2. Fijación bacteriana a la superficie*

Esta etapa es dependiente del tiempo, en el que las bacterias se unen activamente a las superficies por medio de apéndices, como los flagelos, pili, adhesinas y cápsulas bacterianas. La alta energía libre y las superficies húmedas promueven la adhesión bacteriana, formando microcolonias de unión irreversible, donde las células ya no presentan movimiento browniano. A diferencia de la etapa de disposición de la superficie, el tiempo para que se produzca la adhesión celular depende de la especie bacteriana y los sustratos presentes en las superficies (Marshall, 1992; An y Friedman, 1998; Chmielewski y Frank, 2003).

#### *7.2.3. Formación de microcolonias*

Las células bacterianas fijadas de forma irreversible, crecen y se dividen utilizando los nutrientes presentes en la película de acondicionamiento y los fluidos circundantes del medioambiente. Este proceso lidera la formación de microcolonias, las cuales se ensanchan y se unen para formar películas de células cubriendo la superficie (Kumar y Anand, 1998).

#### *7.2.4. Producción de EPS y formación del biofilm*

En cuanto se forma la película de células sobre la superficie, se inicia la producción de EPS. La composición general de la EPS bacteriana comprende polisacáridos y proteínas; que representan del 75-89% de la composición y, en menor cantidad, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y sustancias húmicas (Simões y cols., 2010). Los EPS

ayudan al anclaje de las células a la superficie y estabiliza la colonia de las fluctuaciones del medioambiente (Characklis y Marshall, 1990). Algunos estudios han observado que los EPS proporcionan protección contra las condiciones adversas que pueden existir sobre los microorganismos del biofilm, mediante la concentración de nutrientes, previniendo el acceso de biocidas y la desecación, secuestrando metales y toxinas. Todo esto dificulta su movilización, requiriendo la aplicación de fuerzas como lavados, raspados sobre la superficie o la ruptura química de las fuerzas de fijación, a través de la aplicación de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfectantes y calor (Carpentier y Cerf, 1993; Sauer, 2003; Van Houdt y Michiels, 2010; Simões y cols., 2010).

La composición de los biofilms, puede consistir en monocultivos, de varias especies o una mezcla de fenotipos de una especie determinada, dependiendo los diferentes microorganismos colonizadores. Según sugieren algunos investigadores, los biofilms mixtos son más estables y resistentes a los productos químicos de limpieza, gracias a que poseen una estructura más compleja (Kumar y Anand, 1998; McDonnell y Russell 1999; Brooks y Flint, 2008).

#### *7.2.5. Separación y disgregación del biofilm*

Cuando los biofilms han alcanzado una estructura altamente organizada y se encuentran unas condiciones ambientales concretas, con la presencia de sustancias químicas en el medio circundante y alteraciones de las propiedades de los propios biofilms o del sustrato, las bacterias se desprenden de la matriz y entran en el flujo de corriente. El desprendimiento es un proceso discreto, por lo que ocurre una separación periódica de partículas relativamente grandes de biomasa (células y nutrientes). Posteriormente vuelve a comenzar el proceso de desarrollo del biofilm en un lugar diferente (Kumar y Anand, 1998; Simões y cols., 2010).

### 7.3. *Implicación de la formación de biofilm*

La formación de biofilms en medioambientes de procesos de alimentos es de especial importancia, ya que tienen la capacidad para actuar como fuentes persistentes de contaminación microbiana, que pueden conducir a la alteración del alimento y/o a la transmisión de enfermedades (Van Houdt y Michiels, 2010).

La formación de biofilms en los equipos industriales, por ejemplo en la industria láctea, pueden liderar serios problemas de higiene y pérdidas económicas, ya que los microorganismos en biofilm catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión en las tuberías y tanques de almacenamiento metálicos. Al mismo tiempo pueden reducir la eficacia de transferencia de calor y aumentar la resistencia en los fluidos (Vieira y cols., 1993; Blaschek y cols., 2007).

#### 7.3.1. *Estudio de biofilms sobre superficies de contacto alimentario*

Varios estudios han realizado su enfoque en la microestructura de los biofilms. Una de las técnicas más útiles es la microscopía de epifluorescencia, ya que permite observar el crecimiento sobre superficies, tales como plásticos, acero inoxidable o caucho (Trachoo, 2003). La aplicación de esta tecnología incluye la determinación de células viables, las células en biofilm, formación de microcolonias, morfología de las células, pH del biofilm y distribución química dentro del biofilm. Esta información es esencial para entender como algunos patógenos sobreviven a las condiciones de las plantas alimentarias y ha sido utilizada como soporte para desarrollar y mejorar los programas de diseño, intervención y prevención (Trachoo, 2003).

La aplicación de la microscopía de epifluorescencia fue utilizada por Wirtanen y cols., (1996), para determinar el área de cubrimiento de los biofilms formados por diferentes microorganismos (*Bacillus*

*subtillis*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus inopionatus*, *Pseudomonas fragi* y *Pediococcus inopinatus*) sobre muestras de acero inoxidable. Las muestras fueron lavadas y teñidas con naranja de acridina durante dos minutos para luego ser observadas al microscopio. En otro ensayo realizado por Rowe y cols., (1980) se empleó un sistema de imagen para la detección de células viables, no cultivables, de *campylobacter jejuni*. Su método de tinción vital estaba basado en la habilidad de las células viables para absorber el colorante no fluorescente. La hidrólisis de esta molécula intracelularmente hace que se transforme en fluorescente. Por tanto, sólo se verá la tinción en aquellas células viables y activas.

La microscopía láser de escaneo confocal (CSLM) tiene algunas ventajas sobre la microscopía de epifluorescencia. La CSLM es una versión mejorada del microscopio de epifluorescencia, que crea un plano de foco fino para obtener secciones ópticas o escaneo XZ. Estas secciones ópticas, a continuación, se agrupan en un software para generar una imagen reconstituida tridimensional (Palmer y Sternberg, 1999).

A nivel de materiales utilizados en el ambiente alimentario, existen algunos que poseen un efecto bacteriostático sobre algunos microorganismos patógenos, es el caso del caucho que actúa sobre *L. monocytogenes* (Trachoo, 2003). En la evaluación de la supervivencia de aerosoles de *Pseudomonas fluorescens* y *Enterococcus faecalis* sobre superficies inertes, se apreció que el tipo de material presentó un efecto significativo sobre la supervivencia de los microorganismos, obteniendo como resultados el siguiente orden, de mayor a menor, de acuerdo al crecimiento bacteriano: acero inoxidable, vidrio y PVC. El efecto letal del PVC se debe a su elevada reactividad, gracias a sus sitios oxidantes, la liberación de ácido clorhídrico y a la presencia de aditivos (Robine y cols., 2000).



#### **7.4. Factores que afectan la adhesión**

Existen diferentes factores que afectan el desarrollo y estructura del biofilm, dentro de los cuales se pueden mencionar los siguientes:

- Las propiedades de la superficie.
- La disponibilidad de nutrientes.
- La composición de la comunidad microbiana.
- La disponibilidad de agua.
- La interacción interespecífica.
- El transporte celular.
- La temperatura.

Todas estas características juegan un papel importante en el cambio fenotípico desde las células planctónicas a la forma sésil. Otros factores, como el uso de alcohol u otros agentes desinfectantes, así como la presencia de múltiples microorganismos pueden mejorar la adhesión y maduración del biofilm (Chmielewski y Frank, 2003; Garret y cols., 2008; Shi y Zhu, 2009; Van Houdt y Michiels, 2010).

#### **7.5. Prevención y erradicación de biofilm**

La fijación a las superficies es un proceso bastante rápido y por lo tanto, no es muy aplicable el limpiar y desinfectar continuamente para evitar la adhesión bacteriana. Sin embargo, debe determinarse cuidadosamente una frecuencia adecuada de desinfección para evitar la maduración del biofilm y la acumulación de materia orgánica absorbida, la cual puede influir en el nivel higiénico del material y la

disponibilidad de nutrientes. Las propiedades higiénicas de los materiales o superficies pueden verse alterados, por modificaciones específicas, para que sea intrínsecamente antibacteriano y/o menos susceptible a la fijación (Mettler y Carpentier, 1998). Es por ello que se han realizado estudios con capas de recubrimiento que disminuyen la fijación de ciertos microorganismos. Otra técnica es la incorporación de metales de transición catalíticos, dentro de superficies de polímero, promoviendo la formación de especies reactivas al oxígeno, como los peróxidos y los persulfatos. Estas soluciones se orientan, en particular, a las células más cercanas a la superficie. Un programa de control eficaz se basa, evidentemente, en los sistemas de detección adecuados para monitorizar la colonización bacteriana de las superficies y el control de los biofilms en estados tempranos del desarrollo (Simões y cols., 2010). Se han descrito varios métodos para alcanzar esos fines, como el recuento de microorganismos totales viables, diferentes técnicas de microscopía y espectroscopía, medidas de impedancia y determinación de ATP (Kumar y Anand, 1998; Wirtanen y cols., 2000; Verran y cols., 2002). Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas, y la combinación de los métodos garantizan una mayor eficiencia de detección (Van Houdt y Michiels., 2010).

El objetivo primario del proceso de limpieza es la eliminación de productos residuales. Indirectamente, la eliminación de estos residuos es también un primer punto crítico en el control de biofilms. La elección de los métodos adecuados para la rotura y eliminación, mecánica o química, de la matriz exopolisacárida es esencial para el éxito en el control del biofilm en la industria de alimentos, ya que la matriz protege los microorganismos contra los efectos de los detergentes y desinfectantes (Blenkinsopp y cols., 1992; Zottola y Sasahara, 1994). Sin embargo, una inapropiada estrategia de

limpieza podría llegar a liderar la formación de un biofilm e incrementar la biotransferencia potencial (Zottola y Sasahara, 1994). Los biofilms en la industria de alimentos pueden ser eliminados adoptando diferentes estrategias (Kumar y Anand, 1998).

Los métodos estándar de limpieza empleados en muchas industrias de procesamiento de alimentos, tales como limpieza álcali-base y ácido-base, son solamente adecuadas en la eliminación de la matriz del biofilm polimérico extracelular. Hay estudios que demuestran que algunos detergentes son bactericidas y algunos desinfectantes pueden despolimerizar las EPS, permitiendo así la separación del biofilm de la superficie (Holah y cols., 1990). Cuando se optimizan los parámetros del proceso de limpieza y desinfección, tales como la formulación apropiada, concentración, tiempo de contacto, temperatura y energía cinética de flujo, se mejora drásticamente el resultado final.

La eliminación de biofilms es facilitada, además, por la aplicación de fuerzas mecánicas sobre la superficie durante la limpieza (Wirtanen y cols., 1996). Otros tratamientos alternativos son los campos magnéticos, ultrasonidos y la radiación ionizante, esta última podría emplearse en los tratamientos de higienización sobre gran variedad de productos y superficies de contacto alimentario. La inactivación de plasma atmosférico hace uso de especies reactivas al oxígeno y generación de radicales libres, mediante las descargas incandescentes que inactivan los microorganismos (Wirtanen y cols., 1996; Kumar y Anand, 1998). Las enzimas también han demostrado efectividad, colaborando en la movilización de biofilms (Kumar y Anand, 1998).

## **8. Sistemas de detección para el control microbiológico e higiénico de superficies**

Los sistemas de detección para el control microbiológico de superficies son imprescindibles, para poder evaluar y determinar, si la población microbiana existente o residual se encuentra en un nivel aceptable y si se han destruido los microorganismos indeseados. Los resultados obtenidos se relacionarán con parámetros como la limpieza de la superficie o la calidad del producto alimenticio (Fung, 2002; Leveau y Bouix 2002).

### ***8.1. Métodos clásicos***

Dentro de los métodos clásicos se encuentran el hisopado, las placas de contacto y la extracción de microorganismos de fracciones de superficie; por medio de enjuagues con agitación (Lues and Van Tonder, 2007; Valentine y cols., 2008; Kasuga y cols., 2011). Estos métodos, aunque fiables y eficientes, requieren al menos de entre un par de días a una semana para obtener resultados, lo cual los hace poco apropiados como elemento de vigilancia rápida para el sistema APPCC (Marlony y cols., 2003b; Maukonen y cols., 2003). El manejo de sistemas de detección de microorganismos puede ser importante en la gestión de la seguridad alimentaria y, en cuanto al criterio de selección de los análisis y su aplicación, se debe tener en consideración su utilidad, limitaciones y ventajas (ICMSF, 2011).

#### ***8.1.2. Hisopos o esponjas***

Este método consiste en frotar la superficie con una esponja estéril o con un hisopo de algodón. Posteriormente se resuspenden en un medio adecuado de recuperación y cultivados en medios de

crecimiento adecuados (Lelieveld y cols., 2003). El método tiene como ventaja que es adaptable a gran variedad de superficies, posee una amplia disponibilidad y su coste es relativamente bajo (Mostert y cols., 2005). Por otro lado, sus desventajas radican en la incapacidad del hisopo para recuperar todos los microorganismos de la superficie con eficacia, ya sea porque se encuentren adheridos (biofilm) o por quedar retenidos en el propio hisopo, obteniendo resultados erróneos al disminuir el recuento total. Por estos motivos, existe gran variabilidad en los resultados y no suelen ser reproducibles (Holah y cols., 1988; Lelieveld y cols., 2003; Mostert y cols., 2005).

#### *8.1.3. Placas de contacto*

El método de la placa de contacto consiste en el empleo de una placa de agar estéril (por lo general una placa Rodac), el cual se hace contactar con la superficie a evaluar (Mostert y cols., 2005). Este método es fácil de utilizar pero sólo en superficies planas, lisas y con recuentos bajos, ya que no es posible hacer diluciones. También presenta factores limitantes como la adherencia de microorganismos a la superficie, las cuales no pueden ser desprendidas con facilidad (Mafu y cols., 1990).

#### *8.1.4. Extracción de microorganismos de fracciones de superficies*

Para extraer los microorganismos de una superficie y realizar el control microbiológico, es necesario tomar un fragmento de la superficie, colocarlo en una solución salina normal y agitarlo (con o sin perlas de vidrio o por sonicación) para desprender los microorganismos que se encuentren adheridos a la superficie (Christian y cols., 1983; Sattar y cols., 2001; Traoré y cols., 2002; Gerba y Kennedy, 2007; Christison y cols., 2007; Sivakumar y cols., 2010; Fijan y Šostar-Turk 2010). Estos tres métodos de extracción de

microorganismos de la superficie son equivalentes en la recuperación, pero la agitación con perlas de vidrio permite extraer completamente las bacterias cuando estas se encuentran dentro de un biofilm (Lindsay and Von Holy, 1997).

## **8.2. Métodos rápidos**

La necesidad de reducir tiempos de detección de los microorganismos ha llevado al desarrollo de nuevos métodos que permiten, con la misma fiabilidad, reproducibilidad y repetitividad que los ensayos clásicos, la certificación de la calidad de productos alimentarios (Holah y cols., 1998). Estos métodos deben ser robustos y fiables, con una especificidad que minimice los resultados falsos-positivos (Keith, 1997) y que sirvan como base para tomar medidas correctoras oportunas en el menor tiempo posible (Boer y Beumer, 1999).

Estos métodos incluyen, entre otros, ensayos basados en anticuerpos, en amplificación genética, en detección de Adenosina Trifosfato (ATP) y técnicas microscópicas (Teufel y Redl, 2006; Nugen y Baeumner, 2008).

### **8.2.5. Microscopía de epifluorescencia directa**

La DEM, se ha convertido en la técnica de microscopía ideal para examinar la adhesión celular y formación de biofilms en superficies alimentarias, porque permite la detección selectiva y específica de moléculas en concentraciones pequeñas (Pontefract, 1991; Yuste, 2005), donde los objetos de interés fluorescen y permiten marcar virtualmente cualquier aspecto de los sistemas biológicos (Lichtman y Conchello, 2005).

La fluorescencia es una característica que exhiben algunos átomos o moléculas denominadas fluoróforos, que tienen la capacidad de adsorber la luz de una determinada longitud de onda y emitirla a una longitud de onda más fuerte (Herman, 1998; Petty, 2007). El fluoróforo es promovido a un estado de energía alta (estado excitado) seguido por la emisión de luz, de una longitud de onda más larga, conocida como fluorescencia (Petty, 2007). Esta fluorescencia ocurre cuando el electrón excitado regresa a una órbita de baja energía y emite un fotón de luz, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro (Takeuchi y Frank, 2001; Mostert y cols., 2005).

Para la cuantificación de células viables y no viables se utilizan sistemas de recuento automáticos, basados en programas informáticos que analizan las imágenes obtenidas. Mediante el tratamiento de una serie de parámetros se puede obtener información en poco tiempo (Maukonen y cols., 2003). Las imágenes analizadas se pueden almacenar en un soporte informático para ser reevaluadas o interpretadas desde otros puntos de vista, incluso por otros laboratorios (Rodrigues y cols., 2001).

#### *8.2.5.1. Microscopios de fluorescencia*

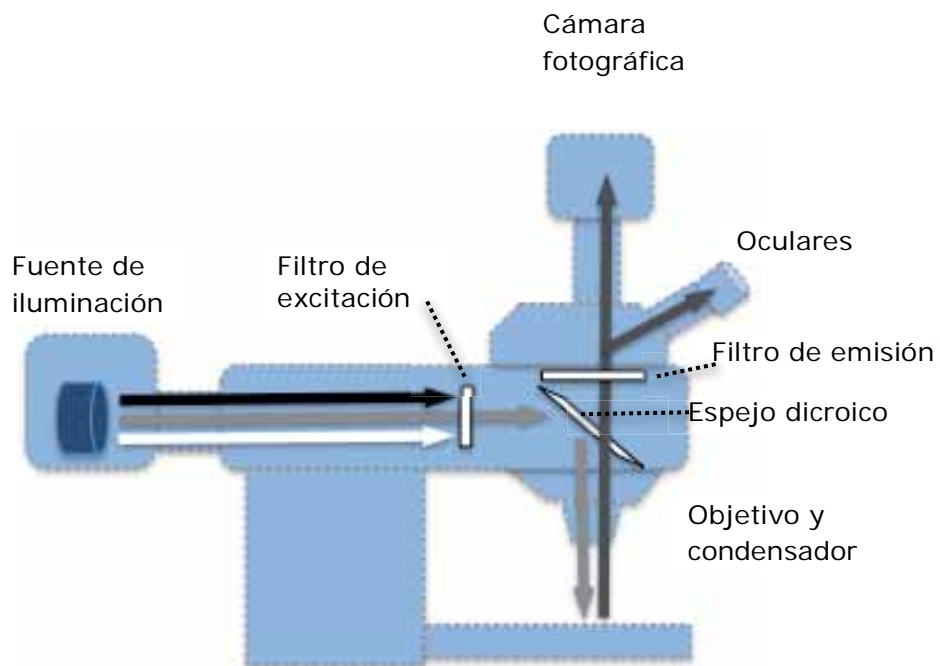
Los microscopios de fluorescencia, dependiendo de la luz incidente, se clasifican en dos grupos: en microscopios de fluorescencia de transmisión de luz y los de fluorescencia de luz incidente o epi-iluminación. Los microscopios de fluorescencia de transmisión de luz requieren una alineación cuidadosa del condensador de luz y de las lentes de los objetivos; para evitar interferencias entre la luz de excitación y la fluorescencia emitida, mientras que en el microscopio de luz incidente, el condensador es también el objetivo; por lo tanto

sólo existe una trayectoria óptica al detector y la alineación es perfecta (Takeuchi y Frank, 2001).

Dentro de los elementos principales del microscopio de epifluorescencia encontramos:

- i) *filtro de excitación*, su función es seleccionar la luz de la longitud de onda incidente.
- ii) *espejo dicroico*, tiene la propiedad de reflejar la luz de ciertas longitudes de onda y dejar el paso de otras.
- iii) *filtro de emisión*, es el filtro que selecciona la luz de la longitud de onda fluorescente.

Las posibles fuentes de luz corresponden a lámparas halogenadas de tungsteno, mercurio de alta presión, xenón, combinación de lámpara o láser de mercurio y xenón, capaces de emitir la energía de la excitación en diversas longitudes de onda (Herman, 1998) **(Figura 5)**.



**Figura 5.** Funcionamiento del microscopio de epifluorescencia.



#### *8.2.5.2. Tinciones fluorescentes empleadas para evaluar la actividad de los microorganismos*

Las principales ventajas de las tinciones de vitalidad son: sensibilidad, resolución inmediata y la posibilidad de analizar las células individualmente con el programa informático adecuado.

En la **Tabla 4** se resumen las características de los fluoróforos empleados para evaluar la actividad celular o viabilidad de los microorganismos.

#### *8.2.6. Sistema automatizado TEMPO*

Los métodos tradicionales empleados para conocer la cantidad de microorganismos en una muestra suelen resultar complejos, ya que involucran la lectura manual y subjetiva de colonias presentes en las placas. Tales análisis son indispensables ya que reflejan la calidad del producto.

La Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) otorgó el certificado de acreditación del sistema TEMPO, en el año 2013, para la enumeración de la biota aerobia mesófila, teniendo en cuenta como referencia de validación la Norma EN ISO 16140 (octubre 2003): microbiología de los alimentos - Protocolo para la validación de métodos alternativos; y como método de referencia la Norma EN ISO 4833: Directrices generales para la enumeración de microorganismos – método por el recuento de las colonias obtenidas a 30°C.

El sistema TEMPO se utiliza para el recuento directo de indicadores de calidad en productos alimenticios y está basado en el fundamento tradicional del recuento estadístico por la técnica del Número Más Probable (NMP).

**Tabla 4.** Criterios y fluoróforos utilizados para evaluar la viabilidad de los microorganismos (modificado de Montañez, 2013).

<b>Criterio</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Característica</b>
<b>Permeabilidad de la membrana</b>	PO-PRO-3	Se une al ADN intracelular de las células con membrana lesionada, es decir permeables (Vodyacova y cols., 1994)
	SYBR green	Se utiliza en combinación con yoduro de propidio para medir la permeabilidad de membrana plasmática (Berney y cols., 2007)
	SYTO 9	Se une al ADN de todas las células con membrana citoplasmática intacta y lesionada (Baena-Ruano y cols., 2006) . Atraviesa la membrana plasmática intacta debido a su bajo peso molecular. Se utiliza en combinación con yoduro de propidio (Sachidanandham y cols., 2005)
	SYTOX Green	Se une al ADN, ingresa en los organismos con membrana plasmática lesionada (Breeuwer y Abee, 2000; Sulley y Lloyd,1999; Créach y cols., 2003)
	Yoduro de propidio	Penetra sólo células con membrana lesionada (Baena-Ruano y cols., 2006) No pasa a través de la membrana plasmática intacta debido a su gran peso molecular (Sachidanandham y cols., 2005)
<b>Respiración celular</b>	Cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC)	Produce un precipitado rojo fluorescente cuando es reducido por el sistema transportador de electrones de las células bacterianas (Créach y cols., 2003)
<b>Membranas intactas y actividad esterasa</b>	Diacetato de fluoresceína/Bromuro de etidio (EB)	El diacetato de fluoresceína es absorbido por las células y escindido por enzimas intracelulares para dar el producto fluorescente fluoresceína (verde) (Breeuwer y Abee., 2000). Las células muertas no metabolizan FDA y son permeables al contraste EB (naranja)(Hannig y cols., 2007)
<b>Potencial de membrana</b>	DiBAC <sub>4</sub>	Ingresa en microorganismos con membrana plasmática lesionada. Por tanto mide la despolarización de la membrana (Suller y Lloyd, 1999)
	Oxonol	Su acumulación dentro de la célula es favorecida por la reducción en el potencial de membrana (Joux y Lebaron, 2000). Por tanto, mide la despolarización de la membrana (López-Amoros y cols., 1995)
	Rodamina y cianinas	Las células con potencial de membrana (interior con carga negativa) acumulan rodamina y cianina (Breeuwer y Abee, 2000)
<b>pH intracelular</b>	Fluoresceína, BCECF, piranina y cianinas	Mide el pH intracelular de las células (Breeuwer y Abee, 2000). Las células viables mantienen el pH interno y no son afectadas por el pH externo, mientras que las lesionadas varían su pH interno (McFeters y cols., 1995)
<b>Recuento Total</b>	4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)	Tinción de contraste. Tiñe el ADN de todas las células (azul) (Boulos y cols., 1999). Pasa a través de la membrana celular de microorganismos viables o muertos (McFeters y cols., 1995)
	Naranja de acrinidina	Se une al ADN y ARN (Whitehead y cols., 2009). Las bacterias teñidas de verde son consideradas inactivas, mientras que las teñidas de rojo o naranja, se consideran activas (McFeters y cols., 1995)

Al ser automatizado asegura resultados rápidos, estandarizados y exactos, al igual que minimiza el factor de variabilidad del operario, incrementa la uniformidad de resultados y asegura una trazabilidad completa.

El sistema TEMPO está compuesto de viales, tarjetas, TEMPO filler y dos estaciones de trabajo: una estación de preparación (TEMPO Prep) y una estación de lectura (TEMPO Reader) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Estaciones del sistema TEMPO.

*a) Viales TEMPO:*

Cada vial contiene un medio de cultivo específico el cual permite el crecimiento bacteriano. El medio está compuesto con un indicador fluorescente basado en la fórmula tradicional de los medios de cultivo.

*b) Tarjetas TEMPO:*

Las tarjetas ofrecen la precisión del método de recuento del número más probable (NMP), empleando 16 tubos en los que se deposita la muestra para ser evaluada. Cada celda corresponde a un tubo de dilución y el tamaño de cada celda corresponde de 1 a 3 niveles de dilución.

c) *TEMPO Filler:*

Una vez diluida y homogenizada la muestra en el medio de cultivo, se pasa al llenador de tarjetas TEMPO Filler, donde se distribuirá la totalidad de la mezcla en cada uno de los pocillos de las tarjetas y se sellarán para evitar ser contaminados.

d) *Estación TEMPO Prep:*

Se codifican cada una de las muestras y se les asigna su tarjeta de siembra correspondiente para luego llevar a incubación teniendo en cuenta la temperatura y el tiempo estipulado para así permitir el desarrollo óptimo de los microorganismos y que se lleve a cabo el metabolismo de los medios de cultivo.

e) *Estación TEMPO Reader:*

Después de transcurrido el tiempo de incubación se llevan las tarjetas a la estación TEMPO Reader para hacer la lectura. Con un microcontrolador conectado a un circuito de detección óptica, se efectúa la lectura de acuerdo al número y tamaño de los pocillos positivos (fluorescentes). El sistema TEMPO transforma estas lecturas empleado métodos estadísticos para calcular la concentración de microorganismos presentes en la muestra inicial o NMP. Un modelo matemático definido es luego aplicado para obtener el resultado final estimado, así se lleva a cabo la interpretación y obtención de resultados en las unidades específicas deseadas.

## 9. Resistencia bacteriana

La resistencia a cualquier agente antimicrobiano es un proceso continuo que puede proceder de mutaciones espontáneas o transmisión de genes resistentes aportados por otras bacterias. Aunque la mutación bacteriana ocurre en forma natural y bajo varias condiciones medioambientales, la mutación puede incrementar su frecuencia bajo condiciones de estrés y bajo concentraciones subinhibitorias de antibiótico. Últimamente, la presencia de antimicrobianos en el medio ambiente dará lugar a la selección de bacterias mutantes más resistentes que poseen una modificación ventajosa frente a la acción de antibióticos (Lagaron y cols., 2012). Tal vez uno de los acontecimientos más graves y destacados de la resistencia adquirida a los antibióticos apareció con *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA). Los brotes de MRSA se han propagado globalmente desde pacientes hospitalizados inmunocomprometidos, hacia varios sectores de la comunidad, amenazando incluso a individuos de bajo riesgo (Hawkey y Jones, 2009).

La naturaleza de la resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida, por mutación o adquisición de plásmidos o transposones. La resistencia intrínseca es demostrable en las bacterias Gram negativas, esporas bacterianas, micobacterias y estafilococos (bajo ciertas condiciones). La resistencia adquirida y mediada por plásmidos, esta más ampliamente asociada con compuestos de mercurio y otras sales metálicas (McDonnell y Russell, 1999). La Transferencia de plásmidos dentro del biofilm puede ocurrir, en un alto grado, debido a la proximidad tan marcada existente entre células. Esta transferencia es beneficiosa para las células ya que el intercambio de DNA puede conllevar la realización de funciones útiles que mejoren su supervivencia (Van Houdt y Michiels, 2010).

### 9.1. Mecanismos de resistencia bacteriana intrínsecos

Los mecanismos de resistencia intrínsecos son una propiedad natural, de una célula bacteriana cromosómicamente controlada, lo que le permite evadir la acción de los agentes antimicrobianos (**Tabla 5**).

Para que un agente antimicrobiano actúe, la capa externa de la célula debe ser superada. La naturaleza y composición de estas capas dependen del tipo de microorganismo y si actúan como una barrera permeable, lo cual puede disminuir su consumo. Alternativamente, la síntesis de enzimas puede producir cierta degradación del agente antimicrobiano (McDonnell y Russell, 1999).

**Tabla 5.** Mecanismos de resistencia intrínseca en bacterias hacia los antisépticos y desinfectantes (McDonnell y Russell, 1999).

Tipo de resistencia	Agente biocida	Mecanismo de resistencia
Impermeabilidad		
bacteria Gram-negativa	QACs, triclosán, diaminas	Presenta una barrera por su membrana externa que puede impedir la adsorción del agente biocida; el glicocalis puede estar involucrado
mycobacteria	Clorhexidina, QACs, glutaraldehído	La pared celular cerosa impide la adecuada entrada del biocida
esporas bacterianas	Clorhexidina, QACs, fenólicos	La capa de la espora y la corteza presenta una barrera para la entrada de los biocidas
bacterias Gram-positivas	Clorhexidina	El glicocalis y los mucoexopolisacáridos pueden estar asociados con la reducción de la difusión del antiséptico
Inactivación	Clorhexidina	La distribución de la molécula de clorhexidina puede ser la causante de la resistencia

Aunque se han postulado muchos mecanismos para explicar la reducción de la susceptibilidad de los organismos sésiles a los

antimicrobianos, cada vez es más evidente, que la resistencia del biofilm es multifactorial.

Los mecanismos de protección del biofilm parecen ser distintos de aquellos que son responsables de resistencia a los antibióticos convencionales. (Glinel y cols., 2012). En primer lugar, la matriz EPS retrasa o impide la acción de los antimicrobianos, ya sea por la limitación de la difusión o por la interacción química con las proteínas y los polisacáridos extracelulares (Simões y cols., 2010). Por otra parte, las células que se encuentran, especialmente en lo profundo del biofilm, exhiben una disminución en la tasa de crecimiento debido a los gradientes de oxígeno y nutrientes (Brown y cols., 1988). Esto resulta en un estado casi inactivo (hibernación) que a su vez se convierte en un aumento de resistencia hacia los biocidas (Gilbert y cols., 1990; Evans y cols., 1991; Van Houdt, 2010). Por ello, cuando las células se desprenden del biofilm ya no presentan la misma resistencia y rápidamente son susceptibles a los antimicrobianos (McDonnell y Russell 1999; Blaschek y cols., 2007).

Otro posible mecanismo de resistencia a los biocidas se basa en que algunas de las células del biofilm son capaces de sentir los cambios generados por el biocida y desarrollar activamente la respuesta de protección al estrés más efectivamente que las células platónicas (Van Houdt y Michiels, 2010).

Todos estos mecanismos de resistencia, que plantean los biofilms, hacen que su eliminación, dentro de las plantas de procesamiento de alimentos se convierta en un desafío (Brooks y Flint, 2008). Así, considerando la alta resistencia de los microorganismos en biofilm hacia los inhibidores, se hace necesario aumentar la concentración de desinfectantes, lo que conlleva a producir daños importantes al medioambiente y a considerar el concepto de la multi-resistencia. En este contexto la prevención de la formación de un biofilm es

claramente preferible a un tratamiento estratégico de eliminación (Glinel y cols., 2012). Por ello, ha de determinarse una adecuada frecuencia de desinfección; para evitar la maduración del biofilm y la acumulación de materia orgánica (residuos del producto), que pueden influir en las condiciones de higiene de los materiales y en la disponibilidad de nutrientes (Van Houdt y Michiels, 2010).

## **10. Nuevos enfoques para reducir la carga microbiana en las superficies.**

Una cantidad significativa de estudios se han dirigido hacia la ingeniería, química o enzimática, de superficies en contacto con alimentos y/o de alto riesgo, desarrollando materiales antimicrobianos para prevenir o inhibir el crecimiento, proliferación y formación de biofilms de microorganismos patógenos transmisibles, tanto en situaciones cotidianas como industriales (Shi y cols., 2004; Adamopoulos y cols., 2007; Cao y cols., 2009).

Por ello, se utilizan diferentes agentes antimicrobianos en gran variedad de superficies; tales como dispositivos médicos, equipos de hospitales, equipos dentales, purificación de agua, procesado, almacenamiento y transporte de alimentos, así como en una amplia gama de materiales relacionados con la industria en general, el medioambiente, la higiene y algunas aplicaciones bioprotectoras (Cao y cols., 2009). Es el caso de los materiales de construcción y materiales terminados, en los cuales es necesario la adición de componentes químicos bioactivos, capaces de prevenir el crecimiento de mohos en los sistemas de ventilación, para mantener la calidad del aire interior y evitar posibles efectos adversos para la salud (Cowan y cols., 2002).



### **10.1. Agentes antimicrobianos**

Con el número creciente de enfermedades infecciosas causadas por diferentes bacterias patógenas y su mayor resistencia hacia los diferentes tipos de antibióticos, hay estudios que se han orientado hacia la búsqueda de nuevos y más efectivos agentes antibacterianos (Bryaskova y cols., 2010). La aplicación de polímeros antimicrobianos minimizan los problemas medio ambientales, que acompañan los agentes convencionales, y mejoran la eficiencia, selectividad y vida útil de tales agentes (Cen y cols., 2003).

Los biocidas son agentes antimicrobianos que poseen efectos, tanto bactericidas como bacteriostáticos. Estos son utilizados en gran variedad de plásticos y materiales poliméricos, ya sea depositando una capa protectora bactericida (basados en la inmovilización o liberación de sustancias) (Glinel y cols., 2012) como dentro de la misma matriz polimérica (Nichols, 2005; Cao y cols., 2009).

El convertir los polímeros inherentemente en antimicrobianos puede ayudar a mantener la baja población microbiana presente, reduciendo así el riesgo de contaminación cruzada y la posibilidad de transmisión de infecciones. Esto significa que los productos antimicrobianos pueden ofrecer una elevada fiabilidad en medioambientes como hospitales, industrias de alimentos y consumidores de productos alimenticios. El uso de estos aditivos debería ser considerado a partir de un enfoque de calidad total (Jones, 2009).

Alternativamente, los materiales pueden ser impregnados con agentes antimicrobianos, como antibióticos, compuestos de amonio cuaternario, iones de plata o yodo, que se liberan gradualmente a través del tiempo en la solución que la rodea, con el objetivo de eliminar los microorganismos (Tiller y cols., 2001). En las últimas décadas han sido aplicados los biocidas de bajo peso molecular, tales como el clorhidrato de fenol, derivados de isotiazolona, que liberan

cloro *N*-halaminas, así como las sales y complejos de metales (normalmente Zn, Ag y Cu) (Malachová y cols., 2011). De los óxidos metálicos el TiO<sub>2</sub>, ZnO, MgO y CaO son de particular interés, ya que son estables bajo condiciones de proceso difíciles (pH extremos, elevadas o bajas temperaturas, altas concentraciones de solutos, etc.) (Zhang, 2007). En muchos de estos casos es posible sustituir una sustancia de bajo peso molecular por agentes antimicrobianos macromoleculares (Seyfriedsberger y cols., 2006).

La adición de componentes químicos bioactivos, en los polímeros, se emplean tradicionalmente para prevenir la degradación de plásticos, como decoloraciones, picaduras, manchas y, más recientemente, para impartir un efecto externo antimicrobiano o higiénico. Esto lo logran con la muerte o prevención de la proliferación microbiana que puede, de otra manera, consumir nutrientes del polímero o adaptarse y crecer sobre la superficie (Nichols, 2005; Eversdijk y cols., 2011).

Un amplio rango de estos productos antimicrobianos ya se está comercializando, incluso en aplicaciones domésticas como utensilios de cocina, tubos, filtros de aire, contenedores y papeleras; así como en las áreas de los alimentos envasados y la medicina, al añadirse a los mismos, en guantes, catéteres y vendajes para quemados, entre otros (D´Arcy, 2001).

Existe un amplio rango de biocidas (también conocidos como bioestabilizadores) disponibles dentro de los cuales tenemos los siguientes (Anónimo 2002):

- 10,10'-oxybisfenoxarsina (OBPA)
- Triclorohidroxidifeniléter (Triclosán)
- N-octil-isotiazolinona (OIT)
- Mercaptopiridina-n-óxido (pyrithione)
- Butil-benzisotiazolinona (butil-BIT)

- Biocidas basados en metales, incluyendo polímeros antimicrobianos inherentes e ingredientes fotocatalíticos, los cuales cuando son expuestos a la luz generan radicales libres.

Generalmente existen dos tipos de agentes antibacterianos, los orgánicos y los inorgánicos. Los agentes antibacterianos orgánicos están representados por antibióticos y compuestos orgánicos complejos y los inorgánicos se agrupan en sales o iones metálicos (Liu y cols., 2007).

#### 10.1.1. *Sistemas orgánicos*

Dentro de los biocidas orgánicos tenemos, entre otros, los siguientes: los péptidos antimicrobianos, revestimiento basado en la contra-autoinducción molecular, revestimiento con base en aceites esenciales y revestimientos basados en enzimas bacteriolíticas (Jones, 2009). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son secretados por numerosos organismos vivos (microorganismos, vegetales, insectos, peces, anfibios y mamíferos) para su propia protección contra microorganismos invasivos. Estos péptidos impermeabilizan las membranas y pueden actuar específicamente contra microorganismos patógenos (Glinel y cols., 2012). Para ello, se ha evaluado la técnica de aplicación capa por capa, para inmovilizar AMPs sobre superficies de materiales. Dicha técnica se basa en la alternancia de adsorción de policationes y polianiones sobre un sustrato sólido. Experimentalmente, las moléculas peptídicas son directamente embebidas dentro de las capas de polielectrolito. En un trabajo realizado por Etienne y cols., (2004), se describió cómo incorporar defensinas, de mosquitos *anopheles*, dentro de polielectrolitos multicapa. Las defensinas corresponden a péptidos

antimicrobianos, promotores de la inmunidad innata, y son producidas fundamentalmente por leucocitos y células epiteliales. Estos autores detectaron una inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* del 98%, cuando se insertaron en la superficie 10 capas de péptidos antimicrobianos dentro de la estructura del film. También se ha propuesto que los péptidos antimicrobianos logran su efecto bactericida de diferentes maneras, pero todos los datos indican que actúan predominantemente mediante la interrupción de la integridad de las membranas celulares a través de la interacción con el componente fosfolípido (Glinel y cols., 2012).

Existen sistemas de base orgánica, donde se incluyen las moléculas de clase organometálica las cuales fundamentan su actividad en la migración de pequeñas moléculas desde la matriz polimérica hacia la superficie donde se forma una película que induce a un efecto antimicrobiano del polímero. La migración, desde el depósito del biocida, ocurre como resultado del movimiento de las moléculas a un gradiente de baja concentración fuera del plástico, este fenómeno es impulsado por las diferencias inherentes de compatibilidad entre los antimicrobianos orgánicos y los sustratos poliméricos en los cuales se dispersan (Jones, 2009). El film resultante en la superficie del polímero es rellenado por nuevo aditivo, que solo difundirá cuando se limpia o lava la superficie o cuando el aditivo se pierde en el medioambiente. El beneficio de este modo de acción es que puede tener una elevada tasa de actividad e interactuar con gran número de bacterias rápidamente. Sin embargo, este afecta la vida útil de la actividad, al ser lixiviado con el tiempo e ir vaciando el aditivo de depósito (D´Arcy, 2001).

Una de las limitaciones de las tecnologías orgánicas incluye la falta de aprobación para contacto con alimentos, debido principalmente a la movilidad y la solubilidad de estos aditivos en simulantes alimenticios. Por lo tanto a la hora de elegir un sistema en contacto

directo con alimentos, la tecnología de base inorgánica es la más aceptada (Jones, 2009).

Otra consideración con los sistemas orgánicos es el efecto de la temperatura durante el proceso, ya que puede influir en la tasa de migración y la longevidad del sistema activo. Los productos de PVC representan buenos ejemplos dónde los sistemas orgánicos son empleados con éxito, para proteger contra la degradación microbiana. Existe un amplio rango de biocidas orgánicos en el mercado, pero solamente unos pocos tienen la estabilidad térmica requerida para soportar el riguroso proceso del plástico. Los grupos más comunes de antimicrobianos organometálicos utilizados actualmente son los basados en isotiazolinona (OIT), tricloro-hidroxi difenil éter, piritionato de zinc y los materiales basados en arsénico, tales como oxybisfenoxarsina (OBPA) (D´Arcy, 2001; Jones, 2009). No obstante, el uso de la OBPA fue restringido en el año 2009, debido al deterioro del medioambiente y la percepción del mercado con respecto a su perfil de toxicidad a largo plazo (Jones, 2009).

#### *10.1.2. Sistemas inorgánicos*

Los biocidas inorgánicos utilizan iones de metales como su agente biocida activo y una vez incorporado en la matriz del polímero, este se mantiene almacenado dentro del polímero, por lo que se pretende una liberación gradual hacia la superficie, proporcionando una actividad antimicrobiana continua y duradera (D´Arcy, 2001). Los metales y óxidos metálicos han atraído mucho la atención en las últimas décadas, debido a su habilidad para soportar condiciones de proceso. Los iones de metales más comúnmente empleados son los de plata, otros incluyen cobre y zinc, de los óxidos metálicos el  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{MgO}$  y  $\text{CaO}$  son de particular interés, ya que se consideran

generalmente como materiales seguros de baja toxicidad (Zhang y cols., 2007, Jones 2009). Los iones metálicos permanecen almacenados dentro del polímero y están continuamente disponibles a lo largo de la vida útil del producto terminado. Mientras exista migración de iones, estos sistemas de liberación aseguran una reposición constante en la superficie (Jones, 2009). Los sistemas inorgánicos tienden a ser más termoestables que los orgánicos, aunque algunos se ven afectados por la decoloración. Sin embargo, esta propiedad de termoestabilidad abre un amplio rango de usos en polímeros que pueden beneficiarse con estos aditivos (D´Arcy, 2001; Jones 2009). Una de las variaciones en el tema de sistemas inorgánicos basados en iones metálicos son las nanopartículas. Estas han sido desarrolladas principalmente para explorar la posibilidad de poder ofrecer una liberación rápida de iones, como consecuencia de una mayor proporción de radio de partícula (Cheng y cols., 2007). Obviamente el ingrediente activo, el ion metálico, se mantiene igual, pero junto con esto existen problemas adversos, tales como la toxicidad no cuantificada, decoloración excesiva resultante de la oxidación rápida y el aumento de las complejidades de producción en los grados activos de la escala nanométrica (Jones, 2009).

### ***10.2. Nanotecnología de los biocidas***

El campo de la nanotecnología es una de las áreas más populares para la investigación y en desarrollo actuales, en básicamente todas las disciplinas técnicas (Paul y Robeson, 2008). La aparición, en las últimas décadas, de la nanociencia y la nanotecnología presenta oportunidades para la exploración del efecto bactericida de las nanopartículas de metales (Ruparelia, 2008). La nanobiotecnología ha emergido de la integración de la nanotecnología y la biotecnología, para desarrollar tecnología biosintética y compatible con el medio

ambiente (Rai y cols., 2009). El efecto bactericida de las nanopartículas de metales ha sido atribuido a su pequeño tamaño y su gran superficie en relación al volumen, lo cual les permite interactuar de cerca con las membranas celulares (Ruparelia, 2008). Diversos estudios realizados por Xu y Xie (2003), así como Zhang y cols. (2007,2010), han señalado la importancia del tamaño de partícula, ya que en aquellas de tamaño más pequeño se refuerza su actividad antibacteriana.

Aunque poco se ha descrito sobre las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de cobre, estos muestran que dichas nanopartículas poseen un prometedor significado como agente bactericida, especialmente en los ámbitos hospitalarios y clínicos. Sin embargo, otras nanopartículas como el platino, oro, níquel, hierro, sílice y sus óxidos no han mostrado efectos bactericidas en estudios con *E. coli* (Ruparelia, 2008).

#### *10.2.1. Nanocompuestos o nanomateriales*

La ciencia y tecnología de los polímeros está inmersa en la nanotecnología, incluso en este campo las investigaciones abarcan una amplia gama de temas. Esto incluiría los polímeros basados en biomateriales, nanopartículas que liberan medicamentos, partículas en mini-emulsión, películas poliméricas ensambladas capa a capa, nanofibras o la mezcla de polímeros y nanocompuestos. Dentro del campo de los nanocompuestos existen diversos temas de trabajo actual, incluyendo compuestos reforzados, propiedades de barrera, resistencia a la llama, propiedades electro-ópticas, aplicaciones cosméticas y propiedades bactericidas, entre otras (Paul y Robeson, 2008).

Los nanocompuestos poliméricos son materiales funcionalmente avanzados, conformados por nanopartículas dispersas dentro de una matriz polimérica y/o un revestimiento de polímero, formando así una estructura núcleo-corteza; obteniendo un material que combina las propiedades adecuadas de ambas partes (Dallas, 2011).

Entre las numerosas nanopartículas que han sido utilizadas como agentes funcionales en polímeros, las nanopartículas de plata representan el más codiciado nanomaterial. Esto debido principalmente a su carga eléctrica, óptica, catalítica y particularmente a su propiedad antimicrobiana, la cual está bien establecida y ampliamente investigada principalmente en sistemas coloidales (Dallas, 2011).

### ***10.3. Clasificación de superficies antimicrobianas según su modo de acción***

Las superficies antimicrobianas según su modo de acción se pueden clasificar en dos clases (Tiller, 2010):

- Clase 1: Previene el ataque primario mediante la creación de una superficie no adherente para las células microbianas.
- Clase 2: Eliminación de las bacterias por aproximación.
- 

Ambos enfoques se pueden conseguir, ya sea por modificaciones permanentes de la superficie o por liberación bioactiva de compuestos



### 10.3.1. *Superficies que repelen los microorganismos*

El efecto de repulsión, generalmente, puede ser logrado por superficies que no permiten la adhesión de la proteína. Tales superficies pueden ser obtenidas por varios métodos, dentro de ellos la modificación química de superficies como el uso de polietilenglicol (PEG) y ciertos otros polímeros sintéticos, que pueden repeler la adherencia de los microorganismos, aunque no los eliminan (An y cols., 1998; Tiller y cols., 2001).

No obstante, la reducción de adherencia bacteriana nunca es completa. Esto es debido a la diferencia de tamaño, a la composición química compleja de la superficie celular microbiana y al hecho que los microorganismos poseen una superficie de adherencia activa. Por estos motivos, la adhesión bacteriana no se puede explicar, del todo, con la teoría de la interacción entre partículas coloidales (An y cols., 1998). Se ha descubierto que las cargas negativas en las superficies repelen las células microbianas porque su carga neta de superficie celular es negativa. Sin embargo, debido a que en la estructura de cada uno de los microorganismos, también existe áreas en su superficie cargadas positivamente, serán éstas las que, eventualmente, permitirán la adhesión de la célula a la carga negativa de la superficie (Jansen y Kohlen, 1995).

Otro método para mantener las células microbianas fuera de las superficies es la creación de materiales que renueven constantemente su superficie (por degradación), también denominado autopulido. Aunque este no mantiene las superficies libres de microorganismos con efectividad, puesto que los procesos de autopulido y formación de biofilm tienen escalas de tiempo diferentes. La última tiene unas pocas horas, mientras que la primera podría estar en el rango de días o meses para proporcionar una protección útil. En la práctica, estos sistemas de autopulido suelen

emplearse en combinación con sistemas de liberación de biocida (Tiller, 2010).

Uno de los enfoques más recientes es la liberación de sustancias que impiden la adherencia activa de las células microbianas sobre la superficie. Dowling y cols. (2001), estudiaron la liberación de sustancias que impiden la adherencia activa de las células microbianas sobre la superficie, empleando como agente antimicrobiano iones de plata como recubrimiento de sustratos poliméricos. Otro enfoque para tener en cuenta es el empleo de enzimas hidrolíticas, las cuales afectan la adhesión de los microorganismos por cuatro vías diferentes (Kristensen, y cols., 2008):

- i)* rompiendo los sitios de unión de los microorganismos.
- ii)* degradando los polímeros del biofilm, originados por los microorganismos que se han establecido en la superficie, tales como las proteínas y los polisacáridos.
- iii)* catalizando la liberación de compuestos antibiofouling desde la superficie.
- iv)* la obstrucción, por enzimas específicas, de la comunicación intracelular durante la colonización de una superficie

### *10.3.2. Superficies de contacto activo*

El primer modelo de contacto activo se basó en la idea que una membrana activa, mediante un agregado biocida en la superficie de un polímero, podría ser capaz de penetrar la pared celular de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas adheridas, consiguiendo la eliminación del microorganismo. Se han estudiado varios compuestos tales como el poli-4-vinil-*N*-piridinio-hexilo-

bromuro sobre vidrio, los grupos dodecil y metil cuaternizados en polietilenamina, efectiva para la eliminación de microorganismos e incluso ciertos virus de la gripe (Lin y cols., 2002).

### *10.3.3. Superficies que liberan biocidas*

Los sistemas que repelen los microorganismos o los eliminan por contacto son los métodos óptimos para la función de una superficie antimicrobiana. Sin embargo, la mayoría de las zonas húmedas y biológicamente contaminadas contienen grandes cantidades de material que se unen de forma no específica a una superficie y la desactivan completamente. Además, la gran cantidad de microorganismos cubriría, eventualmente, toda la superficie con células muertas, las cuales también anularían su eficacia. En estos casos las superficies que liberan biocida mantendrían su actividad (Tiller, 2010).

#### *a) liberación controlada*

La liberación controlada es el método más antiguo para mantener las superficies libres de biofilms. Todos los sistemas eventualmente se deterioran volviéndose inefectivos. Además, en todos los casos está involucrado un reservorio importante de agente biocida dentro de una matriz o superficie, en la cual su tasa de liberación puede ser controlada mediante la encapsulación del agente biocida, la solubilidad del compuesto y/o el equilibrio constante entre el material y el medio circundante (Tiller, 2010). Un método de control más reciente de la tasa de liberación de biocida es el uso de la técnica "capa por capa" (LbL). Este método es uno de los más eficientes en recubrimientos, permitiendo la distribución casi perfecta del biocida

dentro de la matriz y puede ser diseñada para las características de lixiviado de cualquier biocida, incluyendo enzimas antimicrobianas (Li y cols., 2006). Otro método para controlar la tasa de liberación de biocida es la de atraparlos en una matriz que se hidroliza lentamente, los cuales pueden estar incorporados dentro de ácido poliláctico u otro poliéster, multicapas de polielectrolito degradables o incluso el empleo de una matriz que se degrade con una enzima específica (Tiller, 2010).

#### *b) liberación catalizada*

Es un método para obtener una tasa de liberación controlada, sin llegar al agotamiento, con una producción continua de biocida lixiviado por una reacción catalítica. Este método es uno de los más recientes y prometedores, pero la desventaja de este sistema es que la producción de biocidas son altamente reactivos y por lo tanto potencialmente tóxicos. Además, esa energía, que actúa como catalizador, debe estar alimentando constantemente el sistema. La energía catalizadora, con mayor frecuencia, es UV o luz visible, pero pueden ser empleadas fuentes eléctricas o energía química (Linsebigler y cols., 1995).

La catálisis para la formación de biocidas son nanocompuestos inorgánicos, fotosintetizadores orgánicos o algunas enzimas. Uno de los biocidas fotocatalizadores con más éxito es el  $\text{TiO}_2$ , el cual posee un fuerte poder oxidativo bajo luz UV. En presencia de agua, oxígeno y luz UV, la superficie produce constantemente radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas al oxígeno (ROS) (Nakajima y cols., 2000).

## 11. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de plata

Numerosas aplicaciones prácticas de nanopartículas de plata requieren su atrapamiento sobre varios sustratos y matrices. Desde este punto de vista, los polímeros son la primera opción debido a su morfología específica, química y estructura natural, con sus largas cadenas poliméricas permitiendo la incorporación y fina dispersión de nanopartículas. Adicionalmente, los grupos funcionales adecuados de los polímeros pueden ser utilizados como sitios reactivos específicos para el control de una etapa de la síntesis de nanopartículas (Dallas 2011).

Realizando una comparación de todos los agentes antimicrobianos, la plata es probablemente el más poderoso agente antimicrobiano que exhibe una fuerte toxicidad hacia una amplia gama de microorganismos y, simultáneamente, una baja toxicidad humana (Dallas 2011). Sin embargo, su aglomeración y compatibilidad con matrices orgánicas pueden implicar el deterioro de sus propiedades mecánicas y disminuir sus propiedades antibacterianas, lo que limita su uso eficiente en materiales antibacterianos (Cheng y cols., 2008). La zeolita de plata está compuesta por metales alcalinotérreos complejos con cristales de aluminosilicato, los cuales son reemplazados parcialmente por iones de plata, utilizando el método de intercambio de iones. Así se fabrican recubrimientos de zeolita de plata para diferentes artículos, aplicando propiedades antibacterianas (Rai y cols., 2009). El empleo de las sales y complejos de plata, a pesar de ser agentes efectivos antimicrobianos, puede resultar indeseable, debido a la adsorción de iones en las células de la epidermis y glándulas sudoríparas (Dallas 2011).

Panacek y cols. (2006), encontraron que la alta actividad antimicrobiana y bactericida de las nanopartículas de plata, sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo a *S. aureus*

meticilina resistente. También señalaron que la actividad de las nanopartículas de plata son dependientes del tamaño. Las nanopartículas con tamaño de 25 nm fueron las que manifestaron una mayor actividad antibacteriana. Un estudio realizado por Pal y cols. (2007), demostró que la forma de las nanopartículas de plata intervenían en la eficacia antibacteriana, al comparar formas esféricas, de rodillo y triangular truncada, con tamaños cerca de los 100 nm. Se obtuvo como resultado que la forma triangular truncada era efectiva a una concentración más baja (1 µg/l) con respecto a la forma de rodillo (100 µg/l) y esférica (12.5 µg/l) y que la eficacia también está ligada a la concentración de microorganismos inicial.

Por tanto, existe una gran cantidad de factores que afectan la eficacia de estas nanopartículas, lo que no permite conseguir un estándar de eficacia hasta el momento, en función del tamaño o forma, siendo necesarios ensayos previos de verificación.

### ***11.1. Mecanismos de acción de la plata***

Sondi y cols. (2004), demostraron la existencia de plata en las membranas de bacterias tratadas, analizando las células por Microscopía de Transmisión de Electrón y, con el desarrollo del análisis por Espectrometría de Energía Dispersa de Rayos-X, confirmaron la incorporación de plata dentro de la estructura de la membrana celular. Por tanto, la penetración de la membrana celular de la bacteria por las nanopartículas de plata, es un paso previo esencial, causante del efecto antimicrobiano.

El mecanismo exacto de la acción de la plata sobre los microorganismos aún no es muy bien conocido, aunque se considera que la plata metálica, los iones de plata y las nanopartículas de plata poseen actividad antimicrobiana, de acuerdo a los cambios

morfológicos y estructurales que presentan las células bacterianas (Rai y cols., 2009).

De hecho, los iones de plata son generalmente conocidos por actuar con un número de donadores de electrones de grupos funcionales como los tioles, fosfatos, hidroxilos, imidazoles, índoles y otras aminas (Dallas, 2011). La plata también se une al ADN y ARN bacteriano, provocando su desnaturalización, lo que inhibe la replicación bacteriana (Rai y cols., 2009).

Se cree que los iones de plata que se unen al bloque de transcripción de ADN interrumpen la respiración bacteriana y la síntesis de ATP. Se proponen tres mecanismos comunes de actividad antimicrobiana de la plata (Ruparelia, 2008; Dallas, 2011):

- i)* liberación gradual de iones de plata libres, seguido por la interrupción de producción de ATP y replicación de ADN.
- ii)* daño directo a las membranas celulares.
- iii)* generación de nanopartículas de plata o iones de plata como especies reactivas del oxígeno.

Las especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto orgánicos como inorgánicos, las cuales son moléculas muy pequeñas, altamente reactivas, debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada.

### ***11.2. Toxicidad de la plata***

En muchos estudios, las nanopartículas de plata son sugeridas como no tóxicas en bajas concentraciones, pero debido a su tamaño tan

pequeño y propiedades variables, estas son sugeridas como peligrosas para el medio ambiente. Los efectos colaterales de las nanopartículas no han sido del todo estudiados, por lo tanto, se necesitan llevar a cabo estudios detallados, antes de la introducción de productos relacionados con la nanobiomedicina en el mercado (Rai y cols., 2009).

La toxicidad observada ha sido asignada a la oxidación de los iones en la superficie, hacia cationes de plata, que pueden afectar las funciones básicas en células de mamíferos. También se ha sugerido que debido a la adsorción de partículas muy pequeñas desde las células, se crea un efecto letal sobre las membranas celulares. Para disipar este efecto indeseado, la plata se inmoviliza en sustratos de polímero, evitando la adsorción (Dallas, 2011). La baja toxicidad ha sido demostrada a través de la cosmética y aprobación 510K de la FDA. Además ha sido incluida en la Directiva 90/128/EEC, de límites de migración para materiales plásticos y artículos en contacto con alimentos (Simmons, 2001).

## **12. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de zinc**

Las sales metálicas polivalentes de piritionato son conocidas por ser agentes microbianos efectivos y su amplio espectro en su empleo como fungicida y bactericida en productos tales como pinturas anti-incrustantes, productos de construcción, plásticos y artículos derivados de este y productos de poliuretano, entre otros. El más ampliamente utilizado es el piritionato de zinc. Este posee la capacidad de ser insoluble en agua y escasamente soluble en muchos solventes orgánicos incluyendo los alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol), aminas (por ejemplo, dietaloaminas), éter, ésteres y similares (Nelson y cols., 2010).



El Zinc pyrithione (también conocido como Zinc Omadine, ZPT o zinc bis(2-piriditio)-N-óxido) es utilizado más extensamente en la rutina diaria. Aparte de la prevención de la degradación y el deterioro microbiano de materiales de fabricación de partida, tales como plásticos, polímeros y látex. El ZPT es utilizado para prevenir el crecimiento de bacterias, hongos, mohos y algas. Por otra parte, también está registrado para su incorporación como antiincrustante en pinturas para barcos, a fin de controlar el crecimiento de limo, algas y organismos marinos incrustantes debajo de la línea de agua en los cascos de barcos de recreo y comerciales (Sun y cols., 2006).

Una segunda molécula utilizable son las nanopartículas de ZnO. Son efectivas tanto para las bacterias Gram negativas como para las Gram positivas, también ejercen actividad antibacteriana contra esporas, que son resistentes a las altas presiones y alta temperatura. La actividad antibacteriana depende de la concentración y el área de superficie, mientras la estructura cristalina y el tamaño de partícula tienen poco efecto. La alta concentración y una mayor área de superficie mejoran la efectividad antibacteriana (Zhang y cols., 2007). Las ventajas que se tienen utilizando nanopartículas de ZnO es la elevada inhibición de microorganismos patogénicos y su uso en bajas concentraciones (Sharma y cols., 2010).

El efecto tóxico de las nanopartículas de ZnO hacia las especies patogénicas de bacterias se ha mejorado, prolongando el contacto entre las membranas de las células bacterianas y las nanopartículas (Sharma y cols., 2010). Las nanopartículas antifúngicas pueden producir una efectividad duradera. De hecho, los hongos que se encuentran con el agente, están expuestos a altas concentraciones en la superficie, al mantenerse dicha concentración, a los sistemas de liberación lenta (Paulo y cols., 2010). La bicapa lipídica de hongos y bacterias sufre una rotura, debido al comportamiento citotóxico de

las nanopartículas de ZnO, dando como consecuencia el drenaje del contenido citoplasmático (Sharma y cols., 2010).

Como el ZnO es un cristal polar con fase hexagonal, las propiedades dependen en gran medida del proceso de síntesis y las condiciones externas (reacción a la temperatura, concentración de reactivos y tipo de agente utilizado) durante el proceso de formación de la nanoestructura (Sharma y cols., 2010).

### ***12.1. Mecanismos de acción del zinc***

La actividad antibacteriana de las nanopartículas de zinc, según proponen en sus estudios Sawai y cols., (1996,1998), se basa en la generación de peróxido de hidrógeno, como uno de los muchos factores de actividad antibacteriana, mientras Stoimenov y cols., (2002) indican que el mecanismo se basa en la unión de partículas sobre la superficie de la bacteria debido a las fuerzas electrostáticas. Otra teoría indica que las nanopartículas penetran la pared celular de los microorganismos, a través de proteínas portadoras o canales iónicos, y se unen a organelos, interviniendo así en el proceso metabólico como un resultado de la producción de especies reactivas al oxígeno (Sharma y cols., 2010).

### **13. Durabilidad de las superficies biocidas**

Hoy en día existen nuevos desafíos con respecto a la adición de biocidas a los materiales. Los revestimientos en la construcción exhiben, usualmente, una funcionalidad biocida entre 0,5 y 2 años, en condiciones extremas. Sin embargo, el periodo de funcionalidad de los materiales de construcción está garantizado durante 10 años (Eversdijk y cols., 2011). Existen factores que influyen en la

durabilidad de las superficies biocidas. Entre ellos hay que destacar el incremento de la temperatura, el cual hace que las moléculas orgánicas se vuelvan altamente móviles, resultando en una pérdida del compuesto comprendido en el material. También, algunos antimicrobianos orgánicos, frecuentemente, tienen temperaturas de descomposición relativamente bajas. Estos aditivos son aptos solamente para PVC y ciertas poliolefinas de baja temperatura, en los que la temperatura de proceso y la del medioambiente, donde se empleará el producto final, es la adecuada para evitar su descomposición. Esto puede influir en la tasa de migración y la longevidad del sistema activo (Jones, 2009).

Contrariamente a lo esperable, la aplicación de un incremento en la concentración del biocida solamente resulta en una mínima prolongación de la vida útil. Por otra parte, existe un impacto medioambiental al reemplazar tempranamente los revestimientos funcionales. En el caso de que se sustituyan de forma temprana, existirá el riesgo de emisión de cantidades relativamente grandes de biocidas en el medio ambiente. Por otra parte el crecimiento de la demanda ecológica y la legislación internacional medioambiental, incrementa, cada vez más, la presión sobre el comportamiento de los materiales. Un enfoque para limitar la cantidad de biocida necesario, mientras se mantiene la resistencia biológica adecuada, es utilizando una tecnología de liberación lenta. La selección de un sistema de liberación propio permite mantener la concentración del agente activo por encima de la concentración mínima inhibitoria efectiva (MIC), mientras decrece la liberación inicial y la cantidad total de biocida necesario (Eversdijk y cols., 2011).

Los sistemas de liberación disponibles en el mercado incluyen los basados en vidrios cerámicos, dióxidos de titanio dopados, y zeolitas, incluso como medio de soporte y mecanismo de liberación (D´Arcy,

2001). Algunos sistemas favorecen una liberación rápida, tal y como las aplicaciones para el cuidado de heridas, mientras otros tienen un mayor control en el modo de acción continuo sobre el tiempo de vida útil del sustrato (Jones 2009).

#### **14. Bases legales del uso de productos biocidas**

Los biocidas están regulados en la UE desde el año 1998, según la Directiva 98/8. En esta directiva se señalan las condiciones para que las empresas puedan presentar los recursos a las comisiones de la UE, con el fin de evaluar aspectos concernientes a la sustancia concreta que se quiere comercializar, incluyendo su toxicidad y eficacia. Existe un plazo máximo de 10 años para que los productos químicos sean conocidos y poder evaluar su modo de aplicación, acción y riesgos que pueda conllevar su uso.

Una vez que se hayan aprobado los biocidas, los Estados miembros dispondrán que los biocidas no sean comercializados ni utilizados en su territorio a menos que hayan sido autorizados en virtud de la legislación vigente en cada momento. Por ello, los fabricantes han de ajustar sus estructuras y evaluaciones a los criterios y evaluaciones establecidos por la propia UE, incluyendo la modificación y adaptación de las legislaciones nacionales por parte de los países miembros. Para ello, los países han de crear unos registros nacionales donde se conozcan los biocidas utilizados y su correspondiente uso.

Dentro del plazo establecido por esta Directiva, se publicó el Reglamento 1451/2007. En este se describen las moléculas que se encuentran en revisión y en los productos tipo en los que se clasifican. La inclusión en cualquiera de los apartados, es decisión de las empresas que fabrican y distribuyen estos productos químicos, ya

que por cada inclusión es necesario el pago de una tasa correspondiente.

El Reglamento 528/2012, indica que La seguridad de los alimentos y piensos es objeto de legislación de la Unión, en particular del reglamento 178/2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, creando la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y fijando procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Los tipos de productos biocidas se reúnen en 4 grupos principales:

Grupo principal 1: desinfectantes

Grupo principal 2: conservantes

Grupo principal 3: control de plagas

Grupo principal 4: otros productos biocidas

#### ***14.1. Bases legales de las superficies en contacto con alimentos***

Los materiales en contacto con alimentos están regulados en toda la UE por el Reglamento 1935/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE, de manera que se garantiza que todos los materiales que se ponen en el territorio comunitario cumplen los mismos requisitos de calidad y establece el procedimiento a seguir para incluir nuevas sustancias en las listas de las sustancias autorizadas para la fabricación de los mismos.

Todos los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con los alimentos deben fabricarse de conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación, para que, en las condiciones normales o previsibles de empleo, no transfieran sus componentes a los alimentos en cantidades que puedan:

- i) representar un peligro para la salud humana.
- ii) provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos.
- iii) provocar una alteración de las características organolépticas de éstos.

Cualquier material destinado a entrar en contacto con alimentos, ha de ser lo suficientemente inerte para evitar que se transfieran sustancias a los alimentos en cantidades lo suficientemente grandes para poner en peligro la salud humana.

Los materiales poliméricos, que pueden estar compuestos por otras sustancias o aditivos, están regulados a nivel nacional por el Real Decreto 847/2011, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con alimentos. Este Real Decreto es conforme al Reglamento 1935/2004, en el cual se establece que a falta de medidas específicas comunitarias, los Estados miembros pueden mantener o adoptar disposiciones nacionales en este ámbito.

Los materiales y objetos que contengan plásticos no pueden transferir sus componentes a los alimentos en cantidades superiores a las establecidas, para ellos se establecen los siguientes límites:

- i) *migración global* en la que se establece un límite de 10mg/dm<sup>2</sup> de material plástico o 60 mg/kg de alimento.

*ii) migración específica* donde la cantidad de los compuestos individuales procedentes de la superficie que migra al alimento, en función del tipo de material, pueden variar.





**IV. Estudio de la eficacia bactericida de productos químicos  
embebidos en superficies duras de poliéster**



## 1. Materiales y métodos

Se realizó el análisis de matrices poliméricas con propiedades antibacterianas. Para su estudio se utilizaron las normas ISO 22196:2011 (*Mesurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*) y JIS Z 2801:2000 (*Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy*). Los análisis de las superficies se realizaron por triplicado.

### 1.1. Superficies de estudio

Se emplearon superficies duras de poliéster con área de 5,0 x 5,0 cm<sup>2</sup> y un grosor de 1,0 cm, tratadas con tres tipos de agentes biocidas a diferentes concentraciones (**Tabla 6**). Previo a su uso, se realizó un proceso de esterilización para disminuir su carga microbiana interferente.

**Tabla 6.** Tipos de nanopartículas biocidas y su concentración utilizados en el tratamiento de superficies duras de poliéster.

Tipos de agentes biocidas	Concentración (ppm)
NpZnO	400
	500
	650
	850
NpAg	400
	500
	650
	850
NpAg + NpZnO	400 + 400
	500 + 400
	650 + 400
	850 + 400

## 1.2. Cepas bacterianas y suspensión bacteriana de ensayo

Se utilizaron dos cepas de referencia. Como bacteria Gram negativa, *Escherichia coli* CECT 515 (CECT, *Colección Española de Cultivos Tipo*, Valencia, España) y como bacteria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (ATCC, *American Type Culture Collection*; Manassas, EE.UU.). Estos microorganismos son los recomendados por las normas internacionales con las que se han trabajado. Ambas son bacterias frecuentemente transmitidas a los alimentos a partir de superficies de trabajo (WHO,2007). *S. aureus* es más resistente que la mayoría de las bacterias Gram negativas; crece en un amplio rango de temperaturas, de pH, concentraciones de cloruro de sodio, incluso es capaz de permanecer activo en superficies secas y de formar biofilms (Troller, 1993; Akiyama, 1998).

Las cepas liofilizadas fueron rehidratadas en 9,0 ml de agua de peptona tamponada (BPW, *Buffered Peptone Water*; bioMérieux®, Marcy l'Etoile, Francia) e incubadas a 37 °C durante 18 – 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se cultivaron por el método de estría en superficie en Agar Trypticosa de Soja (TSA, *Tryptic Soy Agar*; Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) e incubaron a 37°C durante 18 – 24 h. A partir del cultivo, se tomaron colonias aisladas y se subcultivaron en tubos inclinados de TSA, para obtener los cultivos stock. Se incubaron a 37°C durante 24 h y posteriormente fueron llevados a almacenamiento, a una temperatura de 4°C por un periodo máximo de un mes.

A partir del cultivo stock, del tubo inclinado, se realizó un subcultivo, mediante una siembra por agotamiento en placa de TSA, que se incubó a 37°C durante 18 – 24 h. De esta forma se obtuvo un cultivo en fase estacionaria. De dicho cultivo se preparó la suspensión bacteriana de ensayo (SBE), con una concentración comprendida

entre  $2,5 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  hasta  $1,0 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  (Norma JIS Z 2801 e ISO 22196. Anónimo 2000, 2011).

### ***1.3. Ajuste de la concentración de la suspensión bacteriana de ensayo***

Para la medida de la concentración microbiana se empleó un densitómetro (DENSIMAT. bioMérieux Marcy-l'Étoile, Francia) destinado a medir la densidad de un inóculo bacteriano, obteniendo lecturas en unidades MacFarland (UMcF). Se verificó primero, en un tubo control con 9 ml de agua de peptona tamponada, sin inocular, que la lectura en el equipo DENSIMAT era de 0,0 UMcF. Posteriormente se tomaron colonias de la placa de TSA incubadas, para inocularlas en un tubo con 9 ml de agua de peptona tamponada. Se procedió entonces a su agitación en vórtex y se puso tantas colonias como las necesarias para conseguir las lecturas correspondientes.

El fabricante del equipo DENSIMAT recomienda hacer lecturas por encima de 0,5 UMcF, pero con nuestras cepas obtuvimos concentraciones alrededor de  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Debido a que se necesitaba una concentración más baja para los ensayos, se realizó una dilución decimal en Solución Salina Triptona (*Tryptone Saline Solution*, TSS), para así obtener la SBE, dentro del rango estipulado por las normas, de cada una de las cepas empleadas en la inoculación de las superficies muestra. La concentración inicial de las SBE, fue verificada por siembra en placa y cotejada con siembra en el equipo TEMPO, acreditado por AFNOR para este fin (2013) (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

#### ***1.4. Verificación del tratamiento previo óptimo de las superficies de prueba***

Ninguno de los materiales de trabajo era estéril, por lo que encontramos microorganismos en las superficies. Esto puede ser un problema para un ensayo de superficie, puesto que nos enmascarará los recuentos debidos a las cepas inoculadas. Por este motivo, hay que asegurar una correcta esterilización del material, antes de su análisis, manteniendo intactas sus propiedades. Por tanto, se buscó un tratamiento previo óptimo, con el fin de eliminar estos microorganismos interferentes, presentes en las superficies de prueba, evitando así lecturas erróneas.

Para evaluar el tratamiento previo óptimo de las superficies de poliéster, se trataron de cuatro formas diferentes antes de la inoculación:

- lavado con agua (humedad)
- autoclavado sencillo
- doble autoclavado
- isopropanol
- sin recibir un tratamiento previo, como control del ensayo.

En las muestras tratadas por humedad, se humectó la superficie de contacto con 0,5 ml de agua destilada estéril durante 24 horas a 20°C. Para las muestras tratadas por autoclavado sencillo y autoclavado doble, la operación se realizó a 121°C durante 15 minutos (cada sesión) a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup>, luego fueron llevadas a estufa de aire forzado para secar a 60°C durante dos horas, eliminando la humedad excesiva en la superficie. El tratamiento con isopropanol (Panreac, EE. UU) se realizó con una solución en agua al 70%, que se aplicó por aspersion sobre la superficie de contacto de las muestras y se dejó secar a temperatura

ambiente en campana de flujo laminar. En las muestras sin tratamiento previo se realizó la inoculación en forma directa. La cepa utilizada fue *S. aureus* ATCC 6538, que se mantuvo liofilizada y en refrigeración hasta su uso. A partir de ella se preparó el subcultivo y luego la SBE, tal y como ha sido descrito previamente.

### **1.5. Inoculación de las muestras de ensayo**

Una vez que se esterilizaron y se secaron las superficies, se colocaron en placas de Petri para ser inoculadas con 0,4 ml de SBE y cubiertas con una película de plástico inerte y estéril de 4,0 x 4,0 cm<sup>2</sup>. Las placas con las muestras fueron incubadas en cámara húmeda durante 24 h a 37°C.

Este sistema permite un contacto directo entre el inóculo y el material, minimizando los efectos de la forma y tamaño de la gota en la superficie.

### **1.6. Elección del modelo de recuperación**

Al realizar la extracción de microorganismos de una superficie, se debe elegir un modelo que nos garantice la mayor extracción de microorganismos, para no tener lecturas falsas y poder minimizar la variabilidad de los ensayos.

Para la elección del modelo de recuperación se emplearon muestras control (sin biocida). Las muestras fueron esterilizadas por doble autoclavado, luego se inocularon según el apartado 1.5 y se evaluaron tres sistemas de recuperación de inóculo:

- i)* por agitación con perlas,
- ii)* con hisopo

iii) por irrigación directa.

La recuperación bacteriana por agitación con perlas (RP), se realizó colocando las muestras en frascos con 8 g de perlas de vidrio (2 mm de diámetro) y 10 ml de solución neutralizante conteniendo Solución Salina Triptona, [TSS: 1 g de triptona (Becton Dickinson and Co. EE. UU) y 8,5 g de cloruro de sodio (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, España) por litro; pH  $7,0 \pm 0,2$ ] más la adición de 30 g de Tween 80 por litro. Los frascos se colocaron en una plancha de agitación a 1000 rpm durante 1 min y, a continuación, de la suspensión obtenida se realizaron diluciones decimales en TSS.

En la recuperación con hisopo (RH), este fue humectado en un frasco conteniendo 10 ml de solución neutralizante y se frotó por toda la superficie inoculada, el hisopo se depositó de nuevo en el frasco con neutralizante y se agitó en plancha de agitación a 1000 rpm durante 1 min, a continuación se realizaron diluciones decimales en TSS.

En la recuperación por irrigación directa (RID), la muestra fue irrigada en su superficie inoculada con 2 ml de solución neutralizante, repitiendo esta operación 5 veces, obteniendo un volumen final de 10 ml y del cual se realizaron diluciones decimales.

De las diluciones decimales en TSS, obtenidas en los tres sistemas de recuperación, se realizaron siembras en sistema TEMPO.

### ***1.7. Validación del sistema de lectura del equipo TEMPO***

El sistema TEMPO está acreditado por AFNOR (2003), para la enumeración de flora aerobia mesófila, y es empleado para el recuento directo de indicadores de calidad en productos alimenticios. Al cambiar las matrices alimenticias por superficies de ensayo, se



hizo necesario realizar pruebas de validación para verificar si este sistema puede ser empleado en el estudio de superficies en contacto con alimentos. Para validar las lecturas del equipo TEMPO se utilizó la cepa bacteriana de *S. aureus* ATCC 6538.

La cepa bacteriana, en estado estacionario, fue tomada y puesta en un tubo con 9 ml de agua de peptona tamponada, midiendo su concentración en unidades MacFarland para obtener la SBE. Se emplearon muestras control sin biocida, que fueron esterilizadas por doble autoclavado, para luego inocular de acuerdo al apartado 1.5. Posteriormente se realizó la recuperación por agitación con perlas y las diluciones decimales en TSS. Se realizaron siembras, tanto en placa Petri de TSA como por el sistema TEMPO (rehidratando los viales con 3 ml de agua destilada estéril y añadiendo 1 ml de la dilución decimal). Se emplearon tarjetas de lectura específica para hacer recuento de microorganismos totales (TVC). Para así, obtener lecturas, tanto para la siembra en placa como en el sistema TEMPO, después de 48 h de incubación a 30°C.

### ***1.8. Validación del modelo de recuperación***

Para verificar la tasa de recuperación, se emplearon muestras control. Después de su esterilización y secado, se inocularon como se indicó anteriormente en el apartado 1.5., eliminando el proceso de incubación. En lugar de ello, se procedió inmediatamente a realizar la recuperación del inóculo por agitación con perlas y se hicieron diluciones en TSS. De las respectivas diluciones se efectuaron las siembras correspondientes en sistema TEMPO. El modelo de recuperación debe cumplir con la siguiente ecuación para ser válido el test:

$$\frac{(L_{max} - L_{min})}{(L_{mean})} \leq 0,2$$

Donde:

$L_{max}$ , es el logaritmo en base 10 del número máximo de bacterias viables encontradas en la muestra.

$L_{min}$ , es el logaritmo en base 10 del número mínimo de bacterias viables encontradas en la muestra.

$L_{mean}$ , es el logaritmo en base 10 de la media del número de bacterias viables encontradas en la muestra.

### ***1.9. Evaluación de las superficies duras de poliéster con propiedades antimicrobianas***

Las normas JIS Z 2801: 2000 e ISO 22196:2011 determinan la actividad de superficies activas antimicrobianas, mediante la cuantificación de las células bacterianas, que entran en contacto con estas superficies, y las recuperadas después de transcurridas 24 horas a 35°C. El efecto antibacteriano se determina comparando la supervivencia de las bacterias de una superficie tratada con un agente antimicrobiano, con otra no tratada o muestra control.

Los ensayos se realizaron ajustando la SBE dentro del rango de concentración de  $2,5 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  hasta  $1,0 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  medidos por densidad (apartado 1.3). Previamente las muestras fueron esterilizadas por doble autoclavado, secadas y colocadas en placas Petri, realizando la prueba por triplicado. Posteriormente se procedió a inocular con un volumen de 0,4 ml de la solución bacteriana de ensayo, luego se cubrió con una película de plástico inerte y estéril de  $4,0 \times 4,0 \text{ cm}^2$ , para conseguir delimitar el área de contacto. Dichas placas con las muestras se incubaron durante 24 h a

35°C, en cámara húmeda, para evitar la desecación del inóculo. A su vez un grupo de tres muestras control, para cada microorganismo, fueron recuperadas y sembradas, inmediatamente después de la inoculación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se recuperó el inóculo por agitación con perlas, colocando las muestras en frascos con perlas de vidrio y 10 ml de solución neutralizante. Los frascos se colocaron en una plancha de agitación a 1000 rpm durante 1 minuto y a continuación de la suspensión obtenida se realizaron diluciones decimales en TSS. De estas diluciones decimales se hicieron siembras y se evaluaron con el sistema TEMPO, obteniendo recuentos bacterianos expresados en UFC cm<sup>-2</sup>. Para calcular la eficacia antibacteriana de las muestras, se tuvo en cuenta la muestra control como parámetro de comparación.

Para calcular la eficacia o actividad antibacteriana, se utilizó la siguiente ecuación:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

Donde:

R, es la actividad antibacteriana

$U_0$ , es el promedio del logaritmo en base 10 del número de bacterias viables en células cm<sup>-2</sup>, recuperadas de una muestra control, inmediatamente después de la inoculación.

$U_t$ , es el promedio del logaritmo en base 10 del número de bacterias viables en células cm<sup>-2</sup>, recuperadas de una muestra control después de 24h.

$A_t$ , es el promedio del logaritmo en base 10 del número de bacterias viables en células cm<sup>-2</sup>, recuperadas de una muestra tratada después de 24h.

### **1.10. Análisis estadístico**

Los datos de los recuentos bacterianos fueron transformados a unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ). En la verificación del tratamiento previo de las superficies se realizaron 12 ensayos con  $n=15$ . En el experimental del modelo de recuperación se efectuaron 5 ensayos con  $n=9$ . En la estandarización de la lectura TEMPO se hicieron 7 ensayos con  $n=2$ . Para determinar las diferencias significativas entre valores medios, se realizó análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple sin interacción de Tukey con un  $p \leq 0,05$ . Para determinar la eficacia de las superficies biocidas se realizaron 6.840 análisis (95 ensayos, cada ensayo con  $n=72$ ). Para determinar las diferencias significativas entre valores medios, se realizó análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple con interacción de Tukey con un  $p \leq 0,05$ . Los análisis se realizaron con el programa informático R versión 3.1.0.

## **2. Resultados y discusión**

### **2.1. Estandarización de la concentración de la suspensión bacteriana de ensayo**

Se realizaron los recuentos de las soluciones bacterianas de ensayo, preparadas con el equipo DENSIMAT, para determinar la concentración del inóculo inicial, y se encontró que estaba dentro del rango establecido por la norma, obteniendo valores entre 5,40 y 5,85  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ , tanto para *S. aureus* como para *E. coli*.

Se seleccionó *S. aureus* como representativo de las bacterias Gram positivas y *E. coli* de las Gram negativas. Se trata de microorganismos patógenos potenciales, de transmisión alimentaria,

son resistentes y se encuentran presentes en ambientes relacionados con el procesado de los alimentos (Christison y cols., 2007; Scott y cols., 2008; Todd y cols., 2009a).

## 2.2. Verificación del tratamiento previo óptimo de las superficies de prueba

Al realizar los tratamientos previos a las superficies muestra y las respectivas siembras en viales TEMPO, para microbiota aerobia mesófila o microorganismos viables totales [Total Viable Count (TVC)] y específicas para *S. aureus* obtuvimos los resultados que se reflejan en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Resultados de los recuentos según el tratamiento aplicado a las superficies de estudio.

Tratamiento	Recuentos bacterianos	
	<i>S. aureus</i>	TVC
Sin tratamiento	5,23 <sup>b B</sup> ± 0,62	8,84 <sup>a A</sup> ± 0,63
Humedad	5,10 <sup>b B</sup> ± 0,29	8,26 <sup>a A</sup> ± 0,79
Autoclavado	5,79 <sup>b B</sup> ± 0,68	7,29 <sup>abA</sup> ± 0,44
Doble autoclavado	6,52 <sup>a A</sup> ± 0,38	6,57 <sup>b A</sup> ± 0,46
Isopropanol	5,70 <sup>b B</sup> ± 0,72	7,29 <sup>abA</sup> ± 0,70

Recuentos bacterianos medios expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

<sup>a-b</sup> Valores medios en cada columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-B</sup> Valores medios en cada fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se evaluaron cuatro tratamientos previos para las superficies muestra: lavado con agua (humedad), autoclavado sencillo, doble autoclavado y lavado con isopropanol. Al mismo tiempo se evaluaron muestras sin tratamiento como muestra de control. Al comparar el

recuento obtenido, en los cuatro tratamientos para *S. aureus*, se observó que solo existían diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento de doble autoclavado, donde se obtiene un mayor recuento de *S. aureus* ( $6,52 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ ). Este recuento mayor tal vez sea el resultado de la falta de competencia por los nutrientes o la falta de producción de sustancias inhibidoras o tóxicas de los microorganismos inherentes de las superficies respecto al inoculo inicial de *S. aureus*. En caso contrario se esperaría una interacción antagónica por parte de los microorganismos por sobrevivir.

Cuando se comparó el recuento obtenido, en los cuatro tratamientos, para TVC, se observó que a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de autoclavado ( $7,29 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ ), doble autoclavado ( $6,57 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ ) e isopropanol ( $7,29 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ ), el recuento obtenido en el tratamiento de doble autoclavado es más bajo, lo que nos demostró que para este tratamiento los microorganismos inherentes de la superficie fueron eliminados. De hecho, sólo se inoculó *S. aureus*, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de este microorganismo y los de la flora total. En consecuencia, el doble autoclavado fue el único tratamiento que aseguró la total eliminación de la microbiota acompañante del material.

Al mismo tiempo, cuando comparamos las lecturas de las tarjetas de siembra para *S. aureus* con las tarjetas de TVC, en cada uno de los tratamientos, encontramos diferencias estadísticamente significativas en todos ellos, salvo en el tratamiento de doble autoclavado. Con lo cual aseguramos, que se obtenía un nivel nulo de microorganismos interferentes en los ensayos, causantes de lecturas erróneas.

Si los microorganismos inherentes de las superficies no fueran eliminados, los recuentos que obtendríamos, al final del ensayo, serían mayores que los reales; ya que al inóculo inicial se sumarían dichos microorganismos. Por tanto, podemos evaluar si en realidad existe o no crecimiento bacteriano de la cepa conocida o, en otras palabras, si la superficie posee eficacia antibacteriana.

### 2.3. Elección del modelo de recuperación

Una vez evaluados los modelos de recuperación se compararon los recuentos obtenidos en cada uno de ellos. Nuestros resultados nos indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre la recuperación con hisopo (RH) y las recuperaciones, tanto con perlas (RP) como con irrigación directa (RID) (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Recuentos de los diferentes modelos de recuperación.

Modelos de recuperación	Ensayos					Recuento bacteriano	Validación $\leq 0,2$
	1	2	3	4	5		
RP	6,03	5,56	5,72	6,4	6,94	6,33 <sup>a</sup> ± 0,68	0,18
RH	6,87	4,3	4,09	3,81	6,12	5,04 <sup>b</sup> ± 1,37	0,42
RID	7,24	5,38	5,16	4,93	6,35	5,81 <sup>ab</sup> ± 0,96	0,35

Recuentos bacterianos medios expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

<sup>a-b</sup> Valores medios con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La recuperación con hisopo fue la menos indicada, ya que los microorganismos que tienden a estar adheridos a la superficie no son arrastrados y, los que son arrastrados, pueden quedarse atrapados entre las fibras del hisopo reteniendo así gran cantidad de microorganismos. Esto nos proporcionaba resultados con recuentos más bajos de lo real y con muy baja reproducibilidad. Estos resultados confirman lo ya conocido desde hace tiempo, en cuanto a

la ineficiencia del sistema de muestreo por escobillado de superficie (Hola y cols., 1988).

Por otra parte, entre la recuperación con perlas ( $6,33 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ ) y la recuperación por irrigación directa ( $5,81 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ ) no existen diferencias estadísticamente significativas. La recuperación por agitación con perlas es una metodología relativamente más cómoda a la hora de llevar a cabo el trabajo experimental, por ello se optó por este método. Además, la vibración hace que las perlas choquen contra la superficie causando fricción, lo que trae como consecuencia el desprendimiento de las bacterias y/o la rotura de los biofilms, derivando en un recuento real de la carga microbiana, así como una alta reproducibilidad (Montañez y cols., 2012).

#### ***2.4. Validación del modelo de recuperación***

Al verificar la tasa de recuperación para cada uno de los ensayos, aplicando la ecuación:

$$\frac{(L_{max} - L_{min})}{(L_{mean})} \leq 0,2$$

Donde:

*L<sub>max</sub>*, es el logaritmo en base 10 del número máximo de bacterias viables encontradas en la muestra.

*L<sub>min</sub>*, es el logaritmo en base 10 del número mínimo de bacterias viables encontradas en la muestra.

*L<sub>mean</sub>*, es el logaritmo en base 10 de la media del número de bacterias viables encontradas en la muestra.

con la cual debe cumplir el modelo de recuperación, según lo recomienda la norma ISO 22196:2011. Se obtuvo como resultado que el modelo de recuperación con perlas (0,18) posee una baja



variabilidad de los recuentos obtenidos por ende una alta reproducibilidad, siendo válido para efectuar los ensayos correspondientes. Por el contrario los otros métodos no cumplen con la ecuación de validación, lo que nos indica que son menos reproducibles (**Tabla 8**).

### 2.5. Estandarización de lectura del equipo TEMPO

Al realizar la comparación de las lecturas entre el recuento de *S. aureus*, tanto para el método tradicional de siembra en placa con el medio TSA, como para el método automatizado, que supone el sistema TEMPO, y una vez realizado el estudio estadístico, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos (**Tabla 9**). Por tanto, verificamos la validez del sistema TEMPO para realizar los análisis correspondientes en los ensayos posteriores, convirtiéndose en una herramienta rápida, con resultados robustos y reproducibles en nuestro estudio.

**Tabla 9.** Resultados de la comparación de lecturas entre el equipo TEMPO y recuento en placa de Petri.

Número de lecturas	Tipo de siembra	Recuento bacteriano
25	TEMPO	6,34 <sup>a</sup> ± 0,15
25	Placa	6,35 <sup>a</sup> ± 0,18

Recuentos bacterianos medios expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

Los valores medios no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 2.6. Eficacia antimicrobiana de los diferentes tipos de superficie biocida

Las superficies utilizadas como control (sin tratamiento con agentes biocidas), no aportaron ningún efecto de inhibición contra los

**Tabla 10.** Actividad de nanopartículas de plata de amplio espectro contra bacterias (modificado de Rai y cols., 2012).

Diferentes formas de plata	Microorganismo	Referencia
Iones de Plata	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	Feng y cols. (2000)
	<i>E. coli</i>	Yamanaka y cols. (2005)
Zeolita de plata	<i>E. coli</i>	Matsumara y cols. (2003)
Nanopartículas de Plata	<i>E. coli</i>	Sondi y Salopek (2007)
	<i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella typhus</i>	Morones y cols. (2005)
	<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	Shaverdi y cols. (2007)
	<i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Geethalakshmi y Sarada. (2010). Bonde y cols.(2011)
Compuesto de celulosa bacteriana y nanopartículas de plata	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Hernane y cols. (2011)
Nanopartículas de plata coloidales	<i>E. fecalis</i> , <i>S. aureus</i> MRSA, <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Panacek y cols. (2006)
Nanofibras de polirodanina de plata	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	Kong y cols. (2005)
Recubrimientos de zeolita NanoAg/NanoZn	<i>S. aureus</i>	Bright y cols.(2002)

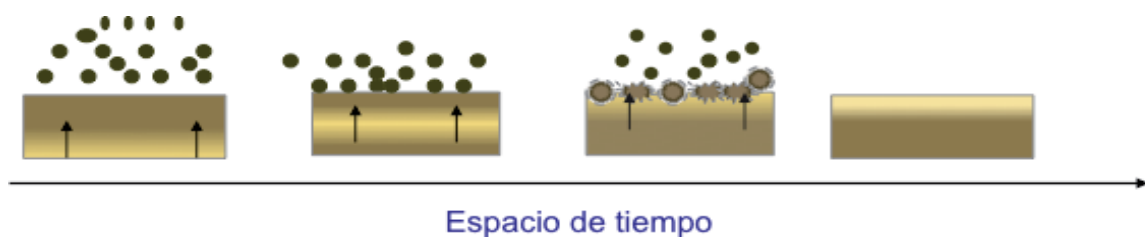
microorganismos evaluados, por el contrario, llegaron a aumentar su población aproximadamente en  $1,5 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ . Esto, en aplicaciones reales de uso, nos indicaría que la superficie sería fácilmente contaminable, volviéndose apta para la formación de biofilms y trayendo como consecuencia problemas de contaminación cruzada. Por otra parte, la adición de agentes biocidas consiguen

disminuir la carga microbiana y evitan la adherencia y posible formación de biofilms en condiciones de ensayo.

De acuerdo con la bibliografía consultada, el empleo de diferentes formas de presentación del metal plata puede ser de gran interés, ya que han demostrado una gran eficacia sobre diferentes clases de microorganismos (**Tabla 10**).

El efecto bactericida, descrito en el presente estudio, es causado por la migración de nanopartículas de agentes biocidas hacia la superficie del material evaluado. Dicha migración dependerá del biocida empleado y la estructura del material que lo contiene. Se cree que la microporosidad y la conformación de la matriz como tal, movilizan las nanopartículas hacia la superficie (**Figura 7**).

Las nanopartículas que migran hacia la superficie pueden atraer las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos y luego causar su ruptura, permitiendo así la desnaturalización de las proteínas y la muerte celular (Ruparelia y cols., 2008).



**Figura 7.** Representación de la migración del biocida impregnado en una matriz hacia la superficie inhibiendo la adhesión y formación de biofilms.

En nuestro estudio analizamos superficies tratadas con diferentes agentes antimicrobianos. Nuestros resultados indicaron que para los tipos de superficie biocida NpZnO, NpAg y la mezcla NpZnO + NpAg, en su concentración más elevada (850 ppm para las dos primeras, y

de 400 + 850 ppm para la mezcla); son significativamente diferentes de las demás concentraciones empleadas (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Eficacia antibacteriana de superficies duras de poliéster.

Tipo de superficie biocida	Concentración	Eficacia antibacteriana	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
NpZnO	400	0,12 <sup>c K</sup> ± 0,51	0,17 <sup>d J</sup> ± 0,58
	500	0,25 <sup>c J</sup> ± 0,71	0,47 <sup>c I</sup> ± 0,83
	650	0,83 <sup>b I</sup> ± 0,57	0,83 <sup>b H</sup> ± 0,65
	850	2,07 <sup>a H</sup> ± 1,01	1,19 <sup>a G</sup> ± 0,92
NpAg	400	2,35 <sup>d G</sup> ± 0,46	2,38 <sup>c F</sup> ± 0,41
	500	4,14 <sup>c F</sup> ± 0,44	2,89 <sup>b E</sup> ± 0,33
	650	4,67 <sup>b DE</sup> ± 0,40	3,62 <sup>a CD</sup> ± 0,43
	850	4,90 <sup>a BC</sup> ± 0,31	3,84 <sup>a C</sup> ± 0,37
NpAg + NpZnO	400+400	4,57 <sup>d E</sup> ± 0,36	3,63 <sup>c D</sup> ± 0,33
	500+400	4,75 <sup>c CD</sup> ± 0,37	3,77 <sup>c C</sup> ± 0,41
	650+400	4,89 <sup>b C</sup> ± 0,36	4,39 <sup>b B</sup> ± 0,41
	850+400	5,11 <sup>a A</sup> ± 0,31	4,80 <sup>a A</sup> ± 0,47

Recuentos bacterianos medios expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

<sup>a-d</sup> Valores medios en la misma columna con diferentes letras minúsculas, correspondiente a cada tipo de biocida, son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-K</sup> Valores medios en la misma columna con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Al realizar comparaciones entre los diferentes tipos de superficie biocida, se observó que el compuesto por la mezcla NpAg + NpZnO, en su concentración más alta, es la que posee una mayor eficacia antimicrobiana, con un valor de 5,11  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  para *E. coli* y de 4,80  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  para *S. aureus*. En sus concentraciones más bajas (400 + 400; 500 + 400 ppm) no es estadísticamente significativa respecto a la superficie biocida NpAg, en sus concentraciones más altas (650 y 850 ppm), con unos valores de

eficacia comprendidos entre 4,67 a 4,75  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  para *E. coli* y 3,62 a 3,84  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  para *S. aureus*. El tipo de biocida NpZnO muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a los biocidas NpAg y NpAg + NpZnO; puesto que posee los valores más bajos de eficacia.

La nano escala permite el aumento de la superficie de contacto del agente antimicrobiano con los microorganismos. Por ello, podemos encontrar aplicaciones en dispositivos médicos, como recubrimiento o como aditivo en la masa del material de una superficie antimicrobiana concreta (Kim y cols., 2007).

El efecto bactericida de las nanopartículas de metales ha sido atribuido a su gran volumen de superficie, debido a su pequeño tamaño, interactuando más de cerca con las membranas microbianas (Ruparelia y cols., 2008). Un material que contiene metales, al entrar en contacto con un medio ambiente húmedo, ayuda a su liberación. Esta capacidad para liberar el metal o permitir la migración hacia la superficie, depende de diversos factores, incluyendo las características de la matriz, tales como su composición, estructura, propiedades fisicoquímicas y la naturaleza del entorno en el que se utiliza.

Por otra parte, Cowan y cols. (2003), corroboraron, que al exponer las superficies inoculadas a humedad ambiente y dejándolo secar, la eficacia aumentaba, no por la acción del biocida, sino por la desecación generada en los microorganismos, por ello fue importante, en nuestro estudio, mantener en ambiente húmedo las superficies de ensayo. En cuanto a la velocidad de liberación, un

método para manipularla, es por medio del grado de desorden atómico. Así, un alto grado de desorden atómico implica una liberación rápida del biocida (Burrell y cols., 2004).

Algunos estudios han señalado que la carga positiva de los iones de plata es crucial en la actividad antimicrobiana, a través de atracciones electroestáticas entre la carga negativa de la pared celular de los microorganismos y la carga positiva de las nanopartículas (Kim y cols., 2007). Así también, algunas nanopartículas penetran dentro de la célula, teniendo en cuenta que el tamaño de partícula influye en el efecto bactericida, incluso también se ve afectado por la forma de las partículas (Ruparelia y cols., 2008). La adhesión de las nanopartículas de plata supone la desnaturalización de la membrana externa y ruptura de la membrana plasmática, causando así el agotamiento de ATP intracelular (Lok y cols., 2006).

Según Cowan y cols. (2003), al mezclar iones tanto de Ag como de Zn a diferentes concentraciones, para hacer un recubrimiento sobre discos de acero inoxidable, el Zn tenía la capacidad de estabilizar el producto y hacer una liberación más lenta de los iones de plata, permitiendo el uso de concentraciones de plata menores, según el tiempo de vida destinado al producto final. Con el recubrimiento de zeolita de plata, más la adición de zinc como estabilizante y su acción antimicrobiana, consiguieron reducciones, tanto de *E. coli* como de *S. aureus*, mayores de 5 log<sub>10</sub> desde 4 horas hasta 24 horas de exposición del inóculo a la superficie biocida. Li y Zhang (2009), en su estudio sobre adhesión bacteriana, encontraron que al incorporar en las superficies un compuesto antimicrobiano orgánico y un inorgánico, los diferentes mecanismos antibacterianos se

potenciaban, ya que los compuestos inorgánicos fueron más eficaces para la eliminación de bacterias.

Este efecto potenciador del Zn coincide con nuestros resultados, puesto que la mezcla de NpAg más la adición de NpZnO, supuso un incremento en la eficacia antimicrobiana. Este efecto fue más evidente cuanto más baja era la concentración de plata (400ppm + 400ppm) aumentando la eficacia en más de  $2 \log_{10} \text{ cm}^{-2}$ . Además, este tipo de mezcla de biocidas también hizo que la superficie actuara de forma más estable (**Tabla 11**).

En cuanto a la sensibilidad de los microorganismos a los diferentes tipos de superficie biocida, se determinó una mayor sensibilidad de la cepa de *E. coli*. Esta fue mayor de  $1 \log_{10}$  para el compuesto de NpAg, en las tres concentraciones más elevadas. En la concentración más baja (400 ppm) no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, relacionadas con la susceptibilidad de los dos microorganismos. Para la mezcla NpAg + NpZnO siguen existiendo diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la sensibilidad de *E. coli* frente a *S. aureus* en más de  $0,5 \log_{10}$  y para el tipo de superficie biocida de NpZnO, la susceptibilidad de los microorganismos no se hizo presente, al no existir diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Nuestros resultados, por tanto, muestran una mayor sensibilidad de *Escherichia coli*, en comparación con *Staphylococcus aureus*. La mayor sensibilidad de *Escherichia coli* en superficies ha sido descrita por DeVere y Purchase (2007), quienes observaron que *E. coli* era más sensible al tiempo de secado de las superficies que *S. aureus* y

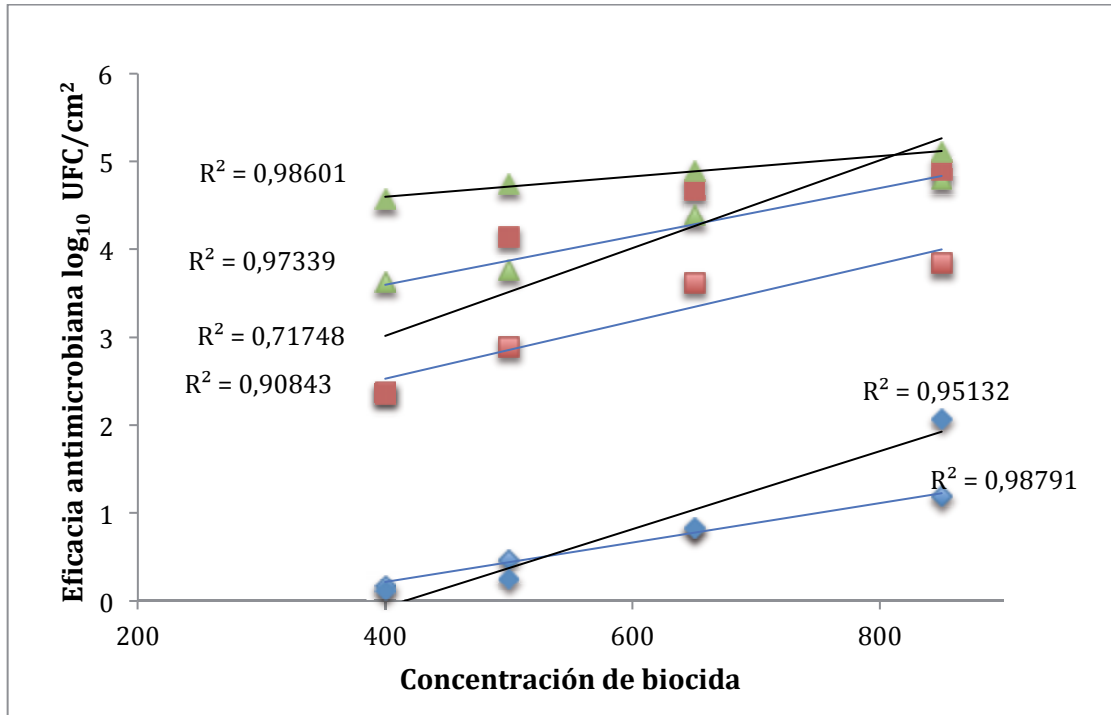
que el orden de sobrevivencia bacteriana era mayor en las superficies de vidrio, plástico, plástico antibacteriano y madera. Rai y cols., (2012) encontraron leves diferencias al exponer cultivos de *E. coli* y *S. aureus* al contacto con nitrato de plata, en forma iónica, tras realizar un estudio por microanálisis de difracción de Rayos X. Estos mismos autores sugirieron que la cepa de *S. aureus* tenía un sistema de defensa mucho más fuerte, comparado con *E. coli*. Al ser una bacteria Gram positiva posee una capa de péptidoglicano en la pared celular y no hay presencia de la región nuclear claramente visible en el centro de la célula, donde las moléculas de DNA están distribuidas al azar. De este modo, está capa externa de la pared celular protege la célula de la penetración de los iones de plata en el citoplasma. Otros estudios apoyan esta teoría, señalando que *S. aureus*, como bacteria Gram positiva, tiende a ser más resistente para muchos tipos de desinfectantes, en comparación de las bacterias Gram negativas (D'Aquino y Núñez, 1997, Luppens y cols., 2002a,b).

Por otra parte, Sondi y Salopek (2004), indicaron que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas sobre las bacterias Gram negativas era dependiente de la concentración de nanopartículas de plata y estaba fuertemente ligada a la formación de intersticios en la pared celular de la bacteria, que se acumulan, causando la lisis y muerte celular.

En nuestro estudio se comprobó, que el incremento de la concentración de biocida, traía, como consecuencia, una mayor eficacia antimicrobiana, tanto para la cepa de *E. coli* como para *S. aureus*, siendo directamente proporcional en cada uno de los casos, con una elevada correlación para los tipos de superficie biocida NpZnO ( $R^2= 0,95$  para *E. coli* y  $R^2= 0,99$  para *S. aureus*), NpAg ( $R^2=$



0,72 para *E. coli* y  $R^2 = 0.91$  para *S. aureus*) y la mezcla NpAg + NpZnO ( $R^2 = 0,99$  para *E. coli* y  $R^2 = 0.97$  *S. aureus*) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Comparación de eficacia antimicrobiana, contra — *E. coli* y — *S. aureus*; respecto a sus diferentes concentraciones en los tipos de superficie biocida ▲ NpAg + NpZnO, ■ NpAg y ◆ NpZnO.

Uno de los grandes problemas causados por los agentes antimicrobianos químicos es la multirresistencia a los fármacos (Multi Drugs Resistance, MDR). Varios microorganismos han evolucionado a través de muchas generaciones para generar multirresistencia (Kim y cols., 2007).

Por ello, se han realizado varios estudios acerca del efecto de las nanopartículas de plata contra las bacterias MRD, encontrando que poseen una eficiencia bactericida superior al compararla con la penicilina. Además, para efectos bactericidas sobre *E. coli*, se demostraron efectos sinérgicos al combinarlas con antibióticos como

la amoxicilina, convirtiéndose en un sistema eficaz para atacar bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ampicilina resistente, *Streptococcus pyrogenes* eritromicina resistente, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente y *Staphylococcus aureus* vancomicina resistente (Rai y cols., 2012). En este mismo sentido, se han realizado varios estudios para determinar los sistemas de resistencia de los microorganismos hacia algunos metales pesados (mercurio, arsénico, cadmio y cobre). No obstante, el mecanismo fundamental de resistencia o regulación de los genes a nivel molecular no ha sido muy bien entendido hasta el momento (Silver, 2003).

Aunque no exista ninguna legislación que indique la durabilidad exigible a un material antimicrobiano, los diferentes tipos de superficies biocidas han de mantenerse activas por períodos indicados en función de los intereses comerciales. Estos pueden ir desde 1 año hasta la totalidad de la vida del material.

En nuestro estudio se realizaron algunas pruebas de durabilidad por agotamiento, pero nuestros resultados no fueron concluyentes. Utilizamos dos formas para determinar el agotamiento de biocida en las muestras:

- i) por inmersión en agua
- ii) por reiteración de inoculación

Como microorganismo de prueba se utilizó *S. aureus*.

En el ensayo por inmersión, la superficie a evaluar se puso en 100 ml de agua a 40°C durante 24 h antes del análisis de eficacia, el cual se realizó de acuerdo con la norma ISO 22196:2011. Las lecturas finales nos indicaron que la eficacia antibacteriana de las superficies no se

vio afectada, por lo tanto el agotamiento del biocida en este tipo de superficies no se ve reflejado (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Agotamiento del biocida evaluado por inmersión.

Tipo de biocida	Concentración (ppm)	Eficacia antibacteriana	
		Tiempo 0	Tratamiento 24 h
Control	0	= 0,00	= 0,00
NpAg	1000	> 5,27	> 5,27
NpZnO	500	> 5,28	> 5,28
NpZnO	1000	> 5,28	> 5,28

Recuentos bacterianos expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

El ensayo por reiteración de inoculación, se realizó por repetición del análisis de eficacia, de acuerdo con la norma ISO 22196:2011, evaluando la misma muestra de superficie hasta un total de 5 inoculaciones. Las lecturas finales nos indicaron que la eficacia antimicrobiana no se modifica y se mantiene a través del tiempo (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Agotamiento de biocida evaluado por reiteración de inoculación.

Tipo de biocida	Concentración (ppm)	Eficacia antibacteriana	
		Tiempo 0	5ª inoculación
Control	0	= 0,00	= 0,00
NpAg	1000	> 5,27	> 5,07
NpZnO	500	> 5,28	> 5,03
NpZnO	1000	> 5,28	> 5,62

Recuentos bacterianos expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

Es necesario realizar un estudio experimental más robusto para poder evaluar y certificar la durabilidad de la actividad antimicrobiana que puedan presentar estos materiales. Esto permitiría poder ajustar mejor sus concentraciones de acuerdo al periodo de tiempo determinado para su uso.



**V. Propiedades antimicrobianas y antifúngicas de biocidas inorgánicos en superficies poliméricas**



## 1. Materiales y métodos

Se realizó el análisis de matrices poliméricas con propiedades antifúngicas y antibacterianas conteniendo biocidas en diferentes concentraciones. Para su estudio se utilizaron las normas JIS Z 2801:2000 (*Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy*) e ISO 846:1997 (*Plastics- Evaluation of the action of microorganisms*), realizando todos los análisis por triplicado.

### 1.1. Preparación de las superficies de estudio

Las superficies poliméricas (caucho flexible y caucho rígido) poseen un área de 4,0 x 4,0 cm<sup>2</sup> y su grosor es de 0,2 cm. Los polímeros de caucho flexible fueron tratados con óxidos metálicos y un biocida órgano-metálico a diferentes concentraciones, tanto en estado libre como encapsulado, y compatible con el catalizador de vulcanizado del caucho. Estos biocidas se muestran en la **Tabla 14**. Los polímeros de caucho rígidos fueron tratados con biocida órgano-metálico en diferentes concentraciones, tanto en estado libre como encapsulado, y se muestran en la **Tabla 15**.

**Tabla 14.** Compuestos biocidas y su concentración utilizados en el tratamiento de las superficies de caucho flexible.

Superficies	Tipo de biocida y concentración
BOC	ZnO + OM + catalizador
BO	ZnO + OM
BC	ZnO + catalizador
BONe	ZnO + OM concentrado
B	ZnO
BOeC	ZnO + OM encapsulado + catalizador

**Tabla 15.** Compuesto biocida y su concentración utilizada en el tratamiento de las superficies de caucho rígido.

Superficies	Tipo de biocida y concentración
B2O	2% organo-metálico
B3O	3% organo-metálico
B2Oe	2% organo-metálico encapsulado
B3Oe	3% organo-metálico encapsulado

Las superficies fueron lavadas por inmersión en isopropanol al 70% durante 10 minutos para eliminar impurezas y reducir la carga microbiana existente, se colocaron en placas Petri para ser llevadas, posteriormente, a secado en estufa de aire forzado durante 1,5 horas a 60°C, para eliminar el exceso de isopropanol. Se prepararon tres superficies tratadas de estudio, de cada tipo de biocida, y tres muestras control sin biocida para cada uno de los ensayos (antibacteriano y antifúngico).

### 1.2. Cepas fúngicas

Las cepas fúngicas utilizadas en el ensayo fueron *Aspergillus niger* CECT 2807, *Paecilomyces variotti* CECT 20213, *Gliocadium virens* CECT 2460, *Chaetomium globosum* CECT 2701, las cuales fueron recuperadas de liofilizados, rehidratando en 9,0 ml de agua de peptona tamponada (BPW, *Buffered Peptone Water*, bioMérieux®, Marcy l'Etoile, Francia) e incubadas durante tres días a 30°C +/- 1°C, tiempo durante el cual las cepas fúngicas crecen formando una capa sobre la superficie del líquido. De este modo se comprobó que la cepa fúngica estaba activa. De estos tubos se realizaron siembras de las cepas fúngicas por duplicado en agar de extracto de malta (MEA;



Biokar Diagnostics, Francia) y se incubaron a 30°C  $\pm$  1°C en ambiente húmedo, durante 5 a 7 días, observando su esporulación.

Como cepas bacterianas se utilizaron las cepas de referencia de *E. coli* CECT 515 y *S. aureus* ATCC 6538. Las cepas liofilizadas fueron rehidratadas en 9,0 ml de agua de peptona tamponada, e incubadas a 37°C durante 18 – 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron, por el método de estría en superficie en Agar Tripticasa de Soja, e incubadas a 37°C durante 18 – 24 h. Se prepararon cultivos stock en tubos de TSA inclinado, siendo incubados a 37°C durante 24 h. Posteriormente se almacenaron a 4°C, por un periodo máximo de un mes.

### 1.3. Suspensión de esporas para ensayo

Para preparar la suspensión de esporas para ensayo (SEE) se utilizó la siguiente solución de lavado:

NaNO <sub>3</sub>	2,00g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,70g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30g
KCl	0,50g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,50g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01g
Tween 80	0,10g
Glucosa	30,00g
H <sub>2</sub> O	1000ml

Se realizaron dos lavados con 5ml de la anterior solución, a cada uno de los cultivos fúngicos en la placa Petri, agitando con movimientos

circulares, durante un minuto, para humectar completamente la superficie del hongo. El sobrenadante se pasó por un filtro sinterizado de vidrio número 2 (con un tamaño de poro comprendido entre 40 y 100  $\mu\text{m}$ ) a fin de eliminar los fragmentos de micelio. Se realizaron observaciones microscópicas del número de esporas de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  verificando que la concentración de microorganismos se encontraba en un rango de  $1 \times 10^5$  hasta  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , para cada una de las cepas fúngicas. La concentración se determinó, a partir de una alícuota, de cada una de las suspensiones fúngicas. Cada alícuota se colocaba sobre un portaobjetos. Se realizaron observaciones microscópicas con el objetivo de 40X, con el fin de determinar el número de esporas presentes. Para ello, se observaron 10 campos al azar, para estimar la cantidad de células viables por mililitro. Finalmente se combinó igual volumen de las cuatro suspensiones para obtener la SEE para inocular, con igual concentración de esporas de cada hongo.

#### ***1.4. Inoculación de las superficies de estudio con SEE***

Cada una de las muestras se colocó en una placa de Petri, con el medio de cultivo MEA, y se procedió a inocularlas pipeteando 0,1 ml de la solución de esporas (SEE) sobre la superficie de la muestra y sobre el agar. Como control de crecimiento, de la mezcla de cepas fúngicas, se realizó una inoculación con 0,5 ml en superficie, en una placa Petri con el medio MEA, y se extendió con asa de Digrafsky. Las placas se llevaron a incubación a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. La placa de control de crecimiento se verificó al tercer día y, para las muestras estudiadas, la duración fue de cuatro semanas, durante las cuales se realizaron observaciones periódicas.

### 1.5. Evaluación del crecimiento

Para evaluar el crecimiento fúngico se examinaron las placas a simple vista y bajo microscopio, para luego puntuar de acuerdo a la escala que se presenta en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Valoración de la intensidad de crecimiento fúngico.

Intensidad de crecimiento	Evaluación del crecimiento fúngico
0	No hay crecimiento aparente bajo el microscopio.
1	No hay crecimiento visible a simple vista , pero visible bajo el microscopio
2	Crecimiento visible a simple vista, cubriendo hasta el 25% del inóculo
3	Crecimiento visible a simple vista, cubriendo hasta el 50% del Inoculo
4	Crecimiento considerable, cubriendo más del 50% del inóculo y cantos de la superficie
5	Crecimiento fuerte, cubriendo la superficie entera

### 1.6. Evaluación de las superficies estudiadas

Teniendo en cuenta la valoración de la intensidad de crecimiento, se evalúa el efecto fungistático de las muestras según la escala dada en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Valoración del efecto fungistático del material.

Intensidad de crecimiento	Evaluación del crecimiento
0	Efecto fungistático fuerte
0+zona de inhibición	Efecto fungistático fuerte , extendiéndose en la zona alrededor de la muestra por difusión
1	El material no es completamente fungistático
2 al 5	Efectividad decreciente hasta ausencia completa del efecto fungistático

### ***1.7. Ensayo para determinar la eficacia antibacteriana***

Para determinar la eficacia antibacteriana de las superficies muestra se realizó el estudio según los parámetros dados en el capítulo IV, apartado 1.9. Las superficies poliméricas fueron tratadas previamente por inmersión en isopropanol al 70% durante 10 minutos y luego secadas en campana de flujo laminar. Se inocularon con 0,4 ml de la SBE de cada una de las cepas, se cubrieron con la película plástica y se incubaron a 35°C durante 18-24 h en ambiente húmedo. La recuperación bacteriana se realizó por agitación con perlas de vidrio (8 gr de perlas de 2mm de diámetro) en 10 ml de solución neutralizante. Los frascos fueron agitados enérgicamente en vórtex durante 1 minuto y, a continuación, de la suspensión obtenida se realizaron diluciones decimales en TSS. Las diluciones fueron sembradas y evaluadas con el sistema TEMPO, obteniendo recuentos bacterianos expresados en UFC cm<sup>-2</sup>.

### ***1.8. Ensayo para determinar la eficacia antibacteriana de los tipos de superficies biocida a través del tiempo***

Se realizaron pruebas de durabilidad para determinar la eficacia antibacteriana, a través del tiempo, de las superficies muestra que presentaron una mayor eficacia en el tiempo inicial. Las superficies fueron tratadas con ciclos de lavado en lavadoras domésticas estándar (Fagor, Mondragón, España), con detergente Persil (Henkel, Alemania) en polvo al 1% y aplicando o no temperatura al agua de lavado. Después del tratamiento de lavado, las muestras fueron esterilizadas mediante su inmersión en isopropanol al 70% durante 10 minutos y se secaron en estufa de aire forzado durante 1,5 horas, para luego ser tratadas como se mencionó en el presente capítulo

(apartado 1.4) para evaluar el efecto antifúngico y (apartado 1.7) para determinar la eficacia antibacteriana.

### **1.9. Análisis estadístico**

Los datos de los recuentos bacterianos fueron transformados a unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ). Para evaluar el efecto fungistático de los tipos de superficie biocida de caucho flexible, analizaron 180 muestras (5 ensayos con  $n=36$ ). En la evaluación del efecto fungistático de los tipos de superficie biocida de caucho rígido, se analizaron 120 muestras (5 ensayos con  $n=24$ ). Para evaluar la eficacia antibacteriana de los tipos de superficie biocida de caucho flexible, se analizaron 180 muestras (5 ensayos con  $n=36$ ). En la evaluación de la eficacia antibacteriana de los tipos de superficie biocida de caucho rígido, se analizaron 120 muestras (5 ensayos con  $n=24$ ).

Para evaluar el efecto fungistático de los tipos de superficie biocida de caucho, tanto flexible como rígido, bajo tratamientos de durabilidad, se analizaron 108 muestras (4 ensayos con  $n=27$ ). Para evaluar la eficacia antibacteriana de los tipos de superficie biocida, tanto de caucho flexible como rígido, bajo tratamientos de durabilidad, se analizaron 216 muestras (4 ensayos con  $n=54$ ).

Para determinar las diferencias significativas entre valores medios, se realizó análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple con interacción de Tukey con un  $p \leq 0,05$ . Los análisis se realizaron con el programa informático R versión 3.1.0.

## 2. Resultados y discusión

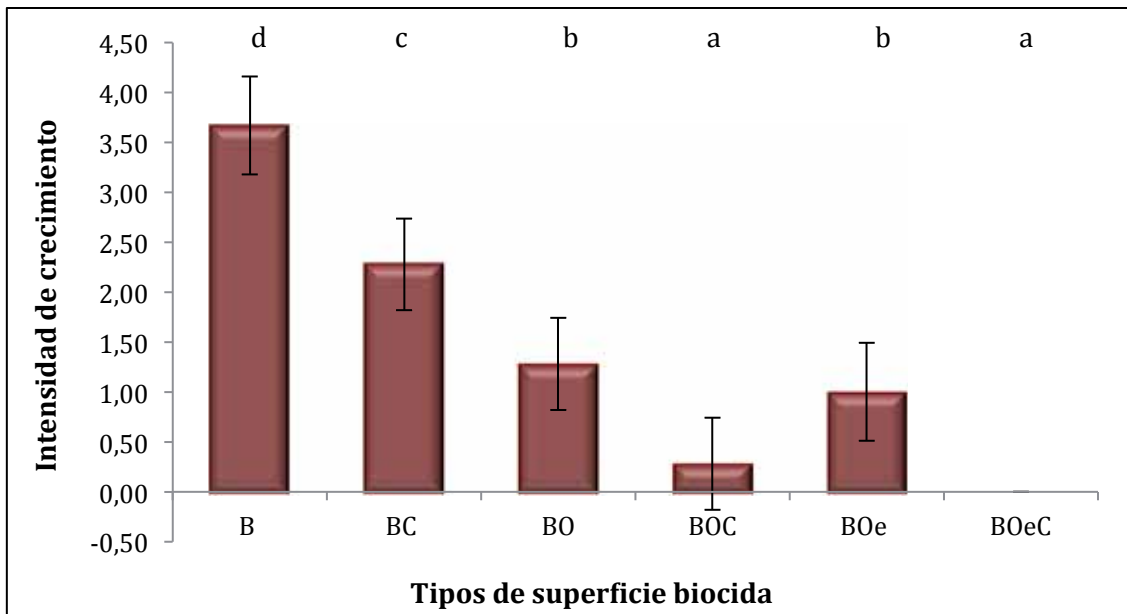
### 2.1. Suspensión de esporas y bacterias para ensayo

La concentración de la suspensión de esporas para inocular las superficies con biocida se estimó en un rango de 5,10 a 5,88  $\log_{10}$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  determinados por microscopía. La concentración de la suspensión bacteriana para inocular las superficies biocidas se hallaron en un rango de 5,45 y 5,90  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ , tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, determinados por lectura en sistema TEMPO. Las concentraciones de SBE se determinaron dentro del rango exigido por la norma JIS Z 2801:2000 (*Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy*) con la que se realizó el ensayo.

### 2.2. Efecto fungistático de los tipos de superficies con biocidas

La evaluación del crecimiento de los hongos sobre las superficies es un parámetro muy demandado, puesto que su crecimiento supone una alteración de las características organolépticas de multitud de materiales. Para valorar la intensidad de crecimiento sobre las superficies, se tuvo en cuenta la tabla de valores que determina el efecto fungistático del material evaluado (**Tabla 16**). Como resultado se obtuvo que en las superficies que contienen biocida órgano-metálico a base de zinc (BO, BOC, BOe y BOeC) se apreció una mayor respuesta fungistática (**Figura 9**).

Los resultados también nos indican que la actividad fungistática de las superficies biocidas puede ser atribuida a la migración del biocida hacia la superficie ya que en la muestra control no se presenta tal actividad.



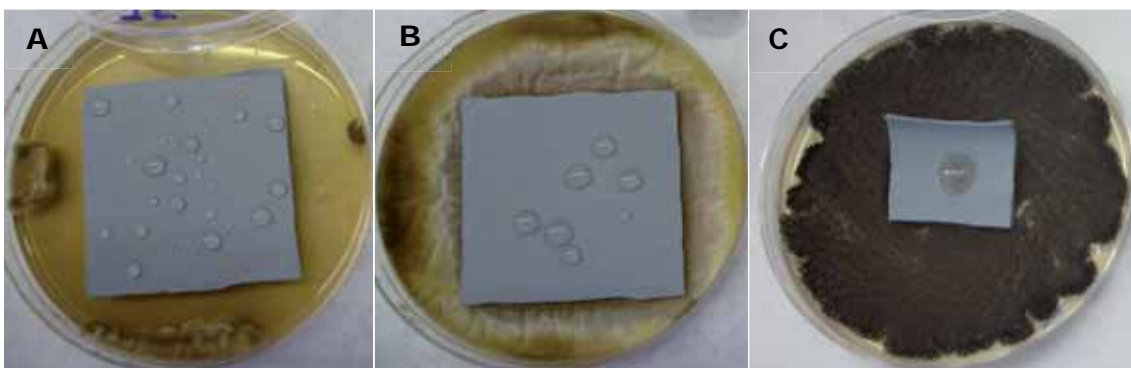
**Figura 9.** Efecto fungistático de los tipos de superficies biocida de caucho flexible.  
<sup>a-d</sup> Valores medios con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Al observar el crecimiento fúngico sobre los diferentes tipos de superficie biocida se determinó, que las superficies que contenían compuesto órgano-metálico en su estructura, fueron más eficientes que aquellos que no lo poseían. La eficacia de los materiales que no contenían biocida órgano-metálico fue deficiente y presentaron crecimiento fúngico sobre la superficie, al observar el inoculo bajo el microscopio. Algún estudio al respecto indica, que los iones metálicos del biocida adheridos a los microorganismos, penetran dentro de la estructura de los hongos y destruyen la membrana celular o se combinan con la proteína, la cual induce a la muerte celular (Gong y cols., 2012).

De los diferentes tipos de superficie biocida, basados en caucho flexible, se observó tres estados bien definidos. La superficie BOeC presentó una zona de inhibición de crecimiento de los hongos alrededor de la muestra evaluada, esta zona de inhibición se genera debido a la difusión de su principio activo. La capacidad migratoria del biocida se encuentra bien definida y en la superficie de la muestra

no se aprecia crecimiento fúngico (**Figura 10A**). Con respecto al tipo de superficie biocida BOC se observó cierto halo de inhibición con respecto a la generación de esporas, ya que hubo crecimiento de los hongos a su alrededor, sobre la superficie del agar, pero no consiguieron formar esporas. Observada al microscopio se apreció un atenuado crecimiento sobre la superficie de la muestra sin llegar a formar esporas (**Figura 10B**). En el tipo de superficie biocida B se aprecia a simple vista el crecimiento y gran esporulación sobre el agar, al igual que hay crecimiento y formación de esporas fúngicas sobre la zona del inóculo, lo que indica que la superficie no es del todo fungistática (**Figura 10C**).

Es importante aclarar que dicha difusión no siempre es positiva y podría considerarse un defecto, ya que la migración del biocida sería tan rápida que la vida útil de la superficie reduciría su actividad a un espacio de tiempo demasiado corto. Al mismo tiempo, dicha migración podría afectar a la composición de los alimentos, en caso de ser empleado en contacto con ellos, puesto que el residuo químico migrado acabaría en el alimento con el que entrase en contacto, después de un tiempo determinado.



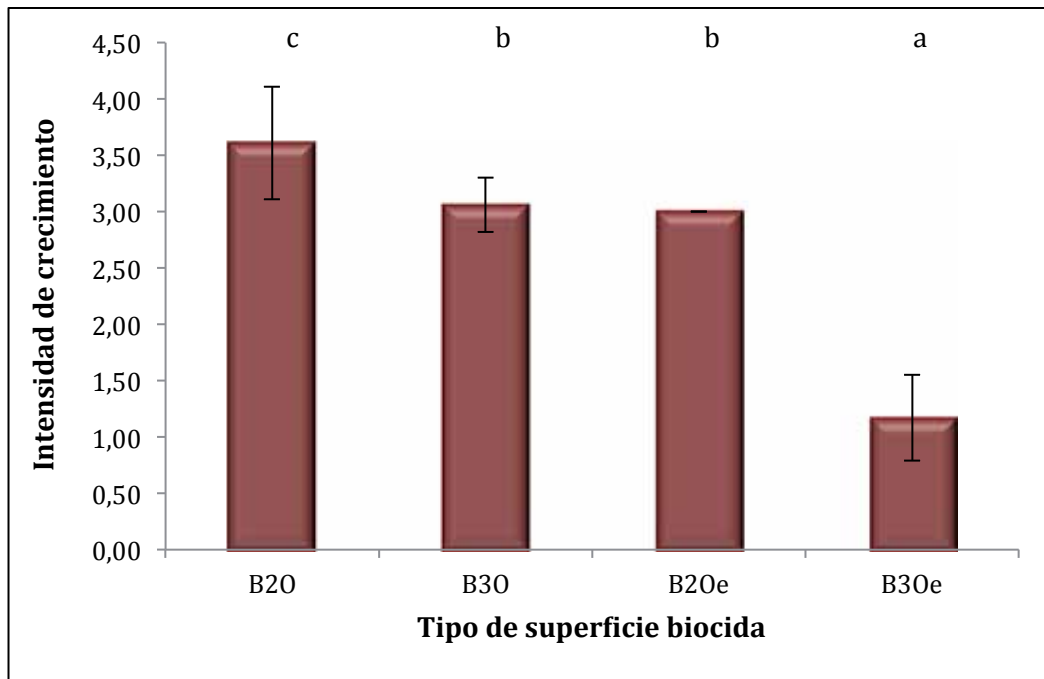
**Figura 10.** Tipos de superficie biocida de caucho flexible 10A) superficie biocida tipo BOeC. 10B) superficie biocida tipo BOC. 10C) superficie biocida tipo B.



Cao y cols. (2009), evaluaron zonas de inhibición de superficies de polimetilmetacrilato, sulfadiazina metil metacrilato y películas poliméricas de sulfadiazina de plata. Estos autores concluyeron que el efecto antifúngico se producía por lo que denominaron “muerte por contacto” ya que no se presentaron zonas de inhibición. Al realizar la recuperación de microorganismos, se verificó que la película polimérica de sulfadiazina de plata tenía solamente recuentos del rango de  $10^0$ UFC  $\text{cm}^{-2}$ , mientras para las otras superficies estaban en el orden de  $10^4$ UFC  $\text{cm}^{-2}$ . Esto indicó que casi ningún agente antimicrobiano monomérico (ej., grupos SD/ASD e iones de plata) lixivió fuera de la película de muestra. Solamente los microbios que entraron en contacto directo con la muestra de sulfadiazina de plata polimérica fueron eliminados y las células circundantes no fueron afectadas. En aplicaciones reales, esta característica de no lixiviación proporciona varias ventajas. La ventaja más obvia sería mejorar la durabilidad de los efectos antimicrobianos, pero también hay que considerar la protección de los alimentos o del medio ambiente.

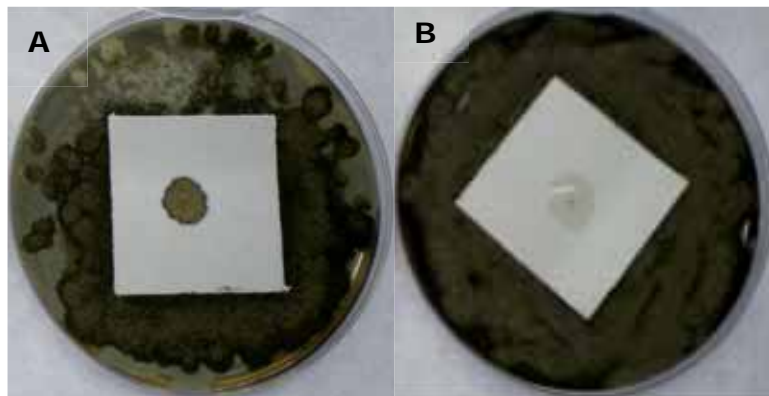
Por otra parte, al evaluar las superficies biocidas de caucho rígido encontramos que no fueron del todo fungistáticas y se observó crecimiento de hongos y generación de esporas a simple vista sobre la superficie (**Figura 11 y Figura 12A**). El tipo de superficie biocida B3Oe ofreció una cierta eficacia, aunque se observó un crecimiento leve sobre la zona del inóculo al observarlo bajo el microscopio (**Figura 12B**).

Al comparar el tipo de superficie biocida BOe, de caucho rígido, y las superficies de caucho flexible que contienen el mismo biocida en menor concentración (2%), podemos apreciar que la matriz influye en su migración, convirtiéndose en menos efectiva y solo igualando su actividad al subir la concentración (3%) y adicionalmente encapsular el biocida.



**Figura 11.** Efecto fungistático de los tipos de superficies biocida de caucho rígido.

<sup>a-c</sup> Valores medios con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



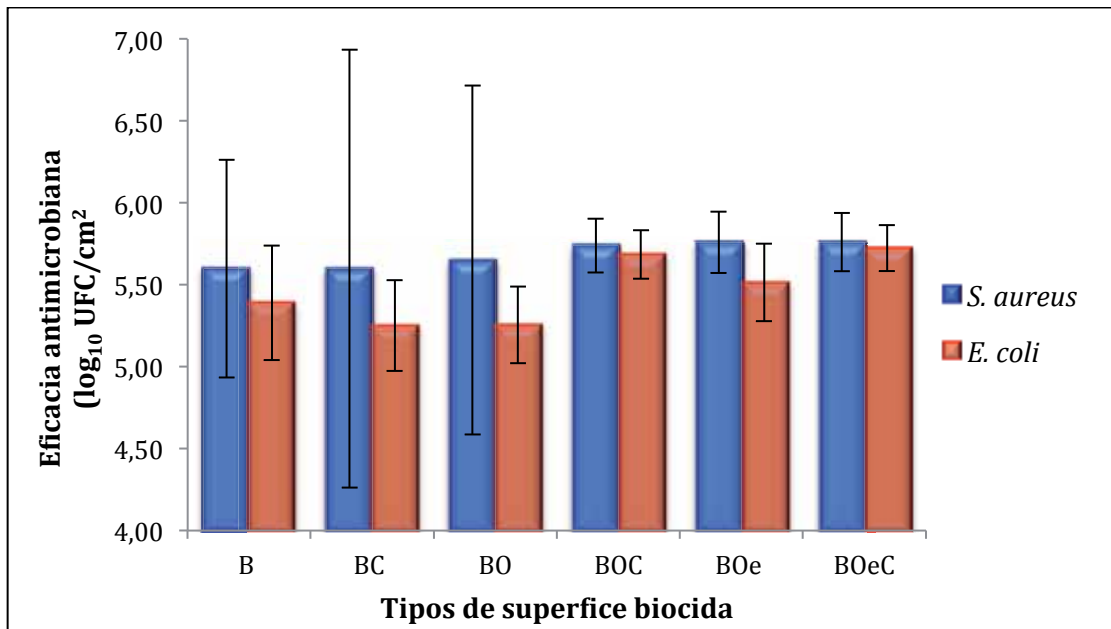
**Figura 12.** Superficies de caucho rígido 12A) superficie biocida tipo B20. 12B) superficie biocida tipo B30e.

Para que un antimicrobiano funcione debe tener la capacidad de migrar a la superficie (Seil y Webster, 2011), puesto que en caso contrario, una vez consumido el biocida superficial, se perdería la eficacia. Sin embargo, se ha de tener en cuenta la compatibilidad con la matriz en la cual se encuentra impregnado. Por este motivo se

podrían haber encontrado diferencias al aplicar el mismo biocida al caucho rígido y al caucho flexible.

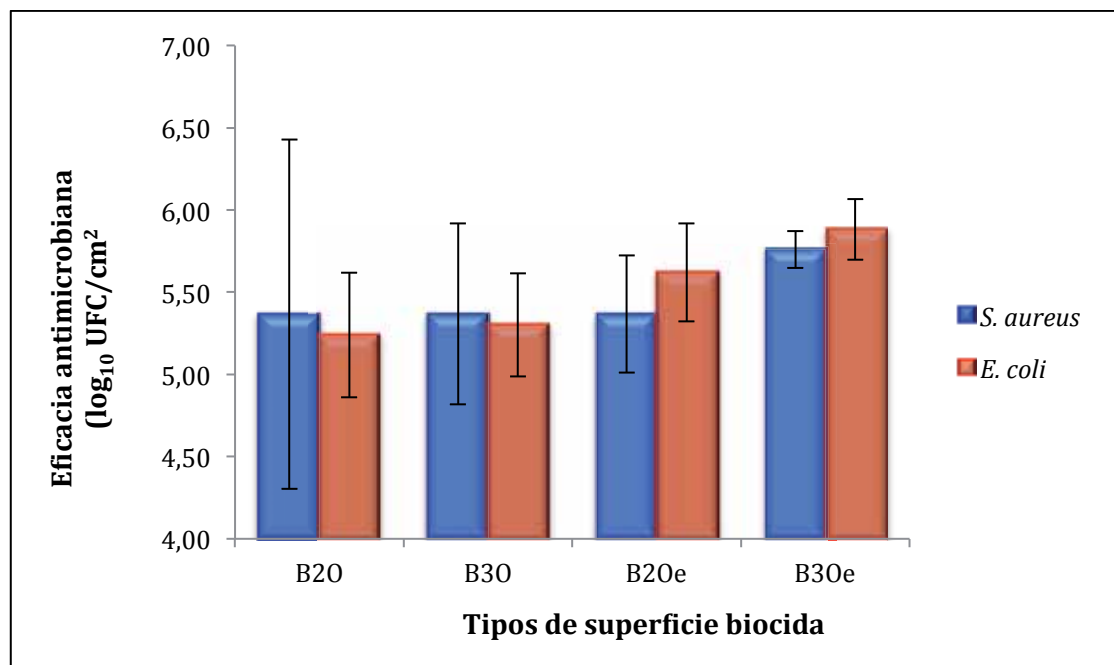
### 2.3. Eficacia antibacteriana de los tipos de superficies biocida

Al evaluar la eficacia antibacteriana de las superficies biocidas de caucho rígido encontramos valores de reducción en un rango que va de 5,25 a 5,76  $\log_{10} \text{ cm}^{-2}$ , tanto para la cepa de *E. coli* como para *S. aureus*. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de superficie. En cuanto a la sensibilidad de las cepas a las superficies biocidas, se observó que es más sensible la cepa de *E. coli* comparada con *S. aureus* pero sin llegar a existir diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Eficacia antibacteriana de las superficies biocidas de caucho rígido. Los valores medios no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Al evaluar la eficacia antibacteriana de las superficies biocidas de caucho flexible hallamos valores de reducción que van desde 5,24 hasta 5,88  $\log_{10} \text{ cm}^{-2}$ , tanto para la cepa de *E. coli* como para *S. aureus*, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de superficie. En cuanto a la sensibilidad de las cepas a las superficies biocidas se observó que es más sensible la cepa de *S. aureus*, comparada con *E. coli*, en las superficies B20e y B30e, pero sin llegar a existir diferencias estadísticamente significativas (**Figura 14**).



**Figura 14.** Eficacia antibacteriana de las superficies biocidas de caucho flexible. Los valores medios no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

El hecho de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, se debe a la elevada variabilidad que detectamos en las muestras de caucho rígido B, BC y BO (**Figura 13**) y las muestras de caucho flexible B20 y B30 (**Figura 14**), lo que no permite ver estas diferencias.

Estos resultados nos indican que los tipos de superficie estudiada y su compuesto biocida, no eran del todo estables y homogéneos, puesto que algunas de ellas (BOC, BOe, BOeC, B2Oe y B3Oe) presentaron una variabilidad inferior al 22%, mientras que otras (B, BC, BO, B2O y B3O) superaron el 50%. En consecuencia, las muestras BOC, BOe, BOeC, B2Oe y B3Oe, presentan una migración constante del biocida empleado, mientras que las muestras B, BC, BO, B2O y B3O, poseen una migración variable. Desde un punto de vista práctico, un grupo de muestras homogéneas, serán más fácilmente comercializables, al poder demostrar la eficacia del biocida y su constante actividad durante el período de tiempo establecido. En sentido contrario, las que presentaron variabilidad, difícilmente podrán ser comercializadas, puesto que no existirá la seguridad de su efecto a lo largo del tiempo. Esta situación es especialmente evidente en el caso de *S. aureus*.

Las nanopartículas de ZnO son efectivas tanto para las bacterias Gram negativas como para las Gram positivas, también ejercen actividad antibacteriana contra esporas que son resistentes a las altas presiones y alta temperatura (Sawai, y cols., 2004; Zhang, 2007). Es importante tener en cuenta la concentración y el área de superficie del compuesto biocida, ya que de esto depende la eficacia antimicrobiana, mientras que la forma y su estructura tienen poco efecto (Yamamoto y cols., 1998). El efecto citotóxico de las nanopartículas de ZnO se debe a su acción sobre la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de los hongos y de las bacterias, causando su rotura, que como resultado conlleva al drenaje del contenido citoplasmático (Sharma y cols., 2010).

Kim y cols. (2007) señalaron que las bacteria Gram positivas (*S. aureus*) son más resistentes a las nanopartículas de plata,

comparadas con las Gram negativas (*E. coli*). Por otra parte, Ruparelia y cols. (2008), al evaluar la eficacia de agentes biocidas metálicos sobre cuatro cepas diferentes de *E. coli* y tres cepas de *S. aureus*, encontraron que algunas cepas de *E. coli* son más resistentes al efecto biocida; contradiciendo de esta manera muchos estudios en los cuales se han realizado comparaciones de resistencia empleando una sola cepa de cada microorganismo. Esto puede ser debido a que la membrana externa de las bacterias Gram negativas puede actuar, en algunos casos, como una barrera que limita la entrada de muchos tipos de agentes antibacterianos (McDonnell y Russell, 1999).

Con respecto a la sensibilidad hallada en este estudio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre microorganismos para cada tipo de superficie biocida, por lo que podríamos decir que la sensibilidad de los microorganismos (tanto Gram positivos, como Gram negativos e incluso los hongos) dependerá de muchos factores como son:

- la composición del biocida empleado,
- la concentración del biocida,
- los componentes de la matriz donde se añade,
- las condiciones de ensayo,
- las diferentes cepas de microorganismos representativos de cada grupo o especie.

Una de las observaciones que se pusieron de manifiesto en nuestro estudio fue que, tanto con hongos como con bacterias, algunas superficies que no habían presentado eficacia frente a los hongos, sí que la presentaban frente a las cepas bacterianas. La resistencia de

los hongos a dichas superficies biocidas fue mayor, debido a su característica de eucariotas, lo que les confiere una mayor capacidad de defensa y reparación de las lesiones provocadas por los biocidas a las concentraciones estudiadas.

#### ***2.4. Eficacia de los tipos de superficies biocida a lo largo del tiempo.***

Al realizar la prueba de durabilidad, mediante su tratamiento con ciclos de lavado y aplicando temperatura, se busca como objetivo forzar la migración del biocida. Esto dará una idea de la vida útil de la superficie. También permite conocer cuál es la temperatura que pueden soportar las superficies para mantenerse en estado activo.

##### ***2.4.1. Efecto fungistático de las superficies biocidas bajo tratamientos de durabilidad***

Los resultados obtenidos en la prueba de durabilidad, teniendo en cuenta la intensidad de crecimiento fúngico, indican que las superficies de estudio mantienen su eficacia por encima de los 1000 ciclos de lavado a temperatura ambiente (20°C). A medida que se incrementa el valor de la temperatura, la eficacia va en detrimento, ya que la migración del biocida de la superficie del material al medio circundante se ve estimulada (**Tabla 18**).

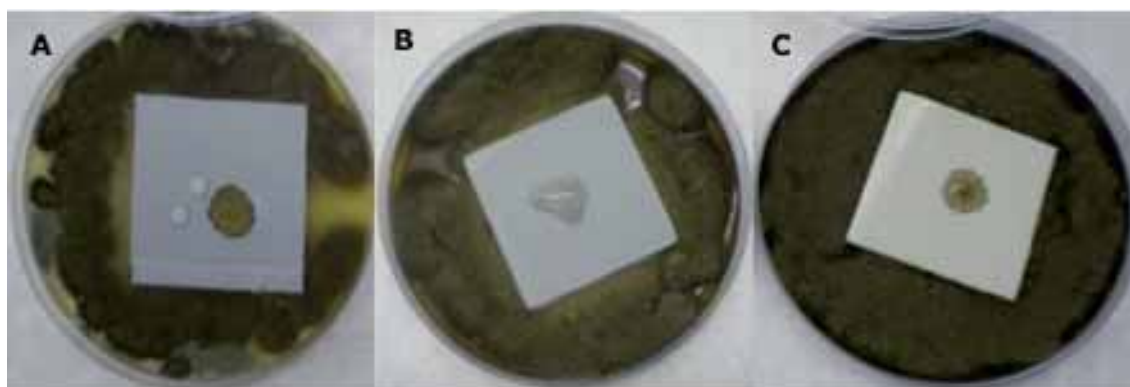
En el primer tratamiento (1000 ciclos de lavado a 20°C) y segundo tratamiento (700 ciclos de lavado a 60°C) el efecto fungistático no presenta diferencias estadísticamente significativas, aunque ya exista una mayor eficacia del tipo de superficie biocida BOeC. En el tercer

tratamiento (350 ciclos de lavado a 90°C) las diferencias del efecto fungistático se hacen evidentes, con diferencias estadísticamente significativas, siendo el tipo de superficie biocida BOeC la más efectiva, seguida de la B3Oe y por último la BOC; esta última pierde completamente su efecto fungistático al ser sometida al tercer tratamiento (**Figura 15**).

**Tabla 18.** Intensidad de crecimiento fúngico de las superficies biocida bajo tratamientos de durabilidad.

Tipo de superficie biocida	Tratamiento		Efecto fungistático
	Ciclos de lavado	Temperatura °C	
BOC	1000	20	1 <sup>a</sup>
BOeC			1 <sup>a</sup>
B3Oe			1 <sup>a</sup>
BOC	700	60	2 <sup>a</sup>
BOeC			1 <sup>a</sup>
B3Oe			2 <sup>a</sup>
BOC	350	90	5 <sup>c</sup>
BOeC			1 <sup>a</sup>
B3Oe			3 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Valores medios con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15.** Tipos de superficie biocida después de 350 ciclos de lavado a 90°C, 15A) superficie de caucho rígido B3Oe, 15B) superficie de caucho flexible BOeC 15C) superficie de caucho flexible BOC.



#### 2.4.2. Eficacia antibacteriana de las superficies biocida bajo tratamientos de durabilidad

En el primer tratamiento (1000 ciclos de lavado a 20°C) se observa una pequeña reducción de la eficacia bactericida, comparada con los resultados a tiempo cero, aunque el tipo de superficie biocida BOeC incrementó su eficacia. Estas diferencias, tanto de reducción como de incremento, no fueron estadísticamente significativas.

Al comparar la eficacia de los tipos de superficie biocida, después del primer tratamiento, la superficie biocida BOeC es significativamente más efectiva en la cepa de *E. coli* que las superficies BOC y B3Oe. Para la cepa de *S. aureus* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el segundo tratamiento (700 ciclos de lavado a 60°C), en cuanto a la eficacia de los tres tipos de superficie evaluadas, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la cepa de *S. aureus*. Para la cepa de *E. coli*, se observó un aumento significativo de la eficacia en el tipo de superficie biocida BOeC. En el tercer tratamiento (350 ciclos de lavado a 90°C) se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la eficacia, siendo más efectivo el tipo de superficie BOeC, seguido de B3Oe y por último el BOC (**Tabla 19**).

A pesar de la reducción en la eficacia bactericida, comparada con el tiempo cero, la acción biocida continúa siendo elevada en los tres tipos de superficies, puesto que se estipula que una superficie es activa cuando tiene una reducción mayor de 2 log<sub>10</sub>., de acuerdo a la norma JIS Z 2801:2000 (*Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy*).

Estas diferencias en la eficacia antimicrobiana, después del tratamiento de durabilidad, nos hace suponer que el biocida encapsulado tiene una mayor estabilidad, se libera más

controladamente y así mantiene su actividad biocida a través del tiempo.

**Tabla 19.** Comparación de la eficacia bactericida de las superficies biocida para cada uno de los tratamientos de durabilidad.

Tipo de superficie biocida	Tratamiento		Eficacia bactericida	
	Ciclos de lavado	temperatura °C	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
BOC	1000	20	5,10 <sup>a</sup> ± 0,55	5,40 <sup>a</sup> ± 0,71
BOeC			5,90 <sup>b</sup> ± 0,19	5,65 <sup>a</sup> ± 0,41
B3Oe			5,35 <sup>a</sup> ± 0,18	5,46 <sup>a</sup> ± 0,16
BOC	700	60	4,95 <sup>a</sup> ± 0,53	4,95 <sup>a</sup> ± 0,62
BOeC			5,65 <sup>b</sup> ± 0,23	5,38 <sup>a</sup> ± 0,20
B3Oe			5,14 <sup>a</sup> ± 0,16	5,21 <sup>a</sup> ± 0,17
BOC	350	90	3,95 <sup>a</sup> ± 0,64	3,67 <sup>a</sup> ± 0,69
BOeC			5,32 <sup>c</sup> ± 0,15	5,36 <sup>c</sup> ± 0,18
B3Oe			4,74 <sup>b</sup> ± 0,12	4,82 <sup>b</sup> ± 0,21

Recuentos bacterianos medios, expresados en log<sub>10</sub> UFC cm<sup>-2</sup>.

<sup>a-c</sup> Valores medios en la misma columna con diferentes letras minúsculas para cada uno de los tratamientos son significativamente diferentes (p<0,05).

Los resultados obtenidos de los ensayos de durabilidad, para bacterias, nos indican que el incremento de la temperatura disminuye la eficacia bactericida de las superficies evaluadas. Este fenómeno se podría explicar por el efecto que causa la temperatura en la migración del biocida hacia el exterior, más conocido como lixiviación. A medida que se fue aumentando la temperatura (60°C y 90°C), pese a la disminución de los ciclos de lavado, la eficacia se vio disminuida. La propiedad de no lixiviar puede ayudar a eliminar la preocupación sobre el uso de agentes antimicrobianos convencionales (como es el caso de los antibióticos), puesto que estos pueden entrar en ambientes circundantes causando complicaciones indeseables (Cen y cols., 2003; Cao y cols., 2009).

Comparando la eficacia bactericida de cada tipo de superficie biocida, después de los diferentes tratamientos de durabilidad, se obtuvo que para la superficie biocida BOC, al aplicar el primer y segundo tratamientos, no presentó diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a su acción frente a las dos cepas bacterianas. Sin embargo, al aplicar el tercer tratamiento la eficacia disminuyó significativamente. Para la superficie BOeC, frente a *S. aureus*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la eficacia, al aplicar los tres tratamientos de durabilidad. Para la cepa de *E. coli* se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el primer y tercer tratamiento. En cuanto a la superficie biocida B3Oe, se observó reducción de la eficacia bactericida en las dos cepas de microorganismos, obteniendo diferencias estadísticamente significativas entre el primer y tercer tratamiento (**Tabla 20**).

**Tabla 20.** Comparación de la eficacia bactericida de cada uno de los tipos de superficies biocida después del tratamiento de durabilidad.

Tipo de superficie biocida	Tratamiento		Eficacia bactericida	
	Ciclos de lavado	temperatura °C	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
BOC	1000	20	5,10 <sup>A</sup> ± 0,55	5,40 <sup>A</sup> ± 0,71
	700	60	4,95 <sup>A</sup> ± 0,53	4,95 <sup>A</sup> ± 0,62
	350	90	3,95 <sup>B</sup> ± 0,64	3,67 <sup>B</sup> ± 0,69
BOeC	1000	20	5,90 <sup>A</sup> ± 0,19	5,65 <sup>A</sup> ± 0,41
	700	60	5,65 <sup>AB</sup> ± 0,23	5,38 <sup>A</sup> ± 0,20
	350	90	5,32 <sup>B</sup> ± 0,15	5,36 <sup>A</sup> ± 0,18
B3Oe	1000	20	5,35 <sup>A</sup> ± 0,18	5,46 <sup>A</sup> ± 0,16
	700	60	5,14 <sup>AB</sup> ± 0,16	5,21 <sup>AB</sup> ± 0,17
	350	90	4,74 <sup>B</sup> ± 0,12	4,82 <sup>B</sup> ± 0,21

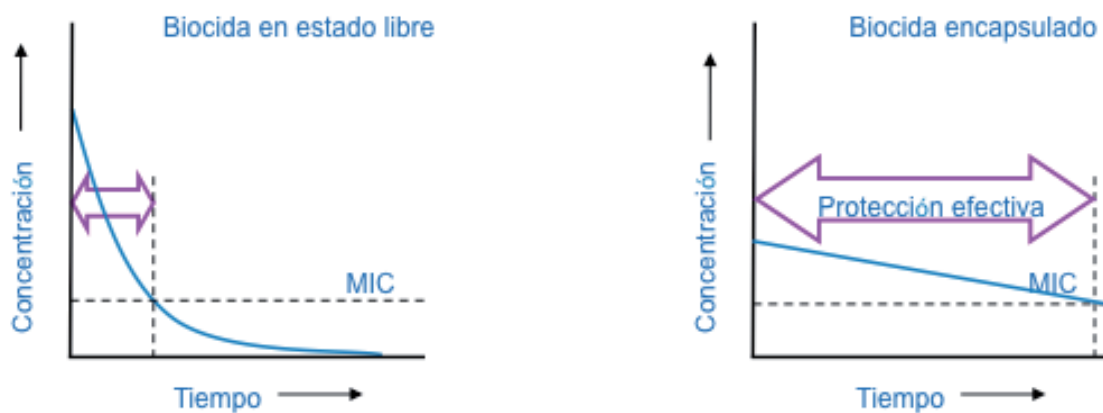
Recuentos bacterianos medios, expresados en log<sub>10</sub> UFC cm<sup>-2</sup>.

<sup>A-B</sup> Valores medios en la misma columna con diferentes letras mayúsculas para cada uno de los tipos de superficie biocida son significativamente diferentes (p>0,05).

De acuerdo con nuestros resultados, el material con mayor eficacia biocida es el tipo de superficie biocida BOeC, que contiene el

compuesto órgano-metálico encapsulado. Nuestros resultados indican que podría garantizarse una durabilidad superior a 3 años de uso, suponiendo un lavado intenso cada 24 horas, a una temperatura de uso correspondiente a 20°C. Cuando la temperatura se incrementa a 60°C, la durabilidad se reduce un 20%, por lo que sería esperable una eficacia prolongada algo más de 2 años. Si la temperatura de uso aumenta a 90°C, se mantendría la eficacia durante sólo un año, eso si el biocida está encapsulado.

Con este estudio se comprobó la necesidad de emplear un sistema de liberación apropiado, puesto que utilizando un sistema controlado, la cantidad de biocida a emplear se ajustará a los requerimientos del producto final, manteniendo así, la resistencia biológica adecuada. La selección de un sistema de liberación lenta consigue alcanzar una situación ideal, dado que permite el mantenimiento de la concentración efectiva, del agente activo, por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y disminuye la liberación inicial, limitando de esta manera la cantidad necesaria de biocida **(Figura 16)** (Eversdijk y cols., 2011).



**Figura 16.** Efecto de la encapsulación del biocida sobre la migración hacia la superficie (modificado de Eversdijk y cols., 2011).

Esto consigue una menor concentración de biocida y una menor contaminación del medio ambiente, de los alimentos o de las personas y animales que entren en contacto con estos materiales.

Por otra parte, se han desarrollado una amplia gama de productos, principalmente iones inorgánicos de plata, basados en la tecnología de encapsulación en una matriz soluble. La matriz protege los iones de plata durante el proceso y luego controla su liberación. En este sistema los iones se liberan junto con la matriz, al ser esta hidrolizada de forma gradual. La alta estabilidad de la matriz permite al sistema de iones de plata ser empleado en un amplio rango de polímeros (Simmons, 2001). No obstante, no sería muy eficaz si la matriz no es hidrolizada, o en aquellos materiales de una dureza especial.



**VI. Eficacia de superficies antibacterianas de contacto  
alimentario para el control de biofilm**





## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Superficies de ensayo

Se evaluaron superficies duras de poliéster con un área de 50 x 50 mm<sup>2</sup> y 10 mm de espesor; y superficies de acero inoxidable 304 grado 2B, de 20 mm de diámetro y 1,2 mm de espesor. Las superficies duras de poliéster se encontraban embebidas con tres concentraciones diferentes de un agente antimicrobiano a base de plata a 500, 600 y 800 ppm, más una muestra control (sin plata). Las superficies de acero inoxidable, antes de su uso, fueron tratadas según la Norma Europea EN 13697:2001 (Anónimo, 2001), mediante un lavado en detergente (Dipol Bac Stop, D.I.S. DINO S.L., Madrid, España) al 5,0% durante 1 hora. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y, a continuación, sumergidas en una solución de 2-propanol al 70% (Panreac Química S.A., Castellar del Vallés, España) durante 15 minutos, favoreciendo una desinfección parcial para luego secarlas en campana de flujo laminar. Finalizando con una esterilización parcial; para luego secarlas en campana de flujo laminar. Finalmente se procedió a su esterilización durante 15 minutos a 121°C, con el fin de eliminar los microorganismos que pudieran interferir en el resultado de los ensayos.

Las superficies duras de poliéster, antes de su uso, fueron tratadas por doble autoclavado. Esta operación se realizó a 121°C durante 15 minutos (cada sesión) a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup>, luego fueron llevadas a estufa de aire forzado para secar a 60°C durante dos horas eliminando la humedad excesiva en la superficie. Estos materiales, dada su dureza, son difíciles de esterilizar, más aún para garantizar la destrucción de las formas esporuladas detectadas. Es por ello, que se hace necesario un doble tratamiento.

### **1.2. Cepa bacteriana y preparación del inóculo**

Se empleó la cepa liofilizada de *Listeria monocytogenes* CCUG 15526 (Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg, Suecia). La cepa liofilizada fue rehidratada en agua de peptona tamponada a 37°C durante 18-24 h. Después se sembró por el método de estría en TSA. Se seleccionaron colonias aisladas para preparar cultivos stock en tubos de TSA inclinado, se incubaron a 37°C durante 24 h y se almacenaron a 4°C durante un período de tiempo máximo de un mes. A partir del cultivo en tubo inclinado se preparó la SBE, subcultivando en 9 ml de BPW e incubando a 37°C durante 18 a 20 h, para obtener un cultivo en fase estacionaria. A partir del cultivo obtenido se realizaron diluciones decimales en TSS. La concentración del inóculo se determinó de la dilución  $10^{-2}$  por DEM, consiguiendo 3 log células  $\text{ml}^{-1}$  como se describe más adelante en el apartado 1.4.

### **1.3. Formación del biofilm**

Para reproducir la formación de biofilms, las superficies de ensayo se colocaron en placas de Petri y se inocularon con 30  $\mu\text{l}$  de la dilución bacteriana en TSS conteniendo 3 log células  $\text{ml}^{-1}$  aproximadamente.

Con el fin de verificar el número inicial de células inoculadas sobre las superficies, se tomaron cinco alícuotas del inóculo, se sembraron en placas de TSA y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Por otra parte, las superficies se colocaron dentro de una cámara, con humedad relativa saturada, durante 72 horas a 22-24°C, para permitir la formación del biofilm. Por tanto, el biofilm de *L. monocytogenes* se desarrolló en condiciones húmedas, estáticas y sin renovación de medio (Fuster-Valls y cols., 2008; Montañez-Izquierdo y cols 2012).

#### 1.4. Evaluación de la estructura del biofilm por DEM

Para evaluar los biofilm por DEM se empleó la tinción vital LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> kit de viabilidad bacteriana (L13152; Molecular Probes Inc., Oregon, USA). Este kit emplea dos fluorocromos de ácidos nucleicos: SYTO 9 y yoduro de propidio (PI). El SYTO 9 penetra en las células tanto con membranas lesionadas como intactas. En contraste, el PI penetra sólo las células con la membrana lesionada y reduce el colorante SYTO 9. Por lo tanto, con la aplicación simultánea de los dos colorantes en proporción adecuada, las células viables con membrana intacta fluorescen en verde y las células muertas o lesionadas en rojo.

Después de la incubación del inóculo durante 72 horas sobre las superficies, las muestras fueron teñidas con 20 µl de la tinción vital LIVE/DEAD. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, para luego ser evaluadas bajo un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokyo, Japón), equipado con una lámpara de mercurio de 100 W (USH-1030L), un filtro de doble paso (U-M51004 F/R – V2) y acoplado a una cámara digital DP50 - CU. Las muestras teñidas se observaron con objetivos 10X, 20X y 40X para examinar la estructura del biofilm y para evaluar el estado vital de las células bacterianas.

La concentración inicial de *L. monocytogenes*, empleada para inocular las muestras y formar el biofilm, se determinó por DEM, tiñendo una alícuota de la suspensión y observando con el objetivo de 40X, con el fin de determinar el número de bacterias viables, realizando el recuento de bacterias viables observadas en 10 campos al azar para estimar la cantidad de células viables por mililitro. Las imágenes se analizaron usando el programa analySIS Auto 3.2 (Fuster-Valls y cols., 2008; Montañez-Izquierdo y cols., 2012).

### **1.5. Validación de la técnica DEM con el recuento en placa**

Para poder determinar la concentración del inóculo se construyó una curva de calibración, comparando la técnica DEM y el cultivo en placa. A partir de diluciones decimales en TSS de un cultivo de *L. monocytogenes* en estado estacionario, se colocaron 20  $\mu$ l de cada dilución decimal sobre un portaobjetos, para luego ser teñida inmediatamente con 20  $\mu$ l de LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>. Se incubó durante 15 minutos en oscuridad y luego se realizó el recuento por microscopía tomando al azar 10 campos a 40X. En paralelo se realizó el cultivo en placas de TSA tomando una alícuota de 1000  $\mu$ l de la dilución correspondiente, e incubándolas durante 24 h a 37°C, para hacer recuento teniendo en cuenta las placas en las que sus unidades formadoras de colonias (UFC) se encontraban entre 30 y 300.

### **1.6. Recuento bacteriano por cultivo**

Para determinar el número de bacterias viables, las superficies se colocaron en frascos con caldo tripton de soja (TSB), perlas de vidrio y tween 80. Se agitaron a potencia máxima, para desprender los microorganismos adheridos a la superficie. Posteriormente, a partir de las diluciones decimales adecuadas, se sembraron en placas de TSA más extracto de levadura (TSAYE), por duplicado, y se incubaron a 37°C durante 24 h. Los datos se expresaron en UFC cm<sup>-2</sup>.

### **1.7. Análisis Estadístico**

Para determinar la relación entre el recuento de microorganismos por DEM y cultivo se aplicó el análisis de correlación y regresión. Para determinar la formación de biofilm se analizaron 90 muestras (6

ensayos con  $n=15$ ), y para realizar el recuento bacteriano se analizaron 90 muestras (6 ensayos con  $n=15$ ).

Para la comparación de medias del recuento microbiano obtenido de las superficies se realizó el análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple con interacción de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), usando el programa informático R versión 3.1.0.

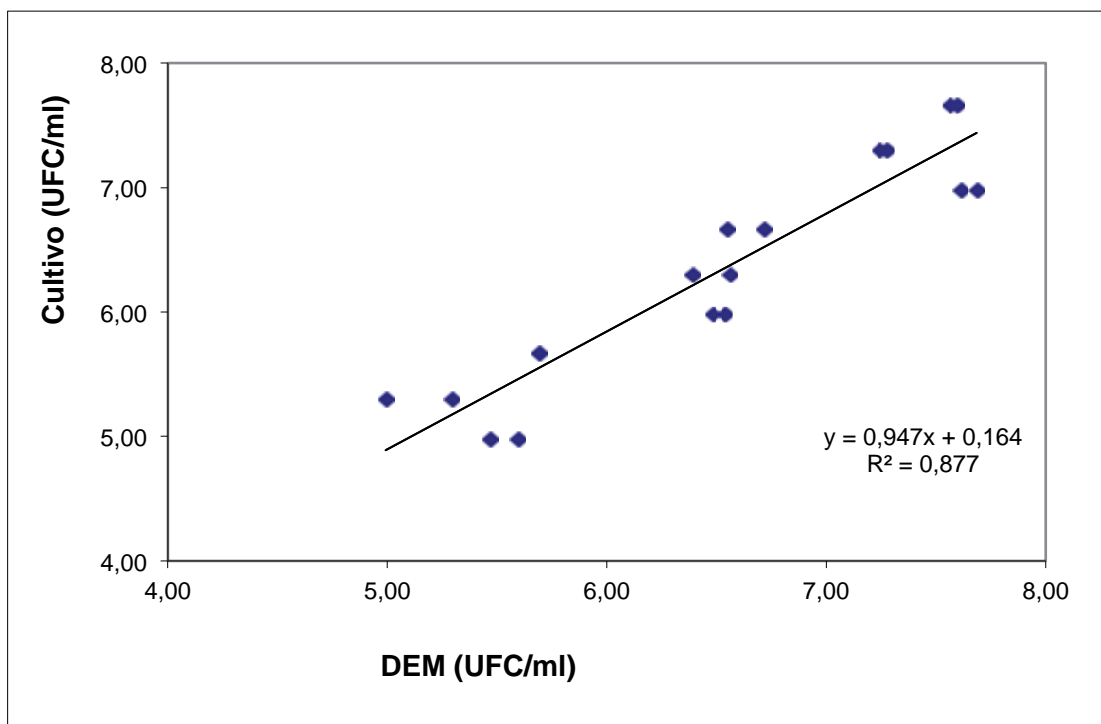
## 2. Resultados y discusión

Para este estudio se intentó trabajar con un biofilm bacteriano compuesto por dos microorganismos (*S. aureus* y *E. coli*). No obstante, su desarrollo fue muy pobre. Según pudimos observar por microscopía de epifluorescencia, esto se debió a que no se producía una sinergia de colonización, sino que, por el contrario, se creaba una fuerte competencia por los sitios de adhesión. Por ello, se decidió trabajar con *Listeria monocytogenes*, que desarrolló un buen biofilm en la superficie que consideramos de referencia (acero inoxidable). *L. monocytogenes* es un patógeno transmitido por alimentos y con capacidad de adherirse a las superficies y formar biofilms, por ello la importancia de controlarlo y/o eliminarlo de los ambientes del proceso de alimentos. Es un microorganismo resistente a condiciones generales empleadas en el control del crecimiento de patógenos en alimentos, como podría ser la temperatura de refrigeración (Teixeira y cols., 2007; Kumar y Annad, 1998).

### 2.1. Curva de calibración para el recuento de *L. monocytogenes*

Para obtener la concentración del inóculo inicial, se realizó la comparación del recuento por DEM y cultivo, obteniendo una

correlación elevada ( $R^2=0,88$ ) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) (**Figura 17**). Por lo tanto, la técnica DEM se utilizó para determinar la concentración del inóculo inicial ( $3 \log_{10}$  células  $\text{ml}^{-1}$  aproximadamente), ya que la cantidad de células que se inoculan sobre las superficies es un dato importante para la posible formación de biofilms.



**Figura 17.** Curva de calibración de DEM para el recuento de *L. monocytogenes*.

## 2.2. Recuento bacteriano por cultivo y evaluación de la estructura del biofilm por DEM

El crecimiento de *L. monocytogenes* en las superficies evaluadas, después de 24 horas de incubación, alcanzaron niveles de  $5,84 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  y  $4,64 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  para el acero inoxidable y el poliéster sin biocida, respectivamente, con una formación de biofilm del 100% sobre estas superficies. La superficie de poliéster B (600 ppm) tuvo un recuento de  $2,19 \log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  y la formación de biofilm fue del 50% (**Tabla 21**).

**Tabla 21.** Evaluación del crecimiento y formación de biofilms de *L. monocytogenes*.

Superficie	Concentración (Ag ppm)	Crecimiento bacteriano	Formación de biofilm
Acero Inoxidable	0	5,84 <sup>a</sup> ± 0,62	18/18
Poliéster sin biocida	0	4,64 <sup>a</sup> ± 0,92	18/18
Poliéster A	500	0,13 <sup>c</sup> ± 0,09	0/18
Poliéster B	600	2,19 <sup>b</sup> ± 2,40	9/18
Poliéster C	800	1,01 <sup>c</sup> ± 0,60	0/17

Recuentos bacterianos expresados en  $\log_{10}$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ .

<sup>a-c</sup> Valores medios con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La habilidad de *L. monocytogenes* para adherirse a superficies de contacto alimentario comunes, como plástico, caucho, acero inoxidable y vidrio, no ha sido aún bien entendida (Hood y Zottola, 1995; Sinde y Carballo, 2000; Stepanovic y cols., 2004). Sin embargo, se han observado diferencias, tanto en la extensión y la velocidad de adhesión, en función de las superficies seleccionadas (Smoot y Pierson, 1998). Las cepas persistentes de *L. monocytogenes* pueden ser más resistentes a la limpieza y desinfección empleadas en la industria alimentaria, especialmente cuando forman biofilms (Tompkin 2002; Kastbjerg y cols. 2009).

Un enfoque para prevenir el problema de la formación de biofilm bacterianos en la industria de los alimentos es la prevención de la

adhesión bacteriana (Sinde y Carvallo, 2000). Con el fin de modificar las características superficiales de los materiales, para minimizar la adhesión bacteriana, es importante conocer las propiedades que son determinantes en el proceso. Así, la hidrofobicidad y rugosidad pueden ser fácilmente alteradas (Teixeira y cols., 2007). Otra forma de controlar la adhesión es la aplicación de agentes antimicrobianos, tanto bactericidas como bacteriostáticos dentro de matrices poliméricas, manteniendo baja la población microbiana presente, evitando así la posible formación de biofilms y el riesgo de contaminación cruzada (Nichols, 2005; Cao y cols., 2009; Jones, 2009).

La tinción vital Live/Dead<sup>®</sup> es una técnica que facilita distinguir las células vivas, que se tiñen de verde fluorescente, de las células muertas teñidas de rojo.

Las superficies evaluadas presentaron gran dificultad para determinar células aisladas debido, tanto a la fluorescencia propia de la superficie como a la tonalidad. Por este motivo el recuento celular por DEM no se llevó a cabo y solo se tuvo en cuenta el recuento obtenido por el método de cultivo.

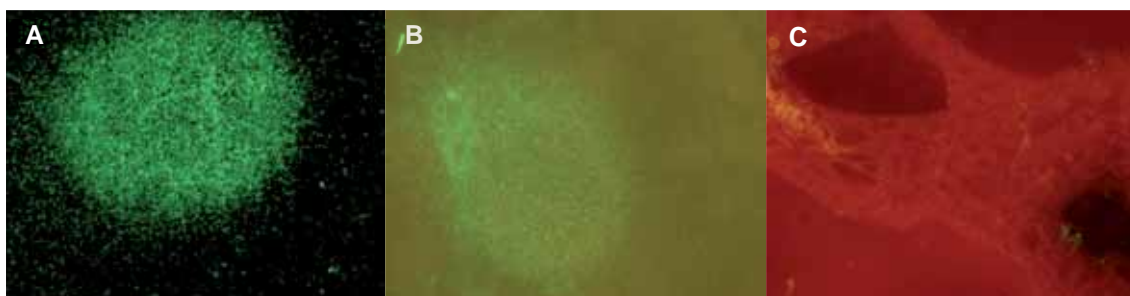
Se observó que el crecimiento de *L. monocytogenes* en las muestras de acero inoxidable y en poliéster sin biocida no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Además, comparadas con las muestras embebidas con Ag se observó que en estas últimas el crecimiento bacteriano fue significativamente inferior. Por lo tanto, el crecimiento de *L. monocytogenes* se inhibió en las superficies tratadas con NpAg. Sin embargo, esta actividad antibacteriana no guardó ninguna relación con respecto a las concentraciones del compuesto de plata ya que al comparar el crecimiento bacteriano en las superficies de poliéster A y C (500 y 800 ppm, respectivamente), no existen diferencias estadísticamente



significativas. Por otra parte la superficie de poliéster C (600 ppm) tuvo una mayor inhibición del crecimiento bacteriano que las superficies A y C de forma significativa (**Tabla 22**).

Una posible explicación para este resultado es que la plata, a pesar de poseer una fuerte actividad antibacteriana, no fue distribuida de forma homogénea en las matrices de poliéster y, debido a esto, su aglomeración pudo ser la causa de disminuir su eficacia antibacteriana, tal como fue propuesto por Cheng y cols. (2006) y Ruparelia y cols. (2008). Con el fin de explotar las propiedades de los nanocompuestos de plata, es necesario obtener una dispersión homogénea sobre la superficie del polímero hospedador, sin la formación de agregados o largas cadenas. De lo contrario, se reduce substancialmente el efecto antimicrobiano. Por la misma razón, el tamaño de las partículas debería ser tan pequeño como sea posible, con un reducido tamaño de distribución. Además, se deben tener en cuenta otros factores importantes que afectan la aplicabilidad real de los nanocompuestos poliméricos de plata, como son la carga eléctrica suficientemente alta y las áreas superficiales libres, que permitan la migración y una acción antimicrobiana de nanopartículas (Dallas y cols., 2011).

En cuanto a la evaluación de las muestras por DEM, se observó que las superficies de acero inoxidable y poliéster sin biocida, presentaron gran cantidad de células viables de *L. monocytogenes* y estas se encontraban formando biofilms sobre las superficies (**Figura 18A y 18B**). Sin embargo, en las superficies con compuestos de plata se observó escasa o nula presencia de *L. monocytogenes*. Consecuentemente, no se detectó la formación de biofilms sobre la mayoría de ellas (**Figura 18C**).



**Figura 18.** Superficies de estudio 18A) acero inoxidable, 18B) dura de poliéster sin biocida y 18C) dura de poliéster con 800 ppm de Ag, inoculadas con *L. monocytogenes* después de 72 h de incubación en condiciones de humedad. Imágenes DEM a 20X con tinción vital *BacLight*<sup>TM</sup>.

Algunos estudios han descrito la importancia de las condiciones húmedas y la disponibilidad de nutrientes para la colonización y posterior adherencia de bacterias a las superficies. Sin embargo, al adicionar un compuesto biocida a la estructura de la superficie, las condiciones favorables para la formación de los biofilms bacterianos disminuyen (Chmielewski y Frank, 2003). La plata tiene la capacidad de atacar las células bacterianas y destruirlas, anulando su posibilidad de adhesión, agregación y producción de EPS sobre la superficie. Además se une al DNA y RNA bacteriano mediante la desnaturalización e inhibe la replicación bacteriana (Rai y cols., 2009).

Se cree que el relieve físico de las superficies favorece la adhesión bacteriana, al igual que las energías libres superficiales. Así, las superficies de acero inoxidable son propensas a la formación de biofilms, debido a su gran energía libre superficial, que deriva en su característica hidrofílica (Teixeira y cols., 2008; Chmielewski y cols., 2006; Verran y cols., 2010<sup>a</sup>).

En nuestro estudio se comprobó, que tanto las superficies de acero inoxidable como las de poliéster sin biocida, fueron aptas para la adherencia y formación de biofilms, considerando que la superficie de poliéster es mucho más porosa y apta para la fijación de

microorganismos. Teixeira y cols. (2007) observaron que superficies de vidrio, caucho y acero inoxidable, inoculadas con *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* eran más propensas a la adherencia bacteriana, comparadas con superficies de cuarzo, que incluían un agente biocida en su composición (triclosán).

Una de las dificultades que se presentó al evaluar las superficies por DEM fueron los colores fuertes y la fluorescencia que llegaban a emitir las superficies de poliéster, puesto que disminuían el contraste entre el fondo (*background*) y los microorganismos, fenómeno que se disipa al observar las superficies de acero inoxidable en donde los contrastes de la fluorescencia están bien definidos.

Los resultados obtenidos al aplicar la técnica DEM fueron la detección de la presencia de biofilms. Cabe destacar que una de las principales ventajas de DEM es la posibilidad de observar la distribución de los microorganismos y su interacción con el sustrato.

La higiene de una planta procesadora de alimentos debe contemplarse dentro de una perspectiva global como una etapa básica del proceso productivo, considerada como un requisito previo del sistema APPCC (Hui, 2003). La adición de agentes biocidas, como parte activa de una superficie, debe ser tomada como un apoyo en un plan de higiene y no como una solución definitiva, ya que la acumulación de microorganismos y sustancias orgánicas pueden ayudar a disminuir su actividad y llegar a recontaminar nuevas superficies, incluso podría ser un aporte a la generación de resistencias por parte de los microorganismos hacia este tipo de agentes biocidas.

Li y Zhang (2009), en su estudio sobre la adhesión bacteriana y formación de biofilms, encontraron que al incorporar un compuesto orgánico ó uno inorgánico, en las superficies, una característica importante fue los diferentes mecanismos antibacterianos, ya que los

compuestos inorgánicos fueron más eficaces para la eliminación de bacterias, de igual modo, otra diferencia radicaba en la hidrofiliidad que caracterizaba a la superficie, puesto que a mayor hidrofiliidad mayor era la adherencia.

## **VII. Conclusiones**



1. Se determinó que el tratamiento previo, de doble autoclavado, para las superficies disminuye la concentración de microbiota inherente de los materiales y asegura un recuento real de la carga microbiana existente.
2. Se determinó que el modelo de recuperación del inóculo basado en el lavado por agitación con perlas, asegura una recuperación eficiente del inóculo inicial, cumpliendo con la ecuación de validación correspondiente.
3. La comparación de lecturas de recuentos de microorganismos, entre el método tradicional de siembra en placa y el sistema automatizado TEMPO, indicaron que es posible y fiable trabajar con el equipo, para determinar la eficacia antimicrobiana de las superficies de estudio, obteniendo resultados robustos y reproducibles.
4. Al estudiar las superficies duras de poliéster tratadas con compuestos antimicrobianos, como son las nanopartículas de plata y de zinc, se determinó que tienen la capacidad de disminuir la carga microbiana inicial. Igualmente se comprobó, que las superficies tratadas con la mezcla de NpAg más la adición de NpZn (850 ppm+400 ppm), poseen la mayor eficacia bactericida en las superficies de estudio ( $5,11 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$  para *E. coli* y de  $4,80 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$  para *S. aureus*).
5. Al evaluar la adición de NpZn a las NpAg, se observó un aumento en la eficacia bactericida de las superficies, resultando en un efecto potenciador. Este era más notorio en la concentración más baja (400 ppm NpAg más la adición de 400 ppm NpZn), aumentando hasta en  $2 \log_{10}$  la eficacia.
6. Al comparar la sensibilidad de los microorganismos se encontró que *E. coli* es más susceptible que *S. aureus* a las superficies tratadas con NpAg y las superficies mezcla (NpAg+NpZn).

7. Con respecto a la eficacia biocida se comprobó, en el caso de las superficies de caucho, que la encapsulación de su compuesto órgano-metálico ayuda a prolongar su efectividad al liberar más controladamente el biocida, presentando una efectividad antifúngica fuerte y su tiempo de vida asegura una actividad mayor a 3 años. Estos compuestos organometálicos pueden ser sustitutos de la plata en el futuro, al garantizar eficacia y durabilidad del efecto antimicrobiano.
8. El efecto antifúngico de las superficies, en el tiempo, es mayor cuando se utilizan en ambientes a temperatura de 20°C. Al aumentar la temperatura, se pierde eficacia a lo largo del tiempo, siendo menor a 90°C.
9. Las superficies poliméricas tratadas con biocida BOC y BOeC (caucho flexible), así como B3Oe (caucho rígido) son una gran alternativa para su implantación tanto en plantas procesadoras de alimentos como en ambientes domésticos para asegurar o disminuir el riesgo por contaminación cruzada y toxiinfecciones de origen alimentario.
10. En los ensayos realizados, la mezcla de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, impedían la formación de biofilm por parte de estos microorganismos. Aunque esta observación fue casual, abre una vía de investigación en los efectos sinérgicos y antagónicos de microorganismos para impedir el crecimiento masivo de bacterias en las superficies.
11. Las superficies duras de poliéster embebidas con compuestos de plata a 500, 600 y 800 ppm, ofrecen una buena actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, pudiendo complementar los pasos de higienización, con la opción de ser utilizadas en ambientes domésticos así como industriales.



12. Las superficies embebidas con 500, 600 y 800 ppm de compuestos de plata, previenen, con mayor frecuencia, la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, comparadas con superficies sin agentes antimicrobianos.
13. La DEM y la aplicación de la tinción vital LIVE&DEAD es una herramienta útil en la detección y evaluación de la estructura de los biofilms bacterianos sobre las superficies metálicas de contacto alimentario. Por el contrario, presenta problemas al realizar recuentos bacterianos sobre algunos plásticos, especialmente cuando su base es poliéster, puesto que disminuían el contraste entre el fondo (background) y los microorganismos.



## **VIII. Referencias bibliográficas**



Ackers, M.L., Schoenfeld, S., Markman, J., Geoffrey, M., Nicholson, M.A., DeWitt, W., Cameron, D.N., Griffin, P.M. y Slutsker, L. 2000. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 Infections associated with pasteurized milk. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 1834-1837.

Adamopoulos, L., Montegna, J., Hanpikian, G., Argyropoulos, D.S., Heitmann, J. y Lucia, L.A. 2007. A simple method to tune the gross antibacterial activity of cellulosic biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 69: 805-810.

AFNOR. 2013. Validation EN ISO 16140 de la méthode TEMPO TVC pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile. Disponible en: [http://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synth-BIO-12-15-09-05\\_fr.pdf](http://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synth-BIO-12-15-09-05_fr.pdf)

AECOSAN. 2014. Materiales en contacto con alimentos. Disponible en: [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/cadena\\_alimentaria/subseccion/materia\\_contacto\\_alimentos.shtml](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subseccion/materia_contacto_alimentos.shtml)

Akiyama, H., Yamasaki, O., Kansaki, H., Tada, J. y Arata, J. 1998. Effects of sucrose and silver on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 629-634.

Altmajer-Vaz, D. 2004. Formulaciones detergentes biodegradables: ensayos de lavado. 1-302.

An, Y.H. y Friedman, R.J. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43: 338-348.

Anderson, J.B., Shuster, T.A., Hansen, K.E., Levy, A.S. y Volk, A. 2004. A camera's view of consumer food-handling behaviors. *Journal of The American Dietetic Association*, 104: 186-191.

Andersen, J.K., Hald, T., Nielsen, N.L., Fiedler, C.S. y Nørrung, B. 2007. New strategies for the use of microbiological examination in food control in Denmark. *Food Control*, 18: 273-277.

Anónimo. 1997. Plastics- Evaluation of the action of microorganisms. *ISO 846:1997*.

Anónimo. 2000. Antimicrobial additives in plastics and European Biocidal Products Directive. *Plastics Additives and Compounding*, 4: 14-17.

Anónimo. 2000. Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy. *Japanese Industrial Standard Z 2801:11*.

Anónimo. 2001. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step2). EN 13697:2001.

Anónimo 2001. code of hygienic practice for the transport of food in bulk and semi-packed food. CAC/RCP 47-2001.

Anónimo. 2001. Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección :de aplicación de empresas del sector alimentario. *Acribia*, Zaragoza.

Anónimo, 2003. Recommended International Code of Practice: General Principles of Hygiene. Codex standard CAC/RCP 1e1969, revision 4. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO standards program, Rome, Italy .

Anónimo, 2005a. Code of Practice for the Transport of Primary Produce and Seafood. New South Wales Food Authority, Newington, Australia.

Anónimo. 2010. Factors affecting fouling and cleanability of open food contact surfaces. A report on findings from the EU Integrated Project Pathogen Combat. Disponible en: <http://www2.mmu.ac.uk/media/mmuacuk/content/documents/rke/A%20-%20Factors%20affecting%20fouling%20and%20cleanability%20of%20open%20food%20contact%20surface.ashx.pdf>.

Anónimo. 2011. Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. *Norma ISO 22196:2011*.

Bajpai, D. y Tyagi, V.K. 2007. Laundry detergents: an overview. *Journal of Oleo Science*, 56: 327-340.

Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. y Chamberlain, H. L. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4543-4548.

Barud, H., Barrios, C., Regiani, T., Marques, R.F., Verelst, M., Dexpert-Ghys, J., Messaddeq, Y. y Ribeiro, S.J. 2008. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 28: 515-518.

Bernbom, N., Ng, Y.Y., Jørgensen, R.L., Arpanaei, A., Meyer, R.L., Kingshott, P., Vejborg, R.M., Klemm, P. y Gram, L., 2009. Adhesion of food-borne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1268-1279.

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.U. y Egli, T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3283-3290.

Blaschek, H.P., Wang, H. y Agle, M.E. 2007. Biofilms in the food environment. Wiley, Blackwell Publishing. Iowa, USA.

Blenkinsopp, S.A., Khoury, A.E. y Costerton, J.W. 1992. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3770-3773.

Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W., 1991. Understanding bacterial biofilms. *Trends in Biotechnology*. 9, 138-143.

Boer, E.d. y Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 119-130.

Boisnault, A., Cassaing, S., Morelle, K., Dubarry, A., Berry, A., Linas, M. D. y Rance, F. 2005. Allergie alimentaire a una moisiture presente sur à une croûte de fromage: A propos d'une observacion pediatrica. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45: 597-600.

Boulos, L., Prevost., M., Barbeau, B., Coallier, J. y Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 77-86.

Breeuwer, P. y Abee, T. 2000. Assessment of viability microorganisms employing florescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 193-200.

Breuer, T. 1999. CDC investigations: the may 1998 outbreak of *Salmonella agona* linked to cereal. *Cereal Foods World*, 44: 185-186.

Bright, K.R., Gerba, C.P. y Rusin, P.A. 2002. Rapid reduction of *Staphylococcus aureus* population on stainless steel surfaces by zeolite ceramics coating containing silver and zinc ions. *Journal of Hospital Infection*, 52: 307-309.

Brooks, J. D., Flint, S.H. 2008. Biofilm in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 2163-2176.

Brown, M.R., Allison, D.G. y Gilbert, P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22: 777-783.

Bryaskova, R., Pencheva, D., Kale, G.M., Lad, U. y Kantardjiev, T. 2010. Synthesis, characterisation and antibacterial activity of PVA/TEOS/A-Np hybrid thin films. *Journal Colloid and Interface Science*, 349: 77-85.



Burrell, R.E., Wright, J.B., Lam, K., Yin, H.K., Naylor, A.G., Moxham, P.H., Gillis, S.H., Schechter, P. y Stiles, J.A. 2004. Metal-containing materials, compositions and methods. Disponible en: <http://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2004037187&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio>

Busscher, H. J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Steenberghe, D., Quirynen, M., Pratt, I.H., Marechal, M. y Rouxhet, P.G. 1989. Physico-chemical properties of oral streptococcal cell surfaces and their relation with adhesion to solid substrata in vitro and in vivo. *Colloids Surfaces*, 42: 345-353.

Busscher, H.J. y Van Der Mei, H.C. 1997. Physico-chemical interaction initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*, 11: 24-32.

Cao, Z., Sun, X., Sun, Y. y Fong, H. 2009. Rechargeable antibacterial and antifungal polymeric silver sulfadiazines. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24: 350-367.

Carpentier, B. y Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499-511.

Carrasco, E., Rueda, A. y García, R.M. 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45: 545-556.

CDC. 2010. Investigation Updates: Nationwide outbreak of *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated black and red pepper. Atlanta, USA. Updates May 4, 2010. Disponible en: [http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo/montevideo\\_timeline2.pdf](http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo/montevideo_timeline2.pdf)

CDC. 2011. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food — Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996–2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60: 749-755.

Cen, Lian,. Neoh, K.G,. Kang, E.T. 2003. Surface functionalization technique for conferring antibacterial properties to polymeric and cellulosic surface. *Langmuir*, 19: 10295-10303.

Characklis, W.G. y Marshall, K.C. 1990. Biofilms. *Wiley Interscience*, New York.

Cheng, J., Teply, B., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X., Levy, E., Radovic, A.F., Langer, R. y Farokhzad, O.C. 2006. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28: 869-876.

Cheng, Q., Li, C., Pavlinek, V., Saha, P. y Wang, H. 2006. Surface-modified antibacterial TiO<sub>2</sub>/Ag<sup>+</sup> nanoparticles: Preparation and properties. *Applied Surface Science*, 252: 4154-4160.

Chmielewski, R.A.N. y Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 2: 22-32.

Christian, R.R., Manchester, J.T. y Mellor, M.T. 1983. Bacteriological quality of fabrics washed at lower-than-standar temperatures in a hospital laundry facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 591-597.

Christison, C.A., Lindsay, D. y von Holy, A. 2007. Cleaning and handling implements as potential reservoirs of bacterial contamination of some ready-to-eat foods in retail delicatessen environments. *Journal of Food Protection*, 70: 2878-2883.

Cowan, M.M., Abshire, K.Z., Houk, S.L., Evans, S.M. 2003. Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *Journal of Industry Microbiology Biotechnology*, 30: 102-106.

Créach, V., Baudoux, A.C., Bertru, G. y Rouzic, B.L. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 19-28.

Criquelion, J., Durand, F., Olivier, F., Rauwel, G. y Sabat, F. 2002. Características generales de las funciones químicas desinfectantes. En: *Manual Técnico de Higiene, Limpieza y Desinfección*. Editores: Leveau, J-Y, Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid.

Dallas, P., Sharma, V.K. y Zboril, R. 2011. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166: 119-135.

D'Aquino, M. y Nuñez, L. 1997. Influencia de la materia orgánica sobre la acción de desinfectantes. *Revista Argentina de Infectología*, 10: 3-9.

D´Arcy. 2001. Antimicrobial additive systems see increased use in polymers. *Plastics, Aditives and Compounds*, 3: 16-18.

Davidson, C.A., Griffith, C.J., Peters, A.C. y Fielding, L.M. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness- DATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminiscence*, 14: 33-38.

De Cesare, Alessandra., Sheldon, Brian W., Smith, Katie S., Jaykus, Lee-Ann. 2003. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of food protection*, 9: 1540-1737.

Denyer, S.P. y Stewart, G.S.A.B. 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41: 261-268.

DeVere, E. y Purchase, D. 2007. Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiology*, 24: 425-430.

D´mello, J. P. F. y Macdonald, A. M. C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.

Donlan, R.M. y Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-193.

Dowling, D.P., Donnelly, K., McConnell, M.L., Eloy, R., Arnaud, M.N. 2001. Deposition of anti-bacterial silver coatings on polymeric substrates. *Thin Solid Films*, 398-399: 602-606.

EFSA. 2009. The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. 271: 128.

EFSA y ECDC. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. Accesado: Abril 2013. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>

Ellis, A., Preston, M., Borczyk, A., Miller, B., Stone, P., Hatton, B., Chagla, A. y Hockin, J. 1998. A community outbreak of *Salmonella berta* associated with a soft chesse product. *Epidemiologic and Infection*, 120: 29-35.

Etienne, O., Picard, C., Taddei, C., Haikel, Y., Dimarcq, J., Schaaf, P., Voegel, J., Ogler, J. A., Egles, C. 2004. Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 48: 3662-3669.

Evans, D.J., Allison, D.G., Brown, M.R. y Gilbert, P. 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27: 177-184.

Eversdijk, J., Erich, S.J., Hermanns, S.P., Adan, O.C., De Bolle, M. De Meyer, K., Bylemans, D., Bekker, M., y Ten Cate, A.T. 2012. Development and evaluation of a biocide release system for prolonged antifungal activity in finishing materials. *Progress in Organic Coatings*, 74: 640-644.

FAO / WHO. 2002. Global forum of food safety regulators, Marrakesh, Morocco. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/004/y3680e/y3680e00.HTM>

Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N. y Kim, J.O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials*, 52: 662-668.

Fijan, S. y Šostar-Turk, S. 2010. Antimicrobial activity of selected disinfectants used in a low temperature laundering procedure for textiles. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 18: 89-92.

Fischer, G., Dott, W. 2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives of Microbiology*, 179: 75-82.

Flint S.H., Bremer P J. y Brooks J D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11: 81-97.

Forsythe, Stephen J. The microbiology of safe food. 2010. 2nd edn. Ed *Wiley-Blackwell*. Malasya.

Foschino, R., Picozzi, C., Civardi, A. 2003. Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *Journal of Food Engineering*, 60: 375-381.

Frantsen, J.E. y Mathiesen, T. 2009. Specifying stainless steel surfaces for the brewery, dairy and pharmaceutical sectors. Disponible en: [http://www.forcetechnology.com/NR/rdonlyres/D1E1985C-50B1-42F7-B21B-EA93600558EA/2414/090527\\_NACE\\_Corrosion\\_2009\\_Paper\\_09373](http://www.forcetechnology.com/NR/rdonlyres/D1E1985C-50B1-42F7-B21B-EA93600558EA/2414/090527_NACE_Corrosion_2009_Paper_09373)

Fung, D.Y.C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 3-22.

Fuster-Valls, N., Hernandez-Herrero, M., Marín-de Mateo, M. y Rodríguez-Jeréz, J.J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacterial survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 19: 308-314.

- García, A. 1989. Programa de limpieza e higiene. *Alimentaria*, 3: 29-50.
- Garret, T.R., Bhakoo, M. y Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18: 1049-1056.
- Geethalakshmi, R., Sarada, D.V. y Ramasamy, K. 2010. *Trianthema decandra* L: a review on its phytochemical and pharmacological profile. *International Journal of Engineering Science and Thecnology*, 2: 976-979.
- Gerba, C.P. y Kennedy, D. 2007. Enteric virus survival during household laundering and impact of disinfection with sodium hypochlorite. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4425-4428.
- Gibson, H., Taylor J.H., Hall, K.E., Holo J.T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 41-48.
- Gilbert, P., Collier, P.J. y Brown, M.R. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 1865-1868.
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C. M. y Jouenne, T. 2012. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia*, 8: 1670-1684.
- Gong 2012, Gong, Y., Han, G., Zhang, Y., Pan, Y., Li, X., Xia, Y. y Wu, Y. 2012. Antifungal activity and cytotoxicity of zinc, calcium, or copper alginate fibers. *Biological Trace Element Research*, 148: 415-419.
- Gorman, R., Bloomfield, S. y Adley, C.C. 2002. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 143-150.
- Gots, R. E., Layton, N. J. y Pirages, S. W. 2003. Indoor health: Background levels of fungi. *AHIA Journal*, 64: 427-438.

Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K. y Seydim, A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT- Food Science and Technology*, 37: 453-460.

Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E. y Al-Ahmad, A. 2007. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives of Oral Biology*, 52: 1048-1056.

Hawkey, P. M., Jones, A. M. 2009. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64: 3-10.

Hennessey, T.W., Hedberg, C.W., Slutsker, L., White, K.E., Besser-Wiek, J.M., Moen, M.E., Feldman, J., Coleman, W.W., Edmonson, L.M. y MacDonal, K.M. 1996. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. *The New England of Journal Medicine*, 334: 1281-1286.

Herman, B. 1998. Fluorescence microscopy. 2nd edn. *Springer-Verlag*, New York.

Herruzo, R. 2000. Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anuales de la Real Academia Nacional de Medicina*, 791-806.

Hirai, Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection*, 19: 191-200.

Holah, J.T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D. y Spenceley, H. 1990. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 255-259.

Holah, J.T. y Thorpe, R. H. 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology*, 69: 599-608.

Holah, J.T. 1995. Progress report on CEN/TC 216/working group 3: Disinfectant test methods for hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 36: 355-365.

Holah, J.T., Betts, R.P. y Thorpe, R.H. 1988. The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *Journal of Applied and Bacteriology*, 65: 215-221.

Hood, S.K. y Zottola, E.A. 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*, 6: 9-18.

Hou, W. y Wang, Q. 2007. From superhydrophilicity to superhydrophobicity: The wetting behavior of a methylsilicone/phenolic resin/silica composite surface. *Langmuir*, 23: 9695–9698.

Hui, Y.H., Nip, W. y Gorham, J.R. 2003. Chapter 3: The FDA's GMP's, HACCP, and the *Food Code*. En *Food Plant Sanitation*, ed. Hui, Bruinsma, Gorham, Nip, Tong y Ventresca. Marcel Dekker, Inc. New York.

Humphrey, T. J., Martin, K. W. y Whitehead, A. 1994. Contamination of hands work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*, 113: 403-409.

Hüsmark, U. y Rönner, U. 1990. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental condition. *Journal of Applied Microbiology*, 69: 557-562.

Hüsmark, U. y Rönner, U. 1993. Adhesion of *Bacillus cereus* spores to different solid surface: cleaned or conditioned with various food agents. *Biofouling*, 7: 57-65.

ICMSF. 2011. Use of data for assessing process control and product acceptance. Microorganisms in foods 8. Springer Science+Business Media.

J.A. 1993. Sanititation in food processing . Academic Press, Inc. San Diego.



Jackson, L.A., Keene, W.E., McAnulty, J.M., Alexander, E., Diermayer, M., Davis, M., Hedberg, K., Boase, J., Barret, T.J., Samadpour, M. y Fleming, D.W. 2000. Where's the beef?: The role of cross-contamination in 4 chain restaurant-associated outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in the pacific northwest. *Archives of Internal Medicine*, 160: 2380-2385.

Janning, B., Veld, P.H., Notermans, S. y Krämer, J. 1994. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 319-324.

Jansen, B. y Kohnen, W., 1995. Prevention of biofilm by polymer modification. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 391-396.

Jarvis, B. B. 2002. Chemistry and toxicology of molds isolated from water-damaged buildings. *Mycotoxins and Food Safety*. Editores: DeVries, J. W.; Trucksess, M. W.; Jackson, L. S. Kluwer Academic/Plenum, New York.

Ji, J. y Zhang, W. 2009. Bacterial behaviors on polymer surfaces with organic and inorganic antimicrobial compounds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 88: 448-453

Johansson, I. y Somasundaran, P. 2007. Handbook for cleaning/decontamination of surfaces. *Elsevier*. Amsterdam, Holanda.

Jones, A. 2009. Choosing antimicrobial additives for plastics. *Plastics, Additives and Compounding*, 11: 26-28.

Joseph, B. Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 367-372.

Joux, F. y Lebaron, P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infections*, 2: 1523-1535.

- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Lebret, V. y Faille, C. 2002. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56: 77-87.
- Kastbjerg, V.G., Nielsen, D.S., Arneborg, N. y Gram, L. 2009. Response of *Listeria monocytogenes* to disinfection stress at the single-cell and population levels as monitored by intracellular pH measurements and viable-cell counts. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 4550-4556.
- Kasuga, E., Kawakami, Y., Matsumoto, T., Hidaka, E., Oana, K., Ogiwara, N., Yamaki, D., Sakurada, T. y Honda T. 2011. Bactericidal activities of woven cotton and nonwoven polypropylene fabrics coated with hydroxyapatite-binding silver/titanium dioxide ceramic nanocomposite "Eart-plus". *International Journal of Nanomedicine*, 6: 1937-1943.
- Keith, M. 1997. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of Salmonellae in foods. *Journal of Food Protection*, 60: 682-685.
- Kiermeier, F., Wildbrett, G. y Mrozek, H. 2000. Productos químicos auxiliares para la limpieza y desinfección. En: *Limpieza y Desinfección en la Industria Alimentaria*. Editor: Wildbrett, G. Acribia, Zaragoza.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H. y Cho, M.H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 95-101.
- Kristensen, J.B., Meyer, R.L., Laursen, B.S., Shipovskov, S., Besenbacher, F. y Poulsen, C.H. 2008. Antibiofouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biothechnology Advances*, 26: 417-481.
- Kong, H. y Jang, J. 2008. Antibacterial properties of novel poly(methyl-metacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*, 24: 2051-2056.

- Kumar, C.G. y Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., Beumer, R. R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of Food Microbiology*, 85: 227-236.
- Kusumaningrum, H. D., Van Asselt, E. D., Beumer, R. R. y Zwietering, M. H. 2004. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. Via domestic kitchen surfaces. *Journal of Food Protection*, 9: 1824-2074
- Lagaron, J.M., Ocio, M.J., Rubio, A. 2012 Antimicrobial polymers. Publicado por Jhon Wiley & Sons, INC., Hokoben, New Jersey.
- Lelieveld, H.L., Mostert, M.A., Hola, J. Y White, B. 2003. Hygiene in food processing. *CRC Press LLC*. Boca Ratón FL., EE.UU.
- Leveau, J. y Bouix, M. 2002. Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. *Antonio Madrid Vicente*. Madrid, España.
- Li, X., Xing Y., Jiang Y., Ding Y. y Li, W. 2009. Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 2161-2168.
- Li, Z., Lee, D., Sheng, X., Cohen, R.E., Rubner, M.F. 2006. Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. *Lagmuir*, 22: 9820-9823.
- Lichtman, J.W., y Conchello, J.A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2: 910-919.
- Lin, J., Qiu, S., Lewis, K. y Klibanov, A. 2002. Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines. *Biotechnology Progress*, 18: 1082-1086.

- Lin, J., Tiller, J.C., Lee, B.S., Lewis, K., Klibanov, M.A. 2002. Insights into bactericidal action of surface-attached poly(vinyl-*N*-hexylpyridinium) chains. *Biotechnology Letters*, 24: 801-805.
- Lindsay, D. y von Holy, A. 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14: 383-390.
- Linsebigler, A., Lu, G., Yates, J. 1995. Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> surfaces: Principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Reviews*, 95: 735-758.
- Liu, Y., Li, J., Qiu, X., Burda, C. 2007. Bactericidal activity of nitrogen doped metal oxide nanocatalysts and the influence on bacterial extracellular polymeric substances. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 190: 94–100.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Li, Y., Xu, H., Qin, L. y Tay, J.-H., 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*, 110: 251-256.
- Llewellyn, L.J., Evans, M.r. y Palmer, S.R. 1998. Use of sequential case-control studies to investigate a community *Salmonella* outbreak in Wales. *Journal Epidemiologic Community Health*, 52: 272-276.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun H., Tam, P.K., Chiu, J. y Che.C. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal Proteomics Research*, 5: 916-924.
- López-Amoros, R., Mason, D. y Lloyd, D. 1995. Use of two oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in seawater by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 22: 165-176.
- Lues, J.F.R. y Van Tonder, I. 2007. The occurrence of indicator bacteria of hands and aprons of food handlers in the delicatessen section of a retail group. *Food Control*, 18: 326-332.
- Lundén, J.M., Aautio, T.J. y Korkeala, H. 2000<sup>a</sup>. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing

plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, 65: 1129-1133.

Luppens, S., Rombouts, F. y Abee, T. 2002a. The effect of the growth phase of *Staphylococcus aureus* on resistance to disinfectants in a suspension test. *Journal of Food Protection*, 65: 124-129.

Luppens, S., Reij, M., Van der Heijden, R., Rombouts, F. y Abee, T. 2002b. Development of a standar test to asses the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4194-4200.

Lynn, J.L. 2009. Encyclopedia of Chemical Technology: Detergency and detergents. *Wiley Online Library*. Accesado: noviembre 2011. Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1002/0471238961.0405200512251414.a01.pub2>

Lyytikäinen, O., Autio, T.J., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Antila, V.-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H. y Siitonen, A. 2000. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 1838-1841.

Mafu, A.A., Roy, D., Goulet J. Y Magni, P., et al. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass and polypropylene and rubber surfaces after short contact time. *Journal of Food Protection*, 53: 742-746.

Malachová, K., Praus, P., Rybková, Z. y Kozák, O. 2011. Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied Clay Science*, 53: 642-645.

Marlony, B., Hoofar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., Bunge, C., Dorn, C. y Helmunt, R. 2003b. Interlaboratory diagnostic accurance of *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 241-249.

Marshall, K.C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *American for Society Microbiology News*, 58: 202-207.

Matsumara, Y., Yoshikata K., Kunisaki, S. y Tsuchido, T. 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4278-4281.

Maukonen, J., Mätto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Shandholm, T., Salo, S. y Saarela, M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biothechnology*, 30; 327-356.

McDonnell, G., y Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 147-179.

McEldowney, S. y Fletcher, M. 1998. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 83-86.

McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H. y Stewart, P.S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *Journal of Microbiological Methods*, 21: 1-13.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tuxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emergin Infectious Diseases*. 5: 607-625.

Mettler, E. y Carpentier, B. 1998. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection*, 61: 57-65.

Mittelman, M.W. 1998. Structure and funtional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81: 2760-2764

Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I., Rodríguez-Jerez, J.J. 2012. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control*, 23: 470-477.

Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I., Rodríguez-Jerez, J.J. 2013. Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene en superficies. Tesis doctoral. *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Montville, R., Chen, Y. y Schaffner, D.W. 2002. Risk assesment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 305-313.

Morgan, D., Newman, C., Hutchinson, D., Walker, A., rowe, B. y Majid, F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiologic and Infection*, 111: 181-187.

Moss, M. O. 1999. Spoilage problems – Problems caused by fungus. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editor: Richard, K. R. Elsevier, Oxford. Reino Unido.

Mostert, M.A., Hala, J. y Lelieveld, H.L. 2005. Handbook of hygiene control in the food industry. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*. Cambridge, Reino Unido.

Nakajima, A., Hashimoto, K., Watanabe, T. 2000. Transparent superhydrophobic thin films with self-cleaning properties. *Langmuir*, 16: 7044-7047.

National Institut Allergy and Infectious Diseases. 2007. Health Science Topics. Foodborne Diseases. Disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/topics/foodborne/Pages/Default.aspx>

Neira, G. y Cañas, L.A. 2007. Procedimientos para medir ángulos de contacto en sólidos particulados finos. *Scientia et Technica Año XIII*, 36: 833-838.

Nelson, B.I., Steinmetz, V., Ford, S. y Ong, W-K. 2010. Antimicrobial zinc pyrithione composition and method. Disponible en: <http://www.google.es/patents/US20100317640>

Newell, Diane G., Koopmans, Marion., Verhoef, Linda., Duizer, Erwin., Aidara-Kane, Awa., Sprong, Hein., Opsteegh, Marieke., Langelaar, Merel., Threlfall, Jhon., Scheutz, Flemming., van der Giessen, Joke., Kruse, Hilde. 2010. Food-borne disease – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139: S3-S15

Nichols, D. 2005. Biocides in plastics. *Rapra Review Reports*, Volumen 15. Editorial Smithers Rapra Publishing, Reino Unido.

Nugen, S.R. y Baeumner, A.J. 2008. Trends and opportunities in food pathogen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 451-454.

Nyachuba, David G. 2010. Foodborne illness: is it on the rise?. *Nutrition Reviews*. 68: 257-269.

OMS, (Organización Mundial de la Salud). 2000. Seventh report of WHO surveillance programme for the control of foodborne infections and intoxications in Europe (1993-1998). Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/dec2000/en](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/dec2000/en)

OMS, (Organización Mundial de la Salud). 2002, Global strategy for food safety: safer food for better health. Accesado: Mayo 2011. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/strategy\\_es.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/strategy_es.pdf)

OMS, (Organización Mundial de la Salud). 2006<sup>a</sup>. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne disease. Taking stock and charting the way forward, 1. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/burden\\_sept06/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/burden_sept06/en/)



OMS, (Organización Mundial de la Salud). 2007. Fact sheet N° 237: Food safety and foodborne illness. Accesado: Mayo 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>

Pal, S., Tak, Y.K. y Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend of the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1712-1720.

Palmas, F. y Meloni, V. 1997. Fungi as a occupational health hazard in seasoned-food-industry workers. *Enviromental Monitoring and Assessment*, 48: 273-284.

Palmer, R.J. y Sternberg, C. 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:263-268.

Panacek, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Nadezda, P., Sharma, V.K., Nevecna, T. y Zboril, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: syntesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 16248-16253.

Pascual, A., Llorca, I. y Canut, A. 2007. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in Food Science and Technology*, 18: S29-S35.

Paul, D.R. y Robeson, L.M. 2008. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer*, 49: 3187-3204.

Paulo, C.S.O., Vidal, M. y Ferreira, L.S. 2010. Antifungal nanoparticles and surfaces. *Biomacromolecules*, 11: 2810-2817.

Petty, H.R. 2007. Fluorescence microscopy: Established and emerging methods, experimental strategies and applications in immunology. *Microscopy Research and Technique*, 70: 687-709.

Pontefract, R.D. 1991. Bacterial adherence: its consequences in food processing. *Canadian institute of Food Science and Thecnology*, 64: 113-117.

Rai, M.K., Yadav, A. y Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biothechnology Advance*, 27: 76-83.

Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle, A.P. y Gade, A.K. **2012**. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against mutidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 112: 841-852.

Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C.A. y Shier, W. T. 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Review*, 29: 3-26.

Reij, M. W. y Den Aantrekker, E. D. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 1-11.

Robine, E., Derangere, D. y Robin, D. 2000. Survival of a *Pseudomonas fluorescens* and *Enterococcus faecalis* aerosol on inert surfaces. *International Journal in Food Microbiology*, 55: 229-234.

Rodrigues, L.C., Cowden, J.M., Wheeler, J.G., Sethi, D., Wall, P.G., Cumberland, P., Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Roberts, J.A. y Roderick, P.J. 2001. The study of infectious intestinal disease in England: risk factor for cases of infectiuos intestinal disease with *Campylobacter jejuni* infection. *Epidemiology and Infection*, 127: 185-193.

Rowe, B., Hutchinson, D., Gilbert, R., Hales, B., Begg, N., Dawkins, H., Jacob, M., Rae, F. y Jepson, M. 1980. *Salmonella* ealing infection asociet with comsuption of infant dried milk. *The Lancet*, 330: 900-903.

Ruparelia, J.P., Chartterjee, A.K., Duttagupta, S.P. y Murkherji, S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and cooper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4: 707-716.

Sachidanandham, R., Gin, K.Y.H. y Poh, C.L. 2005. Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering*, 89: 24-31.

Sattar, S.A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R.C., Scott, E. y Kain, J. 2001. Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *Journal Applied Microbiology*, 90: 962-970.

Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4: 219.1-219.5.

Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. y Shimizu, M. 1996. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *Journal of Chemical*, 29: 627-633.

Sawai, J., Shoji, S., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., Shimizu, M. y Koljima, H. 1998. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 86: 521-522.

Sawai, J. y Yoshikawa, T. 2004. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal Applied Microbiology*, 54: 177-182.

Scott, E., Duty, S. y Callahan, M. 2008. A pilot study to isolate *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* from environmental surfaces in the home. *American Journal of Infection Control*, 36: 458-460.

Seil, J.T. y Webster, T.J. 2011. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7: 2579-2584.

Seyfriedsberger, G., Rametsteiner, K. y Kern, W. 2006. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *European Polymer Journal*, 42: 3383-3389.

Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R. y Minaian, S. 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity on different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 168-171.

Sharma, D., Rajput, J., Kainth, B.S., Kaur, M. y Sharma S. 2010. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Biomolecular Electronics and Organic Nanotechnology for Environmental Preservation: Thin Solid Films*, 519: 1224-1229.

Shi, X. y Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20: 407-413.

Shi, Z., Neoh, K.G., Kang, E.T. 2004. Antibacterial activity of polymeric substrate with surface grafted viologen moieties. *Biomaterials*, 26: 501-508.

Silver, S. 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 341-353.

Simões, M., Simões L. y Vieira, J. 2010. A review of current and emergent biofilm strategies. *Food Science and Technology*, 43: 573-583.

Sinde, E., Carballo, J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluoroethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food microbiology*, 17: 439-447.

Singh, J. 2005. Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment*, 14: 229-234.

Sivakumar, P.M., Balaji, S., Prabhawathi, V., Neelakandan, R., Manoharan, P.T. y Doble, M. 2010. Effective antibacterial adhesive coating on cotton fabric using ZnO anorods and chalcone. *Carbohydrate Polymers*, 79: 717-723.

Smoot , L.M. y Pierson, M.D. 1998. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 10: 1293-1298.

Sondi, I. Y Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182.

Stanfield, P. 2003. Cleaning and sanitizing a food plant. *Food Plant Sanitation*, ed. Hui, Bruinsma, Gorham, Nio, Tong y Ventresca. Marcel Dekker, Inc. New York.

Stepanovic, E. S., Cirkovic, I., Rain, L. y Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 428-432.

Stoimenov, P., Klinger, R., Marchine, G.L. y Klabunde, K.J. 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18: 6679-6686.

Suller, M.T. y Lloyd, D. 1999. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry*, 35: 235-241.

Taylor, R., Maryan, C. y Verran, J. 1998. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surfaces finishes. *Journal Prosthetic Dentistry* 80, 592-597.

Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. y Vieira, M. 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22: 247-251.

Teixeira, P., Silva, S., Araújo, F., Azeredo, J. y Oliveira, R. 2007. Bacterial adhesion to food contacting surfaces. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Disponible en: [http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7711/1/Pilar\\_Teixeira\\_et al.pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7711/1/Pilar_Teixeira_et al.pdf)

Teixeira, P., Lima, J., Azeredo, J. y Oliveira, R., 2008. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:1239-1244.

Teufel, L. y Redl, B. 2006. Improved methods for the investigation of the interaction between textiles and microorganisms. *Lenzinger Berichte*, 85: 54-60.

Thomas, J.G. y Nakaishi, L.A. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm *The Journal of the American Dental Association*, 137: 10s-20s.

Tiller, J.C., Bonner, G., Pan, L-C. y Klivanov, A.M. 2001. Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification. *Biothecnology and Bioengineering*, 73: 246-252.

Tiller, J.C. 2006. Silver-based antimicrobial coatings. *ACS Symposium Series*, 924: 215-231.

Tiller, J.C. 2010. Antimicrobial surfaces. *Advanced Polymeric Science*, 240: 193-217.

Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal Food Protection*, 65: 709-725.

Tood, E.C., Greig, J.D., Bartleson, C.A. y Michaels, B.S. 2009. Outbreak where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *Journal of Food Protection*, 72: 202-219.

Tood, E.C., Greig, J.D., Bartleson, C.A y Michaels, B.S. **2009a**. Review: Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *Journal of Food Protection*, 71: 2582-2595.

Tood, E.C., Michaels, B.S., Greig, J.D., Smith, D., Holah, J. y Bartleson, C. 2010. Review: Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 7. Barriers To Reduce Contamination of Food by Workers. *Journal of Food Protection*, 73: 1552-1565.

Trachoo, N. 2003. Biofilms and the food industry. *Journal Science Technology*, 25:807-815

Trakeuchi, K. y Frank, J.F. 2001. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *Journal of Food Protection*, 64: 2088-2102.

Traoré, O., Springthorpe, V.S. y Sattar, S.A. 2002. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *Journal Applied Microbiology*, 92: 549-555.

Troller, J.A. 1993. Sanitation in food processing. *Academic Press, Inc*, San Diego.

Valentine, N.B., Butcher, M.G., Su, Y., Jarma, K.H., Matzke, M., Webb-Robertson, B.J., Panisco, E.A., Seiders, B.A.B. y Wahl, K.L. 2008. Evaluation of sampling tools for environmental sampling of bacterial endospore from porous and nonporous surfaces. *Journal Applied Microbiology*, 105: 1107-1113.

Van Asselt, E., Fischer, A., De Jong, A. E. I., Nauta, M.J. y De Jonge, R. 2009. Cooking practice in the kitchen-Observed versus predicted behavior. *Risk Analysis an International Journal*, 29: 533-540.

Van Egmond, Hans P., Schothorst, Ronald C. y Jonker, Marco A. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. Perspectives in a global and European contex. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389: 147-157.

Van Houdt, R. y Michiels, C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal Applied Microbiology*, 109: 1117-1131.

- Vasconcellos, J. A. 2004. Quality assurance for the food industry: a practical approach. *CRC Press*, Boca Ratón (Florida).
- Verran, J. y Boyd, R.D. 2001. The relationship between substratum surface roughness and microbiological and inorganic soiling: a review. *Biofouling*, 7: 59-71.
- Verran, J. 2002. Biofouling in food procesing: Biofilm or biotransfer potential?. *Food and Bioproducts Processing*, 80: 292-298.
- Verran, J., Airey, P., Packer A. y Whitehead, K. A. 2008. Microbial retention on open contact surfaces and implications for food contamination. *Advances in Applied Microbiology*, 64: 223-246.
- Verran, J., Packer, A., Kelly, P. y Whitehead, A., 2010. The retention of bacteria on hygienic surfaces presenting scratches of microbial dimensions. *Letters in Applied Microbiology*, 50:258-263.
- Verran, J., Packer, A., Kelly, P. y Whitehead, A., 2010b. Titanium-coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. *International Journal of Food Microbiology*, 141:134-139.
- Vieira, M.J., Melo, L.F. y Pnheiro, M.M. 1993. Biofil formation: hydrodynamic effect on internal diffusion and structure. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 7: 67-80.
- Votyacova, T.V., Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. 1994. Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended satationary phase. The population effect. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3284-3291.
- Wang, S. y Jiang, L. 2007. Definition of superhydrophobic states. *Advanced Materials*, 19: 3423–3424.
- Wildbrett, G. 2000. La limpieza y desinfección en la industria alimentaria. *Acribia*, Zaragoza.



Wirtanen, G. y Salo, S. 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2: 293-306.

Whitehead, K.A., Rogers, D., Colligon, J., Wright, C. y Verran, J., 2006. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51: 44–53.

Whitehead, K. A. y Verran, J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84: 253-259.

Whitehead, K.A., Benson, P. y Verran, J. 2009. Differential fluorescent staining of *Listeria monocytogenes* and a whey food soil for quantitative analysis of surface hygiene. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 75-80.

Yamanaka, M., Hara K. y Kudo, J. 2005. Bactericidal action of silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7589-7593.

Yamamoto, O. 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3: 643-646.

Yuste, R. 2005. Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2: 902-904.

Xu, T. y Xie, C.S. 2003. Tetrapod-like nano-particle ZnO/acrylic resin composite and its multi-funtion property. *Progress in Organic Coatings*, 46: 297-301.

Zalar P., Novak M., DE Hoog G. S. y Gunde-Cimerman N. 2011. Dishwashers-A man- made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, 115: 997-1007.

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M. y York, D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO

nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticles Research*, 9: 479-489.

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Daskalakis, N., Jeuken, I., Povey, M., O'Neill, A.J. y York, D.W. 2010. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 1625-1636.

Zottola, E.A. y Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern?. *International Journal of Microbiology*, 23: 125-148.