

03-027

NEW METHODS FOR BIOFILM CONTROL IN THE FOOD INDUSTRY

Música Vidal, Rodolfo⁽¹⁾; Ramirez Aragon, Cristina⁽¹⁾; Muro Fraguas, Ignacio⁽¹⁾; Santamaria Olivera, Cristina⁽¹⁾; Alba Elías, Fernando⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidad de La Rioja

Conventional methods (chemical, physical or biological) of cleaning and disinfection of equipment and surfaces are effective for the control of bacteria in free-living state (or planktonic state). However, in many cases they are ineffective for the elimination of mature biofilms, since the cells that compose a biofilm are more resistant to different stress conditions and antimicrobial agents than the free-living cells. Therefore, once a biofilm is formed, the bacteria in it are extremely difficult to eliminate. For this reason, and because of the problems that the persistent colonization causes in processing plants, the control of the formation of biofilms is becoming the focus of attention for food producers. Due to the limitation of traditional anti-biofilm methods, new ALTERNATIVE METHODS, such as coatings with antimicrobial agents or coatings to modify the topography or the surface physico-chemical composition, are being developed by researchers in this field. The present communication describes the current biofilm control methods, their limitations and drawbacks, and shows the new control methods (ALTERNATIVE METHODS) that are based, among others, on plasma-polymerization technology using atmospheric plasma equipment.

Keywords: *Biofilm; Plasma-Polimerization; Food Industry*

NUEVOS MÉTODOS PARA EL CONTROL DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los métodos convencionales (químicos, físicos o biológicos) de limpieza y desinfección de equipos y superficies son eficaces para el control de bacterias en estado libre (o estado planctónico). Sin embargo, en numerosas ocasiones son ineficaces para la eliminación de biofilms maduros, ya que las células que componen un biofilm son más resistentes a diferentes condiciones de estrés y agentes antimicrobianos que las células en estado libre. Por tanto, una vez que se forma un biofilm, las bacterias en éste son extremadamente difíciles de eliminar. El control de la formación de biofilms se está convirtiendo en un foco de atención para los productores de alimentos por los problemas que la colonización persistente genera en las plantas de procesamiento. Debido a la limitación de los métodos anti-biofilm tradicionales, nuevos MÉTODOS ALTERNATIVOS están siendo desarrollados por los investigadores de este ámbito, como los recubrimientos con agentes antimicrobianos o los recubrimientos para la modificación de la topografía o composición físico-química superficial. La presente comunicación describe los actuales métodos de control de biofilm, sus limitaciones e inconvenientes y muestra los nuevos métodos de control (MÉTODOS ALTERNATIVOS), basados entre otras, en la tecnología de la plasma-polimerización empleando equipos de plasma atmosférico.

Palabras clave: *Biofilm; Plasma-Polimerización; Industria Alimentaria*

Correspondencia: Fernando Alba-Elías; fernando.alba@unirioja.es



©2018 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

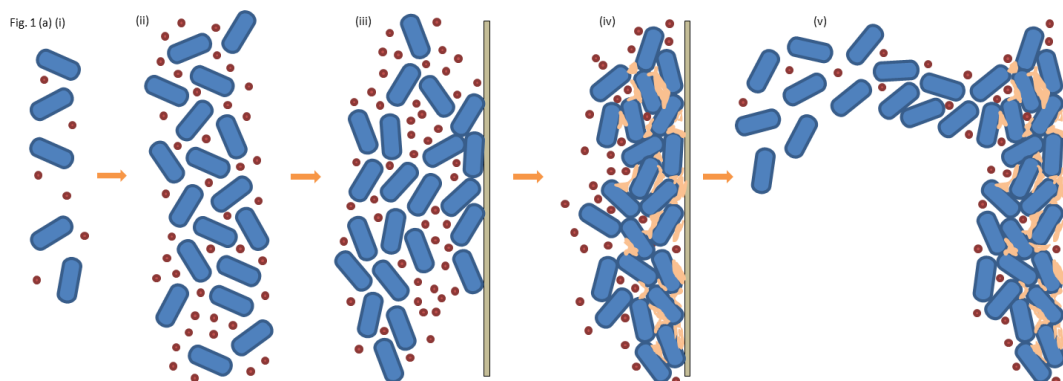
1. Introducción

La persistencia microbiana, definida como la supervivencia por períodos prolongados de tiempo en un determinado nicho ambiental, representa una gran preocupación para la industria alimentaria, ya que la colonización prolongada de ambientes, superficies y equipos de trabajo por microorganismos patógenos o alterantes puede conducir a la contaminación cruzada de los alimentos, con repercusiones importantes para la salud de los consumidores y pérdidas económicas ingentes para los productores.

Los equipos y superficies de contacto de la industria alimentaria se ven frecuentemente colonizados por microorganismos formando estructuras complejas llamadas biopelículas o biofilms, donde viven en consorcio (Figura 1). Una biopelícula es una comunidad microbiana que se caracteriza por la adhesión a una superficie sólida y por la producción de una matriz de polisacáridos extracelulares, proteínas y ADN, que rodea y protege las células microbianas. Esta matriz extracelular favorece la adhesión a superficies, protege a los microorganismos de condiciones ambientales adversas y de agentes antimicrobianos y les ayuda a captar nutrientes del medio para facilitar la proliferación microbiana (Coughlan, Cotter, Hill, & Alvarez-Ordoñez, 2016).

La eliminación adecuada de los biofilms en equipos de procesamiento y transformación y superficies de contacto con los alimentos juega un papel vital a la hora de garantizar un óptimo estado de calidad microbiológica de los mismos, ya que una vez que se forma un biofilm, éste actúa como un reservorio que puede liberar células en estado libre (o estado planctónico) de vuelta a las áreas circundantes, lo que resultará en episodios de contaminación cruzada de alimentos, con riesgos evidentes para la seguridad alimentaria (Li, 2016). El desarrollo de un biofilm tiene lugar en las siguientes etapas: las células bacterianas, una vez alcanzan una densidad de población óptima y mediante la activación de sistemas de comunicación intercelular o de quorum sensing, se adhieren a, y colonizan, las superficies sólidas en la etapa de fijación inicial, seguida por la proliferación, acumulación y maduración del biofilm. Una vez que se establece un biofilm maduro, éste forma una fuente persistente de diseminación y contaminación, porque las células bacterianas o secciones intactas del biofilm pueden separarse del mismo y migrar y colonizar otras superficies y equipos de trabajo (Ma et al., 2012).

Figura 1: Formación de biofilm sobre superficie sólida: (i) baja densidad de población (ii) alta densidad, activación de sistemas de quorum sensing (iii) adherencia a la superficie (iv) maduración del biofilm y producción de matriz polimérica extracelular (v) dispersión



Los patógenos transmitidos por los alimentos suponen una gran preocupación para la industria alimentaria. Debido a su naturaleza ubicua y, en ocasiones, psicrotrófica son organismos especialmente difíciles de controlar. Se ha demostrado que alguno de estos patógenos, como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, pueden formar biofilms en una variedad de materiales y superficies de contacto con alimentos y subsecuentemente pueden verse implicados como agentes de episodios de contaminación cruzada de producto final. De hecho, se ha descrito la persistencia de cepas de *L. monocytogenes* en ambientes de procesado de alimentos por períodos de tiempo de hasta más de diez años en queserías (Fox, Hunt, O'Brien, & Jordan, 2011; Lomonaco et al., 2009), plantas de producción de salmón (Wulff, Gram, Ahrens, & Vogel, 2006) o industrias de procesado de carne y productos cárnicos (Nesbakken, Kapperud, & Caugant, 1996; Ojeniyi, Christensen, & Bisgaard, 2000). Las fuentes más comunes de contaminación por este y otros microorganismos patógenos en instalaciones industriales incluyen equipos de procesamiento, superficies de trabajo, equipos transportadores, suelos, desagües y agua estancada. Se reconoce que, con los métodos de control y saneamiento actualmente disponibles (métodos convencionales), es imposible eliminar completamente estos patógenos del ambiente de procesamiento. Por lo tanto, se necesitan estrategias alternativas para minimizar el potencial de contaminación del producto final (métodos alternativos).

Los **métodos convencionales** (químicos, físicos o biológicos) de limpieza y desinfección de equipos y superficies son eficaces para el control de bacterias en estado libre (o estado planctónico). Sin embargo, en numerosas ocasiones son ineficaces para la eliminación de biofilms maduros, ya que las células que componen un biofilm son más resistentes a diferentes condiciones de estrés y agentes antimicrobianos que las células en estado libre. Por tanto, una vez que se forma un biofilm, las bacterias en éste son extremadamente difíciles de eliminar. El control de la formación de biofilms se está convirtiendo, por ello, en un foco de atención para los productores de alimentos, por los problemas que la colonización persistente genera en las plantas de procesamiento. Debido a la limitación de los métodos anti-biofilm tradicionales, **NUEVOS MÉTODOS ALTERNATIVOS** están siendo desarrollados por los investigadores de este ámbito, como los recubrimientos con agentes antimicrobianos o los recubrimientos para la modificación de la topografía o composición físico-química superficial.

2. Objetivos

La presente comunicación tiene como **objetivo** la descripción de los actuales métodos de control de biofilm, sus limitaciones e inconvenientes y muestra los nuevos métodos de control (MÉTODOS ALTERNATIVOS), basados entre otras, en la tecnología de la plasma-polimerización empleando equipos de plasma atmosférico. En relación con esta última tecnología, se describen sus principales características y las ventajas que éstas le confieren para considerar la misma como uno de los métodos antibiofilm con mayor potencial.

3. Métodos para el control de Biofilms en la Industria Alimentaria

3.1 Métodos convencionales

Los métodos convencionales (químicos, físicos o biológicos) de limpieza y desinfección de equipos y superficies son eficaces para el control de bacterias en estado libre (o estado planctónico). Sin embargo, se ha descrito en numerosas ocasiones que son a menudo ineficaces para la eliminación de biofilms maduros, ya que las células que componen un biofilm son más resistentes a diferentes condiciones de estrés y agentes antimicrobianos que las células en estado libre (Brelles-Mariño, 2012). Por tanto, una vez que se forma un biofilm, las células en éste son extremadamente difíciles de eliminar. El control de la formación de biofilms se está convirtiendo, por ello, en un foco de atención para los productores de

alimentos, por los problemas que la colonización persistente genera en las plantas de procesamiento. Los biocidas y desinfectantes son agentes antimicrobianos usados de forma rutinaria para el control microbiano en conducciones, equipos y líneas de procesamiento de alimentos (Li, 2016). Sin embargo, los biofilms microbianos muestran resistencias inusuales a muchos de estos agentes, ya sea por la expresión de determinantes genéticos de resistencia o por cambios fenotípicos adaptativos en células persistentes. Los hipocloritos, el dióxido de cloro, los yodóforos, el ácido peroxiacético y los compuestos de amonio cuaternario son desinfectantes comúnmente utilizados en las plantas de fabricación de alimentos. Su uso es estrictamente controlado, existiendo concentraciones máximas permitidas durante el proceso de desinfección. La aplicación de estos desinfectantes es bastante fácil y factible, lo que hace que este método sea el más utilizado por la industria agroalimentaria.

Otros métodos comunes de limpieza de equipos y superficies en la industria alimentaria, que también producen efectos inhibitorios, son el uso de agua caliente o vapor de agua a presión, en combinación o no con agentes antimicrobianos como el ácido láctico o cloro. Sin embargo, el tiempo de aplicación relativamente corto de estos agentes no es suficiente para eliminar o inactivar todas las bacterias en un biofilm. Otros agentes químicos, como el óxido de etileno, permiten la desinfección a baja temperatura, pero son mutágenos y carcinógenos o representan un riesgo ambiental y para la salud humana.

Debido a la limitación de los métodos anti-biofilm tradicionales, nuevos Métodos Alternativos están siendo desarrollados por los investigadores de este ámbito, como los recubrimientos con agentes antimicrobianos o los recubrimientos para la modificación de la topografía o composición físico-química superficial (Wang, Shen, & Haapasalo, 2014). A continuación, se describen los 3 métodos alternativos más importantes.

3.2 Métodos Alternativos

- **Agentes Anti-microbianos**

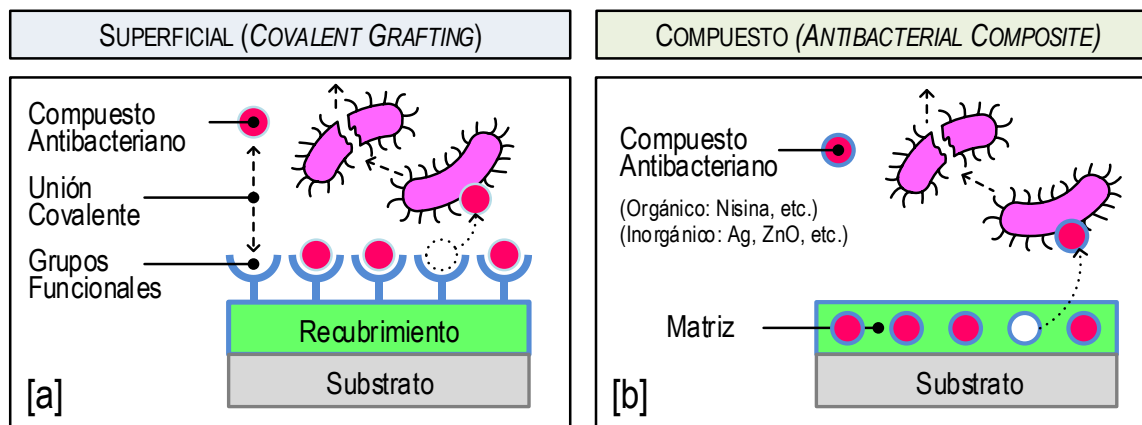
Una de las líneas de investigación más prometedoras se está centrando en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (de naturaleza química o biológica), capaces de inhibir la formación de biofilms o de eliminar biofilms ya formados y que carezcan de los inconvenientes previamente descritos para los métodos convencionales. En este grupo de agentes se pueden incluir distintos compuestos químicos de grado alimentario como ácidos orgánicos (acético, sórbico, benzoico, etc), nitratos, nitritos y sulfitos, así como distintos antimicrobianos de origen natural como aceites esenciales extraídos de plantas. También se están desarrollando estrategias basadas en el uso de enzimas líticas (proteasas, DNAsas, etc), capaces de degradar la matriz polimérica extracelular, o en la inhibición de los sistemas de quorum sensing, consiguiendo de este modo la inhibición de la formación de biofilms en sus primeras etapas. Por último, algunos grupos de investigación también están evaluando la eficacia de distintos métodos biológicos de control de biofilms, basados en la competición entre microorganismos. En este último grupo se puede incluir la utilización de bacteriocinas, como nisina y natamicina, o de bacteriófagos, siendo métodos muy específicos de lucha frente a biofilms formados por una/s determinada/s especie/s microbiana/s (Coughlan et al., 2016).

- **Recubrimientos Anti-microbianos**

En términos generales, utilizan agentes antimicrobianos que pueden estar **atrapados en el recubrimiento** (*organic/inorganic antibacterial composite*) para ser liberados de alguna manera predefinida tras la interacción con su entorno operativo o **inmovilizados sobre la superficie** (*covalent grafting*) para evitar la unión bacteriana y/o inactivar las células unidas, en contacto con la superficie. Un ejemplo de recubrimientos antimicrobianos son los polímeros unidos covalentemente, y superficies recubiertas con antibióticos (de interés en ámbitos hospitalarios, pero con pocas posibilidades de aplicación en industria alimentaria) o péptidos antimicrobianos (Bazaka, Jacob, Chrzanowski, & Ostrikov, 2015). La inserción

covalente (*covalent grafting*) de compuestos antibacterianos sobre superficies de biomateriales (**Figura 2a**) ha sido objeto de considerables investigaciones en la búsqueda de superficies antibacterianas con una eficacia duradera.

Figura 2: Esquema de Recubrimientos Antimicrobianos. [a] Superficial y [b] Compuesto

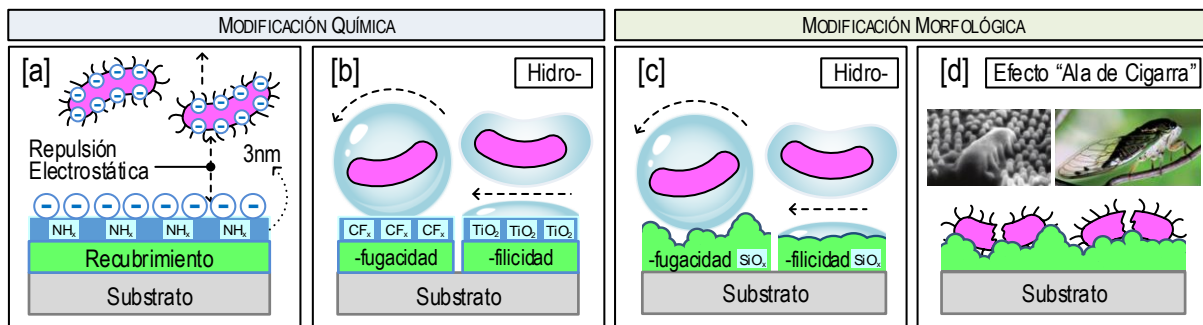


Cuando se busca la prevención de la colonización bacteriana durante cortos periodos de tiempo (días-semanas) se exige que los recubrimientos bioactivos liberen el agente antimicrobiano al medio circundante controlando tiempo o estímulos (**Figura 2b**). El agente antibacteriano puede ser una biomolécula con actividad antimicrobiana conocida, tal como lisozima o nisina, un compuesto de amonio cuaternario de uso común o un aceite natural (**organic antibacterial composite**). Por otro lado, se sabe que ciertos metales poseen propiedades bactericidas (**Figura 2b**), entre ellos plata, dióxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre (CuO), lo que ha permitido el desarrollo de una nueva generación de recubrimientos biocidas (**inorganic antibacterial composite**). Dependiendo de las propiedades del metal, su actividad biocida puede ser desencadenada por diferentes mecanismos, incluyendo la participación de los metales como co-factores catalíticos en la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Sardella, Palumbo, Camporeale, & Favia, 2016).

- **Recubrimientos para la modificación físico-química superficial**

La modificación físico-química de la superficie es una prometedora forma de combatir los biofilms (**Figura 3**). Como se ha mencionado anteriormente, la formación de un biofilm implica la unión o adhesión de células planctónicas a una superficie sólida. Por lo tanto, si la superficie donde se forma el biofilm es modificada en cierto grado, por ejemplo, modificando su morfología o sus propiedades físico-químicas (hidrofugacidad, hidrofiliidad, carga eléctrica, etc.) se puede evitar la adhesión microbiana y, consecuentemente, el posterior crecimiento y maduración del biofilm (Li, 2016). En los últimos años, con el desarrollo de nuevas herramientas de adquisición, análisis y visualización de datos, la comprensión de la estructura y funcionalidad de la superficie celular ha evolucionado y ha permitido esclarecer la influencia que distintas propiedades **físicas** y **químicas** tienen como factor clave de la regulación de las respuestas biológicas celulares durante la formación de biofilms. Como resultado de estos recientes desarrollos, se han diseñado varias estrategias de modificación que se basan en el **efecto sinérgico** de modificaciones **químicas** (grupos químicos hidrófobos o hidrófilos, electronegatividad, etc.) y de la **morfología** superficial (disposición jerárquica de nano- y micro-estructuras, rugosidad, etc.), para prevenir la fijación microbiana y la formación de biofilms (Bazaka et al., 2015). A continuación, se citan algunas experiencias en las que se han creado recubrimientos anti-biofilm a partir de la modificación físico-química de la superficie diana.

Figura 3: Esquema de recubrimientos Anti-Biofilm mediante modificaciones Químicas: [a] Repulsión Electroestática, [b] Hidrofugacidad e Hidrofilicidad y Físicas (Morfológicas): [c] Hidrofugacidad (“efecto hoja de loto”) e Hidrofilicidad y [d] “Efecto ala de cigarra”



En relación con la **electronegatividad** (Figura 3a), (Trentin et al., 2014; Zhong, Pang, Che, Wu, & Chen, 2013) han descrito experiencias exitosas de aplicación de recubrimientos cargados negativamente a partir de los cuales, aprovechando que muchas células bacterianas presentan una carga eléctrica negativa en superficie, se produce una fuerza de repulsión electrostática entre bacteria y recubrimiento que reduce su adhesión. Se ha comprobado que los recubrimientos **hidrófilos**, como los polímeros basados en polietilenglicol (PEG), presentan buena resistencia a la adhesión bacteriana. Tales propiedades anti-adhesivas se han atribuido a su capa altamente hidratada, que sirve como una barrera física y energética efectiva para evitar que microorganismos y proteínas se aproximen a la superficie (Saldarriaga Fernández et al., 2010). También los recubrimientos **hidrófobos** han sido propuestos por otros autores como superficies antibacterianas (Milella et al., 2009). Tanto la **hidrofobicidad** como la **hidrofilicidad** pueden ser provistas mediante modificaciones físicas (morfológicas) (Figura 3b) y/o químicas (Figura 3c) a partir de los recubrimientos aplicados. La humectabilidad de una superficie puede ser modificada químicamente mediante la deposición de moléculas específicas en los primeros 3nm del recubrimiento (CF_x : hidrofugacidad, TiO_2 : hidrofilicidad). También se han descrito superficies nanoestructuradas con efecto antimicrobiano independiente de la química superficial. La Figura 3d muestra la nano-estructura en la superficie en forma de “alas de la cigarra” (*Psaltoda claripennis*), que permite la destrucción de las bacterias en contacto basándose únicamente en su estructura superficial física. Aunque dichas estructuras no pueden evitar la adhesión microbiana, el contacto directo entre las células y las estructuras ordenadas de nano-pilares superficiales resulta en el estiramiento de la membrana celular y la ruptura celular (Bazaka et al., 2015).

3.3 Ventajas del método físico-químico respecto de los métodos antimicrobianos

De los métodos alternativos descritos con anterioridad, se estima que el empleo de RECUBRIMIENTOS PARA LA MODIFICACIÓN FÍSICO-QUÍMICA SUPERFICIAL (MÉTODO ALTERNATIVO C) aplicados mediante PLASMA-POLIMERIZACIÓN ATMOSFÉRICA FRÍA es el método más apropiado para su empleo en la industria alimentaria ya que no posee alguno de los inconvenientes propios de los métodos alternativos antimicrobianos (MÉTODOS A y B) como los que se indican a continuación:

- Los **desinfectantes y agentes antimicrobianos** (MÉTODO A) no son respetuosos con el medio ambiente, deben aplicarse diariamente después del empleo de equipos y líneas de trabajo, así como cada vez que hay un episodio de contaminación, requieren un tiempo relativamente largo de tratamiento y promueven la formación de cepas resistentes después de numerosas aplicaciones (Li, 2016).
- Los métodos basados en recubrimientos **antimicrobianos** (MÉTODO B) no son muy prácticos para las aplicaciones en industria a gran escala debido a su coste relativamente

alto. Estos métodos emplean técnicas de alta tecnología, no rentables y, a menudo, no duraderas, por lo que se requieren aplicaciones frecuentes, lo cual limita drásticamente su aplicación práctica (Li, 2016).

- En relación con la seguridad, los recubrimientos **antimicrobianos** (MÉTODO B) pueden producir fenómenos de **resistencia** bacteriana. Existen incluso varios trabajos en los que se ha descrito cómo concentraciones subinhibitorias de agentes bactericidas pueden inducir o mejorar la formación de biofilms (Ma et al., 2012; Trentin et al., 2014). Además, aunque la naturaleza del material resultante asegure un efecto antimicrobiano de larga duración, la adición del agente antibacteriano puede afectar negativamente a las propiedades fundamentales, estabilidad o procesabilidad del material (Bazaka et al., 2015). El método de **modificación físico-química** (MÉTODO C) superficial NO pretende la destrucción de los microorganismos para mitigar la colonización bacteriana, sino que únicamente interfiere en las interacciones superficie bacteriana-superficie material en las primeras fases de formación del biofilm, y por tanto no generaría fenómenos de resistencia (Trentin et al., 2014).
- Por último, frente a los recubrimientos **antimicrobianos** (MÉTODO B), los recubrimientos para la **modificación físico-química** superficial (MÉTODO C), NO son específicos de una cepa o especie bacteriana específica. La **modificación físico-química** superficial amplía la posibilidad de controlar la adhesión de varias especies y géneros bacterianos ya que no se dirige a una estructura o sustrato microbiano específico, a diferencia de muchos de los recubrimientos antimicrobianos.

4. Métodos para la aplicación de recubrimientos anti-biofilm

Con el nivel actual de desarrollo, los plasmas a baja temperatura proporcionan a los científicos un nivel de confianza comparable, y en muchos casos superior, a las técnicas de recubrimiento convencionales (Mundo et al., 2010). Son numerosos los trabajos sobre la aplicación de recubrimientos anti-biofilm mediante plasma en cámara, a baja o alta presión. En todos los casos, estas experiencias se han realizado a escala de laboratorio. Sin embargo, existen muy pocas experiencias documentadas sobre la aplicación de **recubrimientos anti-biofilm** (por **modificación superficial**) mediante técnicas de **plasma-polimerización fría a presión atmosférica**. Entre los trabajos en los que se han aplicado estos recubrimientos (mediante plasma-polimerización fría a presión atmosférica) se encuentran los trabajos de (G. Da Ponte et al., 2011; Gabriella Da Ponte et al., 2012), sin embargo, en ninguno de ellos se mide la capacidad anti-biofilm de los recubrimientos obtenidos, sino que únicamente se identifica su potencial a partir de su caracterización físico-química superficial.

4.1 Ventajas de plasma-polimerización fría respecto de otros métodos de deposición

A diferencia de las técnicas de deposición convencionales (CVD, deposición química húmeda, plasma a alta/baja presión, etc), la técnica de deposición mediante plasma-polimerización a baja temperatura (fría) supone:

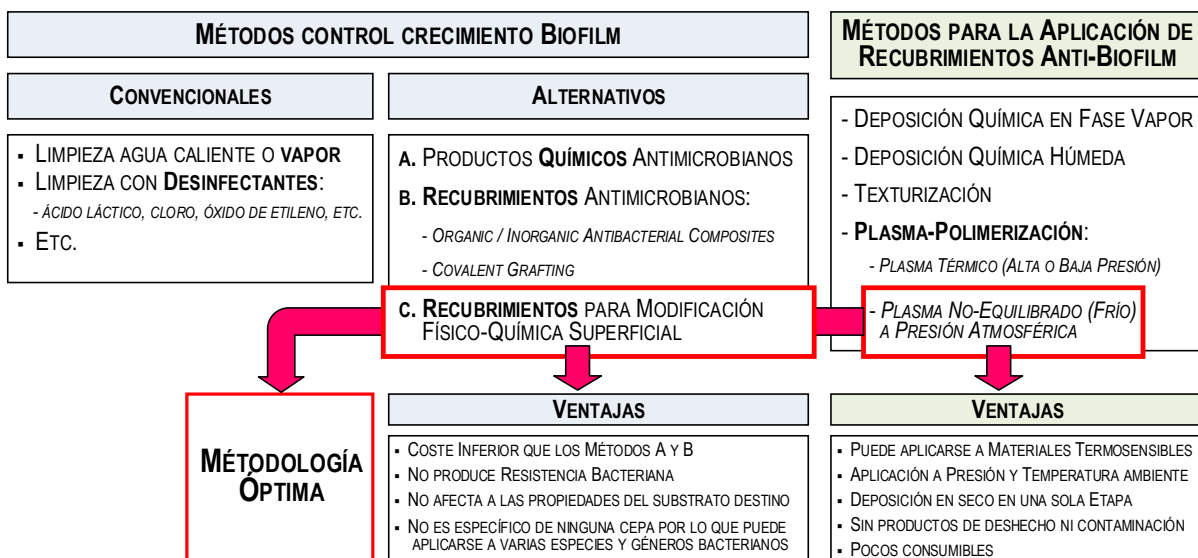
- Una técnica de deposición seca por la que se aplica un recubrimiento en una única etapa para proveer de propiedades funcionales a la superficie diana sin afectar las propiedades de los sustratos.
- Un proceso respetuoso con el medio ambiente, ya que no se producen productos químicos de desecho.
- Una tecnología económica, ya que el gasto de consumibles es relativamente bajo puesto que se aplican recubrimientos de espesores de escala nano o micro.
- Debido al procedimiento de ionización del gas del plasma (plasma no equilibrado o frío),

el proceso de deposición se realiza a presión atmosférica y la temperatura del sustrato destino no supera los 100°C. De esta forma, se evitan alteraciones no deseadas en las propiedades del sustrato.

- Se puede llevar a cabo un control de las características de los recubrimientos obtenidos en función del tipo de precursor utilizado y de los parámetros del proceso (flujo de gas, potencia suministrada, etc), lo que permite que se pueda mejorar la superficie del sustrato de manera específica manteniendo el resto de propiedades sin alterar (Sainz-García, Alba-Elías, Múgica-Vidal, & González-Marcos, 2017).

Con el objeto de clarificar los 2 apartados anteriores, en la **Figura 4** se muestra un esquema de los **métodos** para el control de la formación y crecimiento de biofilms y de los **métodos** para la aplicación de recubrimientos anti-biofilm, así como las ventajas de estos respecto del resto de las alternativas disponibles. Todos estos aspectos han determinado que en la presente comunicación se proponga como óptimo el empleo del **método de plasma-polimerización atmosférica fría para la modificación Físico-Química de superficies industriales con el objetivo de controlar la formación de biofilms**.

Figura 4: Esquema de los Métodos para el control del crecimiento del Biofilm y de los Métodos para la aplicación de recubrimientos Anti-biofilm



5. Plasma-polimerización de recubrimientos anti-biofilm

5.1 Plasma atmosférico frío (atmospheric cold plasma)

El plasma es el estado que alcanza un gas cuando se le aporta una cantidad de energía que logra ionizar sus moléculas y átomos. Es decir, el paso de la materia de estado gaseoso a estado de plasma se produce mediante una disociación de enlaces moleculares, acompañada de un aumento o disminución de los electrones de los átomos, lo que da lugar a la formación de iones con carga positiva o negativa. En función de si se da o no un equilibrio térmico entre las partículas del plasma, se distingue el plasma térmico del frío.

Un plasma frío o no equilibrado es aquel en el que la temperatura de los electrones (5000–10⁵ °C) es mucho mayor que la de las partículas más pesadas (partículas neutras e iones), las cuales se encuentran a temperaturas próximas a la del ambiente (25–100°C). De esta forma, la temperatura de un plasma frío se mantiene generalmente por debajo de los 100°C,

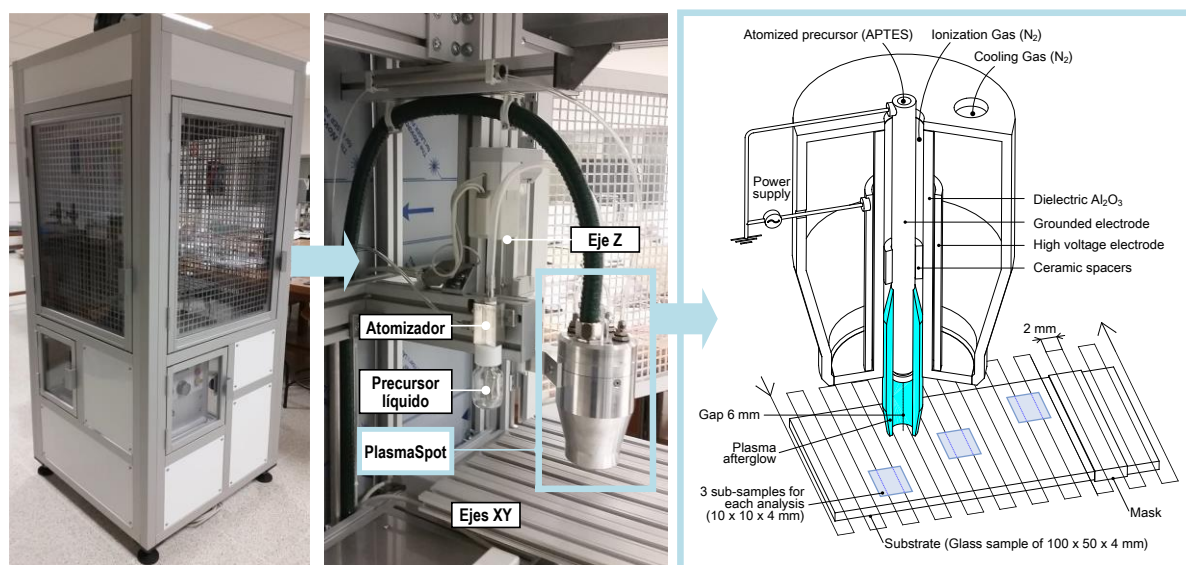
lo que le permite ser empleado en tratamientos superficiales sobre gran variedad de materiales sin provocar su deterioro por un calentamiento excesivo (Múgica-Vidal, Alba-Elías, Sainz-García, & González-Marcos, 2017). La generación de plasma frío se puede llevar a cabo a presión atmosférica en un entorno abierto, es decir, no requieren la utilización de sistemas de vacío ni cámaras dentro de las cuales se establezcan unas condiciones concretas. Estas características dotan a la tecnología de plasma atmosférico frío de una gran versatilidad, relativa simplicidad y bajo coste (Sainz-García et al., 2017). Desde el punto de vista de su aplicación industrial, el plasma se ha convertido en una importante herramienta para llevar a cabo multitud de tratamientos superficiales.

Una de las principales modificaciones a las que puede someterse la superficie de un sustrato tratada con plasma es la “Plasma-Polimerización”. Esta modificación consiste en la deposición de recubrimientos finos utilizando monómeros en estado líquido como precursores, a través su exposición al flujo de plasma. Esta técnica de deposición ha crecido en interés durante los últimos años debido a su gran cantidad de ventajas, que ya fueron expuestas en el apartado de “ventajas de plasma-polimerización fría respecto de otros métodos de deposición”. Esta versatilidad abre un amplio abanico de posibilidades para modificar las propiedades funcionales en la superficie del sustrato, ya que permite, entre otras capacidades, modificar tanto la morfología de la superficie como su composición química.

5.2 Ventajas de plasma-polimerización fría respecto de otros métodos de deposición

Para la aplicación de los recubrimientos anti-biofilm (método plasma-polimerización), existen equipos de plasma atmosférico no equilibrado o frío (Atmospheric Pressure Plasma Jet, APPJ). La selección de los distintos precursores a ser depositados y parámetros operativos del plasma (Variables de Entrada), determinan las características específicas del recubrimiento obtenido. Esta versatilidad es de vital importancia cuando se pretenden modificar de una manera específica las propiedades físico-químicas de los recubrimientos superficiales. Otra característica que hace muy atractiva esta tecnología es que opera a temperatura ambiente y a presión atmosférica, lo que facilita en gran medida su posible aplicación en líneas de producción ya existentes.

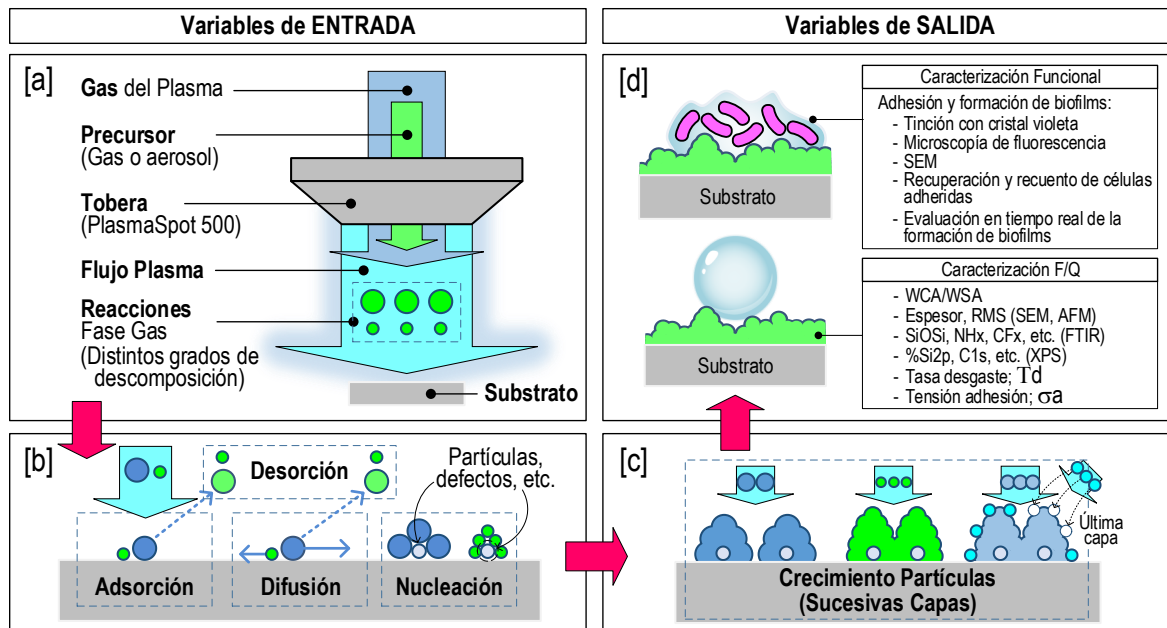
Figura 5: Equipo de Plasma-polimerización de la Universidad de La Rioja



Los autores de la presente comunicación disponen de un equipo APPJ (Figura 5) que consiste en dos electrodos coaxiales, entre los cuales circula el gas que generará el plasma. El

electrodo interior está conectado a tierra, mientras que el exterior es excitado con una determinada frecuencia (corriente de alta tensión). A través del electrodo interior se introduce el precursor (gas o líquido atomizado) hasta la zona de actuación del plasma. En ese momento, el precursor se transforma según las reacciones de la fase gas del plasma. La Figura 6 muestra las diferentes fases del proceso de plasma-polimerización (PP) y formación de un recubrimiento.

Figura 6: Esquema del mecanismo de crecimiento de un recubrimiento mediante PP



En la zona entre la tobera y el substrato se producen una serie de reacciones químicas complejas en fase gas que dan lugar a pequeños fragmentos, iones y radicales. Estas partículas son transportadas por difusión del gas hasta la superficie del substrato a la que llegan con cierta energía, interaccionando con la misma y quedando adsorbidas. Posteriormente las partículas adsorbidas difunden por la superficie distribuyéndose entre diferentes posiciones hasta encontrar una de mayor energía (escalones, defectos, etc.), donde quedan enlazadas con la superficie, iniciando un sitio de nucleación (Figura 6b y c). Tanto en el proceso de adsorción como en el de difusión existe la posibilidad de desorción. A continuación, comienza el proceso de desarrollo de los recubrimientos según el mecanismo de crecimiento de, por ejemplo, Volmer-Weber en tres fases: [a] nucleación: formación de agregados de partículas; [b] crecimiento del núcleo: tanto por adsorción de núcleos pequeños por otros mayores como por coalescencia (fusión de dos núcleos); y [c] contacto entre núcleos y llenado de vacíos. Este proceso de crecimiento se detiene cuando se obtiene la morfología deseada (Figura 6d).

5. Conclusiones

En la presente comunicación se ha descrito el potencial de una novedosa técnica, la aplicación de recubrimientos mediante plasma-polimerización, con la que es posible la modificación superficial de materiales de la industria alimentaria con el objeto de reducir la adhesión microbiana y, consecuentemente, la formación de biofilms por microorganismos alterantes y patógenos, lo que permitiría limitar al máximo los fenómenos de contaminación cruzada y aumentar la vida útil e inocuidad de los alimentos.

6. Referencias

- Bazaka, K., Jacob, M. V., Chrzanowski, W., & Ostrikov, K. (2015). Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification. *RSC Adv.*, 5(60), 48739–48759.
- Brelles-Mariño. (2012). Challenges in Biofilm Inactivation: The Use of Cold Plasma as a New Approach. *J Bioprocess Biotechniq*, 2(4).
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordoñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–21.
- Da Ponte, G., Sardella, E., Fanelli, F., D'Agostino, R., Gristina, R., & Favia, P. (2012). Plasma deposition of PEO-like coatings with aerosol-assisted dielectric barrier discharges. *Plasma Processes and Polymers*, 9(11–12), 1176–1183.
- Da Ponte, G., Sardella, E., Fanelli, F., Van Hoeck, A., d'Agostino, R., Paulussen, S., & Favia, P. (2011). Atmospheric pressure plasma deposition of organic films of biomedical interest. *Surface and Coatings Technology*, 205(SUPPL. 2), S525–S528.
- Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., & Jordan, K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145(SUPPL. 1), S39–S45.
- Li, L. (2016). *Prevention of biofilm formation on food contact surfaces by nanoscale plasma coatings*. University of Missouri-Columbia.
- Lomonaco, S., Decastelli, L., Nucera, D., Gallina, S., Manila Bianchi, D., & Civera, T. (2009). *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 516–520.
- Ma, Y., Chen, M., Jones, J. E., Ritts, A. C., Yu, Q., & Sun, H. (2012). Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by trimethylsilane plasma coating. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5923–5937.
- Milella, A., Di Mundo, R., Palumbo, F., Favia, P., Fracassi, F., & d'Agostino, R. (2009). Plasma nanostructuring of polymers: Different routes to superhydrophobicity. *Plasma Processes and Polymers*, 6(6–7), 460–466.
- Múgica-Vidal, R., Alba-Elías, F., Sainz-García, E., & González-Marcos, A. (2017). Reducing friction on glass substrates by atmospheric plasma-polymerization of APTES. *Surface and Coatings Technology*, 309, 1062–1071.
- Mundo, R. Di, Gristina, R., Sardella, E., Intranuovo, F., Nardulli, M., Milella, A., ... Favia, P. (2010). Micro-/nanoscale structuring of cell-culture substrates with fluorocarbon plasmas. *Plasma Processes and Polymers*, 7(3–4), 212–223.
- Nesbakken, T., Kapperud, G., & Caugant, D. A. (1996). Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1–3), 161–171.
- Ojeniyi, B., Christensen, J., & Bisgaard, M. (2000). Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 303–8.
- Sainz-García, E., Alba-Elías, F., Múgica-Vidal, R., & González-Marcos, A. (2017). Antifriction aminopropyltriethoxysilane films on thermoplastic elastomer substrates using an APPJ system. *Surface and Coatings Technology*, 310, 239–250. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.12.079>

- Saldarriaga Fernández, I. C., Mei, H. C. van der, Metzger, S., Grainger, D. W., Engelsman, A. F., Nejadnik, M. R., & Busscher, H. J. (2010). In vitro and in vivo comparisons of staphylococcal biofilm formation on a cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coating. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1119–1124.
- Sardella, E., Palumbo, F., Camporeale, G., & Favia, P. (2016). Non-equilibrium plasma processing for the preparation of antibacterial surfaces. *Materials*, 9(7), 1–24.
- Trentin, D. S., Bonatto, F., Zimmer, K. R., Ribeiro, V. B., Antunes, A. L. S., Barth, A. L., ... Macedo, A. J. (2014). N₂/H₂ plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. *Surface and Coatings Technology*, 245(April), 84–91.
- Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2014). Dental materials with antibiofilm properties. *Dental Materials*, 30(2), e1–e16.
- Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P., & Vogel, B. F. (2006). One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4313–4322.
- Zhong, L. J., Pang, L. Q., Che, L. M., Wu, X. E., & Chen, X. D. (2013). Nafion coated stainless steel for anti-biofilm application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 252–256.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad a través del proyecto AGL2017-82779-C2-1-R