



UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL
SEDE DE ATENAS

ÁREA DE TECNOLOGÍA
INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE OZONO EN PISOS PARA LA
ELIMINACIÓN DE *LISTERIA SPP* EN UNA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS.

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

DIANA CHACÓN BARRANTES
MARIANELA RAMÍREZ RICHMOND
MARÍA FERNANDA SANCHEZ PICADO

ATENAS, COSTA RICA
2018



UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL
SEDE DE ATENAS

ÁREA DE TECNOLOGÍA
INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE OZONO EN PISOS PARA LA
ELIMINACIÓN DE *LISTERIA SPP* EN UNA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS.

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

DIANA CHACÓN BARRANTES
MARIANELA RAMÍREZ RICHMOND
MARÍA FERNANDA SANCHEZ PICADO

ATENAS, COSTA RICA
2018

Declaración Jurada

Nosotras Diana Chacón Barrantes portadora de la cédula de identidad número 114560166, María Fernanda Sánchez Picado portadora de la cédula de identidad número 114820117 y Marianela Ramírez Richmond portadora de la cédula de identidad número 26930796, estudiantes de la Universidad Técnica Nacional, UTN, en la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, conocedores de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante la Directora de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, sí como los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, al día 30 de agosto del 2018.

Diana Chacón Barrantes
Cédula 114560166

María Fernanda Sánchez Picado
Cédula 114820117



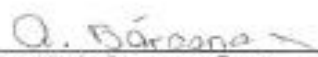
Marianela Ramírez Richmond
Cédula 206930796

TRIBUNAL EXAMINADOR

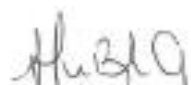
Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos



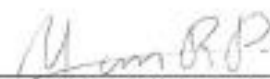
Ana María Bárcenas Parra
Representante dirección Investigación y Transferencia
Sede Atenas



Ana María Bárcenas Parra
Directora de Carrera



Angie Mariela Blanco González
Tutor del TFG



Yamileth Retana Palma
Lector TFG



Oscar Viquez Chaves
Lector TFG

Agradecimientos

A Dios primeramente, por permitirnos culminar este proyecto personal y profesional y por mantenernos fuertes, unidas y firmes hasta el final.

A nuestros profesores de carrera incluyendo diplomado, bachillerato y licenciatura, que colaboraron en nuestra formación profesional, dándonos las bases e inculcándonos el deseo de crecer y aportar a la construcción de una sociedad con valores y principios sin dejarnos vencer. Marcando la diferencia en cada uno de los pasos que demos, en cualquier lugar donde nos involucremos.

A los asesores y tutores, por brindarnos parte de su experiencia y conocimiento, por las arduas horas de dedicación, el sin fin de correcciones y palabras de aliento, para no dejar de lado lo comenzado.

A las personas que nos abrieron las puertas en la industria alimentaria en la que se desarrolló el proyecto, por su buen trato e interés.

Y para culminar a nuestros padres y personas cercanas que insistían en la importancia de cerrar este capítulo para así obtener el ansiado título de licenciadas.

Dianita, Nelis y Fer

Resumen

Listeria monocytogenes es uno de los patógenos alimentarios que causan una mayor preocupación en la industria, debido a su alto índice de mortalidad y capacidad para sobrevivir en condiciones adversas en comparación a otros microorganismos, ligado a esto se suma la formación de biofilms y la tolerancia a los desinfectantes ocasionando la formación de colonias de bacterias persistentes que constituyen una fuente de contaminación crónica en la industria. La presencia de *Listeria spp.* indica que se encuentran las condiciones ideales para el crecimiento de la especie patógena de este género.

En objetivo del presente estudio fue evaluar la aplicación de ozono como una nueva metodología de desinfección en pisos y su efecto en la eliminación de *Listeria spp.*, así como comparar su efectividad con respecto al método de desinfección tradicional (uso de amonio cuaternario).

Se establecieron como variables a controlar para la aplicación del ozono: especificaciones del equipo utilizado, tiempo de contacto del desinfectante, concentración del químico y la presencia de residuos orgánicos en la superficie; para cada una se realizaron pruebas previas para determinar los valores.

Especificaciones del equipo utilizado: la aplicación de la desinfección con ozono se realizó en el piso R, el cual fue seleccionado tomando en cuenta la alta incidencia de positivos de *Listeria* al evaluar el histórico de muestreos desde enero 2017 a enero 2018 y las características del área: condiciones que favorecen el crecimiento del microorganismo y la posible vulnerabilidad al ser un sector que maneja producto alimenticio terminado.

Tiempo de contacto: se tomó el tiempo de exposición como principal variable para obtener la concentración de ozono más efectiva para la eliminación del patógeno. Para esto se realizaron muestreos microbiológicos después del lavado y antes de la aplicación de ozono para tres tiempos diferentes: 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos, los cuales alcanzaron respectivamente concentraciones de 3,3 ppm, 9,0 ppm y 16,5 ppm.

Concentración del químico: la capacidad antibacterial se evaluó mediante hipótesis de proporciones al emplear diferentes concentraciones en distintos tiempos del desinfectante en estudio para eliminación del patógeno. Los índices de efectividad se dieron a los cinco minutos con una concentración de 16,5 ppm a nivel del suelo de empaque, arrojando después de la aplicación resultados de presencia de *Listeria spp.*

Para evaluar la efectividad del método se realizaron 28 muestreos para el análisis de *Listeria spp.* posterior a la aplicación del ozono por 5 minutos (16,5 ppm) en el piso seleccionado que se encuentra en un área con temperatura entre 5-8°C y humedad relativa de 70-72%.

Por último, para la comparación de los resultados obtenidos con la desinfección de ozono versus la desinfección con amonio cuaternario a 200 ppm se utilizó la prueba de hipótesis de dos proporciones, donde se obtuvo diferencia significativa ($p_2 \leq 0.41$) entre los resultados de cada método. Se observó que la aplicación del amonio cuaternario no influyó significativamente en la reducción del microorganismo ($p=0.41$). En cambio, si se apreció diferencias significativas en la eliminación de *Listeria spp.* bajo la aplicación de ozono a 16, 5 ppm; por lo que se concluye, que el ozono es una alternativa eficaz de desinfección para la eliminación de *Listeria spp.* en pisos.

Tabla de Contenido

Resumen	v
Tabla de Contenido	vii
Tabla de cuadros.....	x
Tabla de fórmulas.....	xi
Tabla de figuras.....	xi
Índice de gráficos	xii
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Definición del objeto de estudio	13
1.2 Justificación.....	14
1.3 Antecedentes	15
1.4 Situación Actual	19
1.5 Objetivos	22
1.5.1 Objetivo General	22
1.5.2 Objetivos Específicos.....	22
1.6 Alcances y limitaciones	22
1.7 Referente institucional.....	23
II. MARCO TEÓRICO	24
2.1 Generalidades <i>Listeria</i>	24
2.1.1 Serotipos y patogenicidad.....	25
2.1.2 Listeriosis.....	27
2.1.3 Formación de biofilm	30
2.1.3.1 Factores que favorecen el desarrollo y mecanismo de formación de los biofilms	31
2.1.4 Fuentes de contaminación.....	32
2.2 Generalidades de los desinfectantes	33
2.2.1 Técnicas para la desinfección.....	33
2.2.2 Factores de resistencia de los microorganismos a los desinfectantes	34
2.2.3 Tipos de desinfectantes de uso común en plantas de alimentos y su espectro de acción.....	35

2.2.3.1 Cloro y productos a base de cloro, incluidos los compuestos de hipocloruro	35
2.2.3.2 Yodóforos	36
2.2.3.3 Compuestos cuaternarios de amonio	36
2.2.3.4 Ácidos y álcalis fuertes	36
2.2.3.5 Agentes gaseosos esterilizantes	36
2.2.4 Variables que afectan la efectividad de la limpieza y desinfección .	37
2.2.4.1 Inactivación debida a la suciedad	37
2.2.4.2 Temperatura de la disolución.....	37
2.2.4.3 Tiempo de contacto	38
2.2.4.4 Concentración.....	38
2.2.4.5 Tamaño de la población.....	38
2.2.5 Prevención de <i>Listeria</i> por medio de la desinfección	38
2.3 Ozono	39
2.3.1 Generalidades del ozono	39
2.3.1.1 Características físico químicas del ozono	41
2.3.2 Sistemas de generación de ozono	42
2.3.2.1 Generación de ozono por descargas eléctricas	44
2.3.2.2 Elementos que forman parte de un equipo generador de ozono	45
2.3.2.2.1 Preparación del gas de alimentación	45
2.3.2.2.2 Celda generadora de ozono	45
2.3.2.2.3 Fuente de alimentación o fuente de energía eléctrica.....	46
2.3.2.2.4 Sistema de enfriamiento.....	46
2.3.3 Variables que afectan la producción o aplicación de ozono	46
2.3.4 Toxicidad y normativas del ozono	48
2.3.5 Concentraciones de aplicación de ozono	49
2.4 Análisis Estadístico	51
III. MARCO METODOLÓGICO.....	54

3.1 Localización	54
3.2 Materiales y equipos	54
3.3 Matriz de congruencia y metodológica.....	60
3.4 Procedimiento	63
3.4.1 Determinar por medio de resultados de pruebas experimentales previas los valores de las variables que afectan la efectividad del uso de ozono para establecer los parámetros requeridos de aplicación.	63
3.4.1.1 Especificaciones del equipo.....	63
3.4.1.2 Tiempo de Contacto y concentración del desinfectante.....	64
3.4.1.3 Presencia de residuos orgánicos en la superficie	66
3.4.2 Identificar los pisos que presentan mayor criticidad en la proliferación de <i>Listeria spp.</i> mediante el análisis de los históricos de muestreos microbiológicos de la industria en estudio con el fin de seleccionar los puntos de muestreo adecuados.	68
3.4.3 Validar mediante muestreos microbiológicos el tiempo de aplicación del ozono para de seleccionar la concentración de mayor eficacia en la eliminación de <i>Listeria spp.</i>	69
3.4.3.1 Procedimiento para la determinación de <i>Listeria spp</i> método VIDAS LDUO.....	75
3.4.3.2 Procedimiento para la determinación de <i>Listeria spp.</i> e identificación de la bacteria método API.....	77
3.4.4 Comparar la efectividad del ozono versus el desempeño del químico más utilizado en la desinfección de la industria de embutidos para la eliminación de <i>Listeria spp.</i>	78
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	80
4.1 Variables que afectan la efectividad del ozono	80
4.1.1 Especificaciones del equipo.....	80
4.1.2 Tiempo y concentración de Ozono	82
4.1.3 Presencia de Residuos orgánicos en la superficie.....	84
4.2 Selección de los puntos de muestreo	84
4.3 Tiempo y concentración de aplicación del ozono para la eliminación de <i>Listeria spp</i>	90

4.4 Efectividad de la concentración de ozono versus el desempeño del desinfectante amonio cuaternario a 200 ppm	92
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	97
5.1 Conclusiones	97
5.2 Recomendaciones	97
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
VII. GLOSARIO	106
Anexo	111

Tabla de cuadros

Cuadro 1. Serotipos de las diferentes especies del género Listeria.	26
Cuadro 2. Propiedades del ozono.	41
Cuadro 3. Comparación de los principales métodos de generación de ozono. ...	43
Cuadro 4. Materiales utilizados para el desarrollo del proyecto.	55
Cuadro 5. Equipos utilizados para el desarrollo del proyecto.	58
Cuadro 6. Matriz de congruencia.	61
Cuadro 7. Matriz metodológica.	62
Cuadro 8. Valores utilizados para obtener la generación de ozono en	
Cuadro 9. Procedimiento para la toma y medición de ATP.	67
Cuadro 10. Procedimiento para la toma del muestreo microbiológico para el	
Cuadro 11. Umbrales para la interpretación de resultado para la detección de	
Cuadro 12. Medición de temperatura y humedad en diferentes áreas de la planta de embutidos.	81
Cuadro 13. Concentración de ozono en ppm según el área y tiempo de exposición.	82
Cuadro 14. Mediciones de ozono en el ambiente.	83
Cuadro 15. Mediciones de ATP posterior al lavado en pisos.	84

Cuadro 16. Valores de las variables para la determinación del tamaño de la muestra.	90
Cuadro 17. Plan de trabajo del proyecto de graduación.....	108
Cuadro 18. Parámetro de aceptación y rechazo para mediciones de ATP.	118
Cuadro 19. Resultados de los análisis realizados antes y después de la aplicación de ozono a 1 minutos, 3 minutos y 5 minutos.....	121
Cuadro 20. Resultados de análisis de <i>Listeria spp.</i> posterior al lavado del piso.	122
Cuadro 21. Resultados de los análisis de <i>Listeria spp.</i> posterior a la desinfección con ozono.	123

Tabla de fórmulas

Fórmula 1. Cálculo del tamaño de la muestra.	52
Fórmula 2. Generación de ozono en ppm/min/m ³	64

Tabla de figuras

Figura 1. Distribución de les fatalidades (número y porcentaje) causadas por agentes zoonóticos en la Unión Europea durante 2012.	28
Figura 2. Aplicación de ozono sobre microorganismos.	41
Figura 3. Celda generadora de ozono por descargas eléctricas.	44
Figura 4. Ilustración de medición de la concentración de ozono en el ambiente.	66
Figura 5. Metodología para determinar la efectividad de la aplicación de ozono pisos.	69
Figura 6. Protocolo de método VIDAS® <i>Listeria</i> DUO (LDUO) para muestras productos listos para consumir cárnicos/pollo y muestras ambientales (superficies).	72
Figura 7. División del piso para la toma de muestras.	74
Figura 8. Equipo utilizado para la aplicación de ozono.....	80

Figura 9. Distribución del índice Hídrico o de humedad en Costa Rica y zonificación propuesta.....	86
Figura 10. Procedimiento para la determinación de <i>Listeria spp</i> por método API.....	108
Figura 11. Especificaciones del equipo generador de ozono	110
Figura 12. Datos de seguridad del ozono.....	113
Figura 13. Ficha técnica de uso del detergente Alcaklen	116
Figura 14. Ficha técnica de uso del desinfectante VX.....	119
.....	123

Índice de gráficos

Gráfico 1. Resultados microbiológicos de <i>Listeria spp.</i> por estación del año 2017-2018.	85
Gráfico 2. Comparación porcentaje de positivos de <i>Listeria spp.</i> entre zonas por épocas del año, 2017-2018.....	87
Gráfica 3. Porcentaje de positivos de <i>Listeria spp.</i> en la zona 3 de enero 2017 a enero 2018.	88
Gráfico 4. Cantidad de positivos de <i>Listeria spp.</i> en pisos.	89
Gráfico 5. Determinación de la efectividad del ozono en función del tiempo y la concentración.	91
Gráfica 6. Distribución binomial para la determinación de la efectividad del método.	92
Gráfico 7. Resultado de los muestreos de <i>Listeria spp.</i> antes y después de la aplicación de ozono.....	93

I. INTRODUCCIÓN

Este capítulo comprende una reseña de la situación actual que enfrentan las industrias embutidoras a nivel de inocuidad, ocasionada por la presencia de *Listeria spp.*, además del origen de este patógeno y la importancia de controlar por medio de distintas estrategias, cómo la limpieza y desinfección, así como nuevas tecnologías o métodos alternativos a los convencionales.

1.1 Definición del objeto de estudio

Las industrias procesadoras de embutidos se encuentran diariamente alertas a los posibles problemas microbiológicos a los que están expuestas por la naturaleza de sus procesos, por lo que necesitan tener controles exhaustivos a nivel de limpieza y desinfección en las diferentes superficies de contacto y de no contacto con los alimentos para no ver afectado el producto terminado.

El principal objetivo de inocuidad de las embutidoras, es evitar el incremento de microorganismos patógenos y descomponedores en las diferentes etapas productivas y de almacenamiento. Las superficies de no contacto con los alimentos representan zonas de mayor riesgo de crecimiento de cargas microbianas, especialmente los pisos y drenajes.

Dentro de los patógenos a controlar en este tipo de industria, se encuentra la *Listeria spp.*, siendo un riesgo latente por la composición de materias primas que se manejan en el proceso, es importante establecer barreras entre las zonas donde se manipula el producto crudo, de las zonas donde el producto se encuentra cocido.

La industria alimentaria dirige sus investigaciones al desarrollo de tecnologías y a la aplicación de desinfectantes seguros y efectivos, tanto para el lavado como para la conservación de los alimentos. El ozono, dado su elevado poder germicida y su descomposición espontánea a oxígeno, se ha convertido en un agente potencial para garantizar la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos (Rice, 2005).

Debido a que el uso de este químico ha generado gran interés en conocer más información acerca de su rango de acción y en su efectivo poder

antimicrobiano el enfoque del proyecto se dirige en la aplicación del ozono para la eliminación de *Listeria spp* en superficies de no contacto.

1.2 Justificación

Las industrias destinadas a la elaboración de alimentos, así como las entidades de Salud Pública, luchan diariamente en la disminución de casos asociados a enfermedades generadas por la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos patógenos. La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes* se sitúa entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico ya que presenta una alta tasa de mortalidad (Muñoz et al, 2011).

La OMS (2018), indica: “Los alimentos implicados en los brotes de listeriosis han sido productos cárnicos listos para comer, como salchichas, patés, salmón ahumado y salchichas de carne cruda fermentada, así como productos lácteos (entre ellos quesos blandos y leche y helados no pasteurizados), ensaladas preparadas (ensaladas con repollo y germinados) y frutas y hortalizas frescas. Lo que refleja la preocupación constante en este tipo de industrias hacia la prevención y control de fuentes que pueda causar el desarrollo del microorganismo causante de esta enfermedad.

Listeria spp. está ampliamente extendida en el medio agrario (forrajes, agua, suelo), en la acuicultura y en los ambientes de elaboración de alimentos. Posee una gran capacidad para sobrevivir y multiplicarse en condiciones adversas, puede permanecer largo tiempo en superficies y maquinarias, protegiéndose en los llamados “biofilms”. En general todos los microorganismos que forman y crecen en biofilms están protegidos frente al calor y el estrés ambiental, así como frente a los procedimientos habituales de limpieza y desinfección y son, por tanto, difíciles de erradicar (Canet J. et al, s.f.).

Conociendo las condiciones para el desarrollo, la resistencia y la gravedad que genera este microorganismo, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas que generen resultados más efectivos y compitan contra la resistencia que han generado algunas bacterias frente a los métodos tradicionales de desinfección.

El ozono es un oxidante muy fuerte y literalmente destruye las moléculas de sustancias orgánicas tales como bacterias, mohos, además se utiliza para esterilizar el aire y eliminar los olores y gases tóxicos. Ha sido utilizado por la industria durante muchos años y en diferentes aplicaciones tales como el control de olores, la purificación del agua y como desinfectante Franken (2005).

La evolución, casi exponencial, de la tecnología de ozono y sus aplicaciones prácticas en el campo de la alimentación abren una gran oportunidad en el mundo de la investigación; por lo cual el enfoque del proyecto se dirige en ampliar el rango de aplicación de este químico utilizándolo en la desinfección de pisos para la eliminación *Listeria spp.* en una industria de embutidos, aprovechando así las ventajas de este químico sobre los métodos actuales de desinfección, entre ellas: disminución de costos, menor impacto ambiental por la eliminación de químicos y una alta efectividad en la eliminación de microorganismos.

La elaboración del proyecto genera un gran aporte bibliográfico en el campo de la inocuidad para las industrias nacionales, instituciones gubernamentales, como estudiantes y profesionales de la carrera de Ingeniería de Alimentos quienes luchan constantemente con los problemas de inocuidad, hemos tenido la oportunidad de llevar a la práctica una nueva metodología de desinfección, así como crear una base para futuras investigaciones.

1.3 Antecedentes

Se han descrito alrededor de 250 agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales. Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estima que una de cada seis personas (48 millones) se enferman todos los años en los EE.UU. al consumir alimentos contaminados y que de ellas 3000 fallecen. Los peligros biológicos representan la causa primaria de peligros reportados de los cuales la *Salmonella* (33%) y la *Listeria monocytogenes* (18%) son las principales causantes (FSPCA, 2016).

En el año 1953 se reconoció la participación de un alimento en la transmisión de la enfermedad, siendo hasta 1983 (30 años después), que se comunicó el primer brote de listeriosis relacionado a alimentos (García, 2014). A fines de los años setenta y a comienzos de los años ochenta, el número de aislamientos de *Listeria spp.* en el mundo comenzó a incrementarse y desde 1983 en adelante, una serie de brotes epidémicos en humanos en Norteamérica y Europa, claramente establecieron a la listeriosis como una importante enfermedad de transmisión alimentaria (Puentes, 2012).

Los productos más involucrados son los de pesca ahumados o marinados, productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico y quesos de pasta blanda y semi-blanda (EFSA, 2013).

Este microorganismo, puede contraerse por el contacto con animales, personas infectadas, suelo o agua contaminada. El riesgo de mortalidad de la bacteria ronda entre el 20% y el 30% de acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), y es capaz de generar mayores efectos perjudiciales en la población vulnerable. Dichos efectos van desde infecciones en el sistema nervioso central, hasta abortos espontáneos, muerte neonatal y meningitis. En el año 2010 infectó a un aproximado de 23.000 personas a nivel mundial, y de esa cifra 5.463 fallecieron según los últimos datos publicados por un informe realizado por la OMS (Cossart, 2017).

Para el caso de Costa Rica, el patógeno se identificó por primera vez en 1991 (Echandi y Antillon, 2000). En el año 2000, en el país; se realizó un análisis donde evaluaron la calidad bacteriológica de alimentos consumidos por costarricenses durante diez años, efectuado por la Sección de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica donde se presta especial interés a los alimentos de venta ambulante, a los expandidos en festejos populares y a los obtenidos a partir de algunos servicios de alimentación pública.

Los resultados obtenidos demostraron una importante contaminación fecal y la presencia de algunos patógenos, en estos alimentos donde demuestran la presencia de *Listeria spp.* en el 39% de las muestras y de *L. monocytogenes* en 7% de las mismas. Determinaron la presencia de *Listeria spp.* en un porcentaje muy alto el cual es de gran importancia, ya que

recientemente se han implicado otras especies, incluyendo *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* en la producción de enfermedades, tanto en el hombre como en animales (Echandi y Antillon, 2000).

Otra razón por la que la presencia de *Listeria* es importante en alimentos es porque denota malos hábitos de higiene, ya que el género como tal es utilizado actualmente para determinar la efectividad de la sanitización (EFSA, 2013).

El reporte de estos casos ha causado gran alarma a nivel mundial a los productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias. Esta preocupación a través de los años ha ido en aumento, ya que tanto investigadores como entidades gubernamentales de salud, han llegado a la conclusión que no es posible su completa eliminación a nivel de las plantas procesadoras de alimentos, por lo cual han realizado una llamada a extremarse las medidas para su control tanto a nivel industrial y comercial.

Una de las formas que tienen las empresas para minimizar el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos es por medio de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), específicamente a través de un plan de saneamiento. Actualmente la industria utiliza la aplicación de diferentes productos químicos para implementar sus programas de limpieza y desinfección y lograr cumplir su objetivo primordial, asegurar la inocuidad de sus productos.

Se ha comprobado que la *Listeria spp.*, ha desarrollado diferentes mecanismos para eludir el efecto tóxico de los antibióticos y generar protección contra los compuestos químicos de los desinfectantes. Desde 1988 se viene reportando resistencia a los compuestos de amonio cuaternario, (QAC) entendiendo por resistencia en la industria de alimentos; a la habilidad que desarrollan los microorganismos en sobrevivir a exposiciones cortas de los desinfectantes (Herrera, 2004).

Una de las causas de esta tolerancia es el aumento en la frecuencia de contacto con los QAC (Hermann, 2001). Por esta razón, la industria de alimentos aconseja una rotación constante de los diferentes desinfectantes, sin embargo, se ha considerado que la adaptación cruzada con otros desinfectantes diferentes a los compuestos de amonio cuaternario es responsable de reforzar la supervivencia de los microorganismos (Ruiz et al,

2008), como lo demuestra un estudio en el cual se evidenció la adaptación de *L. spp.* después de 2 horas de exposición a varios desinfectantes como la alquilamina terciaria y compuestos de amonio cuaternario (surfactantes catiónicos con mecanismos similares de acción).

También se resalta la resistencia de *Listeria spp.* a los desinfectantes como el amonio cuaternario, el hipoclorito de sodio y el persulfato de potasio, según el estudio realizado por Lunden en el 2004 donde la resistencia fue investigada mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI), y quedó demostrado que un 7 a 26% de cepas de *Listeria* fue resistente a los compuestos de amonio cuaternario (Alós., 2010).

Las industrias alimentarias han ido incursionando otros métodos para asegurar la eficacia de los programas de saneamiento y por ende asegurar la inocuidad de sus productos. Debido a esto en la década del 70 comenzaron a realizarse investigaciones sobre la resistencia del patógeno a los diferentes desinfectantes utilizados. Debido a estos resultados, desde hace tiempo se investiga el desarrollo de procesos alternativos de desinfección y sanitización que aseguren la inocuidad de los alimentos.

Como consecuencia, surgieron métodos superiores a la cloración en cuanto a efectividad, como el tratamiento con radiación ultravioleta y la ozonización. En 1997 la U.S. Food and Drug Administration (FDA) reconoció al ozono como GRAS (Reconocido como seguro) para su utilización en contacto con alimentos. No obstante, fue en el 2001 cuando este organismo dio su fallo definitivo y aprobó la normativa del uso de ozono como aditivo de alimentos, durante su procesamiento o almacenamiento. Sin embargo, muchas industrias ya habían comenzado a investigar las aplicaciones de este gas, e incluso las habían puesto en práctica (Poutou, 2008).

Actualmente existen procesos de limpieza y desinfección, así como técnicas de conservación, en los más diversos sectores alimentarios que incluyen el ozono, los cuales son sumamente efectivos y presentan importantes ventajas. La actividad antimicrobiana del ozono se basa en su gran potencial de oxidación muy superior a otros compuestos químicos como el peróxido de hidrogeno, ácido hipocloroso, cloro y el yodo (Beutelspacher, 2005).

Según un informe en España se utiliza el ozono como alternativa desinfectante de equipos y superficies en la industria alimentaria, donde fue incorporado como la primera aplicación a escala industrial de un nuevo sistema de limpieza CIP en el que se ha integrado la utilización de agua ozonizada como agente desinfectante, aplicada a una industria láctea, el estudio resalta que es posible obtener la misma eficiencia higiénica con un sistema CIP-ozono que con uno convencional, adicional que se logra eliminar resistencia de ciertas bacterias patógenas a los productos químicos (Ardiles, 2012).

1.4 Situación Actual

A nivel de legislación en Costa Rica las plantas procesadoras de embutidos son reguladas por el ente responsable de Salud Animal (SENASA), siendo un órgano adscrito al Ministerio de Agricultura y Ganadería, según lo establece la Ley N° 8495, Ley General del Servicio Nacional de Salud Animal, en ella se establece el control de muestreo de la bacteria *Listeria* en superficies y producto terminado para los diferentes establecimientos, atreves de muestreos microbiológicos; la cantidad de muestreos es establecida por el SENASA y dependiendo de la cantidad de producción reportada por las empresas alimentarias (Jiménez, 2017).

La incidencia del patógeno *Listeria* ha prevalecido a través del tiempo y SENASA en conjunto con las empresas han doblado esfuerzos para aplicar mejoras en los procesos y controlar este patógeno. Con el fin de establecer los controles en las plantas procesadoras de embutidos en Costa Rica, se publicó en mayo 2017 un documento donde se declara como “Procedimiento ante violatorios” reforzando por parte de la entidad gubernamental el tema de los resultados microbiológicos de rutina y extraordinarios de cada establecimiento, tanto para controles internos del como los realizados por el SENASA en cada empresa, el análisis de superficies, productos en proceso y terminados (Jiménez, 2017).

Además, el procedimiento establece una serie de pautas que las empresas deben seguir en caso de resultados positivos en cuanto al patógeno. En periodos anteriores el SENASA no tenía establecido como requisito legal el reporte obligatorio de resultados microbiológicos internos de

los establecimientos, el objetivo de dicha entidad es fortalecer los sistemas de control microbiológicos de las empresas procesadoras de productos cárnicos en el país.

De igual manera los productos elaborados por las plantas procesadoras de embutidos son regidos bajo el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos, publicado el 19 de mayo del 2009. Donde se detalla en el grupo 8 (Carnes y productos cárnicos) sobre el subgrupo 8.2 (Productos cárnicos cocidos y curados (embutidos)) el parámetro de ausencia de *Listeria monocytogenes*.

El uso de la tecnología de aplicación de ozono en Costa Rica ha sido una innovadora alternativa que ha desafiado el control de patógenos en la industria médica y alimentaria. En el año 2010 se inicia con el desarrollo de pruebas experimentales con la empresa Biopureza en conjunto con el Centro Investigación de Tecnología de Alimentos (CITA), la facultad de medicina y microbiología de la Universidad de Costa Rica en la industria médica y alimentaria. El proceso de investigación se da en forma conjunta con profesionales de la Universidad de Costa Rica y el propietario de la empresa Biopureza (Armenta, 2018).

En Costa Rica se logra la implementación del método por primera vez en un hospital Centroamericano, utilizando el ozono y la luz ultravioleta para garantizar la inocuidad de las salas de operación y la esterilización de instrumentos de trabajo. Actualmente hospitales como el Calderón Guardia, hospital del Trauma (INS) y el México cuentan con equipos en las salas quirúrgicas (Prada, 2018).

Según menciona Carlos Bravo médico dermatólogo, lograron tener la disminución en un 84% de mohos y levaduras en mediciones ambiente en 12 horas y eliminación de *E.coli* en menos de 10 segundos (Rebentos, 2014).

En el año de 2011 la empresa Biopureza da un mayor enfoque en la industria alimentaria, trabajando en el control preventivo de patógenos a nivel de superficies de contacto, no contacto y ambientalmente. Inicia la incorporación a industrias como Florida Bebidas, Florida lácteos, Auto Mercado, Terrapez, Dos pinos, entre otras.

Se ha tenido participación en industrias de alimentos preparados, panificación, vegetales, cárnicos, bebidas y lácteos donde se han desarrollado equipos específicos de ozono y luz ultravioleta según la necesidad de cada empresa, para el control de cargas ambientales, patógenos, mohos y levaduras (Armenta, 2018).

Para el patógeno de *Listeria monocytogenes*. en específico, la empresa Biopureza, ha desarrollado métodos de control sobre hortaliza de hoja, filetes de pescado, canales de bovinos y porcinos, canastas o cajas y tarimas en industria cárnica, frutas y verduras, estantes de almacenamiento de cuartos fríos de industrias de productos alimenticios, maquinaria de corte en cárnicos y peladora de frutas, además de equipos en específico con características variadas que presentan el problema por formación de biofilms.

La efectividad del uso de estas tecnologías ha desafiado al equipo de investigación para explorar más sobre esta área de la desinfección y esterilización y así desarrollar más tecnologías similares que le den solución a muchos problemas de la industria alimentaria.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

Evaluar la aplicación de ozono para la eliminación de *Listeria spp.* en la industria de embutidos mediante análisis microbiológicos, con el fin de mejorar la desinfección de pisos.

1.5.2 Objetivos Específicos

-Determinar por medio de resultados de pruebas experimentales previas, los valores de las variables que afectan la efectividad del uso de ozono para establecer los parámetros requeridos de aplicación.

-Identificar los pisos que presentan mayor criticidad en la proliferación de *Listeria spp.* mediante el análisis de los históricos de muestreos microbiológicos de la industria embutidora en estudio, con el fin de seleccionar los puntos de muestreo adecuados.

- Validar mediante análisis microbiológicos de *Listeria spp.* por metodología API tres tiempos de aplicación del ozono en pisos, para seleccionar la concentración de mayor eficacia en la eliminación del microorganismo.

- Comparar mediante análisis microbiológicos acreditados la efectividad de la concentración de ozono seleccionada versus el desempeño del amonio cuaternario a 200 ppm en la eliminación de *Listeria spp.* en pisos.

1.6 Alcances y limitaciones

Este proyecto está dirigido a la desinfección de pisos en una industria embutidora nacional, las pruebas preliminares y el desarrollo de todos los objetivos se realizaron en dicha la planta. Se utilizaron las instalaciones del laboratorio de la empresa para el análisis de los muestreos.

La desinfección con ozono es una metodología nueva que se encuentra en auge para la industria alimentaria en nuestro país, esto lo convierte en una limitante ya que se cuenta con escasa evidencia bibliográfica a nivel nacional; otra restricción en el desarrollo del proyecto se da debido a la complejidad y costo de los análisis microbiológicos imposibilitan poder cuantificar las unidades formadoras de colonias y la tipificación de *Listeria spp.* dando solo resultados cualitativos como ausencia o presencia del microorganismo.

Dado los efectos a la salud que se pueden generar por la exposición a altas concentraciones de ozono en el ambiente durante largos períodos de tiempo se debe asegurar mediante mediciones de concentración de ozono en ambiente que este no alcance más del 0,1 ppm en 8 horas de trabajo, además se prevé la expansión del químico en el ambiente colocando láminas especiales al equipo dispensador para que el ozono desinfecte directamente el piso, siendo efectivo y no riesgoso para el ser humano.

1.7 Referente institucional

Tanto las pruebas preliminares como las que llevaron a la obtención de los resultados de los objetivos se realizaron en el laboratorio de la empresa embutidora.

II. MARCO TEÓRICO

A continuación, se presentan las referencias bibliográficas consultadas para la realización del proyecto de investigación, que consiste en la evaluación de la aplicación de ozono en la eliminación de *Listeria spp*; parte de los detalles y consideraciones tanto del microorganismo como de los químicos a utilizar, así como sus condiciones y medios para su aplicación.

2.1 Generalidades *Listeria*

El género *Listeria* fue descrito por primera vez en 1926 cuando fue aislado de conejos enfermos con un nivel de mocitos anormalmente elevado (PROQUIMIA, 2016). Se le designó originalmente *Bacterium monocytogenes*, más tarde en honor a Lord Lister, se le cambió el nombre por el de *Listeria monocytognes*, pionero en el concepto de la cirugía aséptica y en la prevención de la sepsis quirúrgica (Ruíz et al, 2008).

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas (Alós., 2010). En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud, presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 30°C o menos, pero inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flajelos se inactivan (Villalobos y Martínez, 2007). Las colonias que tienen uno o dos días de incubación son pequeñas (de 1 a 2 mm) y lisas, al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. (Alós., 2010).

Es un organismo mesófilo (psicótrofo) que puede crecer a temperaturas bajas, son capaces de crecer en condiciones de refrigeración, capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas de -0,4°C a 45°C y a una alta concentración de sal (20%). (PROQUIMIA, 2016)

La *Listeria* es una catalasa positiva, la cual es una enzima que se descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (PROQUIMIA, 2016), es un género bacteriano ubicua en la naturaleza, puede encontrarse en: suelos, plantas, aguas, ensilados, aguas residuales, residuos de mataderos, leche procedente de introducción, animales sanos o con mastitis,

heces humanas o animales, y se aísla del ganado vacuno, ovino o caprino, aves de corral y también, aunque raramente, de animales salvajes (Villalobos y Martínez, 2007).

Entre las diferentes especies incluidas en el género, se destacan dos especies patógenas como *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, y otras no patógenas como *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*. Recientemente se han identificado nuevas especies, en concreto *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. aquatica*, *L. floridensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis* y *L. grandensi* (Alós., 2010).

La capacidad para adquirir genes de resistencia antimicrobiana a partir de otras especies bacterianas, puede soportar condiciones ácidas mínimas de 4,5 pH (Ruiz et al, 2008). La *L. innocua* y *L. monocytogenes*, comparten el mismo hábitat ecológico, requerimientos fisiológicos y pueden crecer perfectamente en los medios selectivos corrientes para *Listeria*, desarrollando colonias que morfológicamente son indistinguibles (Villalobos y Martínez, 2007).

La *Listeria* tiene la capacidad de formar biofilms que desarrollan resistencias a la acción de los desinfectantes (PROQUIMIA, 2016). Acción que le ha permitido sobrevivir a numerosas tecnologías del procesado de alimentos y multiplicarse durante el almacenamiento de determinados alimentos, lo cual, hace que la exposición de los humanos a esta bacteria sea relativamente frecuente.

2.1.1 Serotipos y patogenicidad

La patogenicidad es la capacidad del agente infeccioso de producir enfermedad. El riesgo de contraer la listeriosis depende no solamente de la virulencia de *Listeria*, sino también de la concentración del patógeno en el alimento mediante un mecanismo de dosis-respuesta. Se sabe que la dosis infecciosa es de al menos 10^2 células viables en el caso de los grupos de riesgo y de 10^4 en el caso de la población sana (Parrillada y Vaqué, 2014).

Esta bacteria ingresa al organismo a través del tracto gastrointestinal, una vez en el cuerpo, atraviesa la barrera mucosa del intestino por endocitosis activa de las células endoteliales, llega al torrente sanguíneo y se disemina a otros sitios, en especial al sistema nervioso central y la placenta (Puma,

2004). La *Listeria monocytogenes*, es una de las bacterias más invasoras conocidas, lo cual está relacionado con su capacidad de multiplicarse en el organismo debido a una serie de factores de virulencia.

El principal sitio de infección es el hígado, debido a su capacidad de propagación directa célula a célula puede diseminarse en los tejidos del hospedador e inducir la formación de focos infecciones (Puma, 2004).

Las seis especies de *Listeria* se caracterizan por la posesión de antígenos que dan origen a 17 serovariedades, la principal especie patógena es la *L.monocytogenes*, está representada por 13 serovariedades (ver cuadro 1), algunas de las cuales son compartidas por la *L.Innocua* y la *L.seeligeri*. Aunque la *L.innocua* está representada solamente por tres serovariedades, a veces es considerada la variante apatógena de *L.monocytogenes*.

Cuadro 1. Serotipos de las diferentes especies del género *Listeria*.

	SPECIE	SEROTIPOS
1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e,7
2	<i>L. grayi</i> S	(específico)
3	<i>L. innocua</i>	4ab, SD, 6a, 6b
4	<i>L. ivanovii</i>	5
5	<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, SD, 4b, 4d, 6b
6	<i>L. welshimeri</i>	1/2b, 4c, 6a, 6b, SD

Fuente: Parrillada y Vaqué, 2014.

La mayor heterogeneidad antigénica de la envoltura externa de la especie última, puede estar relacionada con el gran número de hospedadores animales en los que se puede multiplicar. Los serotipos más frecuentes aislados son los tipos 1y4 (Rodríguez, 2007). Los serotipos de *L. monocytogenes* que más frecuentemente se aíslan son 1/2a,1/2b y 4b (en un porcentaje superior al 95% de todos los casos). El estudio de los serotipos es el primer nivel de diferenciación de las cepas de *L. monocytogenes*. La

serotipificación se utiliza en los estudios epidemiológicos, a pesar de que la capacidad de discriminación es bastante pequeña y de que existen cepas no serotipables. Los métodos moleculares permiten diferenciar las cepas y clones de *L. monocytogenes* en subtipos (Parrillada y Vaqué, 2014).

Los genes de virulencia de *Listeria* se organizan dentro de regiones del cromosoma, conocidas como islas de patogenicidad. Estas regiones son adquiridas por la bacteria por medio de mecanismos de transferencia genética horizontal (a veces como parte de un elemento genético móvil), por lo cual son importantes en la evolución bacteriana (Vázquez *et al.* 2001).

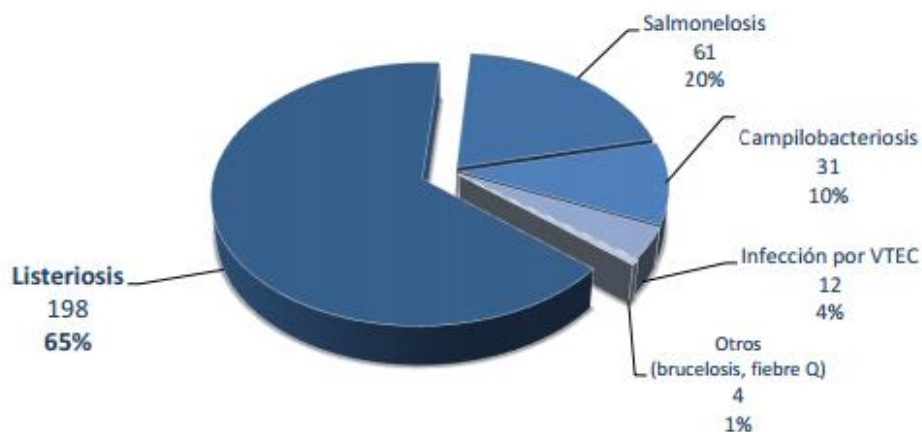
2.1.2 Listeriosis

La *listeria* provoca infecciones asociadas al consumo de alimentos contaminados, conocida como listeriosis, la cual es una enfermedad de origen alimentario de carácter grave, pero de baja frecuencia, que causa la muerte hasta en un 30% de los casos. El mayor peligro como fuente de contagio para el hombre son los alimentos listos para el consumo, especialmente los que se conservan refrigerados por periodos prolongados.

La incidencia de listeriosis es relativamente baja en comparación con otras enfermedades asociadas a microorganismos alimentarios. Según los datos epidemiológicos de los últimos años en diversos países de la Unión Europea y en los Estados Unidos, la tasa anual media de listeriosis se sitúa en torno a los 0,3 casos/100.000 habitantes (Bove, 2014).

El último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sitúa la tasa de listeriosis del 2012 en 0,41 casos/100.000 habitantes en España, sin embargo, es uno de los países con una incidencia más alta de listeriosis (0,91 casos/100.000 habitantes en el 2012), un valor entre 2 y 3 veces superior a la media de la Unión Europea (EFSA, 2012) De acuerdo con el último informe de EFSA sobre zoonosis y brotes de toxiinfecciones alimentarias, los 198 casos fatales de listeriosis representaron el 65% de las muertes causadas por zoonosis confirmadas de 2012 (Figura 1) (EFSA, 2012).

Figura 1. Distribución de las fatalidades (número y porcentaje) causadas por agentes zoonóticos en la Unión Europea durante 2012.



Fuente. Informe EFSA, 2014.

Sólo a partir de comienzos de los años 80 la listeriosis fue reconocida como una enfermedad transmitida por los alimentos, al ocurrir en Estados Unidos y Europa varios brotes en que se demostró mediante estudios epidemiológicos.

En la población existen grupos más sensibles a contraer la listeriosis como son las mujeres embarazadas provocando abortos espontáneos, nacimientos prematuros y mortinatalidad; los pacientes inmunodeprimidos por tratamientos contra el cáncer, trasplantados o personas enfermas de Sida y los ancianos. Se presenta con un cuadro invasivo con infección sistémica, septicemia y encefalitis (Bove & Garriga, 2014). En personas que no pertenecen a los grupos de riesgo o que consumen antiácidos regularmente, una infección elevada de *L. spp.* causa cuadros de gastroenteritis febriles leves similares a una gripe.

El número de células bacterianas que deben ingerirse para que se presente el cuadro aún no está claramente definido, pero se ha establecido que al consumir un alimento que contenga menos de 100ufc/g no debería presentarse el cuadro en individuos que no pertenecen al grupo de riesgo. El

periodo de incubación para la presentación de los síntomas al cabo de 2-90 días (Puentes, 2012).

El diagnóstico oportuno y tratamiento temprano con antibióticos como ampicilina y aminoglucósidos o cotrimoxazol son efectivos. Sin embargo, la sintomatología generalmente no permite un diagnóstico temprano, porque los primeros signos de un brote son generalmente el aborto y/o la muerte del individuo. La confirmación de una infección por *L. spp.* es el aislamiento de la bacteria del líquido cefalorraquídeo o de la sangre del paciente (Bello et al, 2012).

Los antecedentes epidemiológicos de listeriosis muestran que se informa de casos esporádicos, así como brotes de listeriosis invasiva, con una frecuencia de 3 a 8 casos por 1.000.000 habitantes. Se le considera por lo tanto una ETA de baja frecuencia, pero de alta mortalidad, causando la muerte de un 20 a 30% de las personas infectadas. En Estados Unidos constituye menos del 1% de los casos de ETA, sin embargo, es la responsable del 28% de muertes (Cortez y Sánchez, 2015). Esta frecuencia en ocasiones aumenta y en esos casos es generalmente atribuible a algún alimento específico.

En la industria alimentaria el patógeno sobrevive a los procesos de limpieza e higienización por su capacidad de formar biofilm sobre superficies de trabajo y equipos, contaminando los alimentos que allí se procesan (PROQUIMIA, 2016).

En Estados Unidos ha habido una reducción en el número de casos durante los últimos años, en cambio en Europa la presentación de la enfermedad aun es variable. Esta disminución se atribuye en parte a la implementación de sistemas como el HACCP por las empresas, pero también por una mayor información sobre los riesgos por parte de la población.

Los costes, tanto a nivel de salud como económicos, asociados a la incidencia de listeriosis hacen que la minimización del riesgo de *Listeria* en productos listos para el consumo constituya uno de los principales objetivos que hay que tratar en materia de salud pública (Bove, 2014).

2.1.3 Formación de biofilm

Los biofilms son estructuras complejas formadas por microorganismos que se fijan firmemente a una superficie mediante una matriz extracelular (conocida como EPS “extracellular polymeric substance” o expolisacárido), generada por excreciones de los propios microorganismos y compuesta principalmente por polisacáridos y proteínas (PROQUIMIA, 2016).

Los biofilm representan un sistema muy eficaz de protección para los microorganismos frente a condiciones ambientales adversas como variaciones de temperatura, agentes antimicrobianos e higienizantes. La formación del biofilms se produce cuando las bacterias se adhieren a las superficies y empiezan a excretar sustancias viscosas que favorecen su anclaje a todo tipo de materiales como metales, plásticos entre otros (Ciampi et al, 2009).

La tasa de crecimiento en el interior del biofilm es lenta por lo cual requieren de una baja disponibilidad de nutrientes. Esto implica que un alto porcentaje de la población se encuentra en la fase de desarrollo estacionario, lo cual hace que sean más resistentes a la acción de agentes antimicrobianos, que en la fase de desarrollo exponencial (Ríos, 2013).

La exposición de las bacterias a concentraciones subinhibitorias de desinfectantes usados en la industria alimentaria y la consiguiente adaptación, puede aumentar su capacidad para formar biofilms y sobrevivir al tratamiento posterior con concentraciones elevadas de los mismos compuestos (Miramont, 2013). Además, los desinfectantes pueden afectar a la cinética del crecimiento bacteriano, a la hidrofobicidad de la superficie celular, y a la morfología y ultraestructura que son factores directamente relacionados con la adhesión a las superficies y la formación de biofilm (Miramont, 2013).

La superficie sobre la cual se desarrolla biofilm tiene importancia en la firmeza de éste para adherirse y también para ser destruido (Alvarez, 2015), demostraron que sobre acero inoxidable *L. spp* formaba un biofilm más grueso que sobre teflón. Sin embargo, eran más fáciles de eliminar del acero inoxidable.

Al comparar biofilm desarrollados sobre goma o polietileno con los desarrollados sobre acero inoxidable también se demuestra que hay mayor

dificultad para su eliminación o para la destrucción del patógeno sobre la goma y el polietileno que sobre el acero inoxidable al utilizar higienizantes en base a cloro o yodo (Hernández, 2009). Este es un antecedente importante a considerar cuando se requiere determinar potenciales puntos de contaminación por el patógeno en la línea de procesamiento de un alimento. Esta biocapa bacteriana, puede adquirir la capacidad de sobrevivir a los procesos de limpieza y desinfección, debido a que como consecuencia de la adherencia el microorganismo se vuelve más resistente (Ardiles, 2012).

Uno de los problemas que enfrenta la industria es que los productos químicos utilizados para higienizar superficies como el ácido peracético, amonios cuaternarios y compuestos clorados no garantizan la eliminación del patógeno o bien pierden su efectividad en presencia de materia orgánica, como es el caso del cloro. Este problema se ve agravado dado que *L. monocytogenes* forma biopelículas o “biofilm” en superficies donde han quedado residuos orgánicos lo cual dificulta la acción de los higienizantes (González, 2016).

2.1.3.1 Factores que favorecen el desarrollo y mecanismo de formación de los biofilms

Los biofilms pueden formarse en cualquier medio que presente condiciones de humedad, temperatura y aporte de nutrientes adecuadas para el crecimiento bacteriológico. Por consiguiente, la presencia de suciedad o incrustaciones constituyen un sustrato ideal para el desarrollo de los biofilms. La estructura de la superficie también afecta en el proceso de formación, superficies poco uniformes o de alta porosidad, favorecen el anclaje, sea cual sea el material (acero inoxidable, teflón, plásticos entre otros) (Flores, 2018).

Los principales factores que favorecen el desarrollo de un biofilm pueden clasificarse en microorganismos, características del sustrato y condiciones medio ambientales (PROQUIMIA, 2016).

El mecanismo de formación de los biofilms ha sido fuente de numerosos estudios científicos (EFSA, 2013). Según Rodríguez en el 2007, estos estudios han puesto de manifiesto las siguientes etapas en el proceso de desarrollo de las biopelículas:

- a. Invasión: una célula individual se adhiere de forma leve y débil a una superficie, aprovechando como puntos de anclaje la morfología de la superficie y residuos superficiales.
- b. Colonización: consiste en la adhesión y fijación de las células sobre el sustrato, creando colonias bacterianas.
- c. Maduración (o formación de biofilm): se forma una estructura organizada de células bacterianas y matriz EPS, adaptada a la disponibilidad de nutrientes, húmeda y oxígeno del medio. Se desarrollan también mecanismos de cooperación entre especies, las bacterias que forman el biofilm se adaptan al nuevo entorno mediante síntesis de nuevas proteínas y enzimas, que mejoran su resistencia al ambiente. Pueden formarse distintas capas con la posibilidad de desarrollar un biofilm anaeróbico debajo de uno aeróbico.

2.1.4 Fuentes de contaminación

La presencia del patógeno en materias primas como leche, carne, pescado y vegetales, refuerza la necesidad que la industria procesadora de estos alimentos establezca barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso. En particular en aquellos puntos donde el alimento no es sometido a un tratamiento que permita la destrucción del patógeno. Es por ello, que las industrias tienen, o deberían tener barreras sanitarias al ingreso de las salas de proceso. Éstas consisten en un riguroso control del uniforme del personal, lavado de manos, uso de pediluvios y reducción del tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan alimentos. Se ha determinado que *L. spp.* ingresa por medio de la vestimenta, el calzado, las manos de los operarios, como también con los utensilios, el equipamiento y los materiales utilizados (Parrillada y Vaqué, 2014).

La contaminación cruzada, es decir, el contacto de los alimentos listos para el consumo con superficies o utensilios contaminados, es otra vía de contaminación. Dada la dificultad para impedir su ingreso a los lugares de procesamiento, es necesario tomar medidas rigurosas para su eliminación durante los procesos de limpieza e higienización y conocer los parámetros que limitan su desarrollo. Uno de los problemas que enfrenta la industria es

que los productos químicos utilizados para higienizar superficies como el ácido peracético, amonios cuaternarios y compuestos clorados no garantizan la eliminación del patógeno o bien pierden su efectividad en presencia de materia orgánica, como es el caso del cloro (Ciampi et al, 2009).

2.2 Generalidades de los desinfectantes

Las plantas de alimentos requieren de la aplicación de desinfectantes para eliminar y/o prevenir los microorganismos presentes en las superficies de contacto y no contacto con los alimentos. Tener claridad del tipo de biocidas disponibles, su dosis y método de aplicación, son parámetros que pueden determinar la efectividad del desinfectante.

Los desinfectantes son sustancias que permiten disminuir la carga de bacterias presentes, reduciendo al mínimo el riesgo de alimentos contaminados por peligros biológicos y por tanto garantizando la inocuidad de los productos.

El desinfectante tiene como objetivo atacar a los elementos vitales del microorganismo, lograr su destrucción y, por tanto, causar el deterioro de la célula. En la industria alimentaria, debe conseguir la eliminación de los microorganismos patógenos y la reducción hasta niveles considerados aceptables de los microorganismos alterantes (Betelgeux, 2014).

Lavar es un proceso en el que la suciedad se disuelve o suspende, generalmente en agua ayudada de detergentes y desinfectar consiste en destruir la mayor parte de los microorganismos de las superficies mediante agentes químicos. Los productos empleados en la limpieza y desinfección dependerán de la clase de suciedad a tratar, así como el tipo de material (Instituto Nacional de Aprendizaje, 2007).

Hay dos métodos básicos para lavar utensilios, equipos y superficies. El método manual y el método mecánico, ambos son igualmente satisfactorios si se realizan efectivamente. En cuanto a la desinfección se utiliza dos técnicas el calor y la aplicación de químicos (Instituto Nacional de Aprendizaje, 2007).

2.2.1 Técnicas para la desinfección

Existen diferentes metodologías para la desinfección de superficies, las cuales se describen a continuación:

Desinfección por calor: el calor constituye el método más eficaz de desinfección. Por norma general, los desinfectantes químicos deben utilizarse

solamente en casos en que no sea posible una desinfección completa por medio de calor (INAL, s.f.)

El agua entre 65°C y 80°C, durante dos minutos como mínimo, es el más eficaz desinfectante que se conoce y también el más económico. Siempre que sea posible, se elegirá el calor (INA, 2018).

Desinfección por vapor: cuando se use vapor, la temperatura de la superficie deberá elevarse al punto de desinfección durante un tiempo determinado. Las lanzas que emiten chorros de vapor son útiles para desinfectar las superficies de la maquinaria y otras superficies de difícil acceso. El calentamiento de las superficies durante la aplicación de vapor de alta temperatura favorece el secado posterior (Sánchez, s.f.).

Desinfección química: los requisitos que debe reunir un desinfectante presentan ambivalencia, es decir, debe ser eficaz para la eliminación de los microorganismos y ser inocuo no sólo para los objetos tratados sino también para las personas y el ambiente (INA, 2010).

2.2.2 Factores de resistencia de los microorganismos a los desinfectantes

El factor de mayor incidencia en la resistencia de los microorganismos a las materias activas biocidas es la composición de la pared celular. Esta resistencia tiene un carácter innato y determina el espectro de actividad de los desinfectantes (Betelgeux, 2014).

La resistencia adquirida es el resultado de un cambio a nivel del genoma, que provoca una mutación y posterior selección de los microorganismos por el desinfectante, es decir, se produce una selección natural de los microorganismos que han adquirido el nuevo carácter genético. Una mutación espontánea a nivel de un cromosoma puede otorgar a un organismo un carácter que le proporcione resistencia a una materia activa biocida, posteriormente, al multiplicarse transmite el gen de la resistencia, este carácter será cada vez más dominante en la población presente en la industria, siempre que se efectúe la desinfección de sus instalaciones con el mismo principio activo, y se vayan eliminando los microorganismos que no posean la mutación (Betelgeux, 2014).

Es importante corregir las causas que pueden disminuir la eficacia de los detergentes, dentro de las cuales están la presencia de materia orgánica y suciedad sobre las superficies a tratar, la caducidad del producto químico con la consiguiente pérdida de concentración y eficacia, reducido tiempo de actuación antes del enjuague final, utilizar las dosis recomendadas por el fabricante, monitorizar periódicamente las dosis reales aplicadas, entre otros factores en los que se profundizará más adelante (INA, 2018).

2.2.3 Tipos de desinfectantes de uso común en plantas de alimentos y su espectro de acción

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 (Rodríguez, 2007).

Cada producto químico tiene su nivel de efectividad según la superficie, material o problema microbiano a tratar. Los desinfectantes reducen el número de microorganismos vivos presentes, no hay que confundirlo con una esterilización (eliminación total de gérmenes). En general no mata a todos los microorganismos, pues pueden quedar vivas esporas bacterianas; no obstante, disminuye su capacidad de agresión hasta niveles que no resultan nocivos (INA, 2018).

2.2.3.1 Cloro y productos a base de cloro, incluidos los compuestos de hipocloruro

Estos desinfectantes tienen un efecto rápido sobre una gran variedad de microorganismos, y son relativamente baratos. Son los más apropiados para la desinfección en general de las plantas de productos alimenticios. Deben usarse en concentraciones de 100 a 250 miligramos de cloro disponible por litro.

Este desinfectante corroe los metales y produce además efectos decolorantes, es necesario enjuagar lo antes posible las superficies desinfectadas con dichos productos, después de un tiempo suficiente de contacto (Sánchez, s.f).

2.2.3.2 Yodóforos

Estos compuestos siempre se mezclan con un detergente por medio ácido, por lo que son muy convenientes en los casos en que se necesite un limpiador ácido. Su efecto es rápido y tienen una amplia gama de actividad antimicrobiana. Pueden tener una acción corrosiva en los metales, dependiendo de la fórmula del compuesto y la naturaleza de la superficie a la que se aplique. Por estas razones, debe tenerse especial cuidado en eliminarlos enjuagando las superficies después de utilizarlos (Sánchez, s.f).

2.2.3.3 Compuestos cuaternarios de amonio

Estos compuestos presentan también características detergentes, los cuales son incoloros, relativamente no corrosivos de los metales y no son tóxicos. Debe utilizarse en concentraciones de entre 200-1200 miligramos por litro. Se requieren concentraciones más altas cuando se emplean con aguas duras (Sánchez, s.f).

2.2.3.4 Ácidos y álcalis fuertes

Además de sus propiedades detergentes, los ácidos y los álcalis fuertes tienen considerable actividad antimicrobiana. Debe tenerse especial cuidado de que no contaminen los alimentos. Después de un tiempo de contacto adecuado, todas las superficies que han sido desinfectadas deberán someterse a un enjuague final con agua (Sánchez, s.f).

El ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ozono son los principales agentes liberadores de oxígeno (agentes oxidantes), siendo el ácido peracético el de mayor eficacia en termino de actividad antimicrobiana. Se considera un desinfectante eficaz de amplio espectro, no es espumante y se aclara fácilmente (Rodríguez, 2007).

2.2.3.5 Agentes gaseosos esterilizantes

El ozono posee un efecto sobre las bacterias Gram-positivas y Gram negativas, esporas bactrianas y fúngicas, pero su desventaja radica en la toxicidad, puesto que a concentraciones elevadas resulta ser tóxico para los humanos, produciendo afecciones del tracto respiratorio (Rodríguez, 2007).

2.2.4 Variables que afectan la efectividad de la limpieza y desinfección

La acción biocida de los desinfectantes sobre las superficies de la industria alimentaria está influida por numerosos factores, como tiempo de contacto, temperatura de aplicación, concentración, tensión superficial de la solución desinfectante, pH, número y localización de los microorganismos o tipo de microorganismo objetivo (Betelgeux, 2014).

En la práctica, además de los factores enumerados, también influye enormemente la eficacia de la fase de limpieza previa, en la separación de la suciedad orgánica e inorgánica de las superficies de trabajo que deben ser desinfectadas. La acción de los detergentes debe conseguir la separación de la suciedad y de gran parte de los microorganismos de las superficies. El hecho de que un microorganismo sea separado de su soporte aumenta la superficie de contacto con el desinfectante, e incrementa su eficacia biocida.

Por sí sola, la limpieza es capaz de eliminar el 80% de la carga microbiana, la desinfección de las superficies debe conseguir una reducción de la contaminación microbiana de alrededor del 95%. No debe confundirse la desinfección con la esterilización, esta última puede conseguir reducciones de un 99,999% (Betelgeux, 2014).

2.2.4.1 Inactivación debida a la suciedad

La presencia de suciedad y otros materiales sedimentados reducen la eficacia de todos los desinfectantes químicos. Cuando hay mucha suciedad, los desinfectantes no surten ningún efecto. Por lo tanto, la desinfección con sustancias químicas deberá efectuarse después de un proceso de limpieza o en combinación con el mismo (Sánchez, s.f).

2.2.4.2 Temperatura de la disolución

En general, cuanto más alta sea la temperatura más eficaz será la desinfección. Es preferible usar, por lo tanto, una solución desinfectante tibia o caliente, antes que una fría. Por lo que habrá que seguir las instrucciones del fabricante (Sánchez, s.f).

2.2.4.3 Tiempo de contacto

Todos los desinfectantes químicos necesitan un tiempo mínimo de contacto para que sean eficaces. Este tipo de contacto mínimo puede variar de acuerdo con la actividad del desinfectante (Sánchez, s.f).

Cuanto más tiempo, más organismos serán destruidos. El tiempo más usualmente debe estar entorno a los 5 minutos, durante el cual deben ser capaces de asegurar un efecto biocida (Rodríguez, 2007).

2.2.4.4 Concentración

La concentración de la disolución de desinfectante necesaria variará de acuerdo con las condiciones de uso, además deberá ser adecuada para la finalidad a la que se destina y el medio ambiente en que haya de emplearse. Las disoluciones deberán prepararse, por lo tanto, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (Sánchez, s.f).

2.2.4.5 Tamaño de la población

A una mayor carga microbiana se requiere mayor concentración de desinfectante o mayor tiempo de contacto (Rodríguez, 2007).

2.2.5 Prevención de *Listeria* por medio de la desinfección

La *Listeria* está ampliamente difundida en la naturaleza, su presencia en las industrias alimentarias está motivada por su extensa distribución en el ambiente y por su presencia en la materia prima, normalmente se encuentra en zonas de difícil acceso para su higienización.

Betelgeux (2014, pág 19) afirma:

“La Listeria forma biofilms que protegen a las células de condiciones adversas como la desecación, calor y la presencia de sustancias antimicrobianas como lo son los desinfectantes. Los biofilms se desarrollan debido a la limpieza y desinfección defectuosa, presencia de irregularidades, poros, defectos o cavidades en superficies de equipos e instalaciones donde se acumula suciedad y por los restos de suciedad en zonas con presencia de humedad y nutrientes. Los microorganismos de un biofilm pueden ser entre 10 y 1.000 veces más “resistentes” a los desinfectantes, esto se debe a procesos de adaptación y tolerancia de Listeria a desinfectantes. La erradicación de la contaminación persistente por Listeria es difícil, pero no imposible; la aplicación de técnicas específicas de higienización, junto con medidas correctiva, suele conducir a la eliminación de estas cepas”.

Kim y Yousef (2000, pág 2 y 3) indican:

“Se han utilizado desinfectantes que contienen compuestos de amonio cuaternario (QAC), ácido peroxiacético, yodo o cloro para controlar L. monocytogenes en diversas situaciones. Todos los desinfectantes tienen ventajas y desventajas. Algunos establecimientos utilizan QACs para muchas aplicaciones, debido a que se ha comprobado que los QAC son eficaces contra L. monocytogenes y dejan un efecto germicida residual sobre las superficies observamos que los desinfectantes con ácido peroxiacético han demostrado ser eficaces contra las biopelículas que contienen L. monocytogenes. Se ha informado que los desinfectantes rotativos proporcionan una mayor eficacia a largo plazo y la prevención de que L. monocytogenes se establezca en nichos en el medio ambiente y en la formación de biofilms.

Es en estos puntos, y debido a las especiales características de *L. monocytogenes*, donde el ozono puede actuar como un desinfectante eficaz y seguro, capaz de eliminar este microorganismo en poco tiempo y sin la formación de productos secundarios tóxicos (Kim & Yousef, 2000).

Existen diversos estudios recientes que prueban la eficacia del ozono en la destrucción de *L. monocytogenes*, ejemplo una concentración de ozono de 2,5 ppm (5 mg/m³ ó 0,005 mg/L) durante 40 segundos, produce una inactivación de la bacteria del orden de 99,999 – 99,9999 %.

2.3 Ozono

2.3.1 Generalidades del ozono

En la eliminación de patógenos es común que se refiera al uso de desinfectantes como el amonio cuaternario, de los cuales se habló ampliamente en las secciones anteriores; como se conoce estos son compuestos químicos capaces de inhibir o destruir microorganismos presentes en objetos o superficies inanimadas. Además de estas sustancias químicas existen otros compuestos conocidos como oxidantes, los cuales se utilizan con el mismo fin, sin embargo, presentan otras características y ventajas, las cuales han generado una expansión de su uso en diferentes áreas de trabajo.

Los compuestos oxidantes son productos que liberan oxígeno nascente, su efecto generalmente es breve, porque el oxígeno nascente se combina

rápidamente con toda materia orgánica, volviéndose inactivo. Su espectro de actividad es sobre bacterias vegetativas, virus, microbacterias y esporas. Los compuestos oxidantes utilizados como antisépticos son las disoluciones de peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, ácido peracético y ozono; este último es el mejor desinfectante, atacando a todo tipo de microorganismos, bacterias, virus, protozoos, e inhibiendo su crecimiento (Domínguez, 2015).

La molécula de ozono está formada por tres átomos de oxígeno. La razón de sus particularidades radica en el hecho, de que las fuerzas de atracción entre átomos son muy pequeñas, lo cual hace a la molécula de ozono muy inestable dando al ozono la característica de ser muy oxidante, pues fácilmente cede uno de sus átomos a otros compuestos oxidándolos, razón por la cual es empleado como desinfectante y germicida (Beutelspacher & Calderón, 2005).

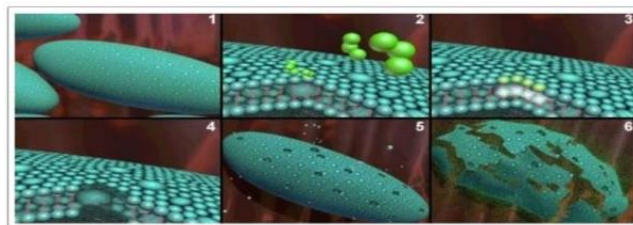
La eficacia del ozono en tratamientos de desinfección se debe a su poder oxidante, el cuál ataca a todas las sustancias susceptibles, ya sean inorgánicas como orgánicas (microorganismos, biomoléculas, entre otros) que se encuentren en contacto con éste, en el caso de los microorganismos los destruye físicamente evitando que generen resistencia (Ainia, 2007).

Una de las ventajas más importantes del ozono con respecto a otros bactericidas es que este efecto se pone de manifiesto a bajas concentraciones (0.01 ppm o menos) y durante periodos de exposición muy cortos, además, se evita la manipulación y el manejo de sustancias químicas peligrosas y no produce contaminación residual (Reynoso et al, 2011).

La inactivación de las bacterias por el ozono es un proceso complejo debido a que éste ataca numerosos constituyentes celulares incluyendo proteínas, lípidos insaturados y sistemas enzimáticos respiratorios en la membrana celular, péptidoglucanos (en capas de esporas), enzimas y ácidos nucleicos en el citoplasma. El ozono oxida varios componentes de la membrana que dirigen el equilibrio interno celular, causando lisis. Cuando la bicapa de lípidos polinsaturados y los grupos sulfhidrilos de las enzimas es oxidada por el ozono, se interrumpe la actividad celular normal incluyendo la permeabilidad que lleva a una muerte rápida (Domínguez, 2015).

En la figura 2 se ejemplifica la destrucción de una célula bacteriana expuesta a la acción del ozono, en esta se representa a la bacteria como el ovalo en color celeste, en la imagen #2 se observa las moléculas de ozono (circulo verde) acercándose a la pared bacteriana. La membrana de la bacteria es el primer lugar de ataque del ozono, una vez en contacto con la bacteria este penetra y de manera inmediata empieza la oxidación de la membrana generando agujeros en la pared bacteriana. En la imagen #5 se presenta los efectos del ozono dentro de la pared y por último la destrucción total de la célula bacteriana.

Figura 2. Aplicación de ozono sobre microorganismos.



Fuente: Reynoso R., Di Cesare C y Rosales C., 2011.

El ozono posee la particularidad de destruir los malos olores atacando directamente sobre la causa que los provoca, y sin añadir otro olor adicional. La acción desodorizante (sin camuflar el olor) es por efecto de la oxidación de las moléculas o compuestos químicos como las cetonas, hidrocarburos, ácidos, derivados del azufre y nitrogenados (Reynoso, Di Cesare, & Rosales, 2011).

2.3.1.1 Características físico químicas del ozono

Es de suma importancia conocer las características fisicoquímicas del ozono para tomar en cuenta a la hora de utilizar este gas en tratamientos de desinfección. En la tabla 2 se muestran las características físico-químicas principales del ozono.

Cuadro 2. Propiedades del ozono.

PROPIEDAD	DESCRIPCIÓN
COLOR	Azul claro a altas concentraciones

OLOR	Picante y penetrante (umbral olfativo 0.01-0.015 ppm)
PESO ESPECIFICO	2.14 Kg O ₃ / m ³
PESO MOLECULAR	48
POTENCIAL DE OXIDACIÓN	2.07 Voltios
PUNTO DE EBULLICIÓN A 100 KPA	-112 ° C
SOLUBILIDAD A 0° C	0.64 ppm

Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2005.

La propiedad más importante del ozono es su potencial de oxidación que es mayor al de todas las sustancias que habitualmente se utilizan como desinfectantes. Según Solsona F. y Méndez J. (2002), el ozono posee un potencial de oxidación con valor de 2.07 Voltios, en comparación con desinfectantes como el cloro que se encuentra en 1,36 Voltios, también es eficaz para esterilizar bacilos flotantes presentes en el aire interior, debido a que la densidad es más pesada que el aire (la densidad es 1.6 veces la del aire).

2.3.2 Sistemas de generación de ozono

Como se mencionó anteriormente el ozono es un gas muy inestable, la corta vida media del ozono (tanto en fase gas como en disolución acuosa) no permite su almacenamiento y distribución como cualquier otro gas industrial, sino que debe generarse *in situ* (Fernández, 2015). Es importante tomar esta consideración en cuenta a la hora de seleccionar la metodología para la desinfección con ozono.

El ozono se forma cuando se aplica la energía suficiente a la molécula de oxígeno para disociarla y formar radicales libres de oxígeno; de esta forma se cumple la condición para formar una reacción entre una molécula y un átomo de oxígeno y obtener la molécula de ozono (Beutelspacher & Calderón, 2005).

Existen dos formas de utilización del ozono las cuales dependen de la aplicación que se le quiera dar, la primera es en fase gaseosa, la cual se utiliza frecuentemente para desinfección y desodorización del ambiente en

diferentes superficies como pisos o drenajes. La otra fase es de forma acuosa: el agua es el vehículo de transporte del ozono por lo tanto la concentración puede ser baja o alta según las necesidades y es perfectamente controlable; en este estudio se aplicará el ozono en fase gaseosa

La formación de ozono se puede generar de diferentes maneras, entre las más utilizadas se encuentran: la electrólisis, la radiación ultravioleta o por descargas eléctricas. Fernández (2015) describe estos métodos en función de su rendimiento:

Electrolisis: se da por electrolisis del ácido sulfúrico, el rendimiento es pobre y no se utiliza habitualmente (el consumo de energía es 2-5 veces mayor que el del método de descarga eléctrica).

Generación fotoquímica mediante reacción del oxígeno con luz ultravioleta: Este procedimiento no se utiliza industrialmente debido al bajo rendimiento de generación de ozono ($O^3 < 1 \text{ g/m}^3$) y al alto consumo energético (del orden de 3 KWh/g). Este es el método de producción natural del ozono estratosférico.

Descarga eléctrica de alto voltaje: es el método que se emplea habitualmente, en este se hace pasar oxígeno a través de un campo eléctrico generándose diversas especies químicas excitadas o no (átomos, iones, radicales, entre otros) que se recombinan para formar ozono.

A continuación, se presenta un cuadro de comparación de estos tres métodos:

Cuadro 3. Comparación de los principales métodos de generación de ozono.

Método	Capacidad típica de generación de ozono (g/h)	Implementación	Volumen agua a Tratar	Consumo energía
DESCARGA ELÉCTRICAS	100	Sencilla	Bajo a alto	El menor
LUZ ULTRAVIOLETA	2	Sencilla	Bajo	10 veces más que el

				primer método
ELECTRÓLISIS	1 a 4	Compleja	Bajo	15 a 20 veces más que el primer método

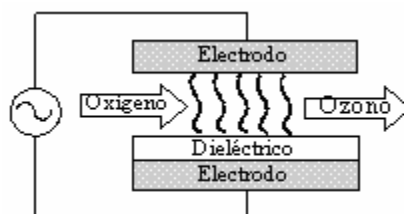
Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2005.

De estos tres métodos el más destacado, por el desempeño de su eficacia e implementación, es el método de la descarga corona o descarga eléctrica, el cual se describe de manera más amplia en la siguiente sección.

2.3.2.1 Generación de ozono por descargas eléctricas

Para formar la molécula de ozono se requiere de una celda, como se muestra en la figura 3, formada por dos electrodos separados por una distancia, del orden de los milímetros; a este espacio se le conoce como espacio de descarga.

Figura 3. Celda generadora de ozono por descargas eléctricas.



Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2005.

Sobre uno de los electrodos se coloca un material dieléctrico, y en el espacio de descarga se inyecta un flujo de aire o de oxígeno de alta pureza, el cual provee oxígeno para la formación del ozono. Para el funcionamiento de la celda, se conecta a los electrodos una señal eléctrica alterna, la cual permite la creación de un campo eléctrico intenso. Este campo eléctrico se encarga de acelerar los electrones que se encuentran en el espacio de descarga, de tal forma que, en la trayectoria del recorrido de estos electrones, colisionan con las moléculas de oxígeno y logran la disociación de sus átomos. El siguiente paso para la formación de la molécula de ozono es la

reacción entre uno de estos átomos y una molécula de oxígeno (Beutelspacher & Calderón, 2005).

2.3.2.2 Elementos que forman parte de un equipo generador de ozono

Los equipos diseñados para la generación de ozono cuentan con una serie de elementos básicos que desempeñan un papel importante para la producción de ozono y su correcta operación. A continuación, se describe cada uno de ellos: celda generadora de ozono, fuente de alimentación, preparación del gas de alimentación y un sistema de enfriamiento.

2.3.2.2.1 Preparación del gas de alimentación

Para la generación del ozono se requiere suministrar oxígeno a la celda. Este gas puede ser oxígeno de alta pureza, o bien aire, cuya concentración de oxígeno en volumen es del 21%. Otro elemento presente en el aire y, al cual se debe prestar especial atención en la generación de gas ozono, es el vapor de agua o el grado de humedad presente en el aire (Beutelspacher & Calderón, 2005).

La calidad del ozono generado depende de las características del gas introducido en el generador, este puede ser aire ambiente sin tratar, aire tratado, y oxígeno puro. El aire ambiente sin tratar contiene cantidades variables de humedad y su temperatura depende de la temperatura ambiente, por tanto, la concentración de ozono generada es muy variable dependiendo de estos parámetros (Ainia, 2007).

El propósito del dispositivo de preparación de gas es secar y enfriar el gas que contiene oxígeno. El generador del tipo descarga de corona utilizan aire seco u oxígeno puro como fuente de oxígeno que se va a convertir en ozono (Solsona & Méndez, 2002).

2.3.2.2.2 Celda generadora de ozono

El generador de ozono es el componente esencial de un sistema de ozonización, donde se produce la descarga eléctrica de tipo corona y donde el oxígeno se transforma en ozono, como se explicó de manera amplia en la sección 2.3.2.2 **Generación de ozono por descargas eléctricas**, por lo que esta sección se centra en los materiales a utilizar para la construcción de la misma.

Según Erwin Beutelspacher y José María Calderón (2005), las celdas generadoras de ozono se fabrican en dos formas geométricas: celdas de placas paralelas y cilíndricas. Los materiales que se utilizan en la construcción de una celda se eligen de tal forma que soporten la acción oxidante del ozono. Para el caso de los electrodos los materiales utilizados son el acero inoxidable, tungsteno y el titanio. Para el material dieléctrico se utiliza el vidrio, alúmina y mica, entre otros. En lo que respecta a los accesorios y mangueras utilizadas en conexiones de la celda se puede utilizar el teflón, el cual posee excelentes propiedades de resistencia a los efectos oxidantes del gas ozono.

2.3.2.2.3 Fuente de alimentación o fuente de energía eléctrica

La fuente de alimentación se encarga de proporcionar una señal alterna cuyas características eléctricas (voltaje y frecuencia), permitan generar el fenómeno de las microdescargas en el interior de la celda (Beutelspacher & Calderón, 2005).

Los equipos generadores de ozono pueden clasificarse de acuerdo con la frecuencia de operación de la fuente: generadores de baja frecuencia (50 a 60 Hz), mediana frecuencia (60 a 1000 Hz) y, en alta frecuencia (más de 1000 Hz) (Beutelspacher & Calderón, 2005). En este proyecto de investigación se utilizarán equipos generadores de baja frecuencia.

2.3.2.2.4 Sistema de enfriamiento

La molécula de ozono se desintegra y se recombina para formar oxígeno molecular si la temperatura en que se encuentra supera los 50°C. Debido a este comportamiento inestable de la molécula de ozono, es importante mantener una adecuada temperatura de operación en la celda. Para ello, se construyen sistemas de enfriamiento, que se encargan de disipar el calor que se acumula en la celda debido al efecto de las microdescargas (Beutelspacher & Calderón, 2005).

2.3.3 Variables que afectan la producción o aplicación de ozono

Según Fernández (2015) los principales parámetros a controlar en el proceso de producción de ozono son:

- a) Frecuencia de la señal de alimentación

- b) Voltaje de alimentación
- c) Humedad
- d) Temperatura: la refrigeración de los electrodos reduce los fenómenos de descomposición térmica del ozono.
- e) Gas de alimentación: aire filtrado y seco punto de rocío < -60°C.
- f) Presión y flujo de gas de alimentación
- g) Características de la corriente eléctrica: el rendimiento de la producción de ozono crece con la intensidad de la corriente, así como con la frecuencia (hasta un valor óptimo del orden de 500-600 Hz).
- h) Presencia de impurezas en el gas de partida: es de especial importancia la sequedad del gas de partida, pues la presencia de vapor de agua provoca una disminución de la producción de ozono, y en el caso de usar aire, se produce la formación de óxidos de nitrógeno y ácido nítrico, que causan problemas de corrosión del ozonizador.

Lo mencionado anteriormente se refiere específicamente a variables propias del equipo de generación de ozono. Otras variables importantes a controlar son factores externos que influyen en la eficacia de la ozonización entre estos se encuentran según, Ainia Centro Tecnológico y ITDI (2007): la temperatura, la presencia de impurezas y el pH.

Con respecto a la temperatura; la relación entre la concentración de ozono y la temperatura es inversa; a mayor temperatura, menor concentración de ozono disuelto en el agua. Ainia Centro Tecnológico y ITDI (2007) indican que la estabilidad del ozono disminuye con la temperatura de tal modo que, en sistemas en los que la temperatura sea cercana a los 50 °C, no se esperan buenas eficiencias de tratamiento con ozono debido a dos fenómenos:

- La rápida descomposición de ozono en oxígeno a dicha temperatura.
- La reducción de la solubilidad en agua, tanto del ozono como de cualquier otro gas, al aumentar la temperatura.

Beutelspacher y Calderón (2005) añaden, el impacto del pH sobre la acción bactericida o virucida es considerado pequeño en rangos de pH de 5.8 a 8. Los cambios en la eficiencia de desinfección debido al pH son provocados por cambios en el índice de destrucción de ozono. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que, para diferentes valores de pH, a

valores constantes de concentración de ozono residual, el grado de inactivación de bacterias prácticamente no sufre cambios.

Por lo que, en caso de estudio no se toma en cuenta los valores de pH utilizados para el enjuague en el procedimiento de limpieza.

2.3.4 Toxicidad y normativas del ozono

El ozono es un gas altamente tóxico y oxidante, por lo que es de suma importancia el conocimiento acerca de los efectos que produce en el ser humano y la normatividad relacionada con los niveles máximos y dosis de exposición.

Beutelspacher y Calderón (2005) indican:

"La exposición al ozono en periodos cortos de tiempo a concentraciones superiores a unas décimas de ppm provoca dolor de cabeza, sequedad en la garganta, irritación de membranas mucosas y nariz. La exposición a altas concentraciones puede provocar edemas pulmonares, lasitud, dolor de cabeza frontal, sensación de enrarecimiento del aire, constricción u opresión, acidez en la boca y anorexia. En exposiciones más severas puede causar tos, sensación de sofocación, taquicardia, vértigo, presión sanguínea baja, severos calambres en el pecho y dolor de cuerpo. Se estima que 50 ppm por 30 minutos podría ser fatal. Los síntomas a exposiciones prolongadas son similares a las exposiciones agudas con el decremento en la función pulmonar dependiendo de la concentración de ozono y la duración de la exposición. También se pueden observar la aparición de asma, alergias y otros desórdenes respiratorios. Algunas tumoraciones y daño genético directo o indirecto han sido encontrados en tejidos animales y/o humanos estudiados. El contacto del ozono con la piel puede causar irritación y quemaduras. En concentraciones por encima de 0.1 ppm el ozono puede causar irritación de los ojos".

Debido a lo alarmante que puede sonar esta información, se indican diferentes autores que hacen mención de las dosis y horas máximas permitidas de exposición:

-Reynoso, Di Cesare y Rosales (2011) indican los límites máximos de exposición según Occupational Safety and Health Administration (OSHA):

- 0.1 ppm concentración a la cual un individuo en buen estado de salud puede exponerse de forma continua al ozono, durante su trabajo

habitual en una jornada de 8 horas diarias y 40 horas semanales sin que aparezcan efectos perjudiciales.

- 0.3 ppm exposición inferior a 15 minutos y no repetida más de 4 veces al día.

-Beutelspacher y Calderón (2005), reportan que son recomendados para áreas de trabajo los siguientes niveles máximos de ozono en el ambiente.

- 0.05 ppm trabajo pesado

- 0.08 ppm trabajo moderado

- 0.10 ppm trabajo ligero

Sin embargo, si el trabajo se desempeña en periodos menores a 2 horas (para trabajos pesado, moderado y ligero) se permiten concentraciones de hasta 0.2 ppm.

- La norma mexicana NOM-020-SSA1-1994 [SSA05], establece que no se debe rebasar el límite máximo normado de 0.11 ppm en una hora, una vez al año, en periodos de tres años.

- Las regulaciones internacionales sobre el ozono coinciden con las nacionales. Ambas estiman 0,1 mg/m³ como la cantidad máxima de ozono a la que puede estar expuesta una persona realizando un trabajo normal durante un plazo de 8 horas (Ainia, 2007).

Afortunadamente, altas concentraciones de ozono ambiental son fácilmente detectadas por el olfato que provocan molestias mucho antes de que puedan llegar a ser dañinas. Ver Anexo 4: Ficha datos de seguridad para conocer los tiempos y concentraciones de exposición permitidos para el ozono por la OSHA.

2.3.5 Concentraciones de aplicación de ozono

Una desinfección efectiva se obtiene mediante la exposición de los microorganismos a concentraciones fijas de un desinfectante como cloro, bromo, ozono, entre otros, durante un determinado periodo de tiempo. Comparando los desinfectantes convencionales el ozono consigue una desinfección superior a concentraciones menores y a tiempos de contacto más cortos (Ainia, 2007).

- La OMS indica que los niveles de exposición del gas ozono recomendados son 0,1 ppm durante 8 horas o 0,2 ppm durante 15 minutos y

los estudios más específicos acerca del efecto bactericida y bacteriostático, viricida, fungicida y esporicida del ozono señalan, con respecto a otros bactericidas, que este se manifiesta a bajas concentraciones (0,01 ppm o menos) y durante periodos de exposición muy cortos. Incluso a concentraciones ínfimas de ozono del orden de 0.01 ppm se observa un efecto bacteriostático. Con lo descrito anteriormente se considera al ozono como un potente bactericida a concentración de 0,01 ppm (0.02 mg/m³) (Domínguez, 2015).

-En un estudio realizado por Brassca M., Morandi S. & Lodi R. (2009), se evaluó la actividad bactericida contra *L. monocytogenes* en 3 productos lácteos: Ricotta Salata di sheep, Taleggio DOP, Gorgonzola DOP. El inóculo de porciones de queso con la cepa T20 de *L. monocytogenes* (colección CNR-ISPRA) tuvo lugar en diferentes momentos de maduración: Ricotta Salata en un comienzo de la vida útil, para Taleggio DOP después de 6, 27 y 40 días y para el DOP Gorgonzola después de 3, 32 y 60 días. En todas las pruebas, se compararon 2 niveles diferentes de contaminación (1-100 CFU / g y 100-1000 CFU / g). El tratamiento de las muestras se llevó a cabo en un gabinete de desinfección equipado con lámparas UV para la generación de O₃ aplicando una concentración igual a 4 ppm durante un tiempo de 8 minutos. La *L. monocytogenes* que se determinó inmediatamente después del tratamiento y después de 7 días de almacenamiento a 4 °C, fue menor a 10 UFC / g.

-Robbins J., Fisher C, Moltz A. & Martin S. (2005) realizaron un estudio donde se evaluó la eficacia del ozono, el cloro y el peróxido de hidrógeno para destruir las células planctónicas de *Listeria monocytogenes* y las biopelículas de dos cepas de prueba, Scott A y 10403S. *L. monocytogenes* era sensible al ozono (O₃), cloro y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las células planctónicas de la cepa Scott A se destruyeron completamente por exposición a 0,25 ppm de O₃ (reducción de 8,29 log, UFC por mililitro).

La destrucción del ozono de Scott A. aumentó cuando se aumentó la concentración, con eliminación completa a 4.00 ppm de O₃ (reducción de 8.07 log). Se requirió un aumento de 16 veces en la concentración de desinfectante para destruir células de biofilm de *L. monocytogenes* frente a células planctónicas de la cepa Scott A. La cepa 10403S requirió una concentración de ozono de 1.00 ppm para eliminar las células planctónicas (reducción de

8.16 log). Se eliminaron las células unidas de la misma cepa a una concentración de 4,00 ppm de O₃ (reducción de 7,47 log).

2.4 Análisis Estadístico

Una de las fórmulas utilizadas para dar validez estadística a las mediciones realizadas para la aplicación de la desinfección con ozono es el cálculo del tamaño de la muestra.

Antes de calcular el tamaño de la muestra se necesita determinar varias cosas, Valdivieso (2011) indica que se deben de conocer las siguientes variables:

Tamaño de la población. Una población es una colección bien definida de objetos o individuos que tienen características similares. Hablamos de dos tipos: población objetivo, que suele tener diversas características y también es conocida como la población teórica. La población accesible es la población sobre la que las investigadoras aplicarán sus conclusiones.

Margen de error (intervalo de confianza): el margen de error es una estadística que expresa la cantidad de error de muestreo aleatorio en los resultados de una encuesta, es decir, es la medida estadística del número de veces de cada 100 que se espera que los resultados se encuentren dentro de un rango específico.

Nivel de confianza: son intervalos aleatorios que se usan para acotar un valor con una determinada probabilidad alta. Por ejemplo, un intervalo de confianza de 95% significa que los resultados de una acción probablemente cubrirán las expectativas el 95% de las veces.

La desviación estándar: es un índice numérico de la dispersión de un conjunto de datos (o población). Mientras mayor es la desviación estándar, mayor es la dispersión de la población.

Si la población es finita, es decir se conoce el total de la población y se desea saber cuántos del total tendremos que estudiar se debe utilizar la siguiente fórmula:

Fórmula 1. Cálculo del tamaño de la muestra.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

(1)

Fuente: Psyma 2015.

En donde:

N = Tamaño de la población o cantidad de pisos

Z = Desviación del valor medio para un nivel de confianza del 95%

d = Error máximo admisible

p = Probabilidad de éxito o proporción esperada

q = Probabilidad de fracaso = 1-p

Para comparar los dos métodos utilizados en la desinfección de pisos se utiliza una prueba de Hipótesis de dos proporciones y distribución binomial.

Una hipótesis estadística es una aseveración o conjetura con respecto a una o más poblaciones. La verdad o falsedad de una hipótesis estadística nunca se sabe con absoluta certidumbre a menos que se examine toda la población, lo cual, por supuesto, sería poco práctico en la mayoría de las situaciones (Walpole & Myers, 2007). En cambio, se toma una muestra aleatoria de la población de interés, y se utilizan los datos contenidos en esta muestra para proporcionar evidencia que apoye o no la hipótesis. La evidencia de la muestra que sea inconsistente con la hipótesis que se establece conduce al rechazo de ésta. El rechazo de la hipótesis significa que hay una pequeña probabilidad de obtener la información muestral observada cuando, de hecho, la hipótesis es verdadera.

Walpole y Myers (2007) indican que el planteamiento formal de una hipótesis a menudo está influido por la estructura de la probabilidad de una conclusión errónea. Si el científico o investigadora se interesa en apoyar con fuerza una opinión, desea llegar a la opinión en la forma del rechazo de una hipótesis. Como resultado, la opinión se alcanza mediante un rechazo. De manera similar, para apoyar la afirmación de que tipo de medidor es más preciso entre dos tipos de medidor. Lo anterior implica que cuando el análisis de datos formaliza la evidencia experimental con base en la prueba de

hipótesis, es muy importante la declaración o establecimiento formal de la hipótesis.

La estructura de la prueba de hipótesis se formulará usando el término hipótesis nula, el cual se refiere a cualquier hipótesis que deseamos probar y se denota con H_0 . El rechazo de H_0 conduce a la aceptación de una hipótesis alternativa, que se denota con H_1 . La comprensión de las diferentes funciones que desempeñan la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1) es fundamental para entender los principios de la prueba de hipótesis. La hipótesis alternativa H_1 , por lo general, representa la pregunta que debe responderse, la teoría que debe probarse y, por ello, su especificación es muy importante. La hipótesis nula H_0 anula o se opone a la hipótesis alternativa H_1 , debería hacer notar que el analista llega a una de las siguientes conclusiones:

Rehace H_0 : a favor de la H_1 debido a evidencia suficiente en los datos

No hace H_0 : debido a evidencia insuficiente en los datos.

III. MARCO METODOLÓGICO

Este apartado describe de manera detallada el procedimiento y las herramientas utilizadas para llevar a cabo el cumplimiento de los objetivos plasmados. Se Incluye dentro de este capítulo la matriz de congruencia y metodológica las cuales permiten tener una visión más amplia de las variables ligadas a cada objetivo.

El cronograma de trabajo que contiene las actividades que se realizaron para llevar a cabo el presente proyecto de investigación se describen de manera detallada en el Anexo 2: **Cronograma del plan de trabajo proyecto de graduación.**

3.1 Localización

El proyecto de graduación se realizó en una planta de embutidora ubicada en Costa Rica, denominada en adelante, Empresa. En este lugar se desarrollaron las pruebas de aplicación de desinfección, muestreo, pruebas de laboratorio y validación de la efectividad del ozono contra el patógeno *Listeria spp*,

3.2 Materiales y equipos

Se utilizaron todos los materiales y equipos con los que dispone la compañía y el laboratorio para llevar a cabo el desarrollo del proyecto. En los cuadros 4 y 5 se describen las características de los principales equipos y materiales necesarios para la aplicación de las pruebas.

Cuadro 4. Materiales utilizados para el desarrollo del proyecto.

Equipo	Función	Especificaciones
		Marca Labplas
Bolsas estériles	Diseñadas para la recolección de la muestra	Bolsa 540 ml con esponja estéril Kss61100
Detergente limpiador	Detergente clorado alcalino de alta espuma recomendado para la limpieza y saneamiento de superficies en equipos propios de la industria alimentaria paredes y pisos.	Dosis de uso: 2-10%, dejar actuar el producto mínimo 5 minutos.
Herramientas estériles	Utilizadas para llevar acabo el traslado, soporte o contenido de materiales.	Según sea necesario: cucharas, tijeras, pinzas, cuchillos, barras de agitación de vidrio, pipetas, placas de Petri, tubos de ensayo, entre otros.
Esponja o hisopos	Utilizados para el muestreo de superficies, para determinación de <i>Listeria</i> .	Mantener en refrigeración de 0 a 5 °C.
Probeta	Instrumento volumétrico que consiste en un cilindro graduado de vidrio pyrex que permite contener líquidos y sirve para medir volúmenes de forma aproximada	Capacidad 100 ml Cristalería clase A
Micropipeta	Empleado para succionar y transferir pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas	ThermoLabsystems Modelo Finn timer Número de serie H74259 Intervalo de medición (20 a 200) µl Resolución 1 µl

	analíticas.	
Agar Oxford Modificado	Medio de cultivo, que, con el agregado de antimicrobianos, permite el crecimiento y aislamiento selectivo de <i>Listeria spp.</i>	Marca: Oxoid, fórmula según la USDA Incubación: Durante 24-48 horas a 35-37 °C, en atmósfera con 5-10% CO₂. Almacenamiento: Medio deshidratado: a 10-35 °C. Medio preparado: a 2-8 °C. Proveedor: Prelab, fórmula según la USDA Incubación: El tiempo, temperatura y atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera aislar.
Agar Sangre	Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos aerobios y anaerobios. También, este medio de cultivo, puede utilizarse como medio base para preparar el medio agar chocolate.	Características del medio: Medio preparado con 5% de sangre de carnero: rojo cereza. Almacenamiento: Medio deshidratado: a 10-35 °C. Medio preparado: a 2-8 °C.
Caldo Fraser	La Base de Caldo Fraser es utilizada con citrato férrico de amonio para el	Marca: Accumedia, fórmula según la USDA Suplemento (7984) Digerido

	enriquecimiento selectivo de especies de <i>Listeria</i>. Este medio es utilizado en la detección rápida en muestras de alimentos y en muestras ambientales	Base de Caldo Fraser Citrato Férrico de Amonio al 5%.
Caldo UVM	El Caldo de Enriquecimiento para <i>Listeria</i> UVM Modificado (UVM Modified <i>Listeria</i> Enrichment Broth) es utilizado para el enriquecimiento selectivo de <i>Listeria spp.</i> La combinación de diversas peptonas, extractos, sales y sustancias tampón permite un crecimiento muy bueno de <i>Listeria</i>.	Marca: Accumedia, fórmula según la USDA
Aceite de inmersión	Utilizado para aumentar la resolución de un microscopio mediante la inmersión de la lente objetivo y el espécimen en un aceite transparente de alto índice de refracción.	Marca: Fisher Scientific
Caldo neutralizante	Utilizado para mantener la gasa de toma de muestras en el método	Mantener en refrigeración de 0 a 5 °C

	VIDAS LDUO.	
Caldo LX	Utilizado para preparar la muestra por el método VIDAS LDUO.	Mantener en refrigeración de 0 a 5 °C
Cartucho de reactivos y cono SPR	Kit utilizado para introducir la muestra en el equipo VIDAS.	Almacenar a temperaturas de 2-8°C.
Hisopo de medición ATP	Utilizados para determinación de materia orgánica en superficies, mediante medición de ATP.	Mantener en refrigeración de 0 a 5 °C.

Fuente: Elaboración propia con base en información de Empresa de embutidos, Costa Rica.

Cuadro 5. Equipos utilizados para el desarrollo del proyecto.

Equipo	Descripción	Especificación
Homogenizador	Utilizado para la homogeneización de distintos tipos de materiales	Marca: Smasher AES Blue Line (casa matrix Biomerieuex)
Incubadora 30°C	La función común es crear un ambiente con la humedad y temperatura adecuada para el crecimiento o reproducción de seres vivos.	Marca: Precisión Modelo 3EG Número de serie 601091061
Incubadora 35°C	La función común es crear un ambiente con la humedad y temperatura adecuada para el crecimiento o reproducción de seres vivos.	Marca: Precisión Modelo 30M Número de

		serie 40241
Agitador Vortex	Es un dispositivo que se usa para agitar pequeños tubos o frascos de líquido.	Marca: Fisher Scientific Vortex Mixer Digital
Autoclave	Utilizado para esterilizar por vapor, consiste en un recipiente cilíndrico de paredes resistentes; metálicas, y con cierre hermético autoclave, en cuyo interior, que contiene un líquido, generalmente agua, el objeto se somete a presiones y temperaturas elevadas sin llegar a hervir.	Marca: HMC Modelo HV 85L Número de serie: Manómetro: 8H5 3561 Termómetro: 80909809 Intervalo de medición (0 a 0,4) Mpa (0 a 128) °C
Microscopio de campo claro Leica DME	Utilizado para el análisis de materiales de tamaño microscópicos, combina una óptica Leica de alta calidad iluminación LED de luz blanca universal.	Marca: Leica Modelo DME Número de serie 33693
Equipo generador de ozono.	Utilizado para la desinfección de superficies, ambientes y drenajes, por medio de generación de ozono.	Marca: BIOPUREZA Emisión: 35.000 uw/cm ² /seg. Potencia: 6.000 uw/seg a 6 cm de distancia de emisor.
Medidor de ozono	Utilizado para medir la concentración de ozono en el ambiente	Marca: BIOPUREZA Medición en ppm.

Equipo VIDA	Sistema de inmunoensayo de sobremesa automatizado. Utilizado para realizar la lectura de los muestreos rápidos.	Marca: VIDA
Balanza	Instrumento de medición de la masa de los objetivos	Capacidad 2000 g, sensibilidad de 0,1g
Luminómetro	Equipo utilizado para la medición de ATP	Marca: Hygiena La medición se realiza en URL (unidades formadoras de luz)

Fuente: Elaboración propia con base en información de Empresa de embutidos, Costa Rica.

3.3 Matriz de congruencia y metodológica

En los cuadros 6 y 7 se presenta la matriz de congruencia y la metodológica, las cuales permiten tener una visión general de cómo se llevó a cabo el desarrollo de los objetivos, así como organizar las diferentes etapas involucradas en el proceso de investigación de manera que exista una congruencia entre cada una y se logre delimitar su alcance. Comprende la identificación del objetivo general y objetivos específicos, el planteamiento del problema, preguntas de investigación, las variables involucradas y cómo se organiza y procesa la información obtenida para realizar las deducciones en la investigación.

Cuadro 6. Matriz de congruencia.

Matriz de Congruencia				
Título	Problema/Hipótesis	Objetivo general	Objetivos Específicos	Preguntas de Investigación
Evaluación de la aplicación de ozono en pisos para la eliminación de <i>Listeria spp.</i> en una industria de embutidos	¿El uso de ozono es eficaz para la eliminación de la <i>Listeria spp.</i> en la desinfección de pisos?	Evaluar la aplicación de ozono para la eliminación de <i>Listeria spp.</i> en la industria de embutidos mediante análisis microbiológicos, con el fin de mejorar la desinfección de pisos.	Determinar por medio de resultados de pruebas experimentales previas, los valores de las variables que afectan la efectividad del uso de ozono para establecer los parámetros requeridos de aplicación.	¿Qué variables se deben tomar en cuenta y en qué parámetros se deben encontrar para que la aplicación del ozono sea efectiva?
			Identificar los pisos que presentan mayor criticidad en la proliferación de <i>Listeria spp.</i> mediante el análisis de los históricos de muestreos microbiológicos de la industria embutidora en estudio con el fin de seleccionar los puntos de muestreo adecuados.	¿Cuáles pisos presentan mayor riesgo y que características poseen que ayudan a la proliferación de la bacteria?
			Validar mediante análisis microbiológicos de <i>Listeria spp.</i> por metodología API tres tiempos de aplicación del ozono en pisos, para seleccionar la concentración de mayor eficacia en la eliminación del microorganismo.	¿Cuál concentración de ozono presenta mayor efectividad en la eliminación de <i>Listeria spp.</i> ?
			Comparar mediante análisis microbiológicos acreditados la efectividad de la concentración de ozono seleccionada versus el desempeño del amonio cuaternario a 200 ppm en la eliminación de <i>Listeria spp.</i> en pisos.	¿Se puede determinar cuál químico presenta mayor efectividad en la eliminación de <i>Listeria spp.</i> ?

Fuente: Elaboración propia, Costa Rica.

Cuadro 7. Matriz metodológica.

Matriz Metodológica					
Objetivo Específico	Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones (subvariables)	Definición Instrumental
Determinar por medio de resultados de pruebas experimentales previas, los valores de las variables que afectan la efectividad del uso de ozono para establecer los parámetros requeridos de aplicación.	Tiempo de contacto del ozono con la superficie a evaluar. Concentración de aplicación del ozono. Humedad relativa	Tiempo: espacio de tiempo disponible para la realización de algo. Humedad relativa: Relación entre la cantidad de vapor de agua que tiene una masa de aire y la máxima que podría tener.	Tiempo: tiempo de exposición que tenga el equipo a una concentración dada con la superficie de muestreo. Humedad relativa: se utiliza un higrómetro para conocer la humedad relativa de las áreas donde se realiza el muestreo.	Tiempo máximo y mínimo de exposición, medido en minutos. Humedad relativa se mide en porcentaje.	Higrómetro Cinta métrica Cronómetro
Identificar los pisos que presentan mayor criticidad en la proliferación de <i>Listeria</i> spp. mediante el análisis de los históricos de muestreos microbiológicos de la industria embutidora en estudio con el fin de seleccionar los puntos de muestreo adecuados.	Características de la áreas de mayor incidencia. Cantidad de muestreos positivos de <i>Listeria</i> spp.	Cada área posee características diferentes que pueden favorecer al crecimiento de <i>Listeria</i> . Muestreos positivos: presencia de <i>Listeria</i> en la superficie de muestreo.	Porcentaje (%) de muestreos positivos en cada piso.	Ausencia o presencia de <i>Listeria</i> spp.	Registro de todos los muestreos realizados en todos los pisos durante un año. Herramienta estadística minitab.
Validar mediante análisis microbiológicos de <i>Listeria</i> spp. por metodología API tres tiempos de aplicación del ozono en pisos, para seleccionar la concentración de mayor eficacia en la eliminación del microorganismo.	Concentración de aplicación del ozono.	Concentración de aplicación del ozono: magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen.	Concentración: se utiliza un medidor de ozono para conocer la concentración según las diferentes potencias que tiene el equipo.	Porcentaje de muestreos positivos después de aplicación en diferente tiempo.	Hisopos, instrumentos de laboratorio estériles, balanza analítica, incubadora, agitador, autoclave, microscopio. Equipo de ozono y medidor de ozono.
Comparar mediante análisis microbiológicos acreditados la efectividad de la concentración de ozono seleccionada versus el desempeño del amonio cuaternario a 200 ppm en la eliminación de <i>Listeria</i> spp. en pisos.	Cantidad de muestreos negativos por método de aplicación	Efectividad: capacidad de lograr el efecto que se desea o se esperar	Porcentaje de análisis microbiológicos dentro del rango de aceptación.	Efectividad alta: mayoría de análisis dentro del rango (95%) después de la limpieza. Efectividad media: pocos análisis fuera de rango (94-80%). Efectividad baja: mayoría de análisis fuera de rango (<79%).	Herramienta estadística minitab.

Fuente: Elaboración propia, Costa Rica.

3.4 Procedimiento de la Investigación

3.4.1 Determinar por medio de resultados de pruebas experimentales previas los valores de las variables que afectan la efectividad del uso de ozono para establecer los parámetros requeridos de aplicación.

Las principales variables a controlar para la aplicación de la metodología de ozono se determinaron por medio de estudios bibliográficos y criterio de expertos, estableciendo como las de mayor relevancia: especificaciones del equipo de ozono, tiempo de contacto del desinfectante, la concentración de aplicación y la presencia de residuos orgánicos en la superficie.

Determinación de los valores de las variables:

3.4.1.1 Especificaciones del equipo

Las características generales del equipo son proporcionadas por el proveedor las cuales se detallan de manera específica en el Anexo 3 Ficha técnica del equipo de ozono. El dispositivo generador de ozono funciona por el método de descarga eléctrica, para efectos del proyecto de investigación es relevante conocer las siguientes especificaciones del equipo: la fuente de alimentación, flujo del gas de alimentación y la temperatura y la humedad del área.

Según la frecuencia de operación de la fuente de alimentación del equipo éste se clasifica como generador de baja frecuencia debido a que se encuentra en un rango de 50 a 60 Hz.

El gas de alimentación que ingresa al equipo es el aire ambiente sin tratar que se encuentra en el área donde se realiza la aplicación de la metodología, según Escalante & Chávez (2004), el aire puro es una mezcla gaseosa compuesta por un 78% de nitrógeno, un 21% de oxígeno y un 1% de diferentes compuestos tales como el argón, el dióxido de carbono y el ozono. Lo que indica que el flujo del gas de alimentación corresponde aproximadamente a un 21% de oxígeno. El equipo transforma el porcentaje de oxígeno en ozono, el mismo tiene una capacidad de generar 8 g de ozono/ hora o 3.3 L/ minuto hasta alcanzar concentraciones de 0-45 g/m³.

Respecto a la temperatura y a la humedad se debe establecer un rango de los valores del área donde se realizará la aplicación, para esto se seleccionaron cinco áreas distintas de la planta donde se realizaron mediciones de temperatura y humedad durante un día completo para obtener un valor promedio en cada área, esto se repitió 4 días distribuidos en diferentes semanas. Al ser un área con temperatura controlada esta se debe encontrar entre 0°C y 8°C. La medición se realiza mediante una termocupla y un higrómetro debidamente calibrados.

3.4.1.2 Tiempo de Contacto y concentración del desinfectante

Los factores determinantes para la eliminación de la *Listeria spp.* por medio de desinfección con ozono corresponden al tiempo de contacto de la superficie con el químico y a la concentración de ozono a la que se ve expuesto el microorganismo.

Para terminar dichos valores se realiza un estudio previo con la compañía proveedora del equipo donde se obtuvo una tabla de referencia de la concentración de ozono en ppm que se genera a diferentes tiempos de contacto en un volumen específico (m³), para lo que se utiliza la siguiente fórmula y los valores del cuadro 12.

Fórmula 2. Generación de ozono en ppm/min/m³

*Generación de ozono (ppm/min/m³) = (Z x Y) / 60 min.

* Ppm real= Y= 1ppm x renovaciones de aire. (2)

Fuente: BIOPUREZA, Costa Rica

Cuadro 8. Valores utilizados para obtener la generación de ozono en ppm/min/m³.

Potencia del equipo	100%
Total mgO₃/ h	4.00
Aire ambiente	50%
Capacidad de generación de ozono (Z)	8 mgO₃/1 h
Peso molecular	48

Renovaciones de aire/ h	20
40mgO3	1ppm /m3

Fuente: BIOPUREZA, Costa Rica.

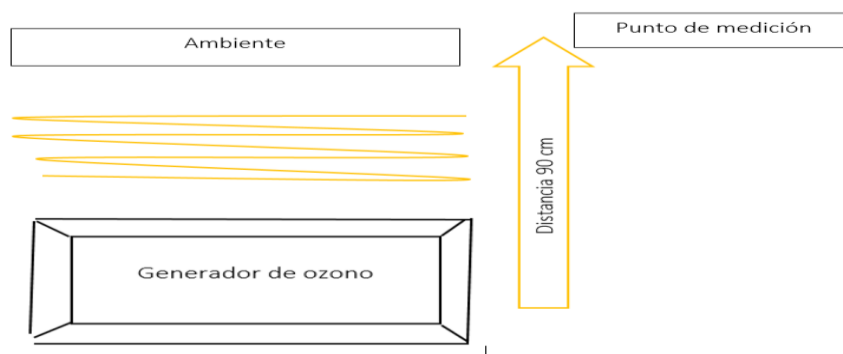
Determinando el valor de la cantidad de ozono generado por el equipo en 1 minuto para un volumen de 1 m³ se toma en cuenta: la potencia del equipo, las renovaciones de aire/ 1 hora, la capacidad de generación de ozono del equipo y el porcentaje de oxígeno proveniente del aire. Los valores de la concentración obtenida se comprobaron mediante un medidor de ozono.

Respecto a los resultados obtenidos se seleccionan tres tiempos de contacto tomando en cuenta productividad para la compañía y las concentraciones generadas, para validar posteriormente su efectividad en la eliminación del microorganismo.

Respecto a la concentración de ozono se debe garantizar que esta no afecte la salud de los colaboradores que aplican el procedimiento por lo que no deberá ser mayor a 0.1 ppm en el ambiente (Reynoso et al, 2011).

Se realizó una prueba previa para determinar la concentración ambiental a la potencia máxima en las condiciones más extremas y más críticas. El ensayo se realizó en un área pequeña (64m²) y cerrada, se colocó el equipo generador de ozono en el centro del cuarto, con un medidor de ozono se tomaron 7 mediciones a diferentes tiempos de exposición del equipo, las tomas se realizaron a una altura de 90 cm del nivel del piso (figura 4), tomando como referencia el mínimo de estatura que pueda presentar un colaborador del área, el muestreo se realizó por duplicado.

Figura 4. Ilustración de medición de la concentración de ozono en el ambiente.



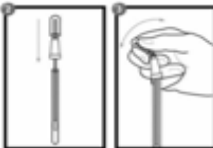
Fuente: Elaboración propia con base en información de Empresa de embutidos, Costa Rica.

3.4.1.3 Presencia de residuos orgánicos en la superficie

La presencia de suciedad en las superficies reduce la eficacia de la aplicación de sustancias desinfectantes por lo que se debe realizar una adecuada limpieza en la superficie para garantizar al máximo la efectividad del ozono, para esto, antes de cada aplicación del desinfectante se realiza una prueba de ATP para determinar la cantidad de materia orgánica que se encuentra en la superficie.

Los valores de ATP aceptables para la superficie de pisos se establecieron por pruebas experimentales al realizar muestreos previos posteriores a la limpieza en diez pisos diferentes, las tomas se realizaron por duplicado en días diferentes con la ayuda de un luminómetro siguiendo los pasos descritos en el cuadro 9.

Cuadro 9. Procedimiento para la toma y medición de ATP.

PASO	INSTRUCCIÓN	EQUIPO	FOTOGRAFÍA
1	Antes de la toma de la muestra, retire de refrigeración el hisopo de enriquecimiento y dejar a temperatura ambiente por 10 min.	Hisopo ATP	
2	Retirar el hisopo del tubo de plástico y ejerciendo presión sobre la superficie frote en un área de 10x10 cm, en tres direcciones: horizontal, vertical y transversal, dentro de la misma área de muestreo. Asegurar ir volteando el hisopo, hasta usar toda la superficie de algodón. Para el muestreo de manos frote en toda el área de la mano: palma y dedos.	Hisopo ATP	
3	Volver a introducir el hisopo en el tubo plástico y sosteniendo firmemente del hisopo utilizando el dedo pulgar y el índice romper o quebrar la válvula a presión, doblando la bombilla hacia adelante y hacia atrás.	Hisopo ATP	
4	Levantarse un poco el hisopo y presionar la bombilla para que el líquido de enriquecimiento baje hasta la parte inferior del tubo. Comprobar que la mayoría de líquido se encuentra en la parte inferior del tubo. Volver a sellar.	Hisopo ATP	
5	Sacudir del dispositivo de prueba, contra la palma de la mano 5 veces.	Hisopo ATP	
6	Encender el luminómetro presionando el botón rojo y esperar 15 segundos para que el equipo esté listo. Seleccionar el plan de muestreo y localización correspondiente.	Luminómetro	
7	Abra la tapa del luminómetro , introduzca el hisopo, cierre la tapa y presione el botón de medición (OK). En caso de que el hisopo presente condensado, es necesario limpiar por medio de una toalla de papel, ya que podría ocasionar fallas en el equipo o resultados erróneos.	Luminómetro Hisopo ATP	
8	Espere 15 segundos para obtener el resultado que aparecerá en la pantalla del equipo. El resultado se expresa en términos de URL. Cuando termine la lectura abra la tapa y deseche el hisopo en el basurero.	Luminómetro Hisopo ATP	

Fuente: Higiene 2018.

3.4.2 Identificar los pisos que presentan mayor criticidad en la proliferación de *Listeria spp.* mediante el análisis de los históricos de muestreos microbiológicos de la industria en estudio con el fin de seleccionar los puntos de muestreo adecuados.

Para los muestreos microbiológicos de la planta dividen las superficies por zonas según la cercanía que se tenga con el alimento:

- Zona 1: Incluye superficies en contacto directo con el producto, es decir: cuchillas, mesas, bandas, balanzas, entre otras.
- Zona 2: Incluye superficies cercanas al producto, como la base de los equipos.
- Zona 3: Se refiere a superficies de no contacto con el alimento, ejemplo: pisos, botas, llantas y drenajes.

El desarrollo del proyecto se enfocó en la zona 3, específicamente en pisos debido a que es la zona que históricamente presenta mayor incidencia del patógeno.

Para determinar la superficie específica donde se aplicará la metodología de desinfección con ozono se realizó un análisis de datos tomando en cuenta los muestreos microbiológicos de *Listeria spp* en pisos ejecutados por la compañía en un periodo de un año (enero 2017- enero 2018).

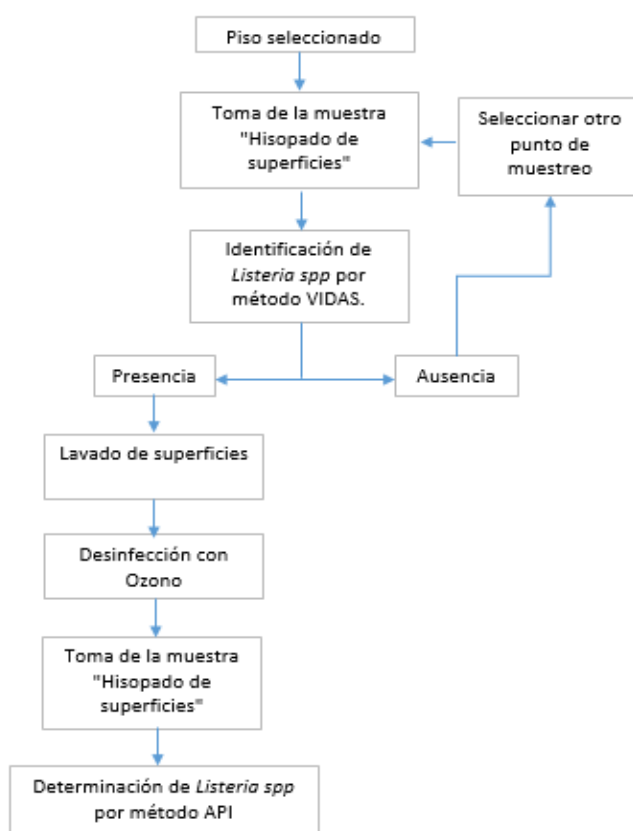
Una vez conocidos los puntos de mayor incidencia se determinó la cantidad de muestreos a realizar para que los resultados de la investigación sean significativos, para esto se aplicó la fórmula 1 que se presenta en la sección 2.4 del marco teórico.

Referente a la fórmula utilizada, el tamaño de la población tuvo de referencia la cantidad de muestreos realizados en la empresa durante un periodo de un año (N). La probabilidad de éxito o proporción esperada (p) se refiere a los resultados positivos encontrados sobre el muestreo realizado durante un año. Además, se utilizó un nivel de confianza (z) del 95% y una desviación del valor medio (D) de 1.96.

3.4.3 Validar mediante muestreos microbiológicos el tiempo de aplicación del ozono para de seleccionar la concentración de mayor eficacia en la eliminación de *Listeria spp.*

Una vez seleccionados los pisos de mayor incidencia de *Listeria spp* en el apartado 3.4.2. se procede a realizar una validación de la aplicación de ozono, como se muestra en la figura 5. Este procedimiento se aplica para los tres tiempos de contacto seleccionados.

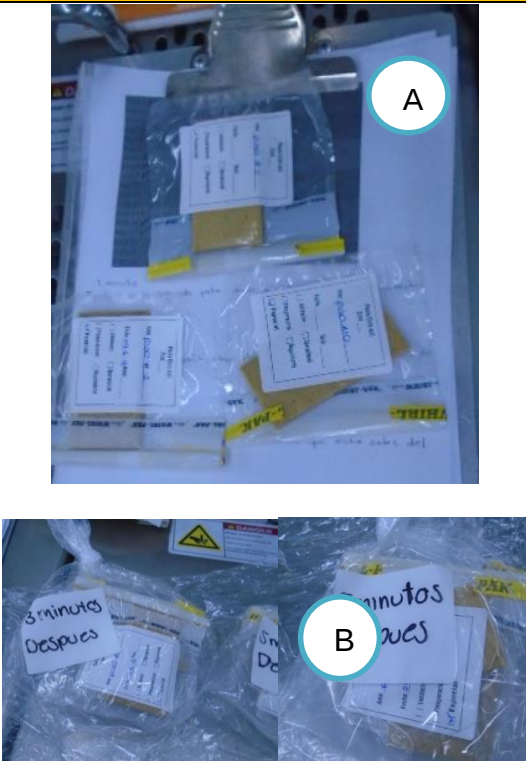
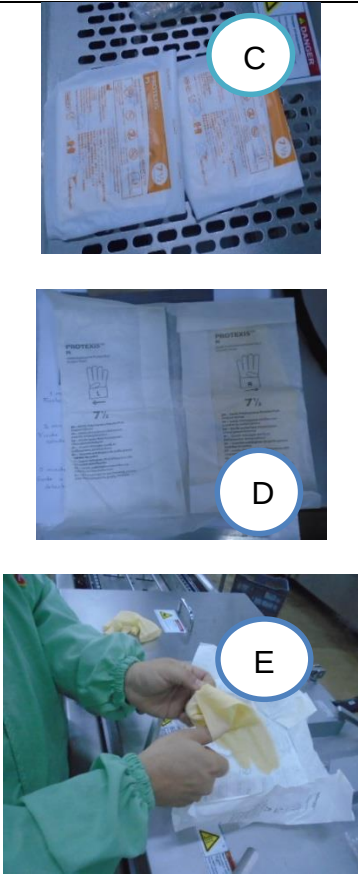
Figura 5. Metodología para determinar la efectividad de la aplicación de ozono pisos.



Fuente: elaboración propia, Costa Rica.

Para realizar la toma de la muestra se utiliza una gasa o esponja la cual se frota en la totalidad de la superficie del piso seleccionado (como se muestra en el cuadro 9), una vez realizada la toma se traslada la muestra al laboratorio para confirmar la presencia o ausencia de *Listeria spp.* por el método VIDAS LDUOS por la metodología presentada en la figura 6, el detalle del método se explica ampliamente en la sección 3.4.3.1 de este apartado.

Cuadro 10. Procedimiento para la toma del muestreo microbiológico para el análisis de *Listeria spp.*

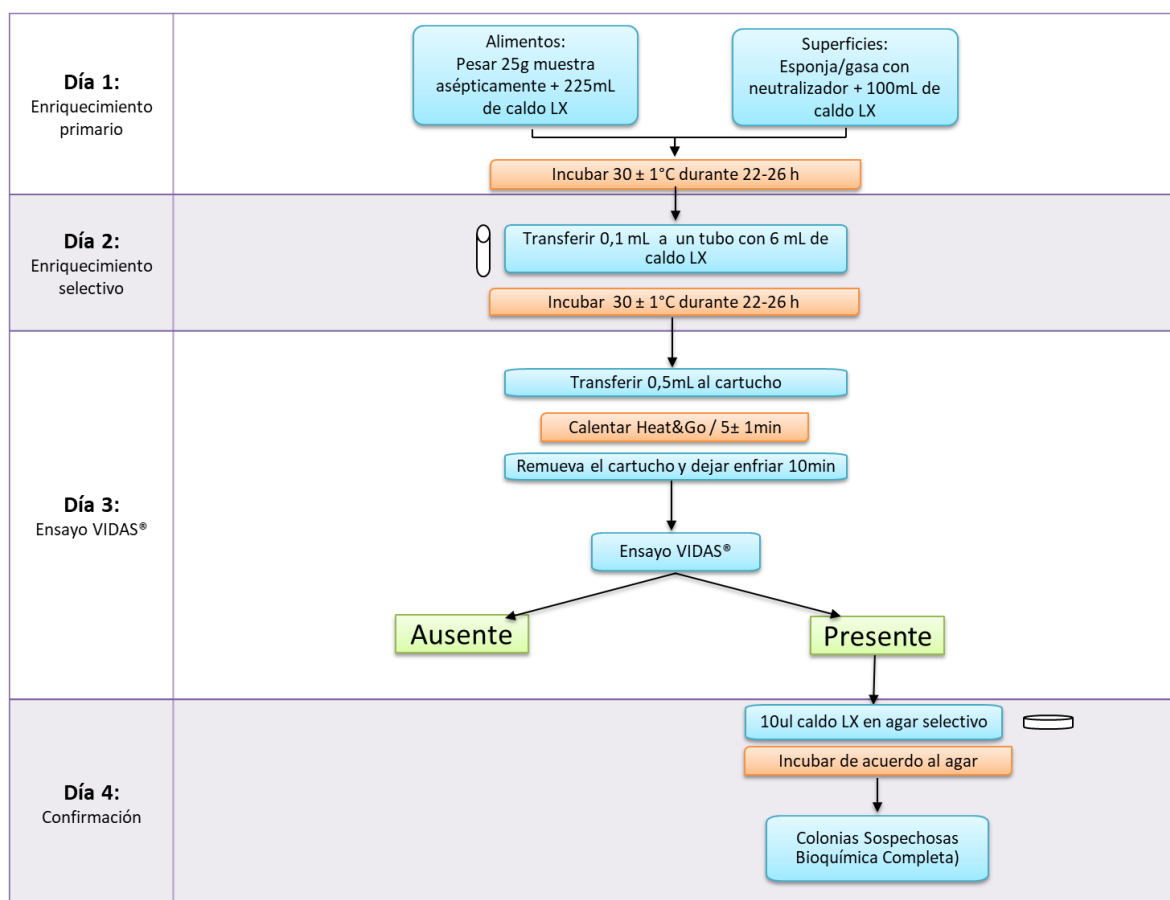
N°	Ilustración	Descripción
1		Se realiza la identificación de las muestras. ^A Cada esponja cuenta con una etiqueta donde se identifica: número de muestra, descripción, hora. ^B Posterior a la identificación, las esponjas son separadas de acuerdo con la clasificación, separándolas por tiempos de exposición.
2		Se identifica la superficie donde se va tomar el muestreo. Se abren los guantes estériles, los cuales vienen sellados. Cuentan un empaque secundario ^C y uno primario ^D ^EColocarse un guante estéril, el cual debe cambiarse en cada toma de muestra.

3		Abrir la bolsa y manipular la esponja con el guante.
4	 	Tomar la esponja mojada y realizar un raspado sobre la superficie a muestrear. Una vez finalizado el muestreo en la superficie se debe introducir la esponja en la bolsa estéril y se debe cerrar. Mientras se hace el muestreo tener la bolsa estéril tapada para que no se contamine.
5	Se ejecuta el lavado y desinfección de la superficie, el piso	
6	 	Se coloca el equipo en la superficie a muestrear, durante el tiempo de exposición designado. ^F Se toma el control de tiempo mediante un cronometro. ^G Finalizado el tiempo de exposición designado se retira el equipo de la superficie.

7		Abrir la bolsa estéril y tomar la esponja mojada ^H y realizar un raspado sobre la superficie a muestrear. ^I Una vez finalizado el muestreo en la superficie se debe introducir la esponja en la bolsa estéril y se debe cerrar. Mientras se hace el muestreo utilizar una bolsa estéril y mantenerla tapada para que no se contamine.
8		Traslado de muestras a una cámara de refrigeración a (3-5°C) para posterior traslado al laboratorio.

Fuente: elaboración propia, 2018.

Figura 6. Protocolo de método VIDAS® Listeria DUO (LDUO) para muestras productos listos para consumir cárnicos/pollo y muestras ambientales (superficies).



Fuente: Laboratorio microbiológico de Embutidora de Costa Rica, 2018.

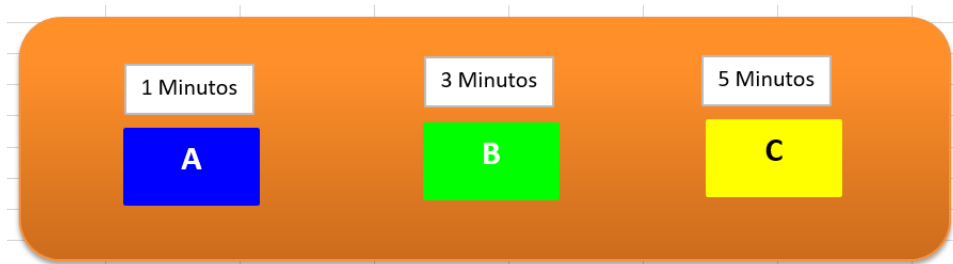
Al realizar la lectura se pueden obtener dos resultados: ausencia o presencia, de obtener ausencia del microorganismo en la superficie se debe repetir todo el procedimiento descrito en la figura 6 en un piso distinto seleccionado según los resultados obtenidos al realizar la revisión del histórico descrito en la sección 3.4.2. Si se confirma la presencia de *Listeria spp.* en la superficie se procede a realizar la limpieza del piso, las propiedades y características del detergente utilizado se describen en el Anexo 5, los pasos a aplicar para la limpieza son:

1. Se remueve en seco, con escurridor, los residuos sólidos de gran tamaño y se desechan en el basurero.
2. Luego se enjuaga la superficie con agua potable.
3. Se aplica el detergente espumante en una concentración del 2 al 4%, mediante un sistema centralizado a la superficie, dejándolo actuar por un tiempo mínimo de 5 minutos.

4. Después se realiza acción mecánica con cepillo.
5. Por último, se enjuaga toda la superficie con agua potable hasta eliminar todo el detergente.

Antes de realizar la desinfección con ozono el piso seleccionado se fracciona en tres partes (A, B y C) como se muestra en la figura 7, para realizar en cada sección una aplicación de ozono con un tiempo diferente.

Figura 7. División del piso para la toma de muestras.



Fuente: elaboración propia, Costa Rica.

La aplicación de ozono se realiza según proveedor del equipo de ozono de la siguiente manera:

1. Trasladar el equipo al área en donde se desea aplicar la desinfección con ozono.
2. Colocarse la mascarilla para ozono.
3. Conectar el equipo a un tomacorriente 110V.
4. Encender el equipo, graduar la generación de ozono y tiempo de operación del equipo según lo determinado en la sección 3.4.1.
5. Desconectar el equipo.

Una vez terminado el proceso de aplicación de ozono se realiza otro muestreo microbiológico en el mismo punto donde se realizó la primera toma (cuadro 9), el cual se traslada al laboratorio para el análisis y lectura siguiendo lo descrito en la sección 3.4.3.2. Procedimiento para la determinación de *Listeria* spp. e identificación de la bacteria método API.

Las muestras se toman por triplicado (en días diferentes) mediante el método de esponja en el mismo punto de muestreo, realizando un total de 18 muestras.

3.4.3.1 Procedimiento para la determinación de *Listeria spp* método VIDAS LDUO.

Para la determinación de *Listeria spp.* por el método VIDAS LDUO superficies según lo establecido por el laboratorio de la empresa embutidora, se deben realizar los siguientes pasos:

1. Para muestras ambientales: por cada esponja/gasa con caldo neutralizador agregar 100ml de caldo LX.
2. Homogenizar por 2 minutos.
3. Incubar a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 22-26 h.
4. Después de la incubación, mezclar y transferir 0,1ml de suspensión a 6ml de caldo LX
5. Incubar a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 22-26 h.
6. Transferir 0,5ml de caldo enriquecido al pocillo de muestra del cartucho.
7. Calentar durante 5 ± 1 minutos.
8. Retirar el cartucho y esperar al menos 10 minutos a que se enfríe
9. Realizar el test VIDAS®

Nota: El caldo de enriquecimiento no calentado puede conservarse durante 72 horas a $2-8^{\circ}\text{C}$ antes de realizar el ensayo VIDAS®

Es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones para el manejo y almacenamiento del kit de muestreo:

- a) Almacenar el kit VIDAS® A $2-8^{\circ}\text{C}$.
- b) No congelar los reactivos.
- c) Todos los reactivos no utilizados deben ser almacenados a $2-8^{\circ}\text{C}$.
- d) Después de abrir el kit, comprobar que la bolsa de conos está correctamente sellada y no presenta daños, de lo contrario, no utilizarla. Después de cada uso se debe sellar cuidadosamente con el desecante dentro y vuelva a colocar el kit completo a $2-8^{\circ}\text{C}$.
- e) Si se cumplen con las condiciones recomendados todos los componentes son estables hasta la fecha de caducidad.
- f) El kit se puede almacenar durante un mes a $18-25^{\circ}\text{C}$ después deberá ser desechado.

Modo de realización Test VIDA

- 1) Sacar de la cámara de refrigeración únicamente los reactivos necesarios. Dejar que se alcance la temperatura ambiente de los reactivos.
- 2) Utilizar un cartucho y un cono por cada muestra. Asegurarse que la bolsa de los conos haya quedado bien sellada después de retirar los conos necesarios.
- 3) Calibradores o estándares: Cada estándar debe analizarse por duplicado. El control positivo debe identificarse como “C3” y el control negativo como “C2”. Homogenizar con un agitador Vortex y dosifique 500µl en el pocillo de muestra. No calentar los estándares y los controles.
- 4) Muestras: transferir 500µl del caldo que ha pasado por el proceso térmico en el pocillo de la muestra.
- 5) Cargar el cartucho y los conos en el equipo. Antes de iniciar el equipo cerciórarse que las etiquetas de color del análisis coincidan y que por cada cartucho haya un cono.
- 6) Iniciar el ensayo.
- 7) Una vez finalizado el ensayo retirar los conos y los cartuchos del equipo.
- 8) Proceder con la interpretación de resultados, los cuales son analizados por el ordenador de manera automática y presentados como se muestra en el cuadro 11.

Cuadro 11. Umbrales para la interpretación de resultado para la detección de *Listeria* por método LDUO.

Umbrales para el valor de test	Interpretación
Detección <i>Listeria</i> spp (DLIS) < 0,10	Negativo: Ausente
Detección de <i>Listeria</i> spp (DLIS) ≥ 0,10	Positivo: Presente

Fuente: Laboratorio microbiológico Embutidora de Costa Rica, 2018.

3.4.3.2 Procedimiento para la determinación de *Listeria spp.* e identificación de la bacteria método API.

El procedimiento para la determinación de *Listeria spp.* por método API es establecido por la Empresa embutidora.

Una vez realizado el muestreo de *Listeria* por hisopado de superficies por medio de esponja, se traslada la muestra al laboratorio donde se coloca para realizar la primera incubación, la cual se efectúa a 30 ± 2 ° C durante 20 a 26 horas. Transcurrido el tiempo se traslada 0,1 $\pm$ 0,02 mL de la muestra en 10 mL de caldo Fraser y se coloca a incubar a 35 ± 2 °C durante 26 ± 2 h.

Después de la segunda incubación se examina la presencia potencial de *Listeria spp.* de manera visual por oscurecimiento del caldo Fraser debido a la hidrólisis de la esculina.

Si hay evidencia de algún grado de oscurecimiento en FB, se debe proceder a rayar con un asa bacteriológica una asada del caldo Fraser en una placa de MOX para aislar posibles colonias sospechosas y dejar incubar la placa de MOX a 35 ± 2 °C durante 26 ± 2 h.

Si no hay oscurecimiento del caldo Fraser, se debe re-incubar el caldo Fraser a 35 ± 2 °C hasta que alcance un tiempo de incubación total de 48 ± 2 h. Después de una incubación total de 48 ± 2 h volver a examinar el oscurecimiento del caldo Fraser y proceder de la siguiente manera:

- Si algún grado de oscurecimiento es evidente, rayar e incubar una placa MOX como se describió en el parrafo de anterior.
- Si no hay oscurecimiento evidente del caldo Fraser, la muestra se considera Negativa para *Listeria spp.*

Para los casos en que se determino *Listeria spp.*, se procede con la confirmación e identificación del tipo de *Listeria*, para esto primero se deben buscar colonias con la morfología típica pequeñas colonias rodeadas de un halo oscuro debido a la hidrólisis de esculina, en lo que se puede presentar dos circunstancias:

- Si hay presencia de colonias sospechosas en MOX, se utiliza una asa para realizar la prueba de catalasa y la tinción de Gram.

- Al estar seguros de la confirmación se procede con la Prueba API para realizar la identificación del tipo de *Listeria*, la cual se realiza según el procedimiento dado por la casa matriz BioMérieux SA.

En el anexo 1, se presenta un esquema de manera detallada de cada una de las etapas con su duración en días para la determinación de *Listeria*.

Importante considerar que todos los medios de cultivo y reactivos se almacenan en cámaras de refrigeración entre 4°C y 8°C para no alterar su estabilidad y no alterar los resultados, además, las herramientas esterilizadas se almacenan en lugares frescos libres de riesgo de contaminación.

3.4.4 Comparar la efectividad del ozono versus el desempeño del químico más utilizado en la desinfección de la industria de embutidos para la eliminación de *Listeria spp.*

Una vez obtenidos los resultados de los muestreos anteriores se procede a aplicar toda la metodología detallada en la sección 3.4.3 utilizando únicamente el tiempo y concentración que presente mayor efectividad en la eliminación de *Listeria spp.* La cantidad de muestreos a realizar se determinó en la sección 3.4.2 de este apartado. Se realizan tres muestreos por día fraccionando el piso como se muestra en la figura 7 con la diferencia que se aplica el mismo tiempo de contacto en todos los sectores. Antes de aplicar la metodología de ozono se realiza un muestreo previo para conocer el estado del microorganismo (presencia o ausencia).

Para la comparación de la efectividad del desinfectante actual versus la nueva metodología (ozono) se realiza una prueba de hipótesis con la herramienta estadística Minitab, utilizando los muestreos obtenidos a lo largo de un año con la metodología tradicional y los resultados obtenidos después de la aplicación de ozono.

Para la prueba de hipótesis se utiliza:

$$H_0 = p_1 = p_2$$

$$H_1 = p_1 > p_2$$

p 1= resultados desinfección actual

p 2= resultados con el método nuevo

El desinfectante utilizado en la empresa como químico tradicional en superficies de no contacto con alimentos es el amonio cuaternario, el cual se utiliza a una concentración de 200 ppm durante 3 minutos, en la ficha técnica presentada en el anexo 7 se describe de manera detallada el modo de aplicación y la dosis recomendada.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En cuanto a esta sección se presentan los resultados obtenidos tras realizar los pasos expuestos en el capítulo tercero, responde a la resolución de los objetivos y aplica lo desplegado en la teoría sustentada, para desglosar el análisis de los datos obtenidos. La respuesta del proyecto de investigación desarrollado, específicamente, de cada uno de los objetivos sobre los cual gira este trabajo, se muestra en este capítulo.

Los cuadros de los resultados que se adjuntan son fuente de elaboración propia debido a que por motivos de confidencialidad de la empresa no se permite adjuntar los análisis microbiológicos originales.

4.1 Variables que afectan la efectividad del ozono

4.1.1 Especificaciones del equipo

El equipo que se utiliza para la medición de ozono cuenta con una estructura metálica, diseñada de acero inoxidable que posee cuatro llantas para el deslizamiento del equipo; este cuenta en la parte inferior con un marco que abarca un volumen de 1m^3 el cual tiene orificios por todo el diámetro (cada 0,5 centímetros) con el objetivo de permitir la salida del ozono por su alrededor, adicional tiene una cortina plástica de 2 centímetros de ancho para lograr concentrar el ozono cuando se encuentre en el proceso de aplicación, el mismo se presenta en la figura 8.

Figura 8. Equipo utilizado para la aplicación de ozono.



Fuente: Biopureza S.A, 2018

Se controlaron las variables de temperatura y humedad en diferentes áreas de la planta para conocer las condiciones a las que se somete el equipo para la generación de ozono (cuadro 12).

Cuadro 12. Medición de temperatura y humedad en diferentes áreas de la planta de embutidos.

NºToma	Día	Área	Promedio Temepratura °C	Promedio Humedad (%)
1	1	Empaque	7,1	72
2		Pelado de Salchichas	6,8	72
3		Cámara 1	5,9	71
4		Cámara 2	6,2	71
5		Cámara 3	6,7	72
6	2	Empaque	7,2	70
7		Pelado de Salchichas	7,0	70
8		Cámara 1	6,1	70
9		Cámara 2	6,5	71
10		Cámara 3	6,4	70
11	3	Empaque	6,9	72
12		Pelado de Salchichas	6,7	72
13		Cámara 1	6,3	72
14		Cámara 2	6,2	71
15		Cámara 3	6,5	72
16	4	Empaque	7,2	71
17		Pelado de Salchichas	7,1	71
18		Cámara 1	6,4	71
19		Cámara 2	6,4	70
20		Cámara 3	6,8	70
Promedio General			6,6	71,1
Máximo			7,2	72
Mínimo			5,9	70

Fuente: Elaboración propia con base en información de Empresa de embutidos, Costa Rica.

Bataller, Santa Cruz y García (2010) indican que las bajas temperaturas favorecen la estabilidad del ozono y su efectividad. El empleo de la refrigeración, según el producto, debe estar acompañado de elevada humedad relativa siempre que se garantice un control del crecimiento de microorganismos. El poder germicida del ozono es despreciable por debajo del 45% de humedad relativa y se recomiendan valores por encima del 90 %.

La planta cuenta con un ambiente refrigerado controlado que se mantiene en un rango de temperatura de 5,9°C a 7,2°C en tiempos productivos y una humedad relativa de 70-72 % HR, estos valores favorecen las condiciones para la generación de ozono.

4.1.2 Tiempo y concentración de Ozono

Se obtiene mediante la fórmula 2 presentada en la metodología las concentraciones generadas por el equipo de ozono en un tiempo determinado como se muestra en el cuadro 13. Los valores teóricos obtenidos fueron verificados por medio de un medidor de ozono el cual proyectó los mismos valores presentados.

Cuadro 13. Concentración de ozono en ppm según el área y tiempo de exposición.

Volumen m3	Tiempo en minutos					
	1	3	5	10	20	40
1	3,3	9,00	16,5	33	67	120
2	1,7	4,50	8,25	16,67	33	60
3	1,1	3,00	5,50	11,11	22	40
10	0,333	0,90	1,65	3,33	6,67	12,00
20	0,167	0,45	0,83	1,67	3,33	6,00
30	0,1111	0,30	0,55	1,11	2,22	4,00
40	0,0833	0,23	0,41	0,83	1,67	3,00
50	0,0667	0,18	0,33	0,67	1,33	2,40
60	0,0556	0,15	0,28	0,56	1,11	2,00
70	0,0476	0,13	0,24	0,48	0,95	1,71
80	0,0417	0,11	0,21	0,42	0,83	1,50
90	0,0370	0,10	0,18	0,37	0,74	1,33
100	0,0333	0,09	0,17	0,33	0,67	1,20

Fuente: BIOPUREZA, 2018.

El equipo de ozono abarca un volumen de 1 m³, por efectividad en el proceso y por criterio de experto se seleccionan los tres menores tiempos: 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos, los cuales generan concentraciones de 3,3 ppm, 9,0 ppm y 16,5 ppm respectivamente.

Domínguez (2015), considera al ozono como un potente bactericida a concentración de 0,01 ppm (0.02 mg/m³). Otro estudio realizado por Brassca M., Morandi S. & Lodi R. (2009) donde se utilizó el ozono para la eliminación

de *Listeria monocytogenes* en diferentes quesos indica que concentraciones de 4 ppm de ozono en 8 minutos son efectivas. A su vez Robbins J., Fisher C, Moltz A. & Martin S. (2005) indican que la exposición de *L. monocytogenes* a 2,5 ppm de ozono durante 40 segundos genera disminuciones de 5 a 6 log en los recuentos.

Las concentraciones obtenidas se encuentran por arriba de las concentraciones de referencia para la eliminación del patógeno. Sin embargo, la Occupational Safety and Health Administration (OSHA) indica que 0.1 ppm representa la concentración máxima a la cual un individuo en buen estado de salud puede exponerse de forma continua al ozono, durante su trabajo habitual en una jornada de 8 horas diarias y 40 horas semanales sin que aparezcan efectos perjudiciales (Reynoso, Di Cesare & Rosales, 2011).

La aplicación de ozono se realiza de manera directa a la superficie del piso, fuera de turnos laborales y por tiempos de exposición muy cortos. En el cuadro 14 se muestra la concentración de ozono en el ambiente tomada a diferentes tiempos de exposición del equipo con la potencia máxima del generador de ozono y a 90 cm de alto, los resultados indican que la concentración de ozono en el ambiente durante la aplicación de la metodología es 0 ppm, de tal manera que la concentración nociva para disminuir la mayor población bacteriana es totalmente tolerable para el ser humano sin efectos adversos.

Cuadro 14. Mediciones de ozono en el ambiente.

Potencia del equipo= 100%		
Medición= a 90 cm de alto de la salida del equipo		
Tiempo de exposición (minutos)	Concentración (ppm) Día 1	Concentración (ppm) Día 2
5	0.000	0.000
10	0.000	0.000
20	0.000	0.000
30	0.000	0.000
60	0.001	0.000
80	0.000	0.000
120	0.000	0.000

Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa embutidora, Costa Rica.

4.1.3 Presencia de Residuos orgánicos en la superficie

En el cuadro 15 se presentan los resultados obtenidos al realizar mediciones de ATP en dos días diferentes, estos muestran valores entre 50-200 URL. Los valores teóricos de aceptación y rechazo para ATP en superficies se muestran en el Anexo 6, según los datos proporcionados por la empresa Hygiena el rango de ATP aceptable para superficies porosas es ≤ 300 URL, estos límites de aceptación y de rechazo se utilizan como una guía, sin embargo, los valores son específicos para cada superficie según el material y diseño.

Cuadro 15. Mediciones de ATP posterior al lavado en pisos.

Toma	Nombre del Piso	Día 1 ATP (URL)	Día 2 ATP (URL)
1	Empaque	70	56
2	Pelado de Salchichas	95	75
3	Cámara 1	110	87
4	Cámara 2	88	112
5	Cámara 3	165	89
6	Pasillo 2700	90	105
7	Pasillo R530	105	96
8	Piso precámara	95	200
9	Piso Aduana	54	154
10	Piso antesala	80	93
Promedio General		100,95	

Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa embutidora, Costa Rica.

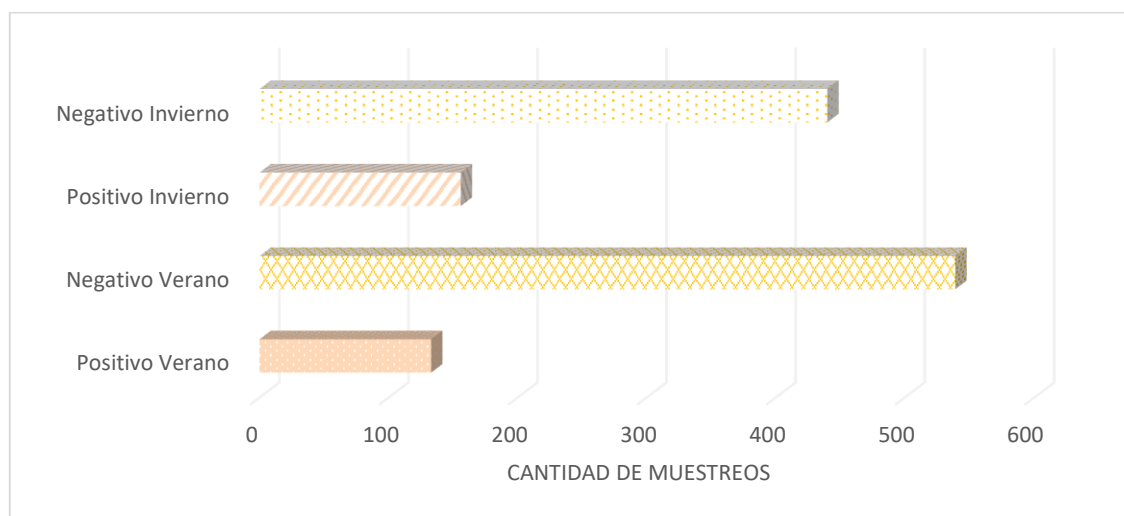
4.2 Selección de los puntos de muestreo

Para determinar los pisos que poseen mayor criticidad en la proliferación de *Listeria* se realiza un análisis de los históricos de muestreos desde enero 2017 a enero 2018, tomando en cuenta las diferentes zonas, la época del año y la cantidad de incidencias por piso.

El gráfico 1 muestra información sobre el número muestreos positivos y negativos obtenidos tras la medición de *Listeria spp.* en las dos épocas del año que tiene Costa Rica; las variables representadas son los positivos y negativos de la época seca, así como, los positivos y negativos de la época lluviosa. Al analizar globalmente el comportamiento de las épocas del año, se puede apreciar que su comportamiento es regular, al tener resultados muy similares en ambas épocas.

Esto se debe a que *L. monocytogenes* es uno de los microorganismos más resistentes a diversas condiciones ambientales en comparación con otras bacterias patógenas no esporuladoras transmitidas por alimentos, lo que le permite sobrevivir durante más tiempo en condiciones adversas. Al mismo tiempo, resiste muy bien en condiciones de desecación y no es afectado por muchos de los productos detergentes usuales, que en condiciones de aplicación tienen valores de pH compatibles con la bacteria (Berto et al).

Gráfico 1. Resultados microbiológicos de *Listeria spp.* por estación del año 2017-2018.



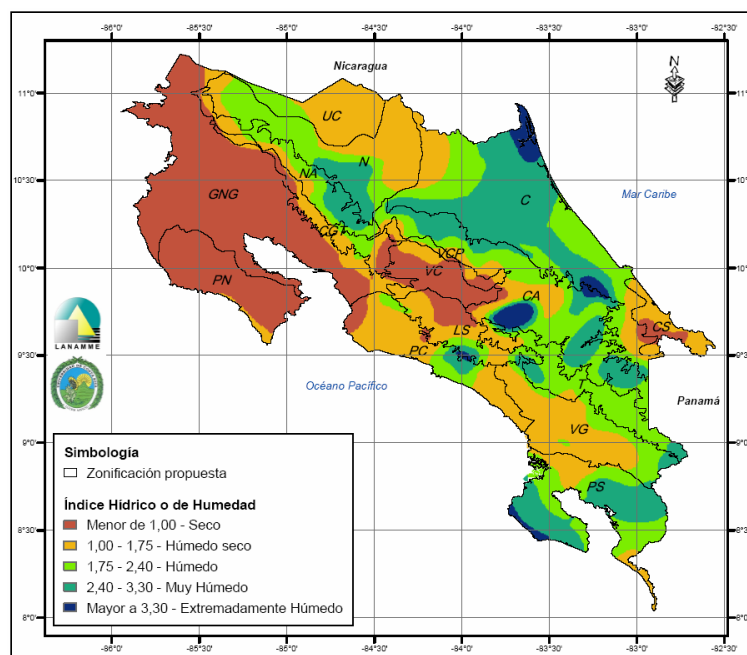
Fuente: elaboración propia según datos experimentales de la Empresa, Costa Rica.

Otra de las características de peso para el desarrollo de los microorganismos es la humedad.

Una humedad relativa muy elevada favorece el crecimiento de los microorganismos, especialmente de aquellos que se encuentran en la superficie (Education and culture lifelong learning programme Leonardo Da Vinci, s.f.).

En la figura 9 se detalla la zonificación del índice de humedad que posee cada área del país. Se evidencia en el mapa que las zonas donde se encuentran la mayor cantidad de fábricas alimenticias (Valle central, Cartago y Heredia) poseen un nivel de humedad considerable para el desarrollo del patógenos en estudio en las tres épocas del año establecidas.

Figura 9. Distribución del índice Hídrico o de humedad en Costa Rica y zonificación propuesta.



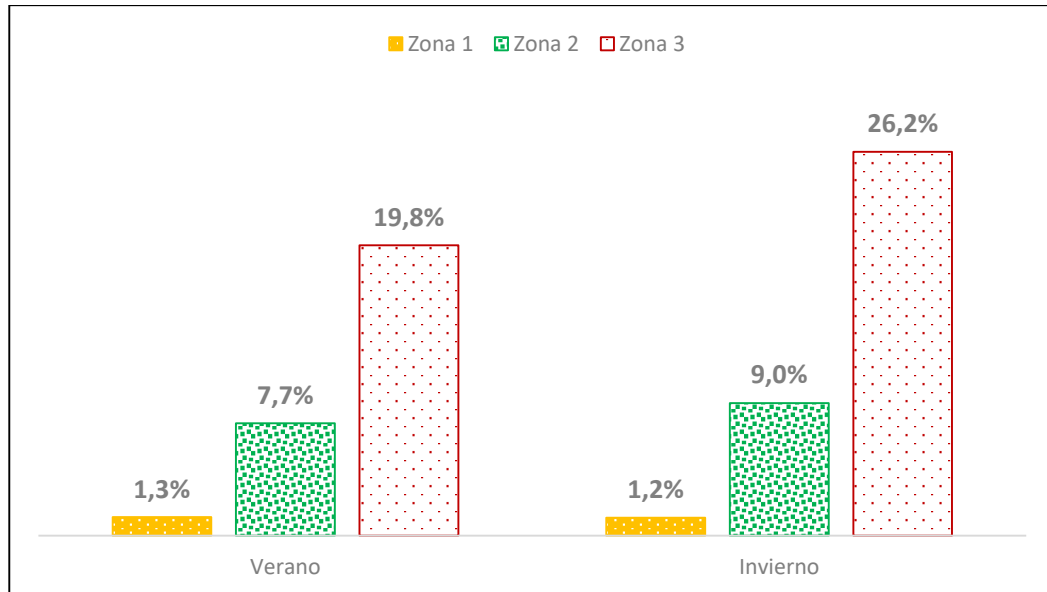
Fuente: Orozco, 2017.

Para determinar el enfoque de los muestreos durante la aplicación de la tecnología de ozono, se realiza un análisis previo de todas las tomas de *Listeria spp.* realizadas, a lo largo de un año, en las diferentes zonas en las que se dividen las superficies (zona 1, zona 2 y zona 3). El gráfico 2 muestra información sobre la cantidad de positivos por zonas de la planta en las dos diferentes épocas del año. Las variables representadas son la clasificación de zonas, la época del año y la cantidad de positivos entre el año 2017 y 2018. El mayor porcentaje de positividad de *Listeria spp.* en ambas épocas del año se encuentra en la zona 3, la cual incluye pisos, llantas y botas; además es notorio que en época lluviosa aumentan los positivos de *Listeria* en la zona 3, esto se debe a que estas áreas presentan las condiciones ideales de crecimiento para este patógeno convirtiéndolo en reservorios para su crecimiento.

La habilidad que tiene *Listeria* para crecer a menos de 5°C y a una actividad de agua baja, explica la frecuente presencia del patógeno en ambientes (piso y drenajes, especialmente en áreas alrededor de refrigeradores y lugares sujetos a contaminación externa) de plantas manufactureras de alimentos, particularmente en biofilmes formados en

superficies, incluyendo acero, vidrio, plástico y otros materiales (Miller et. al.,1997).

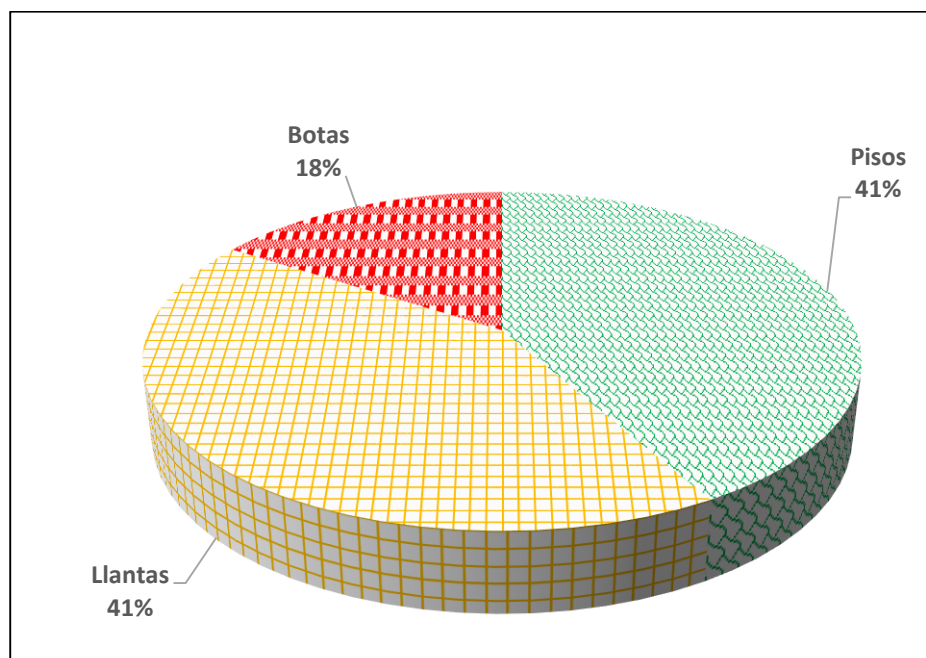
Gráfico 2. Comparación porcentaje de positivos de *Listeria spp.* entre zonas por épocas del año, 2017-2018.



Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

Conociendo la incidencia del patógeno en la zona 3 se determinó la superficie con mayores problemas, en el gráfico 3 se muestra el porcentaje de muestreos que se tomaron para medir la incidencia de *Listeria* en la zona tres de la planta de proceso, específicamente en pisos, llantas y botas y en un periodo de un año comprendido de enero 2017 a enero 2018.

Gráfica 3. Porcentaje de positivos de *Listeria spp.* en la zona 3 de enero 2017 a enero 2018.



Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

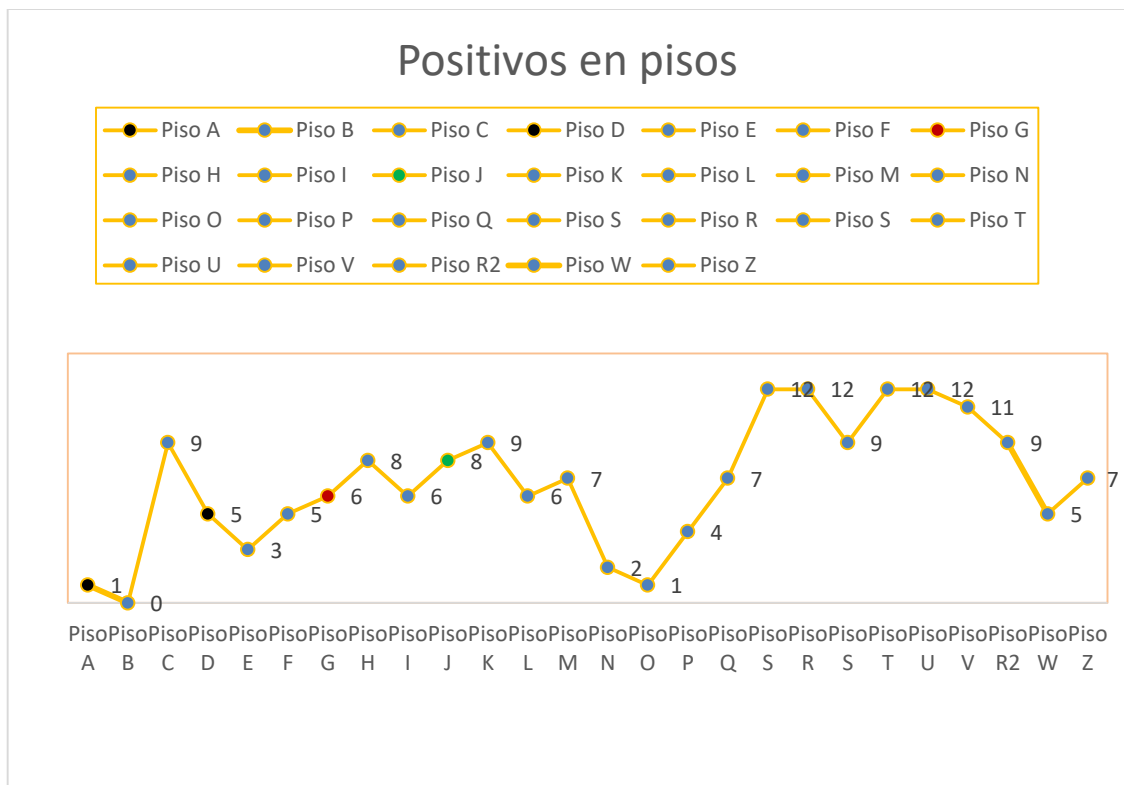
Al hacer una revisión global de la gráfica, se observa que los pisos al igual que las llantas representan el mayor índice de muestreos positivos de *Listeria spp*; con un 41% de presencia cada uno; direccionando el enfoque a estas superficies.

El diseño de plantas y equipos es en ocasiones poco higiénico, aparecen zonas de difícil acceso para la limpieza que favorecen la acumulación de materia orgánica, como lo son los pisos donde pueden encontrar nichos donde refugiarse; los mejores son aquellos donde también se acumula materia orgánica después de la limpieza y desinfección (Ferreira, 2014). Algunos ejemplos de estas zonas son los desagües, las llantas, hendiduras y los poros de los suelos; las cuales tienen una fuerte repercusión en la persistencia de bacterias por largos periodos de tiempo. A pesar de esto se selecciona por criterio de expertos la aplicación del tratamiento de ozono únicamente en pisos, debido a que la contaminación de otras áreas como llantas de equipos se genera al estar en contacto con el piso.

Los pisos de la planta están divididos en 29 superficies según la ubicación que posean, el gráfico 4 presenta la cantidad de muestreos

positivos de *Listeria spp* en los diferentes pisos, tomados en un periodo de un año (enero 2017 a enero 2018). Los pisos presentados con círculo rosado indican que son los de mayor incidencia, siendo estos: el piso R, piso de Hornos, piso pasillo compact y piso pasillo entrada de empaque a precámara, todos estos poseen la misma cantidad de positivos, para la aplicación de la metodología de ozono se selecciona uno de los pisos de mayor incidencia (R), la elección se basa en las características del área y el criterio de experto tomando en cuenta el historial de años anteriores.

Gráfico 4. Cantidad de positivos de *Listeria spp*. en pisos.



Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

Si al realizar los análisis correspondientes el piso presenta ausencia del microorganismo antes de la aplicación de ozono, se procede a escoger otro de los 3 pisos restantes con mayor incidencia del patógeno.

Para determinar la cantidad de muestreos a realizar en la superficie seleccionada se utilizó la fórmula 1, la cual describe:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot q}{d^2 \cdot (N-1) + Z^2 \cdot p \cdot q}$$

Para cada variable se utilizaron los valores presentados en el cuadro 16.

Cuadro 16. Valores de las variables para la determinación del tamaño de la muestra.

Variables de diseño	Valor
N = Tamaño de la población	29
Z = Es la desviación del valor medio con un nivel del 95% de confianza	1,96
d = % Error máximo permitido	3%
p = % probabilidad de éxito o proporción esperada	0,41
q = 1-p	0,59

Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

Los valores de Z y d corresponden a valores fijos recomendados según fuentes bibliográficas. Respecto al valor de N se toma como referencia la cantidad de pisos en que se divide la planta, los cuales corresponden a 29 según lo observado en el gráfico 4. El valor de p se obtiene al sacar el porcentaje de positivos de *Listeria spp* obtenidos en un período de un año en los pisos, el cual corresponde a un 41% según lo determinado en esta sección 4.2. Por tanto:

$$n = \frac{29 \times 3,8 \times 0,41 \times 0,59}{(28 \times 0,0009) + (3,8 \times 0,41 \times 0,59)}$$

$$n = \frac{26,7}{(0,025+0,92)}$$

$$n = \frac{26,7}{0,95} = 28$$

Para generar confiabilidad en el método propuesto para la desinfección de pisos se deberán realizar 28 muestreos posteriores a la aplicación del ozono en el tiempo y en la concentración seleccionados en el apartado 4.3.

4.3 Tiempo y concentración de aplicación del ozono para la eliminación de *Listeria spp*

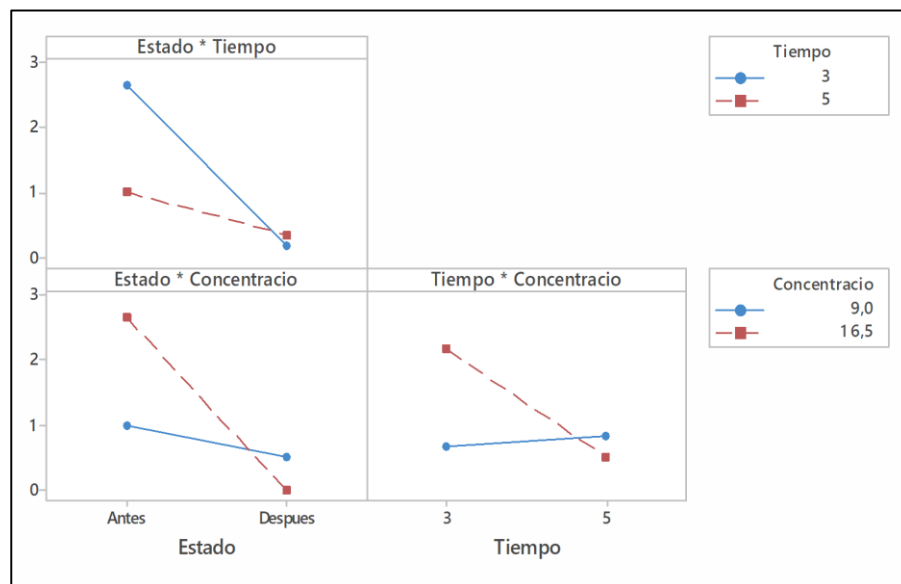
Al ser seleccionado el piso de mayor criticidad e incidencia en *Listeria spp* (piso R zona de empaque) se le realiza la aplicación de ozono en tres

diferentes tiempos y concentraciones bajo temperaturas entre los 5° y los 8°C y con una humedad relativa de 71%. La primera fue de un minuto a 3.3 ppm, la segunda a tres minutos a 9 ppm y la tercera a cinco minutos a 16.5 ppm.

Las muestras se toman por triplicado, en días diferentes mediante el método de esponja en el mismo punto de muestreo, realizando un total de 18 muestras antes y después de la aplicación con las diferentes concentraciones, adicionalmente se realizó ATP después de la limpieza dando datos positivos entre los 100 y 150 URL, garantizando así una carga baja de suciedad y residuos sobre la superficie para la correcta y efectiva desinfección posterior.

La primera concentración de ozono, aplicable a 1 minuto y 3.3 ppm no se tomó en cuenta para la comparación de los resultados finales debido a que la experiencia indica que, en caso de buscar una asepsia total, por encima de reducciones bacterianas de 10⁶ colonias, serán necesarias concentraciones superiores a 10 ppm (Top Ozono, s.f.). Los resultados evidencian que este tiempo y esta concentración no son efectivos para la eliminación del microorganismo (Anexo 8).

Gráfico 5. Determinación de la efectividad del ozono en función del tiempo y la concentración.



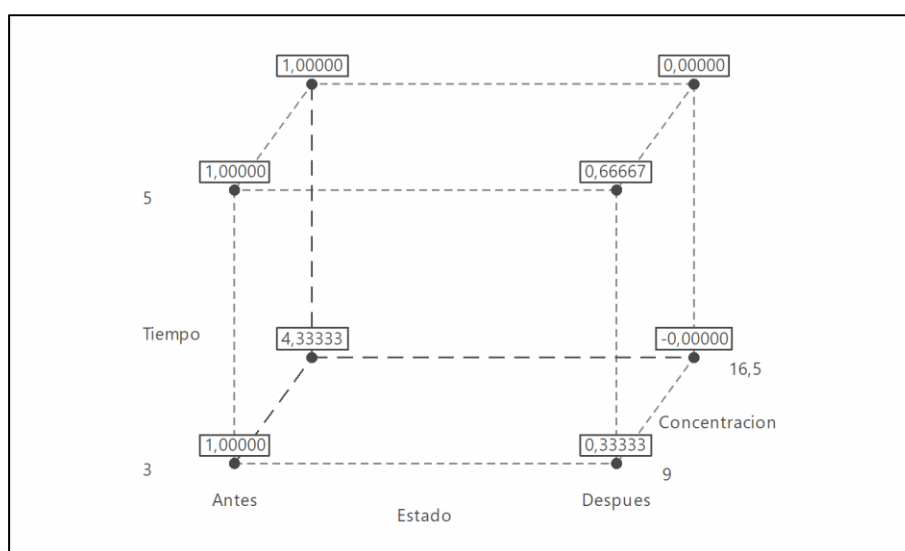
Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

Se utilizó para la obtención de resultados estadísticos la distribución binomial, de dos probabilidades discretas, detallando el número de éxitos

obtenidos tras los ensayos microbiológicos realizados antes y después de la aplicación de ozono.

Según la gráfica 5, se indica que luego de la aplicación de los resultados se analizaron los efectos de la presencia del patógeno *Listeria* y su interacción antes y después del ozono con los dos niveles de concentración establecidos. Se determina que existe un cambio positivo después de emplear la técnica de desinfección y arroja que los mejores resultados se obtuvieron con la mayor concentración y tiempo de exposición.

Gráfica 6. Distribución binomial para la determinación de la efectividad del método.



Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

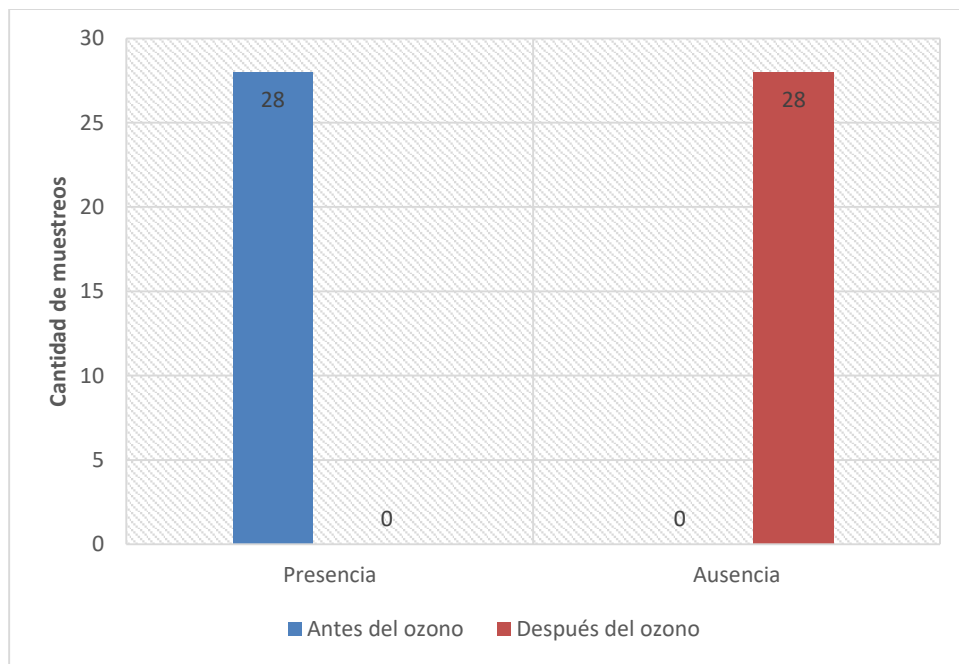
Se observaron diferencias en la distribución de los serotipos aislados entre los muestreos tomados previos a la desinfección y posteriormente ($p=0,43$). La distribución de la efectividad contra *Listeria spp.* de acuerdo con el tiempo y concentración se reduce a cero muestreos positivos después de la aplicación de las 16.5 ppm a los 5 minutos, como se observa en la gráfica 6.

4.4 Efectividad de la concentración de ozono versus el desempeño del desinfectante amonio cuaternario a 200 ppm

Basados en los resultados obtenidos en el objetivo 4.3, se sigue la metodología descrita en la sección 3.4.3 para la toma de los 28 muestreos a

realizar posterior a la aplicación de la metodología de ozono. El gráfico 7 presenta que la bacteria se encuentra presente posterior al lavado de la superficie, contrario a los resultados obtenidos posterior a la desinfección con ozono. En el Anexo 9 y Anexo 10 se muestran las tablas de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Gráfico 7. Resultado de los muestreos de *Listeria spp.* antes y después de la aplicación de ozono.



Fuente: elaboración propia según datos de experimentación de la Empresa, Costa Rica.

Respecto a los análisis obtenidos en la gráfica 3 acerca del porcentaje de muestreos positivos en pisos (41%) y en el gráfico 7 sobre los resultados obtenidos posterior a la desinfección con ozono a 16,5 ppm, se realizó una prueba de hipótesis de dos proporciones utilizando la herramienta estadística Minitab obteniendo los siguientes resultados:

p_1 : proporción donde Muestra 1 = Evento

p_2 : proporción donde muestra 2= Evento

Diferencias: $p_1 - p_2$

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Evento	Muestra p
Muestra 1	432	178	0,412037

Muestra 2 28 0 0,000000

Estimación de la diferencia

	95% superior
	Límite para
Diferencia	Diferencia
0,412037	0,450989
CI basado en la aproximación normal	
Prueba	
Hipótesis nula	$H_0: p_1 - p_2 = 0$
Hipótesis Alternativa	$H_1: p_1 - p_2 < 0$
Método	Z-Valor P-Valor
Aproximación normal	17,40 1,000
Exacto de Fisher	1,000

Donde:

$H_0 = p_1 = p_2$

$H_1 = p_1 > p_2$

p_1 (resultados desinfección actual) = 41% positivos.

p_2 (resultados con el método de ozono).

Con los resultados obtenidos se afirma con un 95% de confianza que la proporción p_2 histórica actual es significativamente menor que la proporción p_1 debido a que el Z calculado (0,0) es menor al Z teórico (17,40) por lo que existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa. Es decir, al utilizar métodos de desinfección tradicionales como el amonio cuaternario se obtiene resultados mayores (más positivos de *Listeria spp.*) que al utilizar la desinfección con ozono.

Utilizando distribución binomial se demuestra que la probabilidad de encontrar muestreos positivos en n cantidad de ensayos es de 0,41. Al realizar los 28 ensayos posteriores a la desinfección con ozono se baja la probabilidad a 0.

La formación de biofilms y la tolerancia o resistencia a los desinfectantes por parte de la *Listeria* son las principales causas de supervivencia bajo la aplicación de químicos para la sanitización de

superficies. Berrón (2016) afirma: Los biofilms que forma *L. monocytogenes* sobre superficies alimentarias presentan una elevada resistencia a métodos de higienización y desinfectantes tradicionales, como el amonio cuaternario.

Investigaciones indican que frente a los principios activos biocidas de los desinfectantes, parece que existen fenómenos de interacción con las sustancias que integran la matriz, mientras que, al mismo tiempo, la estructura microporosa de la matriz del biofilm dificulta el acceso de las moléculas biocidas hasta el interior de la misma, realizándose la transferencia de materia por difusión, con lo que se facilita el contacto de las células con concentraciones subletales del biocida y se favorecen fenómenos de adaptación a los principios activos del desinfectante (Bertó et al, s.f.).

Por lo contrario, numerosos estudios afirman la eficacia del ozono como tratamiento desinfectante debido a su poder oxidante, el cuál ataca a todas las sustancias susceptibles, ya sean inorgánicas como orgánicas (microorganismos, biomoléculas, entre otros) que se encuentren en contacto con este, en el caso de los microorganismos los destruye físicamente evitando que generen resistencia. Además, posee la ventaja de que su aplicación se puede realizar de forma gaseosa lo que le permite de abarcar zonas de difícil acceso. Por tanto, los hallazgos coinciden con lo esperado respecto a la efectividad del mismo.

Como complemento en el análisis de la efectividad se tomó en cuenta el costo beneficio de la implementación del ozono como método de desinfección en pisos respecto a la aplicación actual de desinfectantes.

Según los procedimientos internos establecidos en la empresa, se pueden obtener beneficios en reducción de gastos indirectos respecto al impacto que genera la obtención de resultados positivos de *Listeria spp.*, los principales son:

- Reducción en análisis microbiológicos; por procedimiento interno se establece que en caso de tener positivo se debe realizar muestreos adyacentes; sobre la superficie relacionada, en promedio son 10 muestras, lo cual equivale a un monto de \$100.000 (precio por análisis \$10.000) en laboratorio interno. Adicional se debe ejecutar un análisis de la superficie relacionada durante tres días consecutivos, por metodología rápida, lo cual tiene un valor de \$15.000 por análisis.

- Tiempo operativo del personal de higiene; se debe asignar recurso para ejecutar el lavado profundo de las superficies o equipo relacionadas a un positivo. El tiempo asignado por lavado es de 60 minutos, puede variar de acuerdo al tipo de equipo a lavar, lo cual equivale a \$600 en impacto económico.
- Tiempo de personal para investigaciones; posterior a cada resultado positivo se debe ejecutar un análisis de causa y raíz con un equipo interdisciplinario para ejecutar la investigación, lo cual se toma de 3 a 4 horas.
- Reducción en uso detergente.
- Tiempo administrativo del personal involucrado, porque se deben programar muestreos, ejercicios de trazabilidad, tiempo de revisión de cámaras entre otras.
- Reducción de positivos en zonas adyacentes a la zona 3, siendo estas: zona 1 y zona 2, lo cual genera:
 - Tiempos de paro, en caso de tener positivos en superficies de máquina; las mismas deben retenerse hasta obtener la liberación por análisis microbiológicos. El tiempo de retención de una máquina en estos casos son de 24 a 48 horas según el método de análisis que se ejecute. El impacto de paro involucraría 1440 a 2880 minutos.
 - Retención de productos, desde el último tiempo de lavado, las retenciones de los productos involucrados en estos casos son de 48 horas, lo cual involucra costos indirectos de almacenamiento, electricidad, frío. El impacto económico por almacenamiento de una tarima en retención es \$89,6.
 - La implementación de la desinfección por medio de ozono implica costos en electricidad y el alquiler mensual del equipo el cual ronda en \$316.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Las variables que se deben controlar para garantizar la efectividad de la aplicación de ozono son: especificaciones del equipo dosificador (fuente de alimentación, el flujo de gas para la alimentación, la temperatura y humedad del área), el tiempo de exposición, la concentración de ozono y la presencia de materia orgánica en la superficie.

- Mediante un análisis histórico anual de los resultados microbiológicos de *Listeria spp.* en una industria cárnica, se evidencia que la zona con mayor vulnerabilidad para el crecimiento del microorganismo está conformada por los pisos, siendo el de mayor relevancia para estudiar la efectividad del ozono el piso del área de empaque nombrado como piso R.

- Se comprueba mediante análisis microbiológicos que la concentración de mayor eficacia en la eliminación de *Listeria spp* en pisos de la industria cárnica es la concentración de 16.5 ppm con un tiempo de exposición de 5 minutos, logrando tener una eficacia del 100% en los muestreos realizados.

- La aplicación de ozono es un método efectivo para la eliminación de *Listeria spp* en la desinfección de pisos, lo que logra evidenciar, mediante una distribución binomial, que la probabilidad de positividad en un ensayo de 28 muestras es de 0% mientras que la proporción esperada de encontrar positividad en base al histórico del amonio cuaternario era de un 42%.

5.2 Recomendaciones

En este punto se presentan sugerencias específicas para las instancias involucradas en esta investigación. Dichas recomendaciones resultan a partir de puntos que deben fortalecerse para la mejora del proceso de aplicación de ozono en superficies de no contacto de la zona tres como lo son los pisos para eliminación de *Listeria*.

- Es necesario cuantificar las colonias de crecimiento del patógeno; en los análisis microbiológicos previos y posteriores a la desinfección, para poder conocer la eficiencia por reducción en logaritmos del microorganismo; logrando respaldar estadísticamente los resultados con datos cuantitativos en la aplicación del uso de ozono.

- Es indispensable evaluar con anticipación el diseño completo del equipo dosificador de ozono, en cuanto a tamaño y método de aplicación se refiere, considerando las dimensiones del área de proceso en la que se vaya a aplicar el método y además el tiempo necesario de aplicación, para así lograr un resultado efectivo con el ozono.

- Identificar con metodologías rápidas si las superficies contaminadas con Listeria spp. cuentan con biofilms, debido a que la formación de esta capa de mucopolisacáridos impide físicamente que el ozono actúe sobre las bacterias con rapidez, alargando el tiempo necesario de exposición para la eliminación de la bacteria.

- Se recomienda tipificar el microorganismo para conocer si la especie encontrada representa la bacteria patogénica.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainia Centro Tecnológico y ITDI. (2007). *Manual de aplicaciones del ozono para el control de Legionella*. Comunidad Valenciana.
- Alarcón, M. (2013). *Prevalencia de Listeria Monocytogenes en salchichas tipo Huacho provenientes de los mercados de abastos del cercado de Lima*. Lima Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Alós., J. O. (2010). *Listeria y listeriosis. Control de calidad SEIMC Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles*.
- Alvarez, J. (2015). *Evolución de la contaminación de superficie durante los procesos productivos en pymes del sector cárnico*. Universidad de la Rioja. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. Argentina.
- Ardiles, R. (2012). *Efecto del ácido peracético sobre la supervivencia de Listeria monocytogenes y E.coli en superficies inertes contaminados*. Universidad Nacional del Trujillo. Perú.
- Azul, P. d. (2016). *Procedimientos de Limpieza y Desinfección de Áreas y Equipos*. Empresa de embutidos Costa Rica.
- Azul, P. p. (2016). *Instructivo para el muestreo de análisis microbiológico*. Empresa de embutidos Costa Rica.
- Bataller, M., Santa Cruz S y García M. (2010). *El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 41, No 3, pp. 155-164.
- Batelgeux. (s.f). *Desinfectantes utilizados en la industria alimentaria*. Obtenido de: http://www.batelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_boletin_Desinfectantes_y_Modo_de_accion_en_IIAA.pdf.
- Bello, H; Domínguez, M; González, G. y Vera, A. (2012). *Factores de virulencia y comportamiento frente a los agentes antibacterianos de cepas de Listeria monocytogenes aisladas de diferente origen*. Chile, Concepción: Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Berga, A y López, J. (s.f.) *Planes de limpieza y desinfección*. Consultado en <http://ocw.upm.es/tecnologia-de-alimentos/seguridad-alimentaria/contenidos/Lecciones-y-Test/Lec-3.1..pdf>
- Beutelspacher, E. y Calderon J. (2005). *Diseño y construcción de un generador de ozono para aplicaciones de purificación de agua*. Cuernavaca Morelos, México.

- Beutelspacher, P. (2005). *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review*. Australia: Faculty of health the University of Newcastle.
- Berrón A. (Septiembre 2016). *Evaluación de la capacidad de formación de biofilms por parte de cepas salvajes de listeria monocytogenes resistentes a amonio cuaternario. Análisis, cuantificación y detección*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Bertó R., Canet J., Lorenzo F. y Orihuel E. (s.f). *El control de Listeria monocytogenes persistente en Industrias alimentarias*. Consultado el día 8 de Junio 2018 en www.betelgeux.es/.../AET_-_Articulo_Tecnico_L__Monocytogenes_Persistente.pdf
- Biopureza. (2017). *Equipos para aplicación de ozono*. Consultado en enero 2017. Costa Rica.
- Bove, S. (2014). *Investigación sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo. Programa de Seguridad Alimenticia del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA).Barcelona. pp. 2,7,10.*
- Brandalise, F., Martín Grillo, R., Pinto, L. A., Edgar, A. S., y Sánchez, M. I. (2017). *Organización de las naciones Unidas para Alimentación y Agricultura*. Recuperado el 05 de Agosto de 2017, de <http://www.fao.org/publications/card/es/c/c90b1aa7-f532-4fed-a2eb-a004461bcd71/>
- Brassca, M., Morandi S. y Lodi R. (2009). *Empleo de Ozono para el control de Listeria monocytogenes en diferentes tipos de queso*. Revista Scienza y Técnica Lattiero-Casearia, Vol. 60 (3), pp. 211-215.
- Brugalla, M. (2013). *Listeria monocytogenes en comidas*. Revista seguridad alimentaria, pp. 2-6.
- Ciampi L; Schöbitz, R; Nahuelqui Y. (2007). *Listeria monocytogenes un peligro latente para la industria aliementaria*. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Austral. Chile.
- Colegio de Ciencias de Agricultura de Penn State. (2006). *El Control de Listeria monocytogenes en Establecimientos de Venta al Consumidor o al Detalle*. Pennsylvania, pag: 2-4.
- Díaz, P. y Fernández, P. (2003). *Cálculo del poder estadístico de un estudio*. España, Coruña.

- Cortez, M y Sanchez, A. (2015). *Determinación de Listeria monocytogenes en dos variedades de quesos artesanales, comercializados en los mercados la Tiendona, Central y San Miguelito*. Universidad de el Salvador.
- Cossart, P. (24 de Mayo de 2017). *Listeria monocytogenes: la rara pero agresiva bacteria oculta en alimentos mal manipulados*. Recuperado el 05 de Agosto de 2017, de Universidad de Costa Rica: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2017/05/24/listeria-monocytogenes-la-rara-pero-agresiva-bacteria-oculta-en-alimentos-mal-manipulados.html>
- Domínguez W. (2015). *Efecto del tiempo de exposición del gas ozono sobre el número de bacterias y hongos presentes en el laboratorio de inmunología de la Universidad Nacional de Trujillo*. Perú.
- Durand, D. (2015). *Capacidad de formación de biopelículas de cepas de Listeria monocytogenes aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del Cercado de Lima*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Echandi, M. y Antillon, F. (2000). *Contaminación microbiológica en Costa Rica. Una revisión de 10 años*. Costa Rica: Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- EFSA. (2012). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012*.
- Education and culture lifelong learning programme Leonardo Da Vinci. (s.f). Microorganismos y alimentos. Obtenido de http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf, el día 18 de Julio del 2018.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Listeria monocytogenes in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: Listeria monocytogenes prevalence estimates. Recuperado desde: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3241.pdf>
- Escalante, C y Chavéz, R. (2004). Calidad del aire en la ciudad de Quito. Consultado el 17 de febrero del 2018 en <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsaidis/ecuador10/moni.pdf>
- Franken, L. (2005). *La aplicación de la tecnología de ozono a la salud pública y a la industria*. Food Safety & Security at Kansas State University
- Fernández L. J. (marzo, 2015). Integración de un sistema de desinfección de agua para el área de lavamanos de un Quirófano por medio de ozono. México D.F.

- Flores, S. (30 de Mayo de 2018). Formación de biofilms. (M. R. Richmond, Entrevistador).
- Food and Drugs Administration of US (2008). *Secondary direct food additives permitted in food for human consumption*. Federal Register. 2008;39:17-26.
- FSPSA. (2016). Controles Preventivos de Alimentos para Humanos. Pág 4.4. Capítulo 4. Peligros biológicos para la inocuidad alimentaria.
- García, B. (2014). *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en productos cárnicos listos para su consumo en España*. España: Universidad Politécnica de Valencia Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.
- González, M. (2016). *Control microbiológico de Listeria monocytogenes en alimentos para consumo destinado a lactantes*. Universidad de Sevilla. España.
- Global Kemical. (2017). *Procedimiento para aplicación de químicos y toma de concentraciones*. Consultado en Febrero 2017.
- Hermann, D. (2001). *Determinación de Listeria monocytogenes en carnes crudas artesanales que se expeden en mercados municipales de la ciudad de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia.
- Hernández, A. (2009). *Estudio de la Interacción de bacterias implicadas en la formación de placa dentro-bacterina con superficies de titanio comercialmente puro in vitro y su asociación con la pero-implantitis*. Barcelona: Universidad Politecnica de Catalunya.
- Herrera, I. (2004). *Distribución de serotipos de Listeria monocytogenes aislados de alimentos de Colombia*. Bogota, Colombia: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos .
- Hygiena. (2017). *Procedimiento para muestreo rápido de Listeria*. Consultado en febrero 2017. Costa Rica.
- Ibarra, L. (2013). *Análisis Microbiológico en Quesos Frescos que se Expenden en Supermercados de la Ciudad de Guayaquil, Determinando la Presencia o Ausencia de Listeria y Salmonella*. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Instituto Nacional de Alimentos (INAL) (s.f.). *Recomendaciones para la correcta manipulación de alimentos en locales que elaboran y venden comidas preparadas*. Consultado en

http://www.ops.otg.ar/publicaciones/cursos_virtuales/VETA/bibliografia/Recomendaciones_manipulacion_locales.pdf

Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). 2007. *Manipulación de Alimentos*. Alajuela, Costa Rica.

Instituto Nacional de Aprendizaje. (2018). *Curso de Manipulación de Alimentos*. Capítulo 7.

Jiménez, M. Comunicación personal, 25 de Julio de 2017. *Control de Listeria en plantas procesadoras de embutidos*. Entrevistado por Marianela Ramírez Richmond.

Kemical (2015). Ficha técnica del AlcaKleen. Coyol, Alajuela.

Kim J.G. y Yousef A.E, (2000). *Inactivation Kinetics of Foodborne Spoilage and Pathogenic Bacteria by Ozone*. Vol. 65, No. 3.

Martínez Gómez, M. (s.f.). Universidad Politécnica de Valencia. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/7936/Distribucion%20binomial.p>

Miramont, S. (2013). *Recubrimientos elaborados a partir de biolímeros para el soporte de sustancia con actividad antimicrobiana : carvacrol y sorbatos*. Buenos Aires, Argentina: UTN.BA . Escuela de postgrado.

Muñoz, A. (2006). *Optimización de la producción de la Enterocina AS-48 y ensayo de su eficacia como bioconservante en alimentos*. Granada: Editorial de la Universidad de Granada.

Muñoz, A; Vargas, M; Otero, L; Díaz G y Gúzman V. (2011). *Presencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá 2002-2008*. Revista Biomédica, Vol.31, pp. 39-428.

Organización Mundial de la Salud (2018). *Listeriosis*. Consultado en febrero 2018, de <http://apps.who.int/iris/bitstream>.

Ortiz, M. (2015). *Diversidad genética y persistencia ambiental de Listeria Monocytogenes en dos plantas de procesado de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario*. España, Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

Parillada, F y Vaqué, R. (2014). *Estudio de la incidencia de listeriosis en España*. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

- Pérez, M. A. (2014). *Informe científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación con los riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimentos por mujeres embarazadas*. España: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN).
- Puentes, C. (2012). *Determinación de Listeria monocytogenes en ensaladas listas para el consumo en los restaurantes élites y aledaños de la Universidad de Tolima*. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Perú, Lima.
- Poutou, M. (2008). *Listeria monocytogenes en comidas preparadas*. Barcelona, España: Agencia de Salud Pública de Barcelona.
- Prada, J. R. (15 de Enero de 2018). Utilización de tecnologías. (M. R. Richmond, Entrevistador).
- PROQUIMIA. (2016). *Informe Técnico Listeria Monocytogenes*. Barcelona: Departamento técnico de PROQUIMIA.
- Psyma. (Noviembre 2015). *¿Cómo determinar el tamaño de una muestra?*
Consultado en <http://www.psyma.com/company/news/message/como-determinar-el-tamano-de-una-muestra>.
- Puma, M. (2004). *Determinación de la incidencia de Listeria monocytogenes en pollos frescos y verduras obtenidas en el mercado del centro de Lima Metropolitana*. Centro Latinoamericano de Enseñaza e Investigación de Bacteriología Alimentaria (CLEIBA). Perú, Lima.
- Rebentos, A. (2014). *Utilización de nuevas tecnologías para control de microorganismos*. Costa Rica, San Jose: Noticia Repretel.
- Reynoso, R; Di Cesare, C; Rosales, C. (2011). *Utilización del ozono en la desinfección en Bodegas*.
- Rice, R. G (August 22-25, 2005). *User successes with ozone for agricultural products and food treatment*. Proceeding of 17th World Ozone Congress Strasbourg, France.
- Ríos, A. (2013). *Evaluación del nivel de contaminación de superficies y eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo*. Universidad Autonoma de Bracelona. España.
- Robbins J., Fisher C, Moltz A. y Martin S. (2005). *Elimination of Listeria monocytogenes biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide*. J Food Prot. Vol. 68(3), pp. 494-498.

- Rodriguez, C. R. (2007). *Evaluación de cuatro desinfectantes sobre Listeria aislaaos de productos carnicos crudos en una planta procesadora en Bogota*. Universidad Javeriana carrera de ciencias en microbiología industrial, 9,10.
- Ruiz, J. (2012). *Caracterización fenotípica de Listeria monocytogenes aislados de superficie donde se expende pollo y de alimentos de los mercados de la ciudad*. Peru: Universidad Nacional de Trujillo.
- Ruiz, Z., Potou, R. y Carrascal, A. (2008). *Resitencia antimicrobiana y a desinfectantes*. Bogota: Universidad Javeriana. Laboratorio de Microbiología de alimentos. pp 3-4.
- Sánchez, J. (s.f.). *Clasificación de desinfectantes*. Obtenido de http://www.academia.edu/14408803/clasificacion_de_desinfectantes. Pp 1-2
- Solsona, F. y Méndez, J. (2002). *Desinfección del agua*. Capítulo 6 Ozono.
- Top Ozono. (s.f.). Obtenido de <http://www.topozono.com/es/Limites%20y%20medidas%20del%20Ozono.html>
- Valdivieso, C. (2011). *Determinación del tamaño muestral mediante el uso de árboles de decisión*. Bolivia: Universidad Privada Boliviana.
- Vázquez-Boland, JA., Kuhn, M., Berche P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. y Kreft J. (2001). *Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants*.
- Villalobos, L. y Martínez, R. (2007). *Aisalamiento e identificación por métodos convencionales y PCR listeria monocytogenes en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela*. Revista Científica. Venezuela: Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Postgrado en Biología .
- V. López, M. S. (2006). *Listeria monocytogenes en alimentos*. Revista Argentina de Microbiología, 8.

VII. GLOSARIO

Agua dura: es aquella que contiene un alto nivel de minerales, en particular sales de magnesio y calcio.

Agua ozonizada: agua que ha llevado un tratamiento de desinfección mediante la tecnología de ozono.

ATP (Adenosina Trifosfato): se encuentra en todas las células y es indicador ideal de higiene total (presencia de materia orgánica y bacterias). Los hisopos para el muestreo que se utilizan con el equipo LIGHTNING MVP, cuentan con una tecnología avanzada para detectar ATP de residuos de alimentos y contaminación microbiana en superficies y líquidos con una alta exactitud y reproductibilidad.

CIP: es el acrónimo de Cleaning in Place (limpieza “in situ”).

Endocitosis: es el mecanismo que permite a las moléculas entrar dentro de células de ciertos tipos.

Desinfección: Quitar a algo la infección o la propiedad de causarla, destruyendo los gérmenes nocivos o evitando su desarrollo. El tratamiento de una superficie limpia para reducir el número de microorganismos a un nivel aceptable.

Lisis: es el proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que produce la salida del material intracelular, provocado por lisinas.

Patogenicidad: se define como su capacidad para producir enfermedad en huéspedes susceptibles.

Peritricos: rodeado de pelos, se aplica sobre todo a las bacterias provistas de flagelos.

Producto terminado: Alimento humano que no recibirá ningún otro proceso o transformación.

Serotipos: Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología.

Superficie de contacto: Son las superficies en contacto directo con el producto, que el asociado puede manipular y posterior tocar el producto.

Superficie de no contacto: Son las superficies que no están en contacto con el producto y normalmente no son manipuladas directamente por los asociados.

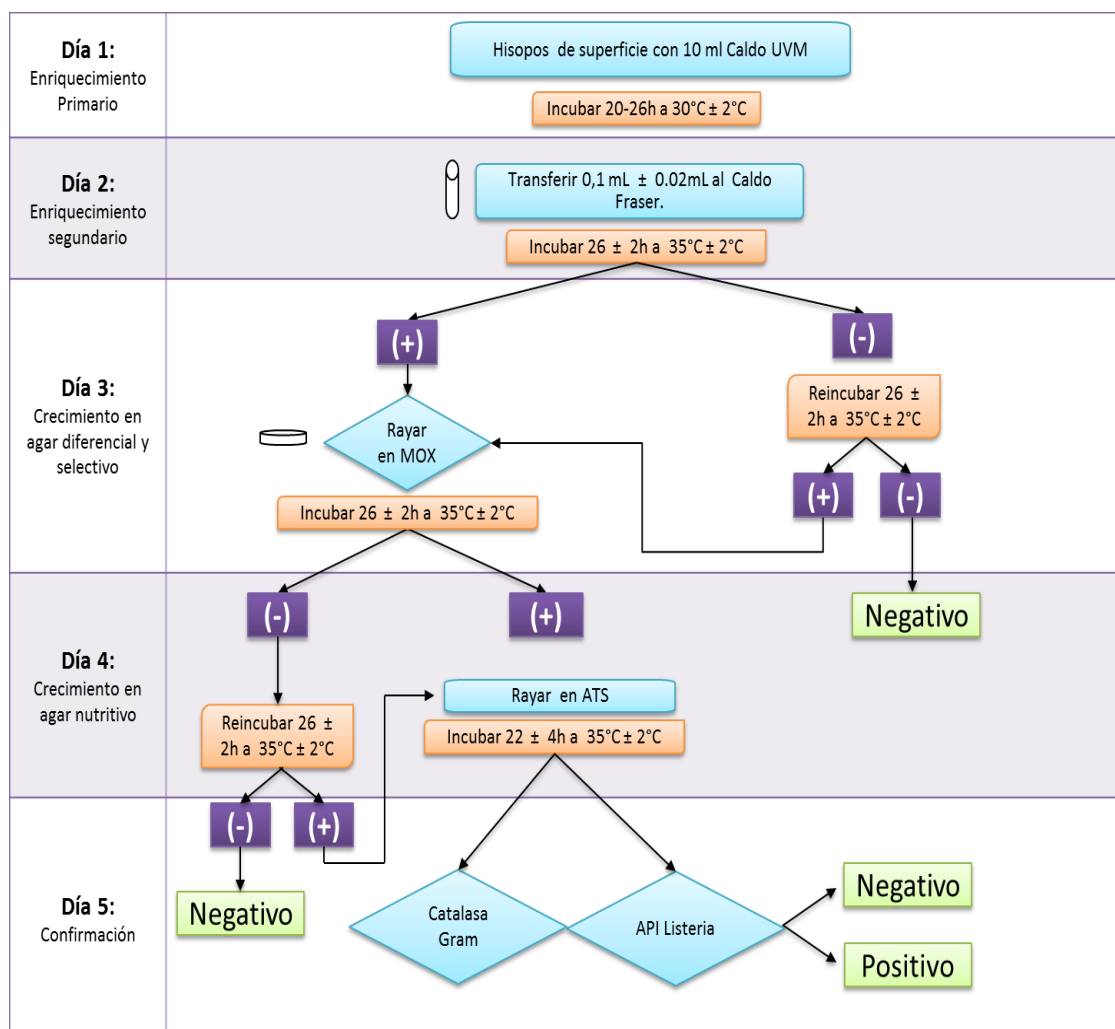
Ubicua: El término ubicuo significa en todas partes.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para la determinación de *Listeria spp* por método API.

Figura 10. Procedimiento para la determinación de *Listeria spp* por método API.



Fuente: Laboratorio de microbiología interno de la empresa de embutidos, Costa Rica 2016.

Anexo 2. Cronograma del plan de trabajo proyecto de graduación.

Cuadro 17. Plan de trabajo del proyecto de graduación.

Fuente: elaboración propia, 2018.

Cronograma de Actividades											
Actividades a desarrollar		Oct-17	Nov-17	Dic-17	Ene-18	Feb-18	Mar-18	Abr-18	May-18	Jun-18	Jul-18
1	Titulo y objetivos										
2	Definicion del objeto de Estudio										
3	Justificacion										
4	Antecedentes										
5	Alcances y limitaciones										
6	Marco Teorico/ Referencias										
7	Marco Metodologico										
8	Revisión y pruebas preliminares del generador con el proveedor										
9	I Pruebas de concentración de ozono en proceso (validación estabilidad ozono)										
10	Analisis de resultado(de prueba I)										
11	II Pruebas de concentración de ozono en proceso (validación estabilidad ozono)										
12	Analisis de resultado(de prueba II)										
13	III Pruebas de concentración de ozono en proceso (validación estabilidad ozono)										
14	Analisis de resultado(de prueba I)										
15	Ajuste de diseño de equipo										
16	Pruebas pre eliminares en área de rpoceso										
17	Verificación de resultados y elección de la concentración a utilizar										
18	Reunión orientación en estadística										
19	Obtención de información para selección de los puntos de muestreo.										
20	Analisis de historial de positividad de listeria en áreas										
21	Definición de puntos y cantidad de muestreos										
22	Revisión de materiales necesarios y logística para los muestreos microbiologicos										
23	Logistica de Compra de Materiales para pruebas										
24	I Recoleccion de pruebas en área de proceso (a. Muestreo rápido, montaje y lectura de resultados)										
25	I Recoleccion de pruebas en área de proceso (b. Muestreo tradiconal, montaje y lectura de resultados)										
26	Recolección y montaje de resultados oficiales										
27	Analisis de resultados										
28	Redacción de resultados										
29	Redacción de conclusiones y recomendaciones										
30	Ajustes al proyecto final: formato, indice, bibliografias,dedicatoria										
31	Revisión final Proyecto										
32	Entrega proyecto para revsión										

Anexo 3. Ficha técnica equipo de ozono.

Figura 11. Especificaciones del equipo generador de ozono



FICHA TÉCNICA

GENERADOR DE OZONO

MODELO BP - 8000

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

El BP-8000 es una unidad multifunciones compacto y portátil con generador de OZONO "Corona Discharge" (CD) y con capacidad para generar 8 g/h en condiciones óptimas con el uso de ingreso de oxígeno puro. Este equipo es enfriado por aire.

Los componentes están contruidos con materiales de alta calidad y los controles son fáciles de usar y ver. El BP - 8000 cuenta con perilla para controlar la concentración de OZONO de 0-100%.

Cuenta con un Generador de OZONO de la Serie "Corona Discharge" con capacidad para generar 8 gr/hr con enfriamiento automático.

- Construido con un compresor de alta resistencia.
- Indicador de funciones con LED
- Dial control de concentración de OZONO de 0 – 100%
- Estructura resistente
- Capacidad de producción de OZONO hasta de 8 gr/hr
- Salida de OZONO con protección de Teflón
- La entrada de oxigeno está construida en Acero Inoxidable.

INSTRUCCIONES GENERALES DE MANIPULACIÓN.

- Antes de realizar la instalación, operación y uso del BP - 8000 lea detenidamente este Instructivo.
- Realice la instalación de este equipo de acuerdo con las instrucciones que se indican en este Instructivo.
- Conecte el BP - 8000 a un contacto con conexión a tierra.
- Para reducir el riesgo de una descarga eléctrica, en caso de extensiones defectuosas, proceda a reemplazar el cable dañado inmediatamente.
- Siga todos los códigos eléctricos aplicables.
- Riesgo de descarga eléctrica. Asegúrese de que el equipo se encuentra apagado y desconectado antes de llevar a cabo cualquier trabajo de mantenimiento. El incumplimiento de esta advertencia puede resultar en lesiones graves.
- Por su seguridad, no almacene ni use gasolina, productos químicos u otros líquidos o vapores inflamables cerca de este equipo o cualquier otro electrodoméstico.
- Si se da un contacto de aceite, grasa o cualquier sustancia inflamable con el oxígeno se puede provocar un incendio. Sustancias inflamables deben mantenerse alejadas de los generadores de oxígeno, tanques y conexiones de válvulas y todo otro equipo de oxígeno.
- No manipule internamente el equipo, permita que la empresa proveedora sea la responsable del mantenimiento, de otra manera se pierde de inmediato la garantía.
- No moje el equipo directamente, esto pueda causar desperfecto en sus componentes eléctricos.

Especificaciones técnicas

IDENTIDAD: ozono (gaseoso)

FORMULA: O₃

Descripción: Se produce en la atmósfera por la acción de la luz ultravioleta sobre el oxígeno a gran altura. Comercialmente obtenido al pasar aire entre electrodos que transportan una corriente alterna de alta tensión. También encontrado como un subproducto en las zonas de soldadura, equipos de alta tensión, o luz UV 1.900 nm longitud de onda.

GENERACION	g/h	SCFH	LPM
BP - 8000	8	6.6	3.3

MEDIDA	ENERGIA	CONCENTRACION	PESO DEL EQUIPO
A" x L" x F"	Watts	gr/m ³	Kgs
11" x 9.5" x 15"	144	0 - 45	8.1

INSTALACIÓN

1.- Colocación del Generador de OZONO en un lugar seco y limpio con buena ventilación.

Nota: Asegúrese de colocar el generador de OZONO en una habitación con temperatura ambiente por debajo de 50 °

2.- Alimentación Principal.

- Utilice el cable de alimentación suministrado para conectar el BP-8000 a una toma de corriente aterrizada. Si el BP-8000 se utiliza donde el agua está presente, una falla a tierra interruptor de circuito debe proteger el circuito.

- El interruptor debe tener una protección a tierra para cualquier falla eléctrica del circuito.

3.- Conexión de la manguera y encendido.

- El BP - 8000 cuenta con un compresor de aire construido en el interior del generador de OZONO. Usted puede usar el compresor interior si el equipo se usa menos de 2 horas por día.

- Este equipo está diseñado para funcionar de forma continua con el uso del compresor hasta dos horas, en caso que requiera continuar, deje descansar el equipo al menos por 30 minutos.

- Encienda / Apague la alimentación principal del equipo y del compresor de aire que se encuentra en el panel frontal.

SEGURIDAD OPERACIONAL

-Los niveles de detección- El OZONO puede ser detectado en el aire por su olor característico a concentraciones de aproximadamente 0,1 ppm. Recomendamos revisar la ficha de seguridad (MSDS).

-El nivel de exposición permisible (PEL) o la concentración ponderada en el tiempo para el OZONO a los que los trabajadores pueden estar expuestos es de 0,1 ppm en promedio durante 8 horas, 5 días a la semana (OSHA). El límite de exposición a corto plazo es de 0,3 ppm promedio de más de 15 minutos. Sin embargo la exposición sin la protección correspondiente a estos niveles y a estos tiempos no debería presentarse si se siguen las recomendaciones de la hoja de seguridad.

-La concentración de ozono en ambientes cerrados que se están manejando no debe sobrepasar la concentración de 3 ppm, ya que con 1ppm debería ser suficiente para el control de microorganismos a nivel ambiental.

-El manipulador de cualquier equipo generador de ozono debe manejar adecuadamente las concentraciones a aplicar, en caso que exista personal permanente operacional dentro del recinto con la finalidad de seguir las regulaciones de seguridad y concentraciones en las distintas normas de ocupación de los recintos.

Equipo de protección personal

Protección respiratoria:

-**Alto Nivel** (> 10 ppm) - equipo autónomo de respiración: MISH / NIOSH.Ejemplo: mascarilla 9922 P2 VO y ozono 3M. Mascarilla Smart FFP2 con válvula para Ozono, FFP2 NR D, 100% PVC-FREE. Especial para OZONO

-**Nivel bajo** (0,3 - 10 ppm) - Canister Tipo respirador (carbón) debe ser utilizado.

-Protección para los ojos: Use gafas de seguridad químicas si es necesario para trabajar en alto de ozono (> 10 ppm).

-MASCARILLA 9922 P2 VO Y OZONO 3M



NOTAS IMPORTANTES- Consulte las regulaciones propias de cada zona y solicite a las empresas encargadas de suministrar equipos de seguridad, la mascarilla correspondiente para manejo de ozono.

-Verifique siempre las concentraciones aplicadas con el uso de equipo de metrología específico para los distintos fines.

Fuente: Biopureza S.A, 2018.

Anexo 4. Ficha de datos de seguridad.

Figura 12. Datos de seguridad del ozono.



OZONO
Ficha de datos de seguridad de materiales (MSDS)

NFPA 704 Designation
Hazard Rating



4 = Extreme
3 = High
2 = Moderate
1 = Slight
0 = Insignificant

Health 3 0 1 Reactive
OX
Special

EMITIDO: Octubre de 2016 REVISADO: 26-Noviembre 2017

SECCIÓN I: IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL

IDENTIDAD: ozono (gaseoso)
FORMULA: O₃

Descripción: Se produce en la atmósfera por la acción de la luz ultravioleta sobre el oxígeno a gran altura. Comercialmente obtenido al pasar aire entre electrodos que transportan una corriente alterna de alta tensión. También encontrado como un subproducto en las zonas de soldadura, equipos de alta tensión, o luz UV 1.900 nm longitud de onda..

El ozono se usa como un agente oxidante en el aire y la desinfección del agua: para el blanqueo de textiles, aceites, y ceras; la síntesis orgánica como el procesamiento de ciertos perfumes, vainillina, alcanfor; para control micro organismos, mohos y bacterias.

Precauciones: Un poderoso agente oxidante, el ozono existe generalmente como un gas y es altamente reactivo químicamente.

La inhalación puede producir varios grados de irritación respiratoria, así como efectos oculares y en la piel cuando se excede la concentración y los tiempos de exposición.

Fabricante / proveedor: generación en el sitio, equipos disponibles de varios proveedores, que incluyen:

Technology Co Ltda: Ozone Systems Inc.1984 Cargo Court Louisville, KY. USA. Manufacture: Bluegrass Water Zone A, F1.1. Bidg, 111, Park Kung Au Industrial Plaza Xikeng. Community, Guanian, Shenzhen City

Modelos: MP, MP series, S-GLAB series, AQUA series AI Models.
Air purifier series, AIR-800, AIR -700. 300 AQUAMATIC all models
Series: 2246,4466, 6688, 1122,2283
2006/95/EC Electromagnetic Compatibility.

SECCIÓN II: INGREDIENTES Y PRECAUCIONES

Ozone, CAS No. 10028-15-6; NIOSH RTECS No. RS8225000

1991 OSHA PELs 8-hr TWA: 0.1 ppm vol. (0.2 mg/m ³) 15-min STEL: 0.3 ppm vol (0.6 mg/m ³)	1991-1992 ACGIH TLV En techo 0.1 ppm (0.2 mg/m ³)
1990 IDLH 10 ppm	1990 DFG (Germany) MAK TWA: 0.1 ppm (0.2 mg/m ³)
1990 NIOSH REL En techo 0.1 ppm vol. (0.2 mg/m ³)	Biopureza: 0.1 ppm / 8 horas a 1,3 mt del suelo con personal laborando.

Category 1: Límite máximo de exposición: 0.2 ppm, durante 8 horas sin protección de respirador.

Other Designaciones: Triatomic oxygen: CAS No. 10028-15-6, NIOSH RTECS No. RS8225000

SECCIÓN III: DATOS FÍSICO

Punto de ebullición: -169 °F, -111,6°C

Presión de vapor: > 1 ATM

Densidad: 1,6 de vapor (aire =1) por volumen.

Peso molecular: 48 gramos /mol.

Solubilidad en agua: 0,49 ml @ 32 ° F (0 ° C), 3 ppm @ 20° C

Punto de fusión: -315,4 °F (-192,7 °C)

% volatilidad: 100%

pH: no listado.

Temperatura crítica: 10,22°F (-12,1°C) (esta es la temperatura límite por encima un gas no puede ser licuado por compresión.

Apariencia y olor: Incoloro a gas de color azul (superior a -169 ° F): olor característico asocia a menudo con chispas eléctricas o rayos en concentraciones de menos de 2 ppm y se vuelve desagradable por encima de 1-2 ppm.

PRECAUCIÓN: La fatiga olfativa se desarrolla rápidamente sin protección, por lo que no se debe utilizar el olor sin protección como un mecanismo de aviso preventivo.

SECCIÓN IV: FUEGO Y RIESGOS DE INFLAMABILIDAD

-Punto de inflamabilidad: No es inflamable

-Medios de extinción: El uso de grandes cantidades de rocío de agua para apagar fuegos donde se encuentre ozono. Utilizar técnicas de lucha contra incendios adecuadas para lidiar con el material circundante.

-Procedimientos especiales contra incendios: Use un aparato de respiración autónomo con piezas de cara completa que opere en una de presión demanda u otro modo de presión positiva.

-Peligros inusuales de incendio / explosión: La descomposición de ozono en el gas oxígeno, (O₂), puede aumentar la fuerza del fuego.

SECCIÓN V: REACTIVIDAD

-Estabilidad: El ozono no es estable. La polimerización peligrosa no puede ocurrir.

-Incompatibilidades químicas: El ozono es químicamente incompatible con todos los materiales oxidables, tanto orgánicos como inorgánicos.

-Condiciones para evitar: El ozono es inestable a temperaturas ambiente y espontáneamente se descompone en gas de oxígeno. evitar la ignición fuentes tales como calor, chispas y llamas. Mantener lejos de agentes reductores fuertes y materiales combustibles, tales como aceites y grasas.

-Productos de descomposición peligrosos: El ozono se descompone espontáneamente a gas oxígeno, incluso a temperatura ambiente.

SECCIÓN VI: DATOS DE PELIGRO PARA LA SALUD

Carcinogenicidad: El ozono no está listado como carcinógeno por la NTP, IARC, u OSHA.

-Entrada primaria: Inhalación

-Órganos objetivo: Sistema respiratorio, los ojos.

-Resumen de Riesgos: La exposición sin equipo de protección en concentraciones mayores a 0.1 ppm de forma constante y permanente puede reducir la sensibilidad celular y / o aumentar el espesor de la mucosa. La exposición breve a concentraciones de 1-2 ppm sin las precauciones debidas, puede causar dolor de cabeza e irritación en el tracto respiratorio, pero los síntomas disminuyen cuando termina la exposición. Las altas concentraciones de ozono producen irritación severa de los ojos y del tracto respiratorio. -La exposición por encima de los límites de ACGIH / OSHA produce náuseas, dolor en el pecho, tos, fatiga y disminución de la agudeza visual. Se debe evitar completamente la inhalación de ozono por encima a > 20 ppm durante una hora o más. Mayor a 50 ppm durante 1/2 hora puede ocasionar daños muy importantes.

-Efectos agudos: el daño agudo causado por el ozono parece deberse principalmente a su efecto oxidante al contacto con el tejido.

-Condiciones médicas generalmente agravadas por la exposición a largo plazo y en concentraciones mayores a las especificadas: historial de trastornos respiratorios o cardíacos.

-Primeros auxilios: eliminar del ozono que contiene aire, obtener ayuda médica inmediata *, administrar oxígeno si es necesario.

-Contacto con los ojos: levante suavemente los párpados y enjuague los ojos continuamente con cantidades de agua inundadas durante 15 minutos o hasta que sean transportados a un centro médico *.

-Inhalación: retire a la persona expuesta al aire fresco, respire con soporte, administre oxígeno humidificado según sea necesario, obtenga ayuda médica *.

-Ingestión: Muy poco probable ya que el ozono es un gas hasta -169 ° F (-111,6°C).

* OBTENGA ASISTENCIA MÉDICA APROPIADO EN PLANTA, PARAMÉDICO O COMUNITARIO. Obtenga asistencia médica inmediata para recibir más tratamiento, observación y apoyo después de los primeros auxilios.

SECCIÓN VII: PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y USOS

Pasos a seguir en caso de derrame / fuga:

1. Descontinuar la producción
2. Aislar y ventilar el área
3. Notificar inmediatamente al personal
4. Denegar entrada
5. Sigla los reglamentos de OSHA

Disposición: Proporcionar ventilación para diluir y dispersar pequeñas cantidades de ozono (por debajo de OSHA PEL) a la atmósfera exterior. Si cuenta con equipo destructor de ozono, úselo. Seguir las normas locales.

Precauciones de manipulación / almacenamiento: Garantizar la formación personal y los procedimientos de emergencia.

SECCIÓN VIII: MEDIDAS DE CONTROL

-Protección respiratoria: Alto Nivel (> 10 ppm) - equipo autónomo de respiración: MISH / NIOSH.

-Nivel bajo (0,3 - 10 ppm) - Canister Tipo respirador (carbón) debe ser utilizado.

-Protección para los ojos: Use gafas de seguridad químicas si es necesario para trabajar en alto de ozono (> 10 ppm).

BIOPUREZA: División y Esterilización de **Bioagricolas UW tres S.A.** Cédula Jurídica 3-101-447464 San José Costa Rica.
info@biopurezza.com, (506)8566-3113. Piedades de Santa Ana, 75 Sur de Escuela. Frente Plaza deportes Contiguo Papelería Vivi. Código postal 10905, Costa Rica.



-Protección de la piel: Efectos del ozono sobre la piel son mínimas o inexistentes.

-Ventilación: Proporcionar ventilación general y local de escape para diluir y dispersar pequeñas cantidades de ozono en la atmósfera exterior.

Fuente: Biopurezza S.A, 2018.

Anexo 5. Ficha técnica del detergente AlcaKleen utilizado en la embutidora

Figura 13. Ficha técnica de uso del detergente AlcaKleen

AlcaKleen P **KEMICAL®**

Detergente saneador alcalino y clorado

AlcaKleen P es un detergente clorado alcalino de alta espuma recomendado para la limpieza y saneamiento por aspersión de superficies en equipos propios de la industria alimenticia, paredes y pisos.

Para tomar en cuenta...
En la industria alimenticia y lechera las superficies internas y externas de los equipos de procesamiento deben mantenerse limpias y lo más asépticas posible para que exista el mínimo riesgo de contaminación en algún producto.

Usos y Aplicaciones
AlcaKleen P, como parte de la línea de productos de alta tecnología de Kemical, está diseñado para cumplir la función de limpieza de diversos tipos de suciedad en superficies y equipos propios de plantas de la industria alimenticia, tanques, llenadoras, superficies de procesamiento, etc.

Además, es apto para industrias lácteas, de bebidas, cervecerías, procesadoras de carne, pollo y empacadoras, procesadoras de pescado y vegetales.

Sus Características y beneficios

Efectivo desengrase y limpieza
La presencia de un tensoactivo facilita la remoción y disolución de la suciedad (grasa, proteína). Su alta alcalinidad permite una rápida saponificación de las grasas, por lo que no vuelven a depositarse; en este proceso el cloro contribuye con la destrucción de suciedad proteínica.

Gran poder quitamanchas
La presencia de un poderoso tensoactivo y de un compuesto oxidante como el cloro facilita la eliminación de manchas en superficies.

Económico
El ser fácil de enjuagar y requerir de poco o ningún restregado da por resultado un ahorro considerable en el consumo de agua.

También, por su formulación para equipos de aspersión se posibilita la automatización del proceso de limpieza y saneamiento de una planta.

Biodegradable
Todos sus componentes son biodegradables por lo que no afecta el medio ambiente.

Diseñado para limpieza y saneamiento de superficies

Reforzado con cloro para sanear y eliminar manchas

Alto poder bactericida

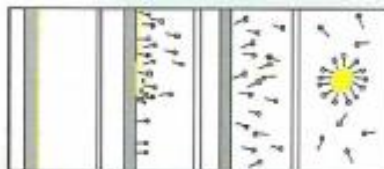
Amigable con el medio ambiente

Rápida remoción de suciedad, incluyendo grasa, azúcares y proteínas

Sencilla aplicación por proyección de espuma o manualmente

¿Cómo actúa?

Este producto contiene un agente tensoactivo especial para esta aplicación. Los agentes tensoactivos son compuestos químicos con una estructura molecular que consiste en una larga cadena no polar, soluble en aceite o grasa (parte hidrofóbica) y una parte polar, soluble en agua (parte hidrofílica). El extremo hidrofílico es suficientemente afín al agua para conferir solubilidad a todo el compuesto.



Cuando la disolución de tensoactivo encuentra una molécula de grasa, los grupos hidrofóbicos se alinean fuera de ésta y la constituyen en el centro de una estructura tipo micela que efectivamente es "puesta en solución". Las gotas de la fase discontinua son mucho más grandes que las micelas. Este efecto solubilizante de los tensoactivos

es la base de su actividad. Como "no desean" estar en la solución acuosa y porque se encuentran, por así decirlo, "más a gusto" en una interfase aceite-agua, son capaces de eliminar y "solubilizar" la suciedad grasosa de la piel, el vidrio, las telas y los metales.

Los tensoactivos normalmente son acompañados con otros aditivos que permiten mejorar su desempeño. AlcaKleen P contiene compuestos que le confieren una elevada alcalinidad que facilita la disolución de las grasas y las descompone en moléculas más pequeñas y fáciles de disolver (saponificación). Además, está fortalecido con cloro que ayuda en la desnaturalización de proteínas y permite eliminar rápidamente depósitos o manchas ocasionadas por estas. El cloro por su alto poder bactericida opera también como un saneador de estas superficies en forma eficiente.

¿Cómo debe ser aplicado?

Concentración recomendada: 2-10%

Paso 1. Enjuagar las superficies que se desean limpiar con agua (preferiblemente entre 40-50°C).

Paso 2. Preparar la disolución del producto a la concentración recomendada.

Paso 3. Aplicar la disolución del producto por medio de proyección de espuma o manualmente.

Paso 4. Dejar actuar el producto por unos 5 minutos.

Paso 5. Enjuagar el producto con agua fría.

¿Qué precauciones tomar?

La manipulación y almacenamiento adecuados del AlcaKleen P minimiza los riesgos para la salud. La hoja de seguridad (MSDS) y la etiqueta del producto proveen de información con respecto a los peligros por exposición, primeros auxilios y correcta disposición del producto.

Presentaciones

Cubeta 19L
Estañón 208 L

Propiedades físicoquímicas

Estado: Líquido
Color: Amarillento a verde claro
Olor: A cloro
Alcalinidad activa(Na2O): 15.3% - 18.7% m/m
Vida útil: 1 año a partir de la fecha de fabricación.

Fuente: Global Kemical, 2016.

Anexo 6. Tabla de los valores de aceptación y rechazo de ATP.

Cuadro 18. Parámetro de aceptación y rechazo para mediciones de ATP.

Parámetros de resultados en Medición ATP				
Área	Análisis	Aceptación	Prevención	Rechazo
Manos	ATP	≤90	N/A	> 90
Superficies acero inoxidable	ATP	≤20	21-60	> 60
Superficies porosas	ATP	≤200	201-300	> 300

Fuente: Hygiena, 2016.

Anexo 7. Ficha técnica de desinfectante amonio cuaternario.

Figura 14. Ficha técnica de uso del desinfectante VX.

VX

KEMICAL

Desinfectante ácido de alto poder

VX es un avanzado agente bactericida de características ácidas para la aplicación en superficies de contacto directo con alimentos.

Para tomar en cuenta...

El uso de un bactericida adecuado es indispensable para mantener condiciones higiénicas en una planta de procesamiento de alimentos. Este bactericida debe contar con un amplio rango de actividad antimicrobiana e idealmente, debiera poseer un prolongado efecto bacteriostático posterior en la zona donde fue aplicado. VX fue creado con estas características para lograr un agente microbicida de características superiores.

Usos y Aplicaciones

VX está recomendado para la desinfección de superficies -en la industria alimentaria- que tengan o no contacto directo con alimentos.

Dentro de las mismas se encuentran:

- Lecherías, cervecerías y plantas de bebidas.
- Plantas procesadoras y empacadoras de carne.
- Plantas procesadoras y empacadoras de leche y productos lácteos.
- Plantas procesadoras y empacadoras de mariscos y vegetales.
- Plantas procesadoras y empacadoras de alimentos.
- Establecimientos de comida.
- Superficies no porosas en contacto con alimentos.

No se debe aplicar en superficies de bronce, aluminio, latón u otros materiales que se puedan corroer en condiciones ácidas.

Sus Características y beneficios

Alto poder bactericida

Su avanzada formulación le da a VX un rápido y excelente efecto microbicida muy superior al de un amonio cuaternario convencional.

Efecto bacteriostático posterior

Su pH permite que los sitios donde se aplicó VX mantengan la acidez necesaria para inhibir cualquier crecimiento microbiológico posterior.

Compatible con ácidos

Con frecuencia el bactericida debe ser aplicado luego de un lavado ácido de equipos, por lo cual es necesario realizar un enjuague antes de aplicarlo. VX es totalmente compatible con residuos de productos ácidos, ahorrando tiempo y reduciendo pasos en el ciclo de trabajo.

Amplio rango de actividad

VX es efectivo en la eliminación de bacterias gram-positivas y gram-negativas, hongos, levaduras y virus. También destruye patógenos como E.coli y Listeria monocytogenes.

Amonios cuaternarios de avanzada

Dosis bajas

Ideal para industrias alimenticias

**No es
desactivado por
aguas duras**

¿Cómo actúa?

VX contiene compuestos de amonio cuaternario que son atraídos al revestimiento proteínico de la pared celular de los microbios, afectándola y liberando los grupos que contienen nitrógeno y fósforo dentro de la célula. Esta acción se presenta de manera rápida y selectiva.

¿Cómo debe ser aplicado?

Aprobado por Food and Drug Administration (FDA)

Aprobados para aplicación en superficies de contacto directo con alimentos en un intervalo aceptable de 150-400 ppm (0.25 - 0.62%) seguido de un adecuado drenaje; según 21 CFR 178.1010 del 1 Abril del 2008, (b)(32), (e) (27).

Dosis: 0.25 - 0.82%

Para aplicación manual disuelva la dosis indicada de VX en agua limpia y aplíquelo, dejando el producto en contacto con la superficie durante al menos 3 minutos.

Para aplicación con dosificador automático:

Paso 1. Luego del lavado y enjuague rocíe las superficies de forma abundante con VX.

Paso 2. Deje en contacto con la superficie durante al menos 3 minutos.

**Amplio espectro
bacteriano**

En cualquiera de los casos descritos, si la dosis es superior al 0.65% se debe enjuagar luego de su aplicación.

¿Qué precauciones tomar?

La manipulación y almacenamiento adecuados del VX minimizan los riesgos para la salud. La hoja de seguridad (MSDS) y la etiqueta del producto proveen información con respecto a los peligros por exposición, primeros auxilios y correcta disposición del producto.

**No requiere
enjuague
posterior**

Equipo de protección personal

VX concentrado y sus disoluciones son irritantes para los tejidos. Cuando lo manipule siga las instrucciones que se presentan en la hoja de seguridad (MSDS).

Presentaciones

Galon (3.785)
Cubeta (19 L)
Estación (208 L)

Propiedades físicoquímicas

Estado: Líquido
Color: Azul
Olor: Característico
Densidad (a 20 °C): 1.03 - 1.06 g/mL
pH 1 %: 2.2 - 2.60
Vida útil: 2 años a partir de la fecha de fabricación.

Anexo 8. Tabla con los resultados de los análisis realizados posterior a la aplicación de ozono.

Cuadro 19. Resultados de los análisis realizados antes y después de la aplicación de ozono a 1 minutos, 3 minutos y 5 minutos.

Informes de Laboratorio, resultados oficiales

# Muestra	Informe	Sección del piso R	Resultado
1	N°18-30230	Sección A (antes)	Presente
2	N°18-30231	Sección A (antes)	Presente
3	N°18-30232	Sección A (antes)	Presente
4	N°18-30233	Sección B (antes)	Presente
5	N°18-30234	Sección B (antes)	Presente
6	N°18-30235	Sección B (antes)	Presente
7	N°18-30236	Sección C (antes)	Presente
8	N°18-30237	Sección C (antes)	Presente
9	N°18-30238	Sección C (antes)	Presente
10	N°18-26084	Sección A después de ozono 1 minuto	Presente
11	N°18-26085	Sección A después de ozono 1 minuto	Presente
12	N°18-26086	Sección A después de ozono 1 minuto	Presente
13	N°18-26087	Sección B después de ozono 3 minutos	Presente
14	N°18-26088	Sección B después de ozono 3 minutos	Presente
15	N°18-26089	Sección B después de ozono 3 minutos	Presente
16	N°18-26090	Sección C después de ozono 5 minutos	Ausente
17	N°18-26091	Sección C después de ozono 5 minutos	Ausente
18	N°18-26092	Sección C después de ozono 5 minutos	Ausente

Fuente: elaboración propia según datos experimentales obtenidos en embudidora, Costa Rica.

Anexo 9. Tabla de resultados de laboratorio obtenidos después del lavado del piso.

Cuadro 20. Resultados de análisis de *Listeria spp.* posterior al lavado del piso.

Informes de Laboratorio, resultados oficiales

Muestras en piso R toma realizada posterior al lavado

# muestra	Informe	Resultado
1	N°18-26093	Presente
2	N°18-26094	Presente
3	N°18-26095	Presente
4	N°18-26096	Presente
5	N°18-26097	Presente
6	N°18-26098	Ausente
7	N°18-26084	Presente
8	N°18-26085	Presente
9	N°18-26086	Presente
10	N°18-26087	Presente
11	N°18-26088	Presente
12	N°18-26089	Presente
13	N°18-26090	Presente
14	N°18-26091	Presente
15	N°18-26092	Presente
16	N°18-26099	Presente
17	N°18-26111	Presente
18	N°18-26112	Presente
19	N°18-26113	Presente
20	N°18-26125	Presente
21	N°18-26126	Presente
22	N°18-26127	Presente
23	N°18-26138	Presente
24	N°18-26139	Presente
25	N°18-26140	Presente
26	N°18-26141	Presente
27	N°18-26153	Presente
28	N°18-26154	Presente

Fuente: elaboración propia según datos experimentales obtenidos en embutidora, Costa Rica.

Anexo 10. Tabla de resultados de laboratorio obtenidos después de la desinfección con ozono.

Cuadro 21. Resultados de los análisis de *Listeria spp.* posterior a la desinfección con ozono.

Informes de Laboratorio, resultados oficiales

Muestreos en piso R toma realizada posterior a la desinfección con ozono		
# muestra	Informe	Resultado
1	N°18-26107	Ausente
2	N°18-26100	Ausente
3	N°18-26101	Ausente
4	N°18-26102	Ausente
5	N°18-26103	Ausente
6	N°18-26104	Ausente
7	N°18-26105	Ausente
8	N°18-26114	Ausente
9	N°18-26115	Ausente
10	N°18-26116	Ausente
11	N°18-26117	Ausente
12	N°18-26118	Ausente
13	N°18-26119	Ausente
14	N°18-26120	Ausente
15	N°18-26121	Ausente
16	N°18-26122	Ausente
17	N°18-26123	Ausente
18	N°18-26124	Ausente
19	N°18-26130	Ausente
20	N°18-26131	Ausente
21	N°18-26132	Ausente
22	N°18-26133	Ausente
23	N°18-26142	Ausente
24	N°18-26143	Ausente
25	N°18-26144	Ausente
26	N°18-26145	Ausente
27	N°18-26155	Ausente
28	N°18-26156	Ausente

Fuente: elaboración propia según datos experimentales obtenidos en embutidora, Costa Rica.

Señores directores
Carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos
Universidad Técnica Nacional

Por este medio hago constar que revisé el documento "EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE OZONO EN PISOS PARA LA ELIMINACIÓN DE LISTERIA SPP EN UNA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS" de las graduandas: Diana Chacón Barrantes, Marianeia Ramírez Richmond y María Fernanda Sánchez Picado, en cuanto a redacción, ortografía, referencias bibliográficas y bibliografía. Se le hicieron las observaciones pertinentes para mejor comprensión de la información consignada.

Dado, en la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, el 26 de setiembre 2018, a las 10 horas.


M. Ev. Ed. Marta Eugenia Picado Melón

Profesora Catedrática, jubilada
Universidad de Costa Rica

**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA USO Y MANEJO DE LOS TRABAJOS FINALES DE
GRADUACIÓN
UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL**

Alajuela, Costa Rica

Viernes 28 de Setiembre del 2018

Señores
Vicerrectoría de Investigación
Sistema Integrado de Bibliotecas y Recursos Digitales

Estimados señores:

Nombre de sustentantes	Cédula
Diana Chacón Barrantes	114-560166
Mariela Ramírez Richmond	2069-30796
María Fernanda Sánchez Picado	114-820117

Nosotros en calidad de autores del trabajo de graduación titulado:

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE OZONO EN PISOS PARA LA ELIMINACIÓN DE
LISTERIA SPP EN UNA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS.

El cual se presenta bajo la modalidad de:

☐ Seminario de Graduación

☒ Proyecto de Graduación

☐ Tesis de Graduación

Presentado en la fecha 07/09/2018, autorizamos a la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, para que nuestro trabajo pueda ser manejado de la siguiente manera:

Autorizamos	SI	No
Conservación de ejemplares para préstamo y consulta física en biblioteca	x	
Inclusión en el catálogo digital del SIBIREDI (Cita catalográfica)	x	
Comunicación y divulgación a través del Repositorio Institucional	x	
Resumen (Describe en forma breve el contenido del documento)	x	
Consulta electrónica con texto protegido	x	
Descarga electrónica del documento en texto completo protegido	x	
Inclusión en bases de datos y sitios web que se encuentren en convenio con la Universidad Técnica Nacional contando con las mismas condiciones y limitaciones aquí establecidas.	x	

Por otra parte declaramos que el trabajo que aquí presentamos es de plena autoría, es un esfuerzo realizado de forma conjunta, académica e intelectual con plenos elementos de originalidad y creatividad. Garantizamos que no contiene citas, ni transcripciones de forma indebida que puedan devenir en plagio, pues se ha utilizado la normativa vigente de la American Psychological Association (APA). Las citas y transcripciones utilizadas se realizan en el marco de respeto a las obras de terceros. La responsabilidad directa en el diseño y presentación son de competencia exclusiva, por tanto, eximo de toda responsabilidad a la Universidad Técnica Nacional.

Conscientes de que las autorizaciones no reprimen nuestros derechos patrimoniales como autores del trabajo. Confiamos en que la Universidad Técnica Nacional respete y haga respetar nuestros derechos de propiedad intelectual.

Nombre del estudiante	Cédula	Firma
Diana Chacón Barrantes	114-560166	<i>Diana Chacón B.</i>
Marianela Ramírez Richmond	206-930796	<i>Marianela R.</i>
María Fernanda Sánchez Picado	114-820117	<i>María Fernanda Sánchez</i>

Día: viernes 28 de Setiembre del 2018.