



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de
la Producción**

**“Efecto del Agua Activada por Plasma frío en la
descontaminación de material de empaque en el llenado
aséptico”**

PROYECTO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

**MAGÍSTER EN GESTIÓN DE PROCESOS Y SEGURIDAD
DE LOS ALIMENTOS**

Presentado por:

**Adriana Bárbara Alvarado Avilés
Christian Gabriel Montesel Pastuzo**

GUAYAQUIL – ECUADOR

SEPTIEMBRE 2021

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer en primer lugar a Dios por ser la fortaleza y brindarnos perseverancia para alcanzar nuestras metas.

Agradecemos de manera especial a la Dra. Ximena Yépez, directora de este trabajo de investigación, por brindarnos su paciencia, apoyo e invaluable guía durante todo este trabajo de titulación.

Al Dr. Patricio Cáceres, por su apoyo, gestión y guía durante la realización de este proyecto.

A la M. Sc Andrea Ortega, por su ayuda incondicional durante el desarrollo práctico, por su predisposición y sabios consejos aportados cuando más lo necesitamos.

DEDICATORIA 1

Quiero agradecer a Dios por haberme dado a través de mi familia fuerzas, paciencia y dedicación para terminar este logro tan importante en mi vida profesional.

Agradecer a mis padres por formarme y sembrar en mí, valores y sus consejos que, nunca faltaron. Por motivarme siempre a seguir adelante, aunque tenga un sin número de obstáculos delante de mí y poder alcanzar mis metas.

A mi esposo Fabricio y a mi pequeña hija Isabella, mi mayor bendición y que algún día vas a poder leer estas líneas y podrás sentir la felicidad que ahora siento, quiero decirles que son los pilares fundamentales y principal motivación para seguir adelante, son los que estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional.

Adriana

DEDICATORIA 2

Dedicado a:

"Mis padres: Luis y Liliana, por su amor, trabajo y sacrificio, gracias a ustedes he logrado llegar hasta donde estoy y convertirme en lo que soy. Es un honor ser su hijo, son los mejores". Los adoro.

"Mi esposa: Fernanda, un día decidiste acompañarme y escribir esta historia, tu apoyo ha sido fundamental, has estado junto a mí, incluso en los momentos más difíciles. Estoy muy agradecido por compartir este amor con una persona tan maravillosa". Te amo.

"A mi hijo: Thomas, en este instante no entenderás mis palabras, pero cuando seas capaz quiero que recuerdes lo que significas para mí, eres la razón de mi alegría, mi principal motivación, mi orgullo y mi esperanza". Te quiero

Gabriel

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dra. Ximena Yépez P.
DIRECTORA DE PROYECTO

Dr. Patricio Cáceres C.
VOCAL

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de titulación, nos corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

Adriana Bárbara Alvarado Avilés

Christian Gabriel Montesel Pastuzo

RESUMEN

Los procedimientos tradicionales de desinfección en materiales de empaque para alimentos procesados presentan inconvenientes como corrosión del material, residuos de desinfectantes, e incluso fallas del operador o equipo. Es de gran importancia la correcta sanitización, debido a que el material de empaque se encuentra en contacto directo con los alimentos y esto representa un gran desafío a nivel de la industria alimentaria.

Los envases de llenado aséptico están expuestos a distintos tipos de microorganismos durante su elaboración, almacenamiento y transporte. La contaminación cruzada proveniente del empaque puede provocar deterioro del producto y posterior daño a la salud del consumidor, además puede generar problemas a nivel de la industria alimentaria, debido a que los empaques se encuentran en contacto directo con el alimento que ha sido esterilizado previo a la etapa de envasado. Comúnmente se utiliza sustancias químicas para la desinfección del material de empaque, como es el peróxido de hidrogeno u otros.

El agua activada por plasma frío atmosférico (PAW) se muestra como una tecnología emergente de desinfección efectiva para alimentos y superficies en contacto con alimentos. Estudios científicos han mostrado su eficacia con un gran poder de desinfección, la misma que se basa en tratar el PAW para lograr formar un ambiente ácido que induce a cambios en el potencial redox, en la conductividad y en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

El objetivo de este trabajo de titulación es determinar el efecto del PAW en la descontaminación de material de empaque en el llenado aséptico. Para esto se realizó la caracterización del PAW mediante la determinación de pH, conductividad y contenido de peróxidos y nitritos. A continuación, se evaluó el efecto de la aplicación del PAW en el control microbiológico de superficies de material de empaque y, por último, se comparó la eficacia y la utilidad de esta como método alternativo en los procesos habituales de desinfección.

Los resultados sugieren que al realizar el tratamiento con PAW sobre superficies de empaques inoculados con *E. coli* existe una reducción de más de 4 log₁₀ de UFC/mL en relación con la muestra control. Al realizar el mismo procedimiento en condiciones similares con cepas de *S. aureus* se obtiene una reducción de 1.58 log₁₀. de UFC/mL, con relación a la muestra control, sin embargo, a una temperatura de 50°C se logró una reducción de más de 5 log₁₀. de UFC/mL. Estos resultados demuestran que el PAW puede ser empleado como desinfectante eficaz para la descontaminación de material de empaque en contacto con alimentos. Adicionalmente, tiene la ventaja de ser amigable con el medio ambiente, esta estrategia de descontaminación puede ser aplicable con distintos tipos de materiales. Es necesario más estudios para una posible aplicación a nivel industrial alimentario, en donde se debe considerar volúmenes de producción.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN..... | I |
| ÍNDICE GENERAL..... | II |
| ABREVIATURAS | IV |
| SIMBOLOGIA | V |
| INDICE DE FIGURAS | VI |
| INDICE DE TABLAS | VII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO 1 | 2 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 2 |
| 1.1 Antecedentes | 2 |
| 1.2 Objetivos del trabajo de titulación | 2 |
| 1.2.1 Objetivo general..... | 2 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 2 |
| 1.3 Hipótesis | 2 |
| 1.4 Justificación del estudio..... | 3 |
| CAPÍTULO 2 | 4 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Envases asépticos | 4 |
| 2.1.1 Ventajas de los envases asépticos | 4 |
| 2.1.2 Materiales empleados para el embalaje de alimentos asépticamente procesados. | 5 |
| 2.1.3 Características de los envases Multicapa | 5 |
| 2.2 Envasado aséptico | 6 |
| 2.2.1 Funciones de envasado Aséptico | 7 |
| 2.2.2 Técnicas de Envasado Aséptico | 7 |
| 2.2.3 Empresa de envases asépticos | 8 |
| 2.2.4 Métodos de descontaminación de empaques en la industria | 8 |
| 2.2.5 Peróxido de hidrógeno | 9 |
| 2.2.6 Casos de alimentos con Peróxido de Hidrógeno..... | 9 |
| 2.3 Problemas de integridad del empaque | 10 |
| 2.4 Microorganismos en superficies en contacto con los alimentos..... | 10 |
| 2.4.1 Microorganismos Aerobios mesófilos..... | 11 |
| 2.4.2 Microorganismos Coliformes..... | 11 |

| | |
|--|----|
| 2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)..... | 11 |
| 2.5 Agua activada con la tecnología de plasma frío atmosférico..... | 11 |
| 2.5.1 Generación de PAW | 12 |
| 2.5.2 Sistemas de plasma frío..... | 12 |
| 2.5.3 Propiedades químicas del PAW | 13 |
| 2.5.4 Propiedades físicas del PAW | 13 |
| 2.5.5. Mecanismo de Inactivación Microbiana con PAW | 14 |
| 2.5.6 Aplicación del agua activada por plasma frío..... | 14 |
| CAPITULO 3..... | 18 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Fuente de plasma frío..... | 18 |
| 3.2 Determinación de pH y conductividad en el PAW | 18 |
| 3.3 Determinación de nitritos en el PAW | 19 |
| 3.4 Determinación de peróxido en el PAW..... | 19 |
| 3.5 Cepas bacterianas | 19 |
| 3.6 Preparación de la muestra | 19 |
| 3.7 Reactivación celular | 20 |
| 3.8 Inoculación superficial, tratamiento PAW y recuperación | 20 |
| 3.9 Análisis estadístico..... | 20 |
| 4. RESULTADOS..... | 21 |
| 4.1 Características fisicoquímicas del PAW | 21 |
| 4.2 Efecto del PAW en la descontaminación de <i>E. coli</i> y <i>S. Aureus</i> | 21 |
| 4.3 Efecto del PAW sobre el empaque de envasado..... | 24 |
| CAPÍTULO 5..... | 25 |
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 25 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 26 |
| ANEXOS..... | 30 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ARCSA | Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria |
| ANVISA | Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria |
| DBD | Descarga de barrera dieléctrica, |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ETAS | Enfermedades transmitidas por alimentos |
| HVACP | Plasma frío atmosférico de alto voltaje |
| INMIVA | Vigilancia de Medicamentos y Alimentos Colombia |
| NED | Sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1-natiletildiamina |
| ORP | potencial de oxidación-reducción |
| PAW | Agua Activada con Plasma frío |
| PEBD | Polietileno de baja densidad |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RONs | Oxígeno altamente reactivas |
| RNS | Especies reactivas nitrógeno |
| <i>S. Aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Staph</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| TSA | El Agar Triptona-Soja |
| TSB | Caldo Triptona-Soja |
| UFC | Unidad formadora de colonias |
| UHT | Ultra pasteurizada |
| UV | Ultravioleta |

SIMBOLOGIA

| | |
|-------------------------------|---|
| Ar | Argón |
| °C | Grados Centígrados |
| cc/m ² /día | Centímetro cúbico/ metro cuadrado por día |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrógeno |
| He | Helio |
| kV | kilo voltios |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| N ₂ | Nitrógeno |
| NO ²⁻ | Nitrito |
| NO ³⁻ | Nitrato |
| O ₂ | Oxígeno |
| O ²⁻ | Superóxidos |
| O ³ | Ozono |
| OH- | Hidroxilo |
| µL | Microlitros |
| µM | Micromoles |

INDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| FIGURA 2.1 Capas de envase..... | 6 |
| FIGURA 2.2 Bobina de elaboración de envases tetra pack..... | 7 |
| FIGURA 3.3 Equipo usado para la activación del agua..... | 18 |
| FIGURA 3.4 Potenciómetro y conductímetro..... | 18 |
| FIGURA 4.5 Comparación de la inactivación de <i>E. coli</i> en PAW Y H ₂ O ₂ | 22 |
| FIGURA 4.6 Comparación de la inactivación de <i>S. aureus</i> en PAW y H ₂ O ₂ | 22 |
| FIGURA 4.7 Tratamiento por PAW sobre <i>S. aureus</i> | 23 |

INDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1 Sistemas de plasma frío para la activación del PAW..... | 12 |
| Tabla 2 Propiedades físicas y químicas destacadas de estudios realizados del PAW | 14 |
| Tabla 3 Resumen de estudios realizados y resultados de la inactivación de microorganismos a usar con PAW | 16 |
| Tabla 4 Caracterización del agua activada por plasma frío a usar en la experimentación | 21 |
| Tabla 5 Desviación estándar de las muestras de <i>E. coli</i> - Ajuste para comparaciones múltiples – medias de mínimos cuadrados Tukey | 31 |
| Tabla 6 Medias de mínimos cuadrados para el efecto tipo de tratamiento, temperatura, tipo de muestra para la hipótesis <i>E. coli</i> | 32 |
| Tabla 7 Desviación estándar de las muestras <i>S. aureus</i> . - Ajuste para comparaciones múltiples – medias de mínimos cuadrados Tukey | 33 |
| Tabla 8 Medias de mínimos cuadrados para el efecto tipo de tratamiento, temperatura, tipo de muestra para la hipótesis <i>S. aureus</i> | 34 |

INTRODUCCIÓN

El empaque aséptico es una parte integral de todas las industrias procesadoras de alimentos líquidos de larga vida útil. Consta de dos partes fundamentales, en la primera parte del proceso de envasado, la zona aséptica suele comenzar desde el extremo del tubo de retención hasta la sección de refrigeración, es decir el tanque aséptico, la llenadora y otras superficies en línea, equipos y piezas. En la segunda parte el envase, la zona aséptica empieza en el punto en el que el material de envasado ya esterilizado entra en contacto con la máquina de envasado, así como las secciones de llenado, sellado y otras superficies por ejemplo cintas, transportadores, sopladores, etc. (Nelson, 2010), las funciones principales del empaque aséptico son garantizar la seguridad del producto procesado, mejorar su vida útil, asegurar la calidad y mantener las características organolépticas propias del alimento.

Los empaques asépticos además de proporcionar contención, protección y conservación también brindan información adecuada hacia el consumidor sobre su contenido de ingredientes e incluso su manejo adecuado después de su consumo, de igual forma es evidente que cada tipo de alimento es susceptible a factores medioambientales como el oxígeno, luz, humedad, microorganismos, entre otros que de varias maneras pueden afectar las características propias del producto. (López & Zapata, 2010).

El agua activada por plasma frío atmosférico (PAW), se obtiene básicamente al reaccionar el agua con un gas y corriente, formando un agente biosida de amplio espectro, cuya actividad química y bioquímica se da por la formación de especies de nitrógeno y oxígeno altamente reactivas (RONS). Esta característica le proporciona al PAW la capacidad de emplearse como un agente desinfectante.

En la actualidad debido al aumento de la resistencia microbiana a métodos tradicionales de limpieza y sanitización ha provocado la búsqueda de nuevos tratamientos de desinfección, mismos que sean eficaces, efectivos y, además se presenten de manera amigable con el medio ambiente. (Zhou et al., 2018, 20).

En este estudio se busca demostrar el potencial de desinfección para la inactivación de microorganismos con el empleo del PAW, sobre las superficies de envases asépticos mismos que se encuentran en contacto directo con los alimentos procesados.

CAPÍTULO 1

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Antecedentes

En la industria alimentaria los envases asépticos son de vital importancia ya que se encuentran en contacto directo con los alimentos, además, sirven para preservar las características propias del producto, por esta razón es necesario la correcta limpieza y desinfección de los empaques con la finalidad de evitar complicaciones hacia el consumidor.

Los métodos que habitualmente se emplean para desinfectar son: procesos físicos, químicos y combinados. El proceso químico más usado es la aplicación de una solución concentrada de peróxido de hidrógeno, mismo que sin un control adecuado pueden alterar en la salud tanto de los operadores del proceso como del consumidor además, este tipo de sustancias suele generar una cantidad mayor de residuos afectando el medio ambiente. En la actualidad se han desarrollado nuevos métodos de descontaminación, entre ellos se presenta la técnica de desinfección usando agua activada por plasma frío atmosférico la cual brinda grandes beneficios y menor impacto ambiental reduciendo los niveles de la huella de carbono. Esta metodología emergente no térmica se encuentra en desarrollo con varios estudios que validan la eficacia, efectividad y sus múltiples aplicaciones con amplios beneficios en la industria alimentaria.

1.2 Objetivos del trabajo de titulación

1.2.1 Objetivo general

Determinar el efecto del agua activada por plasma frío atmosférico en la descontaminación de material de empaque en el llenado aséptico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el agua activada por plasma frío atmosférico (PAW).
- Evaluar el efecto de la aplicación del PAW en el control microbiológico de superficies de material de empaque.
- Comparar la eficacia y la utilidad del PAW como método alternativo en los procesos habituales de desinfección.

1.3 Hipótesis

El PAW presenta efectos antimicrobianos que pueden reemplazar el uso de químicos empleados actualmente en la industria alimentaria para la desinfección de empaques asépticos.

1.4 Justificación del estudio

Este proyecto de titulación tiene como finalidad determinar el efecto de desinfección del agua activada por plasma frío (PAW) sobre una superficie que se encuentre en contacto directo con el alimento. Este proceso de desinfección se realiza habitualmente mediante la exposición de una solución de peróxido de hidrogeno sobre la superficie del material de empaque. El consumo de productos químicos es cuestionado en la actualidad, debido al efecto que tiene sobre el medio ambiente y los residuos que los mismos pueden generar. Durante este estudio se realizará una comparación de la eficacia y utilidad del PAW, como método alternativo en los procesos habituales de desinfección.

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Envases asépticos

La invención de los envases asépticos se presentó a finales de los años veinte, pero no recibió la acogida esperada debido principalmente a altos costos de proceso y poca rentabilidad que representaba para la época. (Gadman, 2004, 24-32). Sin embargo, durante los años siguientes, la tecnología mejoró y con ello se desarrollaron envases asépticos de tamaño y precio adecuado para venta al consumidor, logrando ganar mercado principalmente en toda la industria lechera de Europa a finales de 1960, ya que en ese entonces no se tenía la capacidad de refrigeración para transportar la leche de los centros rurales a las distribuidoras urbanas con el fin de llegar al consumidor final y la respuesta llegó en forma de envases de cartón, conocidos como tetrabrik llamados así por su particular forma similar a la de un bloque de construcción. (Cervera, 2003, 123-126)

El envasado aséptico se puede especificar como el llenado en condiciones inocuas de un producto comercialmente estéril, en contenedores con sellado hermético con el fin de evitar la re-contaminación del producto final. Este proceso se emplea frecuentemente para alimentos y bebidas con alto grado de sensibilidad al calor o aquellos que presentan una elevada calidad nutricional, con la finalidad de obtener un producto con óptimas cualidades sensoriales y una mayor retención de nutrientes. (Alborch, 2013)

La principal limitación del envasado aséptico es su alto grado en inversión de equipos e instalaciones ya que los mismos deben estar a la vanguardia con los avances en tecnología, pero no se puede ignorar sus varias ventajas en la reducción de costes y aumento de la calidad del producto. Por lo tanto, el envasado aséptico es una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más relevantes y con mayor ámbito de aplicación potencial, además de tener varios beneficios sobre los métodos tradicionales ya que aseguran una larga vida útil a temperatura ambiente de un producto procesado y por ende no se necesita un estado de refrigeración posterior, además, son envases fáciles de manipular y almacenar lo que ahorra espacio y tiempo, gracias a ello han logrado ganar gran renombre a nivel mundial ocupando gran parte de los mercados que hoy se conoce. (Cervera, 2003, 123-126)

2.1.1 Ventajas de los envases asépticos

Dentro de las ventajas se puede mencionar:

1. Mejorar la calidad del producto:

El envasado aséptico permite ajustar el tratamiento térmico a las condiciones reales requeridas para el producto, reduciendo así el tiempo de procesamiento. Además, se evita los cambios físicos y químicos de textura, color y sabor, así como la pérdida de nutrientes y evita la formación de compuestos no deseados de tipo volátiles. (Ainia, 2012)

2. Productos más naturales:

No es necesario añadir ningún compuesto químico que pueda mejorar la vida útil del producto y esto se logra evitando la contaminación microbiana dentro del medio ambiente del envase. (Arapack, 2017)

3. Envases menos exigentes:

Los envases no necesitan calentar para esterilizar, por tanto, no tendrán que soportar altas temperaturas. También se requiere tener menos requisitos estructurales y mecánicos para su elaboración. (Enguix et al., 2010)

4. Reducir el impacto ambiental y el costo:

El empaque aséptico tiene un menor impacto de huella de carbono debido a su bajo consumo de electricidad y agua en la producción. A largo plazo, los beneficios económicos del envasado aséptico son mayores. (Envastick, 2018)

2.1.2 Materiales empleados para el embalaje de alimentos asépticamente procesados.

Los materiales como el vidrio y metal fueron ampliamente usados de forma tradicional para el envasado de productos térmicamente procesados sin embargo, presentaban múltiples inconvenientes para el consumidor. Es por ese motivo que existió un cambio en la tendencia hacia el uso de plásticos que en combinación con papel o aluminio mejoran las características de resistencia y protección del producto procesado, además, estos materiales son de fácil adquisición, proporcionan una reducción importante en los costos de embalaje, transporte y procesamiento sin mencionar que se requieren cinco veces menos energía para su producción, en comparación con los envases de metal o de vidrio. (Floros, 1993, 120).

Los distintos elementos empleados proporcionan características propias a los empaques herméticos y esto se debe a las láminas de aluminio mismas que brindan excelentes propiedades de barrera hacia los gases, aromas y a la luz, mientras que el cartón ofrece una superficie de fácil impresión, con propiedades mecánicas de resistencia y rigidez, en cuanto a los diferentes tipos de plástico usados mismos que permiten conseguir un sellado firme formando un envase hermético. Nelson en 2010 menciona que los envases asépticos presentan en su forma plana una tasa de transmisión de oxígeno de aproximadamente 30-40 cc/m²/día, pero cuando se arruga, se raya o se maltrata la tasa de transmisión aumenta a 1500-2000 cc/m²/día y esto se puede presentar debido a los cambios provocados por el procesamiento del envase, distribución, manipulación e incluso en su mal almacenamiento en anaquel. (Nelson, 2010, 135).

Entre los métodos usados para la elaboración del material de envase se encuentra el conocido termoformado, este sistema puede usarse en una línea de producción con una velocidad muy alta ya que la misma minimiza el espacio de almacenamiento necesario para el material de envasado entrante mediante la alimentación rollo a rollo y también da la posibilidad de formar paquetes de varias unidades ahorrando espacio y minimizando costos. (Envapack, 2021, 2)

2.1.3 Características de los envases Multicapa

Los envases multicapa se presentan en una disposición establecida por seis o siete capas de sus distintos materiales (Figura 2.1)

Estas capas son:

- 1) Membrana de polietileno de baja densidad: la cual resguarda e impermeabiliza de la humedad externa, representa el 15% - 20% del peso total del envase.
- 2) Cartón: proporciona y mantiene la forma propia de cada envase, representa cerca del 75% - 80%.

- 3) Polietileno 1: el cual permite la integración del cartón y el material de aluminio, proporcionando un sellado hermético.
- 4) Aluminio: representa un máximo del 5%, se considera la capa más importante ya que evita la entrada de luz, oxígeno y microorganismos, garantizando así la protección del producto conservando sus nutrientes y vitaminas
- 5) Polietileno 2: mejora la adhesión del aluminio y evita el contacto con los alimentos.
- 6) Polietileno 3: evita el contacto del producto con las otras capas del envase (Tetra Pak, 2020).

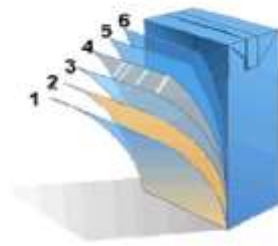


FIGURA 2.1 Capas de envase. (Fuente: Envapack, 2021, 2)

En la elaboración de un envase multicapa de un litro se necesita 20g de papel, 5.7g de polietileno y 1.5 g de aluminio. (Consejo Colombiano de Construcción Sostenible, 2015).

2.2 Envasado aséptico

El envasado aséptico consiste en un procedimiento de carácter continuo en donde los productos se deben esterilizar antes de empacarlos y luego colocarlos en envases previamente desinfectados de manera aséptica, evitando la re-contaminación. (Muller, 1990, 59). Esta técnica se basa en tres sistemas constantes que al combinarse dan lugar al envasado aséptico, el primero se trata de un sistema de esterilización y enfriamiento del alimento fuera del envase, el segundo de un sistema de esterilización por separado del envase y tercero de un sistema de llenado y cerrado del envase aséptico con el alimento estéril. (Rees & Bettison, 1994, 81). El propósito del envase es conservar, proteger y contener los alimentos, además de servir e informar al consumidor, también facilita la venta del producto, almacenamiento, su empleo e incluso su manera de proceder después de su utilización.

Los envases para el envasado aséptico se presentan en forma de bobinas compactas ver figura 2.2 para facilitar su transporte y almacenamiento las cuales contienen impresos varios envases en secuencia con un aproximado de 8000 envases de un litro, la forma del envase se crea directamente a partir de la bobina reduciendo costos durante el proceso. (Tetra Pak, 2008)



FIGURA 2.2 Bobina de elaboración de envases tetra pack (Fuente: Tetra Pack, 2021).

2.2.1 Funciones de envasado Aséptico

Durante el proceso del envasado aséptico, el cual comprende el envío del producto tratado por distintos procesos de esterilización a envases en un ambiente aséptico lo cual proporciona una disminución del proceso de deterioro del alimento además limita considerablemente el uso de aditivos. (Sanz, 2019, 16-20)

Cumpliendo las siguientes funciones:

- Preservar y prolongar la vida útil de los alimentos procesados.
- Proteger de los procesos físicos y químicos. (humedad)
- Facilitar un medio en el cual los clientes se informen del producto.
- Mantener el aspecto, forma, viscosidad entre otros factores propios del alimento.
- Impedir la pérdida de aroma y sabor.
- Cuidar la calidad nutricional del producto. (Medrano, 2012, 20-25)

2.2.2 Técnicas de Envasado Aséptico

Las técnicas de envasado han mejorado con el pasar de los años, pero conservan su función principal la cual es preservar el producto procesado manteniendo sus condiciones y características propias. Entre estas técnicas se puede enlistar las siguientes:

- Tradicional: En esta técnica se realiza mediante tratamientos por calor evitando posibles contaminaciones cruzadas con otros alimentos, operadores o el medio ambiente.
- Al vacío: Esta técnica consiste en la expulsión del aire que circula dentro del alimento, provocando una restricción en la degradación del producto y dificultando el crecimiento de microorganismos.
- Atmósferas controladas: Esta técnica se caracteriza porque el alimento se encuentra rodeado por una atmósfera de nitrógeno y dióxido de carbono, la misma que es constante y controlada a lo largo del tiempo garantizando el producto y sus condiciones.
- Atmósferas modificadas: En esta técnica se sustituye el aire que se encuentra en contacto con el alimento por un gas o una mezcla de gases, en diferentes porciones, los cuales se regulan al envasar el producto para mantener la calidad de los alimentos. (López & Zapata, 2010)

2.2.3 Empresa de envases asépticos

Tetra Pak es una empresa establecida a nivel mundial que, desde sus inicios en los años 50, brinda soluciones en el procesamiento y envasado de alimentos procesados a grado industrial, proporcionando principalmente material y equipo para el envasado tipo Tetra Pak. El producto más conocido a nivel empresarial es el Tetra brik, que se compone por la superposición de capas de aluminio, cartón y polietileno (Tetra Pak, 2008).

Las diferentes capas de los envases han permitido la expansión progresiva de múltiples empresas a nivel mundial. Sus ventajas son: bajo peso, fácil transporte y almacenaje, además brinda protección y conservación al producto final. Actualmente solo en Europa existe un promedio de cien mil millones de litros envasados con varios tipos de productos como: lácteos, vinos, salsas, aceites, zumos, entre otros. (Envapack, 2019, 1). En 2018 se vendieron en Ecuador 7.500 toneladas de contenedores Tetra Pak, de estos, el 29% (2.200 toneladas) se reciclan para producir diversos productos. (El Universo, 2019).

2.2.4 Métodos de descontaminación de empaques en la industria

El empaque que se encuentra en contacto directo con el alimento debe ser previamente esterilizado, con la finalidad de eliminar microorganismos del material, este proceso se clasifican en 3 grupos:

- Procesos físicos: mismos que se realizan mediante técnicas mecánicas, térmicos y de irradiación.
- Procesos químicos: los cuales emplean sustancias como peróxido de hidrógeno, ácido peracético, hipoclorito de Sodio u otras sustancias.
- Combinados: proceso en los cuales se puede emplear peróxido de hidrógeno y calor; Peróxido de hidrógeno y UV; u otras combinaciones.

2.2.4.1 Procesos Físicos

Dentro de los procesos físicos tenemos los mecánicos que son limpiezas en las que se aplica acción mecánica, es decir el uso de un cepillo y agua a presión sobre las superficies de uso cotidiano con la finalidad de retirar o desprender restos de tipo orgánicos, microorganismos, etc., su uso ayuda a disminuir la carga microbiana más no destruye ni elimina por completo los microorganismos presentes en sobre las superficies.

Dentro de este grupo también se encuentran los procesos térmicos, que incluye vapor saturado, vapor seco, vapor sobrecalentado, o una mezcla de estos vapores en el que usan temperaturas mayores a 100°C, con el que se esterilizan botellas de vidrio, latas, contenedores, etc., e incluso se ejerce calor sobre el paquete o material de empaque durante su fabricación. (Reuter, 1989).

2.2.4.2 Procesos Químicos

Debido a la complejidad que representa el empleo de sustancias químicas a nivel de la industria alimentaria, el uso de productos de carácter químico es muy limitado, sin embargo, existen sustancias que se han aprobado con fines de limpieza y desinfección.

La sustancia química más empleada en la industria como agente de desinfección es el peróxido de hidrógeno. El cual para desinfectar el material de empaque, tiene que atravesar primero por un baño de peróxido de hidrógeno con una concentración del 20-30% a altas temperaturas 70°C durante 6 segundos, posteriormente se elimina el exceso con aire caliente o con el uso de rodillo a presión, luego el producto se llena dentro del mismo ambiente estéril de manera hermética este procedimiento lo realiza la máquina de envasado sin intervención del operador evitando así una contaminación del producto. (Tetra Pak, 2021).

2.2.4.3 Procesos Combinados

Los procesos combinados de desinfección se basan en la aplicación de distintos tratamientos con la finalidad de maximizar el proceso de limpieza y desinfectar en este caso superficies que se encuentran en contacto con los alimentos. Entre los más relevantes se puede mencionar el uso de Peróxido de hidrógeno en combinación con calor; Peróxido de hidrógeno y UV. (Trojan UV, 2021)

2.2.5 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno también conocido como agua oxigenada se presenta como un líquido transparente, incoloro, denso, altamente polar y soluble con enlaces fuertes de puentes de hidrógeno no inflamable que, además presenta gran capacidad oxidante, es altamente inestable y se descompone en oxígeno y agua, liberando calor. Para uso industrial se presenta en una concentración recomendada para la esterilización de envases para envasado estéril que varía entre 20% a 55%. (PAHO, 2015)

La Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades indica que el peróxido de hidrógeno usado a nivel industrial puede afectar tanto a obreros, operarios o personal que se encuentre en contacto directo con esta sustancia mismos que al estar expuestos a altas concentraciones pueden desarrollar diferentes afecciones y dependiendo la zona en contacto puede provocar lesiones leves, moderadas e incluso severas. Si esta sustancia ingresa al sistema ya sea por contacto directo en piel puede provocar irritación, si la misma ingresa por inhalación puede provocar irritación pulmonar, al contacto con los ojos puede producir irritación, también se hace mención en caso de una posible ingesta accidental puede provocar vómitos y problemas gastrointestinales. (Agency for toxic substances and disease registry, 2002)

2.2.6 Casos de alimentos con Peróxido de Hidrógeno.

A pesar de los controles y cuidados durante los procesos de limpieza desinfección y envasado de productos de alimentación, se pueden presentar fallas durante la elaboración industrial como es el caso de una industria dedicada a la fabricación de leche envasada que, en 2007 la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Anvisa) Brasil, dictaminó la prohibición de la comercialización de leche de larga duración UHT, luego de encontrar y constatar que los productos fueron adulterados con sosa cáustica y peróxido de hidrógeno. (Hoje em dia, 2016). Un caso con características similares se presentó en 2009, donde el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Inmiva) Colombia, reportó la presencia de peróxido de hidrógeno en dos lotes de leche larga vida UHT, el motivo fue la falla en el arranque de la máquina empacadora, lo que provocó que doce personas sufrieron quemaduras en la mucosa tras el consumo de estas leches contaminadas. (El Tiempo, 2009)

Otro caso se presentó en Ecuador en una pasteurizadora en Quito, que en 2018 reconoció una deficiencia en el proceso de sanitización del empaque lo que provocó que el químico desinfectante peróxido de hidrógeno contamine el producto lácteo, razón por la cual la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), procedió al retiro total del producto de las perchas evitando su consumo. (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, 2018).

2.3 Problemas de integridad del empaque

A pesar del conocimiento, la capacitación e inclusive la pericia tecnológica empleada en el diseño y manufactura de los envases sellados herméticamente y de las precauciones y cuidados que tienen los operadores y técnicos encargados para proteger y garantizar el sellado, el deterioro por infiltración o un mal sellado puede crear una condición en la cual el producto se encuentre comprometido debido al ingreso de bacterias como bacilos, cocos o flora mixta. Lo cual se pudo demostrar en un estudio realizado en Europa donde se analizaron 120 sistemas asépticos, en múltiples envasadoras con distintos productos y se concluyó que aproximadamente el 50% de los sistemas operativos tenían más de un envase no estéril por cada 10.000 envases (Warrick, 1990, 65(6):49), siendo los principales causantes de la contaminación y el deterioro de los alimentos envasados asépticamente: el sellado y la integridad del envase.

Esto representa el principal desafío que enfrentan las empresas o fábricas procesadoras de alimentos debido a que es necesario satisfacer las demandas legales y de los clientes con la finalidad para promover la seguridad alimentaria y proporcionar alimentos libres de contaminantes que sean seguros para el consumo humano como indica el Reglamento General de la Ley Alimentaria EC 178/2002, el Reglamento de la UE No. 1441/2007 y Codex Alimentarius (Diario Oficial de la Unión Europea, 2007)

2.4 Microorganismos en superficies en contacto con los alimentos

Los alimentos después de ser procesados por cualquier método de esterilización quedan expuestos a una contaminación con microorganismos patógenos presentes en la superficie, los cuales son responsables del deterioro acelerado del alimento, provocando que los mismos no sean aptos para los consumidores, además causan las pérdidas económicas en la industria alimentaria. Este tipo de contaminación es conocida como contaminación cruzada la cual según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador la define como “Contaminación producida cuando un proceso, producto o materia prima puede ser contaminante de otro proceso, producto o materia prima”. (Ministerio de Salud del Ecuador, 2015)

Tanto los equipos de proceso, materiales y los envases que entran en contacto directo con el alimento estéril, si no se desinfectan de manera correcta pueden ser fuente de contaminación con microorganismos patógenos los cuales darán origen a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). Dentro de este grupo de microorganismos patógenos se puede citar a: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, mohos y levaduras, entre los más representativos ya que pueden permanecer en las superficies y contaminar los alimentos especialmente aquellos listos para su consumo. (Fuster, 2006)

2.4.1 Microorganismos Aerobios mesófilos.

Este grupo de microorganismos son capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C (Temperatura ambiente) con una temperatura óptima entre 30°C y 40°C. Recuentos altos de este tipo de microorganismos refleja la calidad sanitaria de los productos procesados analizados, además nos proporciona un indicio de las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma de manipulación durante su elaboración. Lo cual indica una posible existencia de microorganismos de tipo patógenos y una alteración del producto final. (Red Nacional de Laboratorios de Alimentos, 2014)

2.4.2 Microorganismos Coliformes

Este tipo de microorganismos se encuentran en suelo, agua y tracto gastrointestinal, se presentan en forma de bacilos Gram negativos y son usados comúnmente como indicadores de contaminación de la producción de bebidas y alimentos. Dentro de este grupo se encuentran los siguientes géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. (Olmos, 2003, 142-143).

El mayor representante es *Escherichia coli* (*E. coli*), este microorganismo vive en el intestino de animales, la mayoría de este tipo de microorganismos son inofensivos pero algunas cepas producen toxinas las mismas que pueden causar intoxicación alimentaria y graves enfermedades. Los síntomas pueden incluir náuseas o vómitos, cólicos abdominales, diarrea líquida o con mucha sangre y fiebre, mismos que al no ser tratados oportunamente puede causar la muerte. (Organización Mundial de la Salud, 2018)

2.4.3 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Este tipo de microorganismo se desarrolla a temperatura ambiente en los alimentos y produce toxinas, una de las características en los alimentos contaminados con este tipo de bacterias es que los mismos no presentan señales de haberse echado a perder, incluso mal olor. Dentro de los síntomas provocados por una intoxicación alimentaria por esta bacteria incluyen náuseas, vómito, dolores estomacales y diarrea. En casos más graves, se produce deshidratación, dolor de cabeza, calambres y cambios en la presión arterial y en la frecuencia del pulso. (Ingraham & Ingraham, 1998, 367)

2.5 Agua activada con la tecnología de plasma frío atmosférico.

Esta tecnología emergente no térmica nos sirve como un método alternativo para la desinfección microbiana, la cual consiste en tratar agua con plasma frío (PAW), creando un ambiente ácido que induce a cambios en el potencial redox, en la conductividad y en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas nitrógeno (RNS), dando como resultado una composición química diferente, esta técnica emergente puede servir como método alternativo de desinfección para microorganismos. (Zhao et al., 2020)

2.5.1 Generación de PAW

La concentración y el tipo de las especies reactivas que se encuentran presentes en PAW van a depender de los gases y líquidos utilizados para la generación de plasma frío atmosférico, las mismas que se forman en el líquido o en la interfaz líquido-gas. Con el uso de oxígeno, nitrógeno y agua como moléculas para la producción de PAW, dará como resultado la formación de varias especies primarias (incluyendo oxígeno atómico, oxígeno, superóxido, ozono, radicales hidroxilo y nitrógeno excitado y atómico), que luego continuarán reaccionando para formar especies secundarias (que incluyen peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, óxido nítrico, nitratos e iones de nitrito, reacciones químicas que dan como resultado la formación de ROS y RNS en la PAW. Estas especies reactivas han sido reportadas por poseer una alta actividad antimicrobiana (Thirumdas et al., 2018)

Los parámetros críticos del PAW son los siguientes:

- acidez,
- conductividad,
- potencial redox y
- concentración de ROS y RNS

Otros factores importantes que se deben considerar son: el tiempo de tratamiento y los gases utilizados, la distancia entre los líquidos y el generador de plasma frío. (Thirumdas et al., 2018)

Tabla 1
Sistemas de plasma frío para la activación del PAW

| | Modo de operación | Parámetros críticos | Química |
|---|--|--|--|
| <i>Plasma frío directamente en agua</i> | Descargas eléctricas directamente en el agua | <ul style="list-style-type: none"> • Distancia entre el plasma frío y la superficie del agua • Gases • Tipos de electrodos (por ejemplo, grafito, cobre) • Voltaje • Corriente de descarga • Frecuencia • Tamaño de electrodo | <ul style="list-style-type: none"> • Peróxido de hidrógeno • Peróxido • Nitrato • Nitrito • Hidrógeno • Anión superóxido • Ozono • Radicales de óxido nítrico • Radical hidroxilo |

(Fuente: (Locke, 2012), (Thirumdas, y otros, 2018))

2.5.2 Sistemas de plasma frío

Para la producción de plasma frío atmosférico es necesario aportar energía a un gas provocando así su ionización, dependiendo de la cantidad y tipo de energía que se transfiere hacia el gas los sistemas de plasma frío se dividen en plasma térmicos y fríos. (Méndez Montoro de Damas, 2017). Los plasmas térmicos se presentan a temperaturas de varios miles de grados centígrados y son empleados en la industria metalúrgica, en

la incineración de residuos o como medio para procesos químicos. En cambio, los plasmas fríos son empleados para el tratamiento de materiales a temperatura ambiente y aquellos que son sensibles al calor. En cuanto a los plasma fríos tipo frío se subclasifican en: descargas corona, jet y de barrera dieléctrica (DBD) (Jiménez Avilés et al., 2017).

El método más empleado para la obtención del PAW es la descarga de barrera dieléctrica, que tiene como principal característica un electrodo que se encuentra aislado lo que limita la corriente de la descarga provocando que no se cree un flujo de corriente y tampoco que se caliente el gas, además los electrones se dirigen al electrodo positivo y las especies de gas reactivo (RGS) se mantienen dentro de un paquete sellado y no pueden escapar debido al aislamiento. La excitación debe tener lugar con una tensión alterna de alto voltaje lo que permite que la descarga de barrera dieléctrica de gas genere un plasma frío. Esta es una técnica conocida como plasma frío atmosférico de alto voltaje. (Yepez & Keener, 2016, 169 - 174)

2.5.3 Propiedades químicas del PAW

Predominantemente, el PAW se compone de oxígeno, superóxidos, iones excitados, electrones, átomos, ozono, campos eléctricos locales y Ultravioleta (UV). Cuando el plasma frío interactúa con el agua, desencadena reacciones químicas dinámicas y forma una serie de especies reactivas acuosas. (Liao et al., 2017).

Al generar PAW, se producen diferentes procesos en la capa de interfaz como la transferencia de especies gaseosas al líquido y reacciones químicas. (Wende, et al. 2018). Las descargas que se generan en el sistema son altamente transitorias y dinámicas, que en su mayoría son impulsados por fuertes campos eléctricos. El tratamiento del agua con plasma frío conduce a la disociación en desequilibrio de las moléculas de agua, lo que da como resultado la formación de especies de vida corta como los iones hidroxilo (OH^\cdot) y los electrones hidratados (Khlyustova et al., 2019). Las reacciones rápidas posteriores entre los iones hidroxilo (OH^\cdot) forma especies altamente reactivas que poseen un potencial redox muy alto y los electrones hidratados reaccionan para formar especies más estables, incluidos los superóxidos (O_2^\cdot), el ozono (O_3), el H_2O_2 . (Zhao et al., 2020)

2.5.4 Propiedades físicas del PAW

En cuanto a las propiedades físicas del PAW las especies reactivas y los iones formados producen un pH ácido, conductividad eléctrica aumentada y potencial de oxidación-reducción (Tabla 2). Varias especies de RONS producidos en el ambiente líquido o gas-líquido poseen propiedades ácido-base, ya que pueden liberar iones de hidrógeno en una solución acuosa. Cuando el agua se trata con plasma frío atmosférico, la solución se acidifica mediante la absorción de NO_3^\cdot y NO_2^\cdot generado por plasma frío en el líquido, y mediante la producción posterior de NO_3^\cdot a partir de NO_2^\cdot en la fase líquida (Cha, et al. 2016).

Tabla 2
Propiedades físicas y químicas destacadas de estudios realizados del PAW

| Dispositivo de plasma frío | Gas de trabajo | Tiempo de activación (min) | pH | ORP (Mv) | Conductividad (us/cm) |
|--|---------------------------------------|----------------------------|-------------|----------|-----------------------|
| <i>Plasma frío jet</i> | Ar/O ₂ | 15 | 3.0 | 550 | 450 |
| <i>Plasma frío microjet</i> | Aire | 20 | 2.3 | 540 | - |
| <i>Plasma frío microjet</i> | Ar/O ₂ | 20 | 6.1 | 250 | 18.8 |
| <i>DBD micro discharge Plasma frío jet</i> | Aire | 15 | 2.7 | - | - |
| <i>Arco deslizante</i> | Aire, O ₂ , N ₂ | 15 | 2.8,3.2,3.0 | - | 1100, 300, 500 |
| <i>Plasma frío microjet</i> | Ar/O ₂ | 20 | - | 490 | - |
| <i>Electrodo alta tensión DBD</i> | Argón | 15 | 3.0 | - | 200 |
| | Aire, O ₂ | 20 | 2.1, 2.2 | - | - |
| <i>Baja frecuencia chorro plasma frío</i> | He | 5 | 4.2 | - | - |
| <i>DBD con electrodos de baja tensión</i> | Aire | 10 | 1.9 | 550 | 2000 |
| <i>Arco deslizante</i> | Argón | 2 | 3.6-3.7 | - | 50-70 |

Fuente: (Thirumdas, y otros, 2018)

2.5.5. Mecanismo de Inactivación Microbiana con PAW

Se ha demostrado que PAW presenta una gran actividad para inactivar varios grupos de microorganismos mediante mecanismos de estrés oxidativo y efecto físico. En el año 2013, Zhang y colaboradores estudiaron el daño celular bacteriano causado por el estrés oxidativo en *Staphylococcus aureus*, mediante la evaluación de los estados estructurales y químicos de la superficie bacteriana. Los resultados mostraron que el contenido de oxígeno aumentó y el contenido de carbono disminuyó, después del tratamiento con PAW. Los investigadores emplearon espectroscopia para identificar los efectos, y concluyeron que existe una alteración de la estructura de los enlaces químicos, debido al estrés oxidativo provocado por el uso del PAW. (Thirumdas et al., 2018).

2.5.6 Aplicación del agua activada por plasma frío.

En los últimos años el agua activada por plasma frío (PAW) ha atraído mucha atención debido a sus múltiples aplicaciones en las áreas de la industria. Los usos que ofrece son variados y se encuentran en constante desarrollo, entre los cuales están el área agrícola, procesamiento de alimentos, medicina, entre otros. (Keener y col., 2012). Además, diversos estudios concluyen en gran medida que la aplicación de plasma frío atmosférico directamente sobre los productos alimenticios o superficies juega un papel importante en la inactivación microbiana. Entre los cuales se puede citar los siguientes estudios en distintos campos de la industria:

2.5.6.1 PAW en la descontaminación microbiana

Según la investigación realizada por Liao y colaboradores se utilizó agua activada por plasma frío como medio para descongelar carne de res, con el fin de mejorar la seguridad microbiológica, el estudio presenta una diferencia significativa en la reducción de la carga microbiológica en comparación a los métodos tradicionales de descongelación con una reducción de 0,83 - 1,76 logs. Además, este proceso no altera las características fisicoquímicas y la calidad sensorial de la carne (Liao et al., 2017).

A su vez esta teoría se soporta con un estudio realizado por Bai y colaboradores los mismos que realizan un análisis usando agua activada por plasma frío para inactivar esporas de *Bacillus cereus*, donde obtienen como resultado que esporas con una carga de 10^6 UFC/mL disminuyen a 1,62-2,96 log₁₀. UFC / ml a 55 ° C (Bai et al., 2020)

Así mismo un artículo con características similares presentado por Liao y colaboradores donde se propone el uso de agua activada por plasma frío en su forma de hielo con el fin de mejorar la conservación de camarón, en este estudio se obtiene como resultado una reducción significativa en la carga microbiana además concluyen que el tratamiento aplicado mantiene las características organolépticas propias del producto (Liao et al., 2018).

A su vez Frías y colaboradores demuestran una evaluación del agua activada por plasma frío como tecnología alternativa de descontaminación no térmica de un alimento como el tofu obteniendo como resultado que existe un control en el crecimiento microbiano durante el almacenamiento del producto y de igual manera la textura y frescura se mantiene por más tiempo (Frías et al., 2020)

Todos los artículos antes mencionados llegan a la conclusión que el uso de agua activada por plasma frío mantiene la calidad del producto además disminuye la presencia y el crecimiento de microorganismos además nos proporcionan un enfoque para evaluar la eficacia de la descontaminación microbiana y nos abre un camino para futuras aplicaciones.

2.5.6.2 PAW en la Agricultura

Con respecto al área de la agricultura el uso plasma frío atmosférico se encuentra en desarrollo y experimentación sin embargo se puede mencionar estudios y publicaciones muy bien desarrolladas y documentadas con bases sustentables reproducibles para futuros estudios.

El autor Ohta en su artículo plasma frío en la alimentación y la agricultura menciona los beneficios del plasma frío atmosférico sobre cultivos, semillas y suelo, con un principal enfoque sobre la descontaminación de semillas, mejora en la germinación y ayuda en el crecimiento de plantas, y concluye que la aplicación de este tipo de tecnología es viable y no genera ningún impacto ni reacción no deseada pero sí requiere de grandes esfuerzos de parte de toda la comunidad involucrada para su aplicación (Ohta et al, 2016).

Un estudio realizado en 2019 Xiang y colaboradores indico que el uso de PAW puede inactivar bacterias levaduras y mohos en alimentos como frutas, semillas, hortalizas e inclusive hongos comestibles, lo que mejora en gran medida su calidad microbiológica y extendiendo su vida. (Xiang y col., 2019). El mismo investigador en 2020 realizó un estudio aplicando PAW durante 30 min en semillas “mung bean” germinadas, demostrando una reducción en la población de bacterias aerobias totales, así como la de mohos y levaduras, en 2,3 y 2,8 unidades logarítmicas, respectivamente, y concluyo

además que no existió cambios significativos en las características sensoriales ni en el contenido en flavonoides y polifenoles de los productos analizados

2.5.6.3 PAW en procesamiento de alimentos

La rama del procesamiento de alimentos es muy amplia y se encuentra en constante progreso debido en gran medida las exigencias del mercado y a la gran variedad de productos existentes, la aplicación del plasma frío en esta área al igual que en las otras antes mencionada se encuentran en constante avance, donde se puede citar varios análisis y estudios que revolucionan el campo de los alimentos.

Según un estudio donde se aplicó plasma frío a presión atmosférica en un producto procesado de gran consumo como es la harina de trigo el cual es usado como ingrediente esencial en la elaboración de una gran variedad de sub productos como pan, galletas, pasteles, fideos etc., los autores Misra y colaboradores aplicaron este procedimiento con la finalidad de mejorar la funcionalidad de esta materia prima, obtuvieron como resultados un aumento de la visco elasticidad, una mejora en la fuerza de la masa y el tiempo de mezclado, características importante dentro del uso de la harina, además mencionan que no se observó reacción adversa alguna e indican que este procedimiento puede ser replicado a otros tipos de harinas (Misra et al., 2015).

En relación con productos cárnicos en 2018 Zhao y colaboradores demostraron la capacidad del PAW para la inactivación de microorganismos como la *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, en carne almacenada a refrigeración demostrando una reducción de la población bacteriana superficial en 3,1 unidades logarítmicas, alargando de 4 a 6 días la vida útil sin alterar su calidad tras la cocción (Zhao y col., 2018). En cambio, Lin y colaboradores en 2019 demostró una reducción microbiológica al emplear PAW en huevos (Lin y col., 2019).

También se han realizado estudios en grasas y aceites los cuales se usan como ingredientes esenciales en la industria alimentaria, un estudio realizado por Yepes y col 2016, el cual investigo la aplicación plasma frío atmosférico de alto voltaje (HVACP) para producir aceite de soja parcialmente hidrogenado sin la formación de ácidos grasos trans, en donde el aceite de soja fue expuesto a especies altamente energizadas de hidrógeno y nitrógeno y los resultados demostraron una reducción del índice de yodo de 133 a 92 además los ácidos grasos saturados aumentaron 12%, los monoinsaturados aumentaron 4.6% y los ácidos grasos insaturados disminuyeron 16.2%. (Yepez & Keener, 2016)

Tabla 3
Resumen de estudios realizados y resultados de la inactivación de microorganismos a usar con PAW

| Microorganismos | Modo de activación | Tiempo de activación (min) | Almacenamiento | Tiempo de tratamiento | Inactivación (Log₁₀ UFC/mL o UFC/g) |
|------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> | Descarga de plasma frío sobre superficie de agua | 20 | 0 | 15 | 0.6 |
| <i>S. aureus</i> | | 10 | 0 | 5,10,15 | 1.5,1.6,1.9 |

Fuente: (Thirumdas, y otros, 2018)

2.5.6.4 PAW en la descontaminación de superficies y equipos

La capacidad que presentan los microorganismos de tipo patógenos como los considerados alterantes en adherirse a las superficies tanto de equipos como de superficies en contacto con los alimentos es alta, y si no existe una correcta limpieza y esterilización de estos puede provocar problemas de contaminación cruzada causando repercusiones para la salud y puede provocar grandes pérdidas de tipo económicas para las industrias. (López, 2021).

Entre los estudios en los que se menciona el potencial de inactivación bacteriana con el uso de PAW tanto para bacterias de tipo Gram positivas como para la familia de las Gram negativas en materiales de uso industrial alimentario se menciona en el trabajo llevado a cabo en 2020 por Fernández y colaboradores en el cual se evaluó la eficacia del PAW para inactivar cepas de *L. monocytogenes* sobre el acero inoxidable y poliestireno (10^6 - 10^7 UFC/cm²), con tiempos comprendidos de 30 y 60 minutos, demostrando una reducción de recuentos inferiores a 10^2 UFC/cm².(Fernández y col 2020)

CAPITULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fuente de plasma frío

La fuente indirecta de PAW utilizada para la realización de este estudio fue similar a la publicada en 2016 por Yepez y colaboradores. En la cual el sistema utilizó un transformador BK-130 (Phenix Technologies, Accident, MD) con un voltaje de entrada de energía eléctrica de 120 V (CA) a 60 Hz, la misma que presenta una capacidad de salida de alto voltaje de hasta 130 kV. Además, se utilizó un contenedor de plástico rígido como recipiente de tratamiento y se colocó dentro de una funda de nylon extruido, para mantener el gas dentro del contenedor, como se muestra en la figura 3.3. El gas empleado para este trabajo fue aire atmosférico (Yepez & Keener, 2016)



FIGURA 3.3 Equipo usado para la activación del agua (Fuente: Laboratorio de Posgrado VLIR, FCV, ESPOL)

3.2 Determinación de pH y conductividad en el PAW

El análisis de conductividad y pH del agua activada que se utilizó en este proyecto se midió con un conductímetro o pH-metro (BOECO BT-600, Germany), como se observa en la figura 3.4.



FIGURA 3.4 Potenciómetro y conductímetro (Fuente: Laboratorio de Posgrado VLIR, FCV, ESPOL)

3.3 Determinación de nitritos en el PAW

Para la medición de nitritos en el agua activada se usó el método de Reacción de Griess, en el que se establece que se debe dejar estabilizar la temperatura de la solución de sulfonilamida y la solución NED (sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamina) de 15 a 30 minutos, luego se debe añadir 50 μL de cada muestra experimental a los pocillos por triplicado y dispensar 50 μL de la solución de sulfanilamida a todas las muestras experimentales y a los pocillos que contienen la serie de dilución para la curva de referencia del estándar de nitrito. Se debe dejar incubar protegido de la luz a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos y dispensar 50 μL de la Solución NED a todos los pocillos, nuevamente se deja incubar de 5 a 10 minutos protegido de la luz, comenzará a formarse un color púrpura/magenta inmediatamente. En este momento se debe medir la absorbancia en 30 minutos ya que después de este tiempo el color puede desvanecerse, en un lector de placas con un filtro entre 520nm y 550nm. (Promega Corporation, 2009)

La composición de las soluciones usadas fueron para la solución NED (Diclorhidrato de N-1-naftiletildiamina al 0,1% en agua) y para la Solución de sulfanilamida (Sulfanilamida al 1% en fosfórico al 5% ácido) (Promega Corporation, 2009)

3.4 Determinación de peróxido en el PAW

La determinación de las concentraciones de peróxido en solución se realizó usando el método de oxidación de yoduro de potasio a yodo, con determinación espectrofotométrica a una longitud de onda de 390 nm. En resumen, se añadió 50 μL de tampón fosfato y 100 μL de solución de KI (1 M), a un volumen de 50 μL de PBS tratado con plasma frío. Luego de 30 min que ha transcurrido de incubación, se leyó la absorbancia en un lector de placas espectrofotométricas a 390 nm. Se incluyó una curva estándar de concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno en cada placa, que se utilizó para convertir las absorbancias en concentraciones de peróxido. (Boehm, Heslin, Cullen, & Paula, 2016)

3.5 Cepas bacterianas

El proyecto realizado se basa en una experimentación controlada en el cual se compara los resultados obtenidos de muestras experimentales con muestras de control. Con un análisis por duplicado, tanto para el control como para el microorganismo a evaluar, y se empleó dos tipos de microorganismos para esta experimentación: a) *Escherichia coli* (ATCC 11775) que es un gram negativo de la familia enterobacteriaceae, y b) *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) que es una gram positivo de la familia Staphylococcaceae. Los microorganismos fueron obtenidos del laboratorio de microbiología de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la ESPOL.

3.6 Preparación de la muestra

Para la parte experimental de este proyecto de titulación se utilizó agua activada por plasma frío para comprobar la efectividad de la misma sobre suspensiones de microorganismos de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Para lograr la activación del agua por plasma frío, se aplicó un tratamiento con voltaje de 90 kV a 60 mL de agua ultra pura tipo 1, que fue esterilizada previamente. El agua se colocó en un plato Petri, dentro de

una caja de polietileno cubierta y sellada con una funda de nylon co - extruido. Este envase permite mantener las especies reactivas dentro de la cámara de tratamiento.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 horas luego del tratamiento. A continuación, fueron envasadas y almacenadas en refrigeración a 4°C para su caracterización y para su posterior aplicación en el tratamiento.

3.7 Reactivación celular

Se inoculó una colonia de *E. coli* en un tubo con 15 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Esta solución enriquecida se centrifugó por 10 minutos a 8720 g (Legend Micro 17, Thermo Scientific), el sobrenadante del tubo se descartó y luego se lavó dos veces el pellet con solución salina estéril al 0.9% (NaCl). Con ayuda del Standard 0.5 McFarland se ajustó la concentración de la suspensión para obtener aproximadamente 10^8 UFC/mL como concentración inicial.

3.8 Inoculación superficial, tratamiento PAW y recuperación

Para este paso, se inoculó 100µL de la suspensión de *E. coli* en material de empaque Tetra Pak (2x2 cm) y se dejó secar. Se prepararon dos muestras, una para control y otra para determinar la inactivación de la bacteria. Luego, la muestra control se colocó en 6 mL de agua destilada, mientras que la muestra a analizar se sumergió en 6mL de PAW (tratada previamente con 90kV durante 5 minutos) permitiendo un tiempo de contacto de:

- 10 minutos y a una temperatura ambiente de 25°C,
- 1 minuto y a una temperatura de 50°C,
- 15 segundos y a una temperatura de 80°C,

Los cuales corresponden al tiempo promedio requerido para la acción de sustancias desinfectantes. Para la recuperación, se colocó el material inoculado, así como el agua utilizada para su desinfección, en tubos estériles y se sometió a vórtex durante dos minutos. Alícuotas de 1 mL se obtuvieron de cada muestra para realizar diluciones seriadas 1:10 en NaCl.

Finalmente, para realizar la recuperación y recuento se sembró 100 µL de las diluciones correspondientes en TSA, se incubó a 37°C durante 24 horas, el mismo procedimiento se repite con el microorganismo *Staphylococcus aureus*, luego se procedió a contar las colonias formadas para determinar la reducción en la población celular a causa de la acción del PAW.

Este proceso se lo ejecutó por duplicado y también se lo realizó con el peróxido de hidrógeno al 20% (químico comúnmente usado para la desafección) para una comparación en cuanto a su eficacia con la PAW, obteniendo los resultados mostrados en el siguiente capítulo.

3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SAS (versión 9.3) para Windows (SAS Institute Inc. 2008). El análisis de las varianzas se realizó utilizando el procesamiento GLM. Se utilizó la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas al 95% de nivel de confianza ($p < 0.05$). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado, tanto el PAW como el peróxido de hidrógeno.

CAPITULO 4

4. RESULTADOS

4.1 Características fisicoquímicas del PAW

En la tabla 4, se presentan las características fisicoquímicas del PAW obtenidas en el laboratorio, resultados que son equiparables con estudios reportados en 2018 por Thirumdas y colaboradores. Los investigadores mencionan que la reducción de pH se debe a la formación de especies químicas como peróxido de hidrogeno, ácido nítrico y ácido peroxinitroso, con valores de pH que oscilan entre 1 y 7. En este caso el resultado obtenido luego del tratamiento por 10 minutos fue de un pH de 3.45. Los mismos autores indican que las especies químicas formadas son causantes del efecto antimicrobiano del PAW (Thirumdas et al., 2018).

Con relación a los valores obtenidos de nitritos, mismos que se encuentran en un rango de -0.90nm a -0.95nm, en 2016 Shen y colaboradores mencionan que la presencia de nitritos y nitratos en la PAW demuestra la existencia de especies reactivas nitrógenos causantes de actividad antimicrobiana y la reacción que se produce entre los NO^- y H_2O_2 resulta en la formación de peroxinitrito mismo que potencia el efecto antibacteriano (Shen et al., 2016).

Sobre el peróxido de hidrogeno existen varios estudios antimicrobianos los cuales demuestran su eficacia y eficiencia, la formación de esta especie reactiva en la PAW se da por recombinación de los radicales OH formados por el impacto electrónico sobre la molécula de agua. En 2010, autores como Shainsky y colaboradores demostraron que una concentración de $0.6 \mu\text{M}$ es suficiente para inhibir el crecimiento microbiano, y un valor elevado nos indica que usar esta agua activada por plasma frío atmosférico sería más efectivo para la inactivación de microorganismos (Shainsky et al., 2010)

Tabla 4

Caracterización del agua activada por plasma frío a usar en la experimentación.

| pH | Nitritos (nm) | Peróxido de hidrógeno (μM) | Conductividad (Mv) | Tiempo (min) | Voltaje | Gas de Trabajo |
|------|---------------|---|--------------------|--------------|---------|----------------|
| 3.45 | -0.93 | 420.5 | 202 | 10 | 90kV | Aire |

4.2 Efecto del PAW en la descontaminación de *E. coli* y *S. Aureus*

Los resultados que se obtuvieron en la experimentación del tratamiento con agua activada por plasma frío y el tratamiento con peróxido de hidrógeno se presentan en la figura 4.5 y 4.6, que muestran las tablas de control y validación de resultados experimentales obtenidos con la aplicación del programa estadístico, SAS (versión 9.3) para Windows (SAS Institute Inc. 2008), respectivamente. Donde se puede observar que al realizar el tratamiento con el PAW sobre la superficie de material de empaque inoculada con el microorganismo *E. coli* existe una reducción de más de $4 \log_{10}$ UFC/mL en relación con la muestra control, a diferencia del microorganismo *S. aureus* el cual presentó una reducción de $1.58 \log_{10}$ CFU/mL con relación al peróxido de hidrógeno. Estos resultados se obtuvieron con la aplicación de distintas temperaturas y tiempos, al realizar el tratamiento con PAW para la descontaminación de empaque. (Anexo 1)

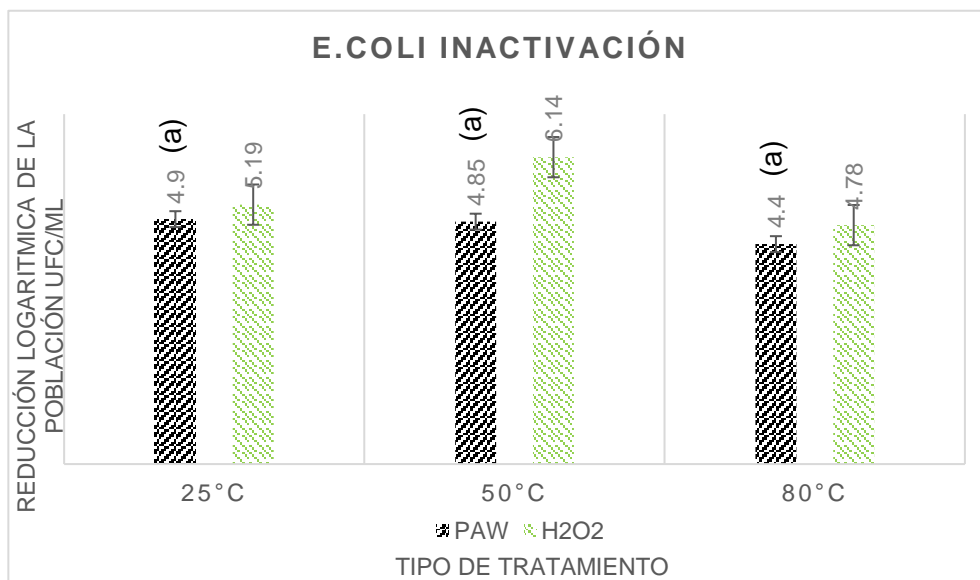


FIGURA 4.5

Comparación de la inactivación de *E. coli* en PAW Y H₂O₂

Figura 4.5. La letra (a) demuestra que el tratamiento del PAW no presenta diferencia significativa en relación con el tratamiento que se realiza actualmente para la desinfección del material de llenado aséptico.

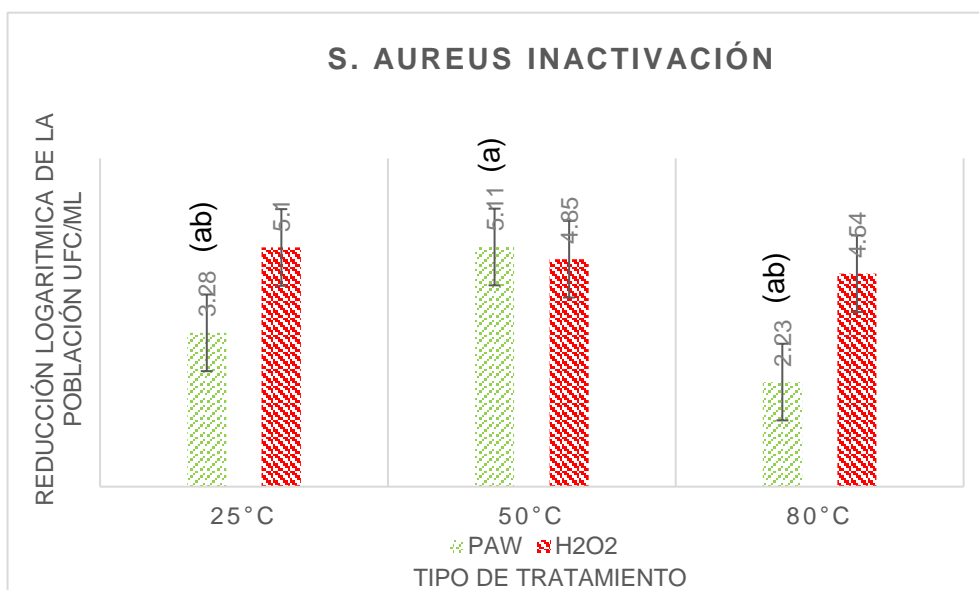


FIGURA 4.6

Comparación de la inactivación de *S. aureus* en PAW y H₂O₂

Figura 4.5. La letra (a) demuestra que el tratamiento del PAW a esta condición de 50°C y tiempo de contacto 1 min, no presenta diferencia significativa en relación con el tratamiento que se realiza actualmente para la desinfección del material de llenado aséptico. Las letras (ab) se considera que existe una diferencia significativa con relación al tratamiento comparado.

Con relación a las temperaturas estas se comprendieron entre 25, 50 y 80°C con tiempos de contacto de 10 minutos, 1 minuto y 15 segundos respectivamente, con la finalidad de recrear las condiciones en las cuales funcionan las maquinas envasadoras asépticas en la industria, resultando que al aplicar una temperatura de 50°C se demostró una reducción de más de 5 log₁₀ UFC/mL en el microorganismo *S. aureus* como se muestra en la Figura 4.6, concluyendo que el PAW puede ser utilizado como un desinfectante eficaz para el microorganismo *E. coli*, ya que el mismo tuvo una reducción de más de 4 log₁₀ UFC/mL al aplicarlo en los tres tratamientos mencionados como se muestra en la Figura 4.5 la cual nos indica que el PAW no demuestra diferencia significativa en relación con el método usado tradicionalmente, sin embargo es necesario realizar más pruebas para indicar la efectividad del PAW sobre el microorganismo *S. aureus*.

Los datos de diferencia significativa fueron obtenidos del programa estadístico utilizado el cual nos proporcionó los siguientes valores: para *E. coli*, la diferencia significativa fue de 0.5296 y para el caso de *S. aureus* fue de 1.0086.

Esta combinación de tiempo-temperatura de contacto del líquido desinfectante con el empaque han sido establecidos con referencia a los manuales funcionamiento y servicio técnico Tetra Pak (Tetra Pak, 2008). Estos valores han sido diseñados y acondicionados bajo estándares propios del fabricante, para garantizar el estado aséptico de los productos tratados por esterilización UHT. Además, el corto tiempo de contacto a altas temperaturas se establece con la finalidad de conservar las características microbiológicas y fisicoquímicas de los productos alimenticios. Al comparar el efecto del agua activada sobre cada uno de los microorganismos, se puede notar que al trabajar con *E. coli*, se logró mejores resultados que con el *S. aureus*, esto se debe a las características propias del microorganismo y su capacidad de difusión en el medio, como hace mención Ayebah y colaboradores (2005). Los investigadores sostienen que el aumento de materia orgánica disminuye el potencial Redox del PAW lo que causa que se reduzca la actividad antimicrobiana, esto se relaciona debido a que las bacterias *E. coli* poseen una tasa de crecimiento de 1 cel/mL cada 20 min. (Carrillo Pacheco & Mejía Bravo, 2009) a diferencia del *S. aureus* el cual es de 1 cel/mL cada 17 min. (Pumarola, 1992, 55)

En cuanto a la morfología, autores como Pasachova y colaboradores en su artículo “*Staphylococcus aureus*: Generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular”, mencionan que este microorganismo presenta una gruesa capa de peptidoglicano en la estructura de su membrana lo que permite una mayor resistencia a factores externos (Pasachova Garzón et al., 2019). A diferencia de la bacteria *E. coli*, que presenta una pared celular más simple y menos compleja, susceptible a agentes desinfectantes (Aljanati, 2004, 36)

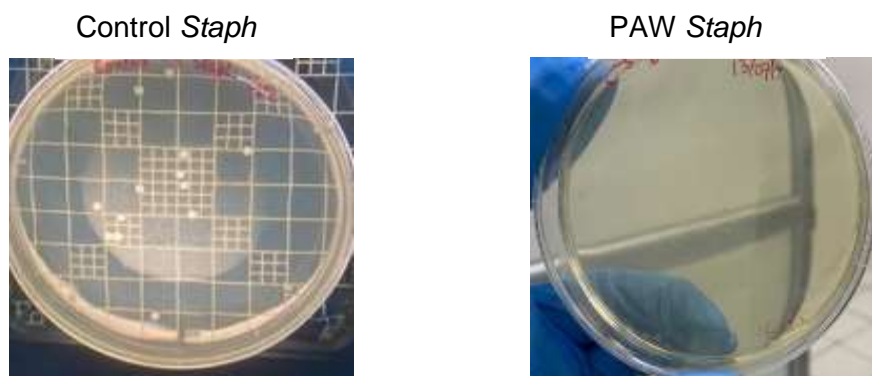


FIGURA 4.7

Tratamiento por PAW sobre *S. aureus*.

Los resultados del análisis estadístico para el experimento con *E. coli* se muestran en las tablas de anexo A y B. Se obtuvo un valor de P mayor a 0.05 para el método de descontaminación con PAW para el microorganismo *E. coli* en sus tres variantes de temperatura y tiempo de contacto, el cual muestra estadísticamente que se acepta la hipótesis del presente proyecto, que sugiere que el tratamiento del PAW es significativamente similar al tratamiento del peróxido de hidrógeno.

Los resultados del análisis estadístico para el experimento con *S. aureus* se muestran en las tablas del anexo C y D. Se obtuvo un valor de P mayor a 0.05 para el método de descontaminación con PAW para el microorganismo *S. aureus* en una de las tres variantes de temperatura y tiempo de contacto (50°C, 1 min de exposición), en donde se sugiere que el tratamiento es significativamente similar al tratamiento con la solución de peróxido de hidrogeno. En cambio, los resultados nos muestran un valor de P menor a 0.05 para las dos combinaciones de tiempo y temperatura restantes, rechazando la hipótesis de que el tratamiento con PAW y peróxido de hidrogeno son similares para *S. aureus*.

4.3 Efecto del PAW sobre el empaque de envasado.

En el capítulo 2 apartado 2.4 se hace mención sobre la presencia de microorganismos en superficies en contacto con los alimentos y su importancia al realizar la correcta desinfección. Por lo tanto, la adecuada selección del desinfectante y las correctas condiciones de aplicación deben ser las adecuadas para obtener el máximo beneficio con un mínimo impacto sobre el material de envase. En el caso del tratamiento con PAW que después de su aplicación ha mostrado ser un agente prometedor como desinfectante, debido a que el mismo no causa afección a la integridad y calidad del envase gracias a sus características químicas propias y su capacidad de disolverse en vapor de agua además autores como Yi-Ming Zhao y colaboradores, mencionan que los radicales hidroxilos son especies altamente reactivas de corta duración. Así mismo refieren sobre el oxígeno y el ozono mencionando que son especies de vida corta no y no estables. (Yi-Ming Zhao et al., 2020). Además, esta técnica emergente de descontaminación se presenta como un proceso amigable con el medio ambiente debido a que la no utiliza químicos, ni genera residuos contaminantes. Los compuestos anti bactericidas provienen del aire y agua.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se logró cumplir el objetivo planteado en el proyecto, con muy buenos resultados. Se pudo evaluar el efecto de la aplicación del agua activada por plasma frío atmosférico en el control microbiológico de superficies de material de empaque y comparar la eficacia y la utilidad del agua activada por plasma frío como método alternativo en los procesos habituales de desinfección.
2. Se demostró que el agua activada por plasma frío presenta resultados excelentes en la desinfección de materiales de empaque de llenado aséptico para ambos microorganismos usados en este proyecto, presentando una reducción mayoritaria para *E. coli* que para *S. Aureus*, ambas en comparación con una muestra control con agua destilada.
3. Se comprobó la validez de los datos obtenidos en los conteos mediante un programa estadístico, en el que obtuvimos resultados de la desviación estándar de la muestra.
4. Se determinó que la caracterización del agua activada por plasma frío que se usa para la desinfección del material de empaque es de gran importancia para obtener resultados satisfactorios.
5. Se comprobó que el agua activada por plasma frío estudiada en este proyecto, es una adecuada alternativa para la inactivación de *E. coli* en el material de empaque de llenado aséptico, además que es una tecnología emergente no térmica que es amigable con el medio ambiente y no tiene residuos en su aplicación como en el caso de sustancias químicas.
6. Se observó que la exposición del PAW tuvo un efecto insignificante sobre la morfología de la superficie material del empaque.
7. Los resultados demuestran que PAW es un método eficiente para reducir la carga microbiana en superficies de material de empaque.
8. Los resultados de este estudio indican que los dispositivos PAW que emplean aire ambiente son recomendables para el tratamiento de superficies uniformes y podrían introducirse dentro de la cadena de producción alimentaria para ofrecer descontaminación continua en línea de superficies en contacto con alimentos, minimizando contaminación de alimentos durante el procesamiento.
9. Se recomienda evaluar el efecto residual en el empaque del PAW en comparación con el método tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria. (03 de 09 de 2018). *Alerta sobre lote afectado de producto LECHE ENTERA ULTRAPASTEURIZADA LARGA VIDA UHT de marca VITA*. Recuperado el 08 de 08 de 2021, de Control Sanitario Arcsa: <https://www.controlsanitario.gob.ec/alerta-sobre-lote-afectado-de-producto-leche-entera-ultrapasteurizada-larga-vida-uht-de-marca-vita/>
- Agency for toxic substances and disease registry. (01 de Abril de 2002). *Hydrogen Peroxide*. Recuperado el 13 de 05 de 2021, de Peróxido de Hidrogeno: https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts174.pdf
- AINIA. (2012). *ventajas del envasado aséptico para productos líquidos y triturados*. Recuperado el 09 de 06 de 2021, de ventajas del envasado aséptico para productos líquidos y triturados: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/9-ventajas-del-ensado-aseptico-para-productos-liquididos-y-triturados/>
- Alborch, M. (01 de 01 de 2013). *Las 8 claves del éxito del envasado aséptico*. Recuperado el 10 de 06 de 2021, de AINIA: <https://www.ainia.es/insights/las-8-claves-del-exito-del-ensado-aseptico/>
- ARAPACK. (07 de 02 de 2017). *Envasado esterilizado*. Recuperado el 08 de 05 de 2021, de Envases asépticos ¿qué son?: <https://www.arapack.com/envases-asepticos-que-son/>
- Boehm, D., Heslin, C., Cullen, P., & Paula, B. (2016). Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. *Scientific Reports*, 11-12.
- Cervera, A. L. (2003). *Envase y Embalaje: (La Venta Silenciosa)* (1 ed.). ESIC. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=Yzha4dQ10yoC&dq=historia+del+envase&source=gbs_navlinks_s
- Consejo Colombiano de Construcción Sostenible. (1 de 02 de 2015). *EJEMPLO DE RECICLAJE DE LOS ENVASES DE CARTÓN POSTCONSUMO*. Recuperado el 07 de 04 de 2021, de Consejo Colombiano de Construcción Sostenible: http://cccs.org.co/wp/wp-content/uploads/filebase/estudios_de_caso/otros/Tetra-Pak-ejemplo-de-reciclaje-postconsumo.pdf
- Diario Oficial de la Unión Europea. (05 de 12 de 2007). *COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS*. Obtenido de <http://www.apryma.com/normativa2011/reglamento-1441-2007-criterios-microbiologicos.pdf>
- El Tiempo. (03 de 02 de 2009). Invima lanzó nueva alerta sobre leche contaminada de Parmalat y ordenó congelar 2 lotes del producto. *El Tiempo*. Obtenido de <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-4791757>
- El Universo. (27 de Octubre de 2019). Ecuador es líder en el reciclaje de envases de Tetra Pak. *El Universo*. Obtenido de

<https://www.eluniverso.com/noticias/2019/10/24/nota/7573910/envases-tetra-pak-agua-ecuador/>

Enguix, C., Alborch, M., & Angel, J. (10 de 01 de 2010). *NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL ENVASADO ASÉPTICO DE PRODUCTOS LÍQUIDOS Y TRITURADOS*. Recuperado el 06 de 06 de 2021, de Guía Envase: <http://envases-barrera.guiaenvase.com/articulos-packaging-innovacion/sistemas-packaging-reutilizable-aseptico/nuevas-tecnologias-para-el-ensado-aseptico-de-productos-liquidos-y-triturados/>

Envapack. (03 de 04 de 2021). Envases. *Envapack*(11), 1. Obtenido de <https://www.envapack.com/2021/04/que-material-de-empaque-es-el-mejor-para-conservar-mi-producto/>

Envastick. (02 de 07 de 2018). *Envastick*. Recuperado el 05 de 05 de 2021, de Ventajas y desventajas del envasado de alimentos: <https://envastick.com/ventajas-y-desventajas-del-ensado-de-alimentos/>

Floros, J. D. (1993). *Tecnología de envasado aséptico* (3 ed.). Purdue. Obtenido de <https://docs.lib.purdue.edu/aseptic/>

Fuster, N. (15 de 12 de 2006). *Importancia del control Higiénico de Superficies Alimentarias*. Recuperado el 10 de 05 de 2021, de Universidad Autónoma de Barcelona: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5683/nfv1de1.pdf>

Gadman, A. (2004). *packaging*. Nobuko. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=_N4jimo8VdUC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Hoje em dia. (15 de 12 de 2016). Parmalat é condenada por adicionar soda cáustica e água oxigenada no leite. *Hoje em dia*. Obtenido de <https://www.hojeemdia.com.br/horizontes/parmalat-%C3%A9-condenada-por-adicionar-soda-c%C3%A1ustica-e-%C3%A1gua-oxigenada-no-leite-1.434545>

Jiménez Aviles, G., Pacheco Pacheco , M., Valdivia Barrientos , R., Pacheco Sotelo, J., & Colín Cruz , A. (1 de enero de 2017). *Control of a Dielectric Barrier Discharge Reactor based on Graphical System Design*. Obtenido de Revista Ingeniera : <https://www.revistaingenieria.unam.mx/numeros/2017/v18n1-02.pdf>

Locke, B. R. (2012). Elementary Chemical and 698 Physical Phenomena in Electrical Discharge Plasma in Gas–Liquid Environments and in Liquids. *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*.

Lopez, A., & Zapata, L. (1 de 07 de 2010). *Tecnología de Envasado y Conservación de Alimentos*. Recuperado el 22 de 05 de 2021, de Envasado y Conservacion: [https://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20\(1\).pdf](https://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20(1).pdf)

Medrano, A. (2012). *Envasado y presentación de productos de panadería y bollería*. IC. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=mU0pEAAAQBAJ&pg=PT25&dq=funciones+del+ensado+as%C3%A9ptico&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjV5bC9t6XxAhX-ElkFHZuiCj4Q6AEwAnoECACQAg#v=onepage&q=funciones%20del%20ensado%20as%C3%A9ptico&f=false>

- Ministerio de Salud del Ecuador. (1 de 07 de 2015). *Servicios de Restauración. Buenas Practicas de Manufactura*. Recuperado el 12 de 06 de 2021, de Servicio Ecuatoriano de Normalización: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_3039.pdf
- Muller, P. (1990). *Tecnologías de America del Norte para el procesamiento de alimentos* (1 ed.). IICA Biblioteca Venezuela,. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=SzShR3DcsHwC&dq=envasado+aseptico&source=gbs_navlinks_s
- Nelson, P. E. (Ed.). (2010). *Principles of Aseptic Processing and Packaging* (Tercera ed.). Philip E. Nelson.
- Nelson, P. E. (2010). Tecnología del envase aséptico. En *Principles of Aseptic Processing and Packaging* (3 ed., págs. 116-120). Philip E. Nelson. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=m97VRCEDfEUC&printsec=frontcover&dq=PRINCIPLES+OF+ASEPTIC+PROCESSING+AND+PACKAGING&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- PAHO. (12 de 12 de 2015). *Validación de procesos de desinfección*. Recuperado el 13 de 04 de 2021, de paho.org: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/ppt-Desinfeccion-de-alto-nivel-desafios-de-su-practica.pdf>
- Promega Corporation. (2009). Griess Reagent System. *Promega*, 1-8.
- Red Nacional de Laboratorio de Alimentos. (1 de 11 de 2014). *Microorganismos Indicadores*. Recuperado el 8 de 8 de 2021, de Microorganismos Indicadores: http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_iii.pdf
- Rees, J. A., & Bettison, J. (1994). *Procesado Térmico y Envasado de Los Alimentos*. Acribia S.A. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=usdJAAAACAAJ&dq=envasado+aseptico&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y
- Rohit Thirumdas, Anjinelyulu Kothakota, Uday Annapure, Kaliramesh Siliveru, Renald Blundell, Ruben Gatt, Vasilis P. Valdramidis. (02 de 05 de 2018). Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology*, 77(1), 21-31. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417305873>
- Sanz, I. M. (2019). *Envasado, acondicionado y embalaje de productos alimentarios*. CEP. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=MZCYDwAAQBAJ&dq=funciones+del+envasado+as%C3%A9ptico&source=gbs_navlinks_s
- Tetra Pack. (2021 de 2021). *Envasadora*. Recuperado el 11 de 04 de 2021, de <https://www.tetrapak.com/es-ec/solutions/packaging/filling-machines/tetra-pak-a1-for-tfa>
- Tetra pak. (2008). Recuperado el 04 de 04 de 2021, de <https://www.tetrapak.com/es-ec>
- Tetra Pak. (02 de 12 de 2020). *Enasadando Ideas*. Recuperado el 07 de 04 de 2021, de ENVASES INTELIGENTES CONECTAN A CLIENTES CON MARCAS:

<http://www.ervasandoideas.com/es/innovation/es-posible-un-envase-que-proteja-un-alimento-y-a-la-vez-este-conectado-y-sea-unico-a-la-vez.htm>

- Tetra Pak se convierte en la primera empresa de envases de cartón en lanzar pitillos de papel en Europa. (2019). *Revista Online Envapack*(1), 2. Recuperado el 07 de 04 de 2021, de Revista Online Envapack: <https://www.envapack.com/2019/08/tetra-pak-se-convierte-en-la-primera-empresa-de-envases-de-carton-en-lanzar-pitillos-de-papel-en-europa/>
- Thirumdas, R., Kothakota, A., Annapure, U., Siliveru, K., Blundell, R., Gatt, R., & Valdramidis, V. (2018). Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in food science & Technology*, 41-47.
- Trojan UV. (1 de 1 de 2021). *Proceso de Oxidación UV*. Recuperado el 08 de 08 de 2021, de Tratamiento de Contaminación Medioambiental: <https://www.trojanuv.com/es/aplicaciones/tratamiento-de-contaminaci%C3%B3n-medioambiental/>
- Warrick, W. D. (1990). *Aseptics: the problems revealed*. *Food Manufac.* (Vol. 65(6):49). Warrick D.
- Yepez, X., & Keener, K. (2016). High-voltage Atmospheric Cold Plasma (HVACP) hydrogenation of soybean oil without trans-fatty acids. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 169-174.

ANEXOS

ANEXO A

Resultados del análisis estadístico

Tabla 5
Desviación estándar de las muestras de E. coli - Ajuste para comparaciones múltiples – medias de mínimos cuadrados Tukey

| TYPE | TEMP | TRT | Count LSMEAN | Standard Error | Pr > t | LSMEAN Number |
|------|------|-----|--------------|----------------|---------|-----------------|
| H2O2 | 25 | C | 5.19000000 | 0.10009371 | <.0001 | 1 |
| H2O2 | 25 | T | 0.00000000 | 0.10009371 | 1.0000 | 2 ^a |
| H2O2 | 50 | C | 6.14500000 | 0.10009371 | <.0001 | 3 |
| H2O2 | 50 | T | 0.00000000 | 0.10009371 | 1.0000 | 4 ^a |
| H2O2 | 80 | C | 4.78000000 | 0.10009371 | <.0001 | 5 |
| H2O2 | 80 | T | -0.00000000 | 0.10009371 | 1.0000 | 6 ^a |
| PAW | 25 | C | 4.91000000 | 0.10009371 | <.0001 | 7 |
| PAW | 25 | T | -0.00000000 | 0.10009371 | 1.0000 | 8 ^a |
| PAW | 50 | C | 4.84000000 | 0.10009371 | <.0001 | 9 |
| PAW | 50 | T | -0.00000000 | 0.10009371 | 1.0000 | 10 ^a |
| PAW | 80 | C | 4.39000000 | 0.10009371 | <.0001 | 11 |
| PAW | 80 | T | 0.00000000 | 0.10009371 | 1.0000 | 12 ^a |

*Los valores de conteo de la Anexo 3 se realizaron por duplicado. Los valores seguidos por la letra a son las muestras que no representan diferencia estadística significativa en comparación con el método comúnmente utilizado para desinfección de materiales de empaque de llenado aséptico.

ANEXO B

Tabla 6
Medias de mínimos cuadrados para el efecto tipo de tratamiento, temperatura,
tipo de muestra para la hipótesis
E. coli.

| i/j | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | | 36.66449 <.0001 | - 6.74655 0.0008 | 36.66449 <.0001 | 2.896424 0.2512 | 36.66449 <.0001 | 1.978045 0.6996 | 36.66449 <.0001 | 2.472557 0.4307 | 36.66449 <.0001 | 5.651558 0.0037 | 36.66449 <.0001 |
| 2 | -36.6645 <.0001 | | - 43.411 <.0001 | 0 1.0000 | -33.7681 <.0001 | 0 1.0000 | -34.6864 <.0001 | 0 1.0000 | -34.1919 <.0001 | 0 1.0000 | -31.0129 <.0001 | 0 1.0000 |
| 3 | 6.746548 0.0008 | 43.41103 <.0001 | | 43.41103 <.0001 | 9.642972 <.0001 | 43.41103 <.0001 | 8.724593 <.0001 | 43.41103 <.0001 | 9.219105 <.0001 | 43.41103 <.0001 | 12.39811 <.0001 | 43.41103 <.0001 |
| 4 | -36.6645 <.0001 | 0 1.0000 | - 43.411 <.0001 | | -33.7681 <.0001 | 0 1.0000 | -34.6864 <.0001 | 0 1.0000 | -34.1919 <.0001 | 0 1.0000 | -31.0129 <.0001 | 0 1.0000 |
| 5 | -2.89642 0.2512 | 33.76806 <.0001 | - 9.64297 <.0001 | 33.76806 <.0001 | | 33.76806 <.0001 | -0.91838 0.9972 | 33.76806 <.0001 | -0.42387 1.0000 | 33.76806 <.0001 | 2.755135 0.3036 | 33.76806 <.0001 |
| 6 | -36.6645 <.0001 | 0 1.0000 | - 43.411 <.0001 | 0 1.0000 | -33.7681 <.0001 | | -34.6864 <.0001 | 0 1.0000 | -34.1919 <.0001 | 0 1.0000 | -31.0129 <.0001 | 0 1.0000 |
| 7 | -1.97805 0.6996 | 34.68644 <.0001 | - 8.72459 <.0001 | 34.68644 <.0001 | 0.918378 0.9972 | 34.68644 <.0001 | | 34.68644 <.0001 | 0.494511 1.0000 | 34.68644 <.0001 | 3.673513 0.0796 | 34.68644 <.0001 |
| 8 | -36.6645 <.0001 | 0 1.0000 | - 43.411 <.0001 | 0 1.0000 | -33.7681 <.0001 | 0 1.0000 | -34.6864 <.0001 | | -34.1919 <.0001 | 0 1.0000 | -31.0129 <.0001 | 0 1.0000 |
| 9 | -2.47256 0.4307 | 34.19193 <.0001 | - 9.2191 <.0001 | 34.19193 <.0001 | 0.423867 1.0000 | 34.19193 <.0001 | -0.49451 1.0000 | 34.19193 <.0001 | | 34.19193 <.0001 | 3.179002 0.1682 | 34.19193 <.0001 |
| 10 | -36.6645 <.0001 | 0 1.0000 | - 43.411 <.0001 | 0 1.0000 | -33.7681 <.0001 | 0 1.0000 | -34.6864 <.0001 | 0 1.0000 | -34.1919 <.0001 | | -31.0129 <.0001 | 0 1.0000 |
| 11 | -5.65156 0.0037 | 31.01293 <.0001 | - 12.3981 <.0001 | 31.01293 <.0001 | -2.75513 0.3036 | 31.01293 <.0001 | -3.67351 0.0796 | 31.01293 <.0001 | -3.179 0.1682 | 31.01293 <.0001 | | 31.01293 <.0001 |
| 12 | -36.6645 <.0001 | 0 1.0000 | - 43.411 <.0001 | 0 1.0000 | -33.7681 <.0001 | 0 1.0000 | -34.6864 <.0001 | 0 1.0000 | -34.1919 <.0001 | 0 1.0000 | -31.0129 <.0001 | |

ANEXO C

Tabla 7
Desviación estándar de las muestras *S. aureus*. - Ajuste para comparaciones múltiples – medias de mínimos cuadrados Tukey

| TYPE | TEMP | TRT | Count LSMEAN | Standard Error | Pr > t | LSMEAN Number |
|------|------|-----|--------------|----------------|---------|-----------------|
| H2O2 | 25 | C | 5.11000000 | 0.81717629 | <.0001 | 1 |
| H2O2 | 25 | T | -0.00000000 | 0.81717629 | 1.0000 | 2 ^a |
| H2O2 | 50 | C | 4.84000000 | 0.81717629 | <.0001 | 3 |
| H2O2 | 50 | T | -0.00000000 | 0.81717629 | 1.0000 | 4 ^a |
| H2O2 | 80 | C | 4.54000000 | 0.81717629 | 0.0001 | 5 |
| H2O2 | 80 | T | -0.00000000 | 0.81717629 | 1.0000 | 6 ^a |
| PAW | 25 | C | 5.28000000 | 0.81717629 | <.0001 | 7 |
| PAW | 25 | T | 2.00000000 | 0.81717629 | 0.0307 | 8 |
| PAW | 50 | C | 5.11500000 | 0.81717629 | <.0001 | 9 |
| PAW | 50 | T | -0.00000000 | 0.81717629 | 1.0000 | 10 ^a |
| PAW | 80 | C | 4.30000000 | 0.81717629 | 0.0002 | 11 |
| PAW | 80 | T | 2.00000000 | 0.81717629 | 0.0307 | 12 |

*Los valores de conteo de la tabla Anexo 5 se realizaron por duplicado. Los valores seguidos por la letra a son las muestras que no representan diferencia estadística significativa en comparación con el método comúnmente utilizado para desinfección de materiales de empaque de llenado aséptico.

ANEXO D

Tabla 8
Medias de mínimos cuadrados para el efecto tipo de tratamiento, temperatura,
tipo de muestra para la hipótesis S. aureus.

| i/j | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | | 4.421709 0.0245 | 0.233632 1.0000 | 4.421709 0.0245 | 0.493224 1.0000 | 4.421709 0.0245 | - 0.1471 1.0000 | 2.691099 0.3299 | -0.00433 1.0000 | 4.421709 0.0245 | 0.700897 0.9997 | 2.691099 0.3299 |
| 2 | -4.42171 0.0245 | | -4.18808 0.0354 | 0 1.0000 | -3.92849 0.0534 | 0 1.0000 | - 4.56881 0.0194 | -1.73061 0.8254 | -4.42604 0.0243 | 0 1.0000 | -3.72081 0.0739 | -1.73061 0.8254 |
| 3 | -0.23363 1.0000 | 4.188077 0.0354 | | 4.188077 0.0354 | 0.259592 1.0000 | 4.188077 0.0354 | - 0.38073 1.0000 | 2.457466 0.4383 | -0.23796 1.0000 | 4.188077 0.0354 | 0.467265 1.0000 | 2.457466 0.4383 |
| 4 | -4.42171 0.0245 | 0 1.0000 | -4.18808 0.0354 | | -3.92849 0.0534 | 0 1.0000 | - 4.56881 0.0194 | -1.73061 0.8254 | -4.42604 0.0243 | 0 1.0000 | -3.72081 0.0739 | -1.73061 0.8254 |
| 5 | -0.49322 1.0000 | 3.928485 0.0534 | -0.25959 1.0000 | 3.928485 0.0534 | | 3.928485 0.0534 | - 0.64033 0.9999 | 2.197875 0.5772 | -0.49755 1.0000 | 3.928485 0.0534 | 0.207673 1.0000 | 2.197875 0.5772 |
| 6 | -4.42171 0.0245 | 0 1.0000 | -4.18808 0.0354 | 0 1.0000 | -3.92849 0.0534 | | - 4.56881 0.0194 | -1.73061 0.8254 | -4.42604 0.0243 | 0 1.0000 | -3.72081 0.0739 | -1.73061 0.8254 |
| 7 | 0.147102 1.0000 | 4.568811 0.0194 | 0.380734 1.0000 | 4.568811 0.0194 | 0.640326 0.9999 | 4.568811 0.0194 | | 2.838201 0.2719 | 0.142775 1.0000 | 4.568811 0.0194 | 0.847999 0.9986 | 2.838201 0.2719 |
| 8 | -2.6911 0.3299 | 1.73061 0.8254 | -2.45747 0.4383 | 1.73061 0.8254 | -2.19787 0.5772 | 1.73061 0.8254 | - 2.8382 0.2719 | | -2.69543 0.3280 | 1.73061 0.8254 | -1.9902 0.6930 | 0 1.0000 |
| 9 | 0.004327 1.0000 | 4.426035 0.0243 | 0.237959 1.0000 | 4.426035 0.0243 | 0.49755 1.0000 | 4.426035 0.0243 | - 0.14278 1.0000 | 2.695425 0.3280 | | 4.426035 0.0243 | 0.705224 0.9997 | 2.695425 0.3280 |
| 10 | -4.42171 0.0245 | 0 1.0000 | -4.18808 0.0354 | 0 1.0000 | -3.92849 0.0534 | 0 1.0000 | - 4.56881 0.0194 | -1.73061 0.8254 | -4.42604 0.0243 | | -3.72081 0.0739 | -1.73061 0.8254 |
| 11 | -0.7009 0.9997 | 3.720812 0.0739 | -0.46726 1.0000 | 3.720812 0.0739 | -0.20767 1.0000 | 3.720812 0.0739 | -0.848 0.9986 | 1.990202 0.6930 | -0.70522 0.9997 | 3.720812 0.0739 | | 1.990202 0.6930 |
| 12 | -2.6911 0.3299 | 1.73061 0.8254 | -2.45747 0.4383 | 1.73061 0.8254 | -2.19787 0.5772 | 1.73061 0.8254 | - 2.8382 0.2719 | 0 1.0000 | -2.69543 0.3280 | 1.73061 0.8254 | -1.9902 0.6930 | |