

Evaluación de las variables de producción, estabilidad y actividad biocida del ácido hipocloroso obtenido por electrólisis para su uso como desinfectante.

Pedro Andrey Gómez Pabón

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico
Modalidad Práctica Empresarial

Directora

Débora Alcida Nabarlatz

Doctora en Ingeniería Química y de Procesos

Tutora y Codirectora

Jane Angélica Neira Dulcey

Candidata a Magíster en Química

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2023

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia por su constante apoyo y motivación, a mi directora y codirectora por la guía y valiosos comentarios, a mis amigos y compañeros, por su amistad y colaboración; a la Universidad Industrial de Santander por brindarme la oportunidad de la formación académica, a Zumo Tecnología Zumotec, por brindarme la oportunidad de realizar la práctica empresarial en sus instalaciones.

Contenido

Introducción	8
1. Objetivos	10
1.1 Objetivo general	10
1.2 Objetivos específicos	10
2. Marco conceptual	11
2.1 Ácido hipocloroso	11
2.1.1 Definición	11
2.1.2 Historia	11
2.1.3 Ácido hipocloroso en el organismo	12
2.1.4 Producción química de ácido hipocloroso	13
2.1.5 Acción antimicrobiana del ácido hipocloroso	15
3. Estado del arte	17
4. Descripción metodológica	19
4.1 Evaluación de parámetros de producción en la generación de ácido hipocloroso	19
4.1.1 Preparación de las soluciones de estudio	20
4.1.2 Caracterización de las soluciones de ácido hipocloroso	20
4.1.3 Análisis estadístico	22
4.2 Evaluación de parámetros de producción en la estabilidad del ácido hipocloroso	22
4.2.1 Monitoreo de la degradación de la solución de ácido hipocloroso	22
4.3 Evaluación de parámetros de producción en la actividad biocida de ácido hipocloroso	23
4.3.1 Preparación del inóculo	23
4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo	24
5. Resultados	25
5.1 Evaluación de parámetros de producción en la generación de ácido hipocloroso	25
5.2 Evaluación de parámetros de producción en la estabilidad de ácido hipocloroso	31
5.3 Evaluación de actividad biocida del ácido hipocloroso	34
6. Conclusiones	36
Referencias bibliográficas	37
Apéndices	40

Lista de tablas

Tabla 1 Concentración mínima bactericida ($\mu\text{g/mL}$) en un amplio rango de microorganismo evaluados a temperatura ambiente por 60 min.	16
Tabla 2 Diseño experimental	20
Tabla 3 Datos obtenidos de los experimentos realizados.....	25

Lista de figuras.**Pág.**

Figura 1 Representación esquemática de la producción intracelular de HClO en el estallido respiratorio.....	13
Figura 2 Esquema de la generación de HClO.....	15
Figura 3 Modelo que ilustra el mecanismo de acción germicida del HOCl y del ión ClO ⁻ , basado en su capacidad de penetrar la membrana de la célula microbiana	35

Lista de apéndices**Pág.**

Apéndice A. <i>Análisis de varianza ANOVA para el diseño experimental realizado para la concentración de cloro libre (CLL)</i>	40
---	----

Resumen

Título: Evaluación de las variables de producción, estabilidad y actividad biocida del ácido hipocloroso obtenido por electrólisis para su uso como desinfectante. *

Autor: Pedro Andrey Gómez Pabón**

Palabras clave: Electrólisis, ácido hipocloroso, estabilidad, actividad bactericida.

Descripción: En la actualidad las infecciones asociadas a los dispositivos (IAD) es una problemática de salud pública, pues debido a que el uso frecuente de desinfectantes ha permitido que las bacterias desarrollen resistencia a éstos. Con el objetivo de disminuir la resistencia microbiana, la empresa Zumotec S.A desea desarrollar un nuevo desinfectante que consta de ácidohipocloroso (HClO) para ello desea mejorar su proceso de producción de ácido hipocloroso, por esa razón en este trabajo se estudia la significancia de factores como la concentración de sal, tiempo de electrólisis y pH en la generación y estabilidad del ácido hipocloroso producido por electrolisis con el objetivo de optimizar las condiciones de producción. Por medio de un diseño factorial se obtuvo que los factores estudiados tienen significancia en las variaciones de las propiedades fisicoquímicas de las soluciones obtenidas (concentración de cloro libre (CLL), pH y ORP) siendo el tiempo de tratamiento el más influyente en estos cambios; sin embargo, la estabilidad no se ve afectada por las condiciones de producción dando una degradación promedio de la CLL del 70 % en un periodo de 15 días. Las mejores condiciones de producción se obtuvieron a una concentración de sal de 50 g/L, con pH 5 y tiempo de reacción de 180 minutos. La actividad bactericida se evaluó por medio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en *Escherichia coli* usando el método de la microdilución en caldo siendo la CMI de 6,2 µg/mL.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora Débora Alcida Nabarlatz. Doctora en Ingeniería Química y de Procesos. Codirectora Jane Angelica Neira. Candidata a Magíster en Química.

Summary

Title: Evaluation of the variables of production, stability and biocidal activity of hypochlorous acid obtained by electrolysis for use as a disinfectant. *

Author: Pedro Andrey Gómez Pabón**

Keywords: Electrolysis, hypochlorous acid, stability, bactericidal activity.

Description: At present, device-associated infections (IAD) is a public health problem, because the frequent use of disinfectants has allowed bacteria to develop resistance to them. With the aim of reducing microbial resistance, the company Zumotec S.A wants to develop a new disinfectant that consists of hypochlorous acid (HClO), for which it wants to improve its production process of hypochlorous acid, for that reason, in this work the significance of factors is studied. such as salt concentration, electrolysis time and pH in the generation and stability of hypochlorous acid produced by electrolysis in order to optimize production conditions. By means of a factorial design it was obtained that the factors studied have significance in the variations of the physicochemical properties of the solutions obtained (free chlorine concentration (FLC), pH and ORP) being the treatment time the most influential in these changes; however, stability is not affected by production conditions giving an average CLL degradation of 70% over a period of 15 days. The best production conditions were obtained at a salt concentration of 50 g/L, with pH 5 and a reaction time of 180 minutes. The bactericidal activity was evaluated by means of the minimum inhibitory concentration (MIC) in Escherichia coli using the broth microdilution method, the MIC being 6.2 µg/mL.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora Débora Alcida Nabarlatz. Doctora en Ingeniería Química y de Procesos. Codirectora Jane Angelica Neira. Candidata a Magíster en Química.

Introducción.

Uno de los problemas más importantes del siglo XXI son las infecciones causadas por los microorganismos resistentes a los antibióticos y desinfectantes, debido a que son difíciles de diagnosticar, e involucran tratamientos largos, complejos y costosos (Calderón, 2010). Las Infecciones Asociadas a Dispositivos (IAD) están relacionadas a Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) consideradas una problemática de salud mundial, donde alrededor de 1 millón de personas contraen este tipo de infecciones. En el año 2021, en Colombia se registraron 1357 casos de IAD causadas por bacterias Gram positivas y negativas, siendo la levadura *Candida albicans* la responsable del 75% de las infecciones fúngicas (Romero Pineda, 2021).

La OMS ha incentivado la creación de nuevos compuestos para protocolos de desinfección adecuados que ayuden al control y prevención de los microorganismos causantes de este tipo de infecciones (Calderón, 2010). El ácido hipocloroso (HClO) hace parte de los biocidas conocidos como moléculas antimicrobianas no antibióticas, que pueden ser usadas en procesos de desinfección y prevención de un extenso número de infecciones (Calderón, 2010). Existen formas para producirlo “in vitro” como hidrólisis del gas cloro, electrólisis de solución salina y acidificación de hipoclorito (Castillo Torres, 2020). El más implementado es la electrólisis de una solución salina debido a la facilidad del proceso porque se usa NaCl disuelto en agua, y no es necesario el almacenamiento de químicos peligrosos (Nakagawara et al., 1998). El proceso de producción de ácido hipocloroso está influenciado por

factores característicos del agua alimentada, como dureza, materia orgánica, temperatura, pH, concentración de la sal, tipo de electrolito, densidad de corriente, caudales de agua alimentada y del electrolito. En términos de estabilidad y eficiencia influyen factores como pH, ORP (potencial de oxido-reducción) y condiciones de almacenamiento (Ampiauw et al., 2021).

Zumo Tecnología Zumotec SA es una empresa de base tecnológica situada en la ciudad de Bucaramanga con más de dos décadas de experiencia en la investigación y desarrollo de soluciones innovadoras. Su enfoque principal se centra en la creación de productos de higiene y desinfección, utilizando materias primas vegetales que son seguras tanto para la salud como para el medio ambiente. Entre sus productos de la línea de limpieza encontramos el CITRILAC, desinfectante de superficies, frutas y verduras, que consiste en una solución acuosa que contiene ácidos orgánicos, ácido hipocloroso, y un biotensioactivo no iónico, diseñado para remover la suciedad, higienizar y sanitizar todo tipo de agentes infecciosos en frutas, verduras, hortalizas y superficies.

En el presente trabajo se evaluarán entonces las variables de producción en la generación, estabilidad y actividad biocida del HClO obtenido por electrólisis con el objetivo de determinar condiciones óptimas de producción de ácido hipocloroso, para un potencial desarrollo de un agente de desinfección en la empresa Zumo Tecnología Zumotec SA, que contiene HClO como una alternativa a los compuestos antimicrobianos tradicionales, que permitirá eliminar y/o reducir la resistencia antimicrobiana.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

- Evaluar las variables de producción en la generación, estabilidad y actividad biocida del ácido hipocloroso obtenido por electrólisis.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar las variables de producción como tiempo de electrólisis, concentración de sal y pH del agua en la generación de ácido hipocloroso.
- Evaluar la estabilidad del ácido hipocloroso mediante la cinética de disminución de cloro total en agua.
- Evaluar la actividad biocida del ácido hipocloroso determinando la concentración mínima inhibitoria en *Escherichia Coli*.

2. Marco conceptual.

2.1 Ácido hipocloroso.

2.1.1 *Definición.*

El ácido hipocloroso es un compuesto químico que se forma cuando el óxido ácido de clorose combina con agua. Este compuesto recibe su nombre debido a que el cloro está presente en su estado de oxidación más bajo, que es +1, su fórmula molecular es HClO y posee un peso molar de 52,46 g/mol (Cevallos Guerrero, 2014). Es un poderoso agente oxidante el cual en solución acuosa se disocia a H^+ y OCl^- teniendo la capacidad de desnaturalizar proteínas y destruir virus mediante la formación de cloroaminas (Block & Rowan, 2020).

2.1.2 *Historia.*

Durante la Primera Guerra Mundial, Alexis Carrel y Henry Dakin desarrollaron una solución conocida como la solución de Dakin, la cual consistía en una mezcla de hipoclorito de sodio acidificado y tamponado. Esta solución se utilizaba para desinfectar heridas y fue la primera vez que se mencionó el uso de desinfectantes clorados. La solución de Dakin generaba concentraciones óptimas de ácido hipocloroso (HClO), que resultaron ser efectivas en el tratamiento de heridas al preservar las propiedades terapéuticas y eliminar infecciones potenciales en el proceso de cicatrización. Sin embargo, esta solución perdió vigencia debido a su baja estabilidad y al costoso método de preparación que dificultaba su producción a

gran escala (Fuentes Lagla, 2018).

A finales del siglo XX, Stephen J. Weiss determinó la capacidad bactericida del ácido hipocloroso liberado por los neutrófilos, demostrando que la activación de 0,6 neutrófilos durante una incubación de 2 horas podría generar una cantidad de HClO suficiente para destruir 150 millones de bacterias E. Coli. En Colombia, se logró obtener una molécula de ácido hipocloroso con una estabilidad superior a los 12 meses, lo que permitió desarrollar una formulación farmacéutica conocida como Neutroderm. Esta solución antiséptica se utiliza en el cuidado de heridas en miembros inferiores, como úlceras, traumas venenosos y pie diabético. El producto fue desarrollado por laboratorios AQUILABS S.A (Cevallos Guerrero, 2014).

2.1.3 Ácido hipocloroso en el organismo.

El ácido hipocloroso (HClO) es una de las sustancias antimicrobianas no antibióticas presentes en el sistema inmunológico humano. Se produce de forma natural en el fagosoma de los neutrófilos, macrófagos y células de Von Kuppfer durante un proceso llamado estallido respiratorio, que ocurre como resultado de la fagocitosis tal como se muestra en la figura 1.

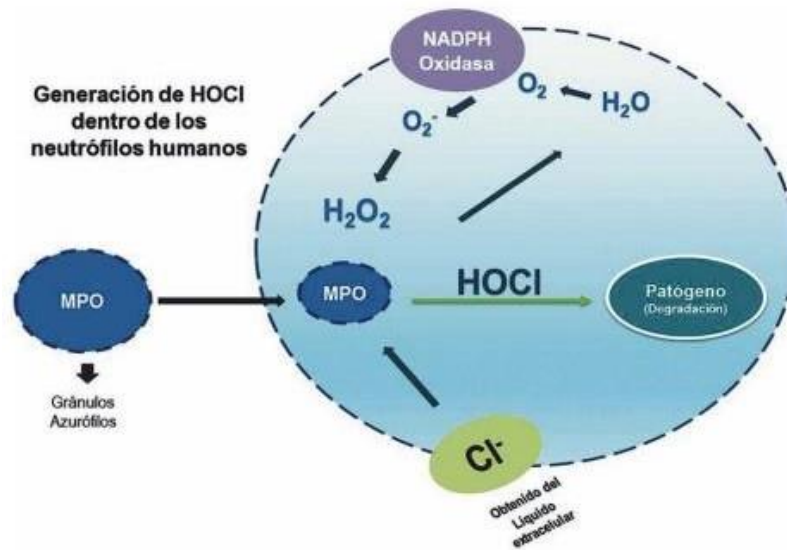
En este proceso, la enzima NADPH oxidasa facilita la formación de peróxido de hidrógeno mediante la interacción entre el oxígeno molecular y la enzima. Posteriormente, la enzima mieloperoxidasa cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el cloro, lo que resulta en la formación de ácido hipocloroso.

Estas interacciones reactivas tienen lugar en el lumen del fago lisosoma, donde la acidez aumenta a medida que avanza el proceso. Esto permite estabilizar y optimizar la actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso, contribuyendo así a la

capacidad del sistema inmunológico para combatir las infecciones microbianas (Fuentes Lagla, 2018).

Figura 1

Representación esquemática de la producción intracelular de HClO en el estallidorespiratorio.

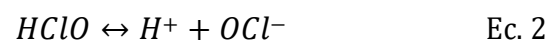
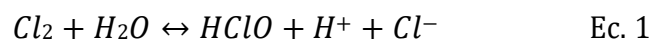


Nota: tomado de (Fuentes Lagla, 2018).

2.1.4 Producción química de ácido hipocloroso.

2.1.4.1 Hidrólisis de gas cloro.

Cuando el gas de cloro se añade al agua se producen dos reacciones:



La Reacción N° 1 es la correspondiente a la hidrólisis del gas cloro; debido a que la constante de equilibrio de esta reacción es grande es posible que se puedan disolver grandes cantidades de cloro en el agua. La Reacción N°2 es la correspondiente a la ionización en donde se debe tener en cuenta la distribución del HClO y el ion hipoclorito, puesto que la capacidad biocida del HClO es entre 40 y 80 veces mayor a su forma de ion (Cevallos Guerrero, 2014).

2.1.4.2 Acidificación de hipoclorito.

Cuando el ion hipoclorito se encuentra en un medio ácido transcurre la siguiente reacción (Cevallos Guerrero, 2014).



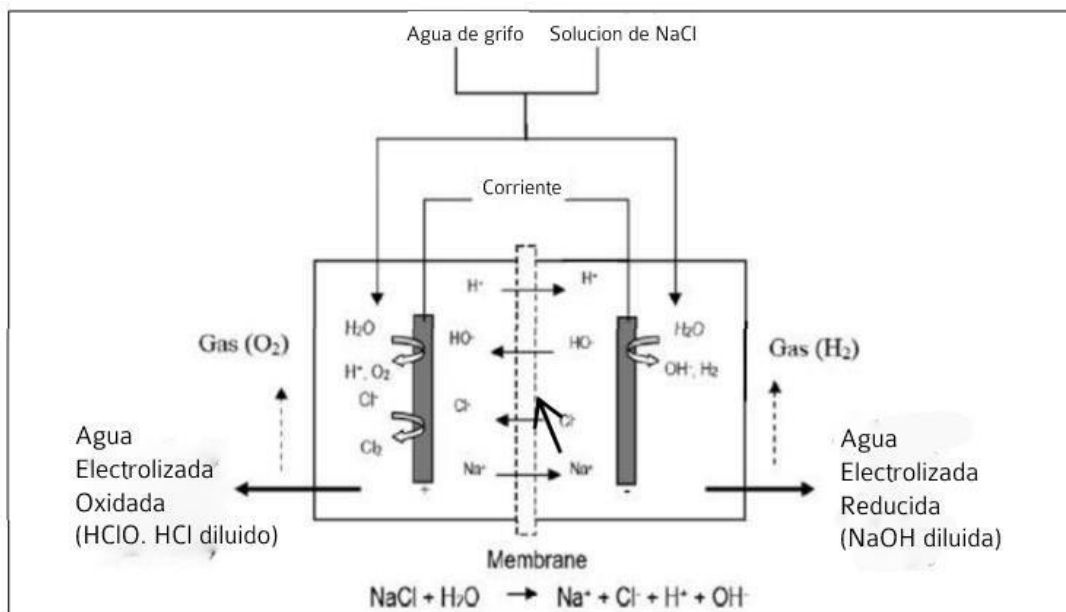
2.1.4.3 Electrólisis de solución salina.

Los sistemas de electrólisis utilizados para la generación de cloro funcionan mediante la disolución de sal común (cloruro de sodio) en agua y la circulación de una corriente eléctrica continua a través de la solución salina. Este proceso da lugar a una serie de reacciones electroquímicas (Cevallos Guerrero, 2014). Las soluciones generadas por electrólisis son denominadas soluciones de agua electrolizada y pueden ser de tres tipos (ácida, alcalina y neutra), en donde el tipo de agua electrolizada generada va a depender del tipo de electrólisis que se use. El tipo más común de agua electrolizada es la ácida (EWA). En la figura 2 se observa el proceso de generación de EWA por electrólisis de membrana, en donde el NaCl disuelto en agua desionizada se divide en cargas positivas (Na^+) y negativas (Cl^-) con el paso de una corriente eléctrica; en forma paralela se generan iones de hidróxido (OH^-) e

hidrógeno (H^+). Los iones con carga negativa (OH^- , Cl^-) son transportados hacia el ánodo en donde pierden sus electrones formando oxígeno molecular, gas cloro (Cl_2), iones de hipoclorito (OCl^-), ácido hipocloroso ($HClO$) y ácido clorhídrico (HCl) lo que es conocido como EWA, mientras que los iones de carga positiva (H^+ , Na^+) viajan al cátodo para generar hidrógeno gaseoso e hidróxido de sodio ($NaOH$) o conocida como agua electrolizada alcalina (Nurul Aniyah et al., 2022).

Figura 2

Esquema de la generación de HClO



Nota: tomado de (Nurul Aniyah et al., 2022)

2.1.5 Acción antimicrobiana del ácido hipocloroso.

El ácido hipocloroso (HClO) ha demostrado ser un potente antimicrobiano de amplio espectro, capaz de actuar contra diversos organismos, como bacterias, esporas y hongos, incluyendo aquellos que son clínicamente relevantes, según lo mencionado por Fuentes Lagla en 2018.

En bacterias Gram negativas, el HClO genera reacciones enzimáticas con las proteínas de la membrana celular, lo que resulta en alteraciones en su permeabilidad. Por otro lado, en bacterias Gram positivas, el HClO actúa sobre los grupos amino de la glicina presente en el peptidoglucano de la pared celular.

Además de estos mecanismos, el HClO puede bloquear la síntesis de ADN en bacterias al oxidar los nucleótidos a nivel intracelular. También tiene la capacidad de inactivar enzimas y sistemas de transporte de electrones, destruir la membrana celular y favorecer la lisis bacteriana. Estos diferentes modos de acción contribuyen al amplio espectro antimicrobiano del HClO, incluso contra organismos multirresistentes.

En resumen, el HClO exhibe múltiples mecanismos de acción que le permiten combatir una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, esporas y hongos. Su capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana celular, bloquear la síntesis de ADN, inactivar enzimas y sistemas de transporte, y destruir la membrana celular, lo convierte en un antimicrobiano eficaz y versátil (Calderón, 2010). En la tabla 1 se muestra la concentración mínima bactericida (CMB) para ciertos microorganismos, demostrando que el HClO posee un amplio rango de acción como desinfectante.

Tabla 1

Concentración mínima bactericida ($\mu\text{g/mL}$) en un amplio rango de cepas de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) evaluadas a temperatura ambiente por 60 min. Nota: tomado de (Wang L et al., 2007).

Patógeno	ATCC	CMB
Escherichia coli	25922	0.7
Pseudomonas aeruginosa	27853	0.35
Staphylococcus aureus	29213	0.173
Staphylococcus epidermidis	12228	0.338
Micrococcus luteus	7468	2.77
Corynebacterium amycolatum	49368	0.169
Haemophilus influenzae	49144	0.338
Proteus mirabilis	14153	0.340
Staphylococcus hominis	27844	1.4
Staphylococcus haemolyticus	29970	0.338
Staphylococcus saprophyticus	35552	0.35
Candida albicans	10231	2.7
Klebsiella pneumoniae	10031	0.7
Serratia	14756	0.169
Streptococcus pyogenes	49399	0.169
Enterobacter aerogenes	51697	0.676
Candida albicans	10231	0.17
Aspergillus niger	16404	86.6
Methicillin-resistant Staphylococcus aureus	33591	0.682
Vancomycin-resistant Enterococcus faecium	51559	2.73

3. Estado del arte.

Con respecto al uso del ácido hipocloroso como desinfectante, en el año 2007 Wang y colaboradores, describieron la producción química, estabilización y actividad biológica de un fármaco que incluía HClO en su formulación. En este estudio se obtiene que la distribución de las especies de cloro es dependiente del pH para mantener una solución de HClO en forma estable, donde para maximizar su actividad antimicrobiana el pH debe estar entre 3,5 a 5,0, dando como resultado una solución con potente actividad antimicrobiana en un amplio rango de microorganismos (Wang L et al., 2007).

En el año 2018, Andrés Hernández y Javier Tafur desarrollaron un agente desinfectante mediante la electrólisis del cloruro de sodio en agua potable. Evaluaron la concentración de sal, densidad de corriente y agitación como variables clave, encontrando que las condiciones óptimas fueron una concentración de 27 g/L, densidad de corriente de 6,7 A/dm² y agitación de 300 rpm. Esto resultó en una concentración de agente desinfectante de 3,813 g/L después de 20 minutos de operación. Estos hallazgos destacan la importancia de dichas variables en el proceso de electrólisis para obtener un agente desinfectante efectivo a partir del cloruro de sodio, con posibles aplicaciones en la desinfección de agua potable y otros procesos similares (Hernández Salamanca & Tafur Logreira, 2018).

En el año 2022 Nurul y colaboradores, en busca de una alternativa para los desinfectantes nocivos a base de alcohol, usaron la electrólisis de cloruro de sodio para producir ácido hipocloroso, probando dos parámetros críticos sobre la electrólisis: la cantidad de cloruro de sodio y el tipo de electrodo usado (carbono,

grafito y titanio). Los resultados demostraron que la cantidad de NaCl usada afecta la cantidad de HClO producida, pues entre más cantidad de sal se use para la electrólisis se produce una mayor cantidad de ácido hipocloroso. Adicionalmente el electrodo de grafito fue escogido como el óptimo debido a que es el único con la capacidad de obtener una solución limpia de ácido hipocloroso, debido que los electrodos de titanio y carbono se van desintegrando por las reacciones de electrólisis generando impurezas en la solución obtenida (Nurul Aniyah et al., 2022).

Yaqub y colaboradores, en el año 2021 produjeron HClO por medio de la electrólisis de HCl en un reactor de acrílico sin diafragma entre electrodos de óxido de iridio revestidos con titanio, evaluando factores como caudal de alimentación, pH, temperatura, voltaje, concentración del ácido y APS (dosificación de la bomba de ácido). Por medio de un diseño de experimentos de superficie de respuesta se obtuvieron los parámetros óptimos que fueron 6.5 L/min, pH 7.5 a 20 °C, 3.8 voltios, 6 % m/v de ácido clorhídrico y 3% de APS con un tiempo de electrólisis de 30 minutos, siendo el caudal, la concentración y la APS los parámetros más significativos. Se encontró que la concentración óptima de cloro libre para la producción de HClO fue de aproximadamente 6 g/L (Yaqub et al., 2021).

En el año 2013, Whangchai y Uthaibutra investigaron factores como la concentración de sal, el tiempo de electrólisis y el potencial eléctrico que afectan la eficiencia del agua electrolizada sobre la mortalidad de células de *Penicillium digitatum* en suspensión. Las condiciones óptimas de eficiencia se dieron a 60 min de electrólisis, potencial de 8 V y una concentración de 5 % m/v obteniendo

concentraciones de cloro libre de 385 ppm y una variación de pH 2,6-3,2 con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. digitatum* cuando se incubaba a 28°C durante 48 h, reduciéndola población de 100 UFC/mL a menos de 20 UFC/mL (Whangchai & Uthaibutra, 2013).

3. Descripción metodológica

3.1 Evaluación de parámetros de producción en la generación de ácido hipocloroso

En este estudio, se llevó a cabo la generación de ácido hipocloroso utilizando una cámara de electrolisis sin membrana junto con una densidad de corriente de 120 A/m². Se utilizó un diseño experimental factorial para evaluar los efectos de los siguientes parámetros: concentración de sal ([NaCl]), potencial de hidrógeno (pH) y tiempo de electrolisis (trxn), en las propiedades fisicoquímicas del ácido hipocloroso generado por electrolisis, como la concentración de cloro libre (CLL), pH y potencial de oxidación-reducción(ORP).

En la Tabla 2 se detalla el diseño de experimentos utilizado para la evaluación de los parámetros. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

Tabla 2*Diseño experimental*

pH	Tiempo de electrólisis (min)	Concentración de NaCl (g/L)
3	90	15
		30
		50
	180	15
		30
		50
5	90	15
		30
		50
	180	15
		30
		50

3.1.1 Preparación de las soluciones salinas de estudio.

Se tomó una probeta y se midió un litro de agua destilada. A continuación, se añadió la cantidad necesaria de cloruro de sodio (NaCl) para alcanzar la concentración deseada. Se prepararon soluciones salinas con concentraciones de 15, 30 y 50 g/L. Luego, utilizando entre 0,5y 1,5 g de ácido cítrico en polvo, se ajustó el pH de las soluciones a los niveles deseados de 3 y 5. De esta manera, se obtuvieron un total de 6 soluciones con los parámetros a evaluar.

Para el proceso de generación de ácido hipocloroso, se tomó 500 mL de cada solución y se introdujo en la cámara de electrolisis. Las soluciones fueron evaluadas a diferentes tiempos de electrolisis, específicamente a los 90 y 180 minutos.

3.1.2 Caracterización de las soluciones de ácido hipocloroso.

3.1.2.1 Determinación de la cantidad de cloro presente.

Para cuantificar la concentración de ácido hipocloroso (HClO), se empleará un espectrofotómetro UV-Vis de marca DRAWELL. Este espectrofotómetro tiene un rango de absorbancia de 0 a 5, un rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm, una resolución de 1 nm, una exactitud de $\pm 0,8$ nm y una reproducibilidad de $\pm 0,25$ nm. Se utilizará una celda de cuarzo con un paso de luz de 1 cm y un volumen de 3,5 mL.

El análisis se realizará a una longitud de onda específica de 430 nm. Para ello, se utilizará una curva de calibración que se construirá utilizando un patrón de NaClO. Con el objetivo de cuantificar la concentración de cloro libre, se empleará el reactivo Taylor (ortotolidina) como solución indicadora.

Posteriormente, se determinará la concentración de HClO en las muestras obtenidas mediante el proceso de electrólisis. Esta concentración se calculará utilizando la ecuación de la curva de calibración proporcionada por la empresa Zumotec S.A, que relaciona la absorbancia medida con la concentración conocida de cloro libre. (Erices, 2018; Murillo Guerrón, 2008).

$$CLL = 2,2608(ABS) + 0,0382 \quad (Ec. 4)$$

En donde CLL es la concentración de cloro libre en ppm, y ABS es la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 430 nm.

3.1.2.2 Determinación de los potenciales de hidrógeno (pH) y de óxido reducción (ORP).

Para cuantificar el pH y el ORP de la solución obtenida, se usa un pHmetro/ORP marca Hanna con un electrodo pH/ORP cuerpo titanio Quick.

3.1.3 Análisis estadístico.

El análisis de los resultados para evaluar la influencia de los parámetros como la concentración de cloruro de sodio, pH y tiempo de electrolisis en la generación y propiedades del ácido hipocloroso se llevó a cabo utilizando el programa Minitab versión 21.0. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para determinar la significancia estadística de cada parámetro.

La significancia se reporta con un nivel de confianza del 95%, lo que indica que los resultados obtenidos tienen un 95% de probabilidad de ser estadísticamente significativos y no el resultado de la variabilidad aleatoria. El ANOVA multifactorial permitió evaluar la contribución individual de cada parámetro y su interacción en las propiedades y generación del ácido hipocloroso.

Mediante este análisis estadístico, se pudo determinar qué parámetros tienen un impacto significativo en la generación y propiedades del ácido hipocloroso, lo que proporciona información importante sobre el proceso de electrolisis y ayuda a optimizar las condiciones de producción.

4.2 Evaluación de parámetros de producción en la estabilidad del ácido hipocloroso

4.2.1 Monitoreo de la degradación de la solución de ácido hipocloroso.

Las soluciones de ácido hipocloroso generadas son almacenadas en frascos ámbar a temperatura ambiente, para evaluar la estabilidad del ácido hipocloroso mediante el monitoreo de los cambios de pH y disminución de cloro total en agua la cual se mide con la ecuación 5, haciendo uso de un pHmetro y un espectrofotómetro UV-Vis a 430 nm por el método de Taylor, durante 15 días (S. M. E. Rahman et al., 2012).

$$\% \text{ degradación}_{CLL} = \frac{|CLL_0 - CLL_i|}{CLL_0} \times 100 \quad (\text{Ec.5})$$

En donde CLL_0 es la concentración de cloro libre inicial y CLL_i es la concentración de cloro libre en el día i .

4.3 Evaluación de parámetros de producción en la actividad biocida de ácido hipocloroso

La actividad biocida se evaluó midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la mínima concentración de antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C, siendo establecido como “Gold standard” frente a otros métodos que evalúan la susceptibilidad antimicrobiana (Mantilla & Yupanqui, 2018).

4.3.1 Preparación del inóculo

La cepa *Escherichia coli* ATCC25922 es incubado en agar nutritivo a una temperatura de 37°C por 24 h, posteriormente son tomadas un estimado de 3-5

colonias, con diámetros mayores a 1 mm para ser suspendidas en una solución salina del 0,85% y se incuba la suspensión en caldo Mueller Hinton hasta alcanzar una densidad óptica equivalente al 0,5 de la escala de McFarland (Saldarriaga, 2016).

4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo.

El proceso es llevado a cabo en placas de cultivo celular de 96 pozos fondo U, de capacidad de 200 μ L, cada pozo es llenado con una cantidad de 60 μ L de caldo nutritivo Mueller Hinton (MH), de la solución madre se toma la cantidad necesaria del HClO para que en el primer pozo queda una dilución con relación de 1/2, para luego ir sucesivamente creando diluciones cada vez menos concentradas en los pozos (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128...) hasta el pozo 10. Luego detener todas las diluciones creadas cada pozo se inoculará con 80 μ L de la suspensión de *E. coli* y se incubarán a una temperatura de 37 °C por 24 h. Se añaden dos pozos adicionales para los controles positivos y negativos, para el control positivo solo se inocula el microorganismo y en el control negativo no se inocula ni solución ni microorganismo. Para la lectura de la CMI se hizo en relación con su definición, luego del tiempo de incubación se detecta el tubo con la concentración más baja en la cual no se detecta crecimiento visible (Saldarriaga, 2016).

4. Resultados.

5.1 Evaluación de parámetros de producción en la generación de ácido hipocloroso

Se generó ácido hipocloroso por medio de un proceso de electrolisis para evaluar la influencia de la concentración de cloruro de sodio ([NaCl]), pH y el tiempo de electrolisis (trxn), midiendo los valores de pH, potencial de oxidoreducción (ORP) y la concentración de cloro libre (CLL) para verificar la relación existente entre los factores evaluados y las variables de salida, todas las mediciones son mostradas en la tabla 3.

Tabla 3

Datos obtenidos de los experimentos realizados.

pH	Tiempo de electrólisis (min)	Concentración de NaCl (g/L)	CLL (%m/v)	pH	ORP(mV)
3	90	15	0,136	8,405	757,5
		30	0,230	8,35	788,5
		50	0,367	8,32	813
	180	15	0,398	8,37	765
		30	0,545	8,31	783,5
		50	0,630	8,29	814,5
5	90	15	0,279	8,685	765,5
		30	0,399	8,525	809
		50	0,479	8,47	814,5
	180	15	0,516	8,555	720,5
		30	0,607	8,49	786,5
		50	0,675	8,455	788,5

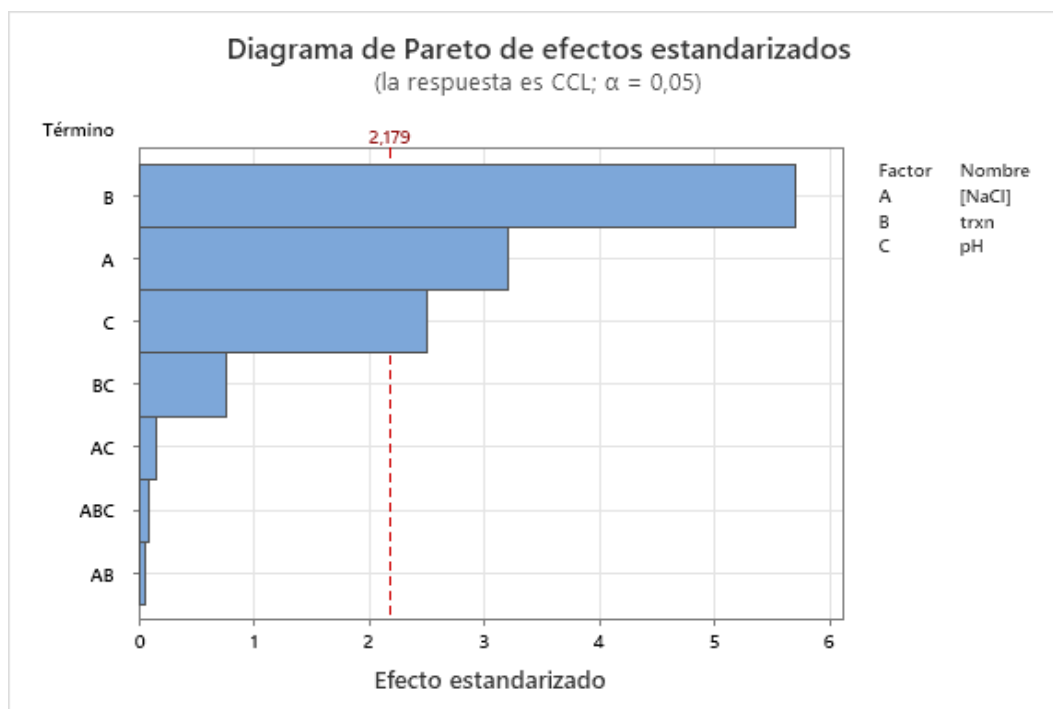
El análisis de varianza ANOVA permitió establecer la significancia estadística ($p < 0,05$) que posee cada factor estudiado en la variación de los

parámetros de salida.

En la tabla 4 se observa que los tres factores poseen significancia en la concentración de Cloro Libre obtenida; sin embargo, las interacciones entre los factores parecen no afectar este parámetro de salida puesto que ($p > 0,05$), adicionalmente indica que el tiempo de reacción (tr_{xn}) es el factor con mayor importancia estadística en la varianza, lo cual lo confirmamos con el diagrama de Pareto (grafica 1), donde confirma el efecto de cada factor sobre la variable de salida.

Grafica 1.

Diagrama de Pareto de los factores concentración de cloruro de sodio [NaCl], tiempo de reacción (tr_{xn}) y pH en la concentración de cloro libre (CLL).



En la gráfica 2 se pueden observar los efectos principales de los factores en la Concentración de Cloro Libre (CLL). Se observa que a medida que la

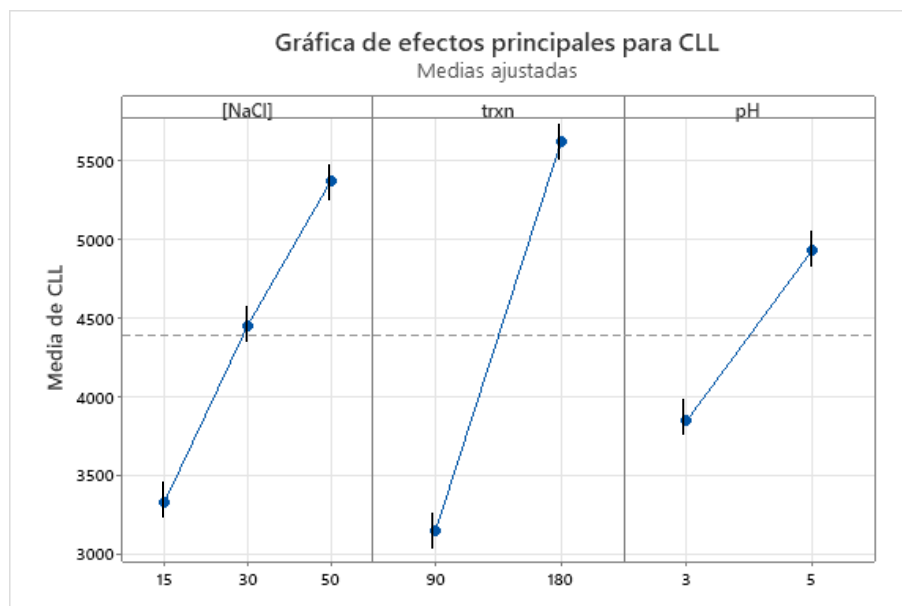
concentración de sal aumenta, la concentración de cloro obtenida también es mayor. Este comportamiento se debe a que a medida que se utiliza una mayor cantidad de sal, se generan más iones que migran hacia los electrodos de sodio y cloruro, lo cual resulta en un aumento en la cantidad de hidróxido de sodio y cloro. Este aumento de reactivos en el medio provoca un desplazamiento del equilibrio hacia la producción de productos, de acuerdo con el principio de Le Chatelier (HERNÁNDEZ SALAMANCA & TAFUR LOGREIRA, 2018).

El tiempo de electrólisis también afecta la concentración de CLL. En un tiempo prolongado de electrólisis, las concentraciones de CLL son más altas. Esto se debe a que a medida que aumenta el tiempo de electrólisis, la corriente y el intercambio de iones ocurren durante más tiempo, lo que permite cambios fisicoquímicos en la solución obtenida (Khalid et al., 2020). Sin embargo, existe un punto de saturación en el que el tiempo deja de tener un efecto importante en los cambios de CLL, pH y Potencial de Oxidación-Reducción (ORP) de la solución. Este punto de saturación es dependiente del voltaje utilizado en el proceso (G. S. W. Hsu et al., 2017).

En cuanto a la dependencia del pH, se observa que la concentración de CLL aumenta a medida que el pH se acerca a la neutralidad, como se muestra en la gráfica 2. Esto se debe a que a medida que disminuye la concentración de iones de H^+ , mejora la absorción de cloro en el ánodo, lo que resulta en un aumento en la CLL obtenida (A. Rahman & Alagha, 2010).

Grafica 2.

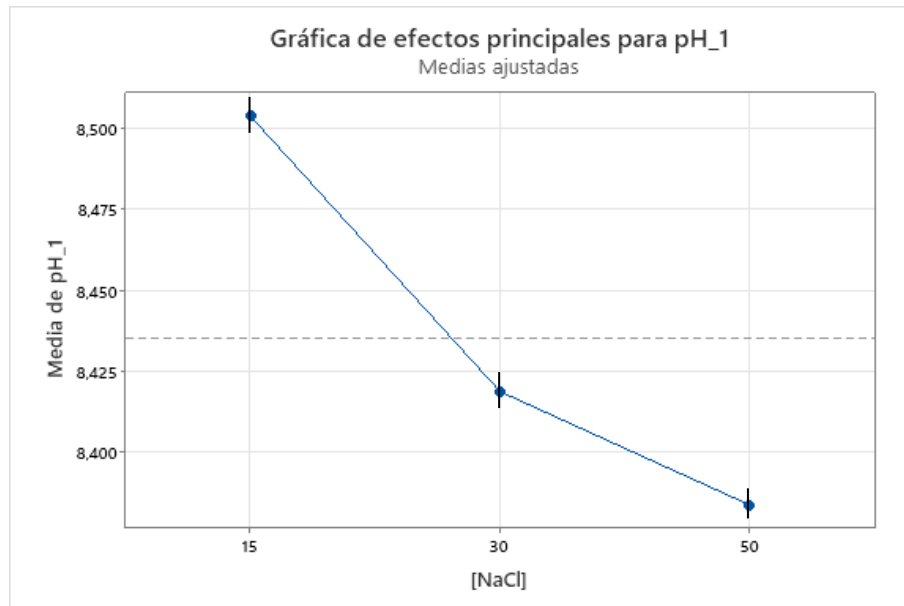
Variación de cloro libre (CLL) con respecto a la concentración, tiempo de electrólisis y pH.



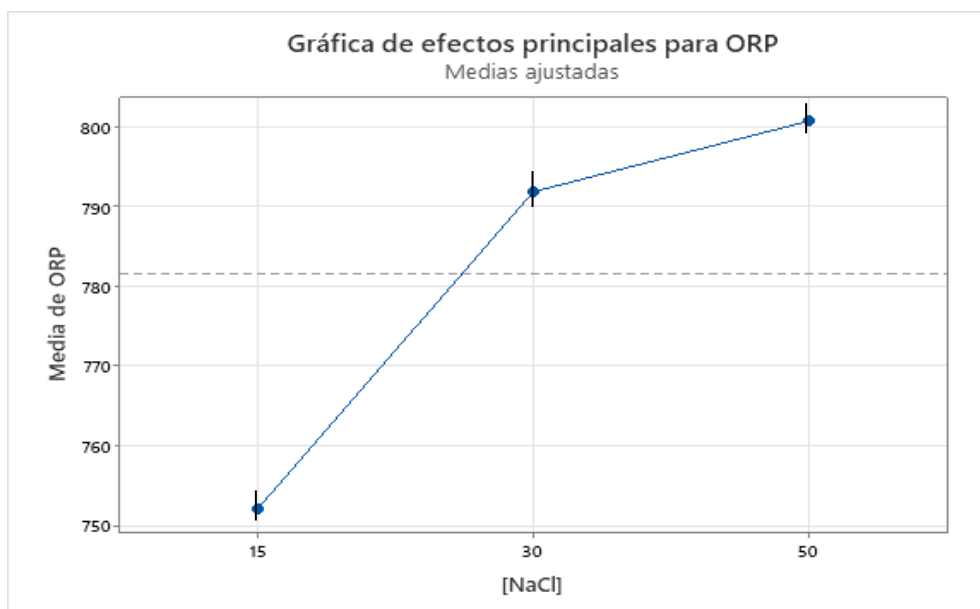
Con respecto al pH de la solución obtenida se esperaría un comportamiento contrario a la CLL, pues a medida que aumenta la concentración de sal el pH final obtenido debería ser menor, esto se debe a que el aumento del cloruro de sodio desplaza las reacciones hacia la formación de productos como cloro y ácido hipocloroso lo cual ocasiona que el pH disminuya (S. Y. Hsu, 2005), tal como se observa en la Gráfica 3. Por otro lado, con el potencial de oxido reducción (ORP) se tiene una tendencia de proporcionalidad con respecto a la concentración de sal inicial tal y como muestra la gráfica 4, esto es posiblemente debido a la liberación de oxígeno generada por la ruptura de los radicales inestables de hidroxilo y clorhídrico (Imran AL-HAQ et al., 2005).

Grafica 3.

Efecto de la concentración de NaCl en el pH final.

**Grafica 4.**

Efecto de la concentración de cloruro de sodio [NaCl] en el ORP.

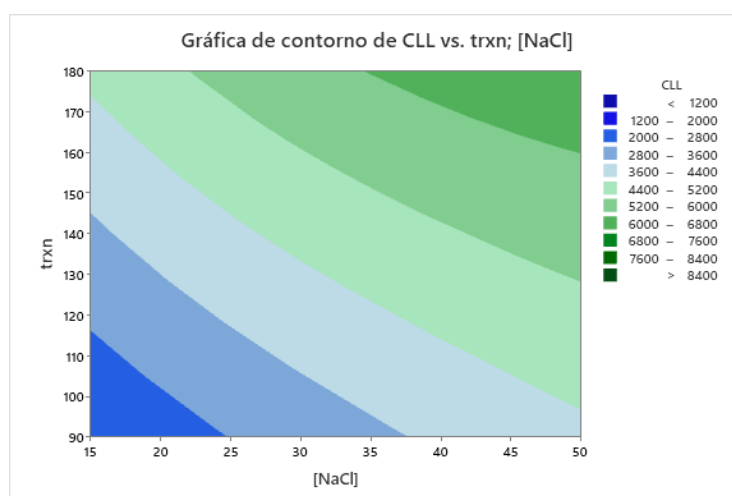


Con base a la relación entre el poder bactericida de los desinfectantes clorados y la cantidad de cloro presente, así como el pH predominante del cloro, se busca obtener soluciones con altas concentraciones de Cloro Libre (CLL) y pH cercano a la predominancia del HClO, que actúa como forma más efectiva en el rango de pH 3 a 6 (Block & Rowan, 2020). Para lograr esto, se llevó a cabo un estudio de los factores más importantes, como la concentración de cloruro de sodio ($[NaCl]$) y el tiempo de electrolisis ($trxn$), mediante la creación de una superficie de contornos en la gráfica 5.

Mediante este enfoque, se determinó la trayectoria óptima para maximizar la CLL y, considerando que la CLL también afecta el pH final, se buscó obtener una solución con alta CLL y un pH cercano al valor deseado. Los resultados indicaron que las condiciones de operación óptimas fueron una concentración de cloruro de sodio de 50 g/L, 180 minutos de electrolisis y un pH de 5. Bajo estas condiciones, se obtuvieron soluciones con un valor de CLL de 6750 ppm, con un pH de 8.4 y un Potencial de Oxidación-Reducción (ORP) de 788.5 mV.

Gráfica 5.

Superficie de contorno de CLL vs $trxn$, $[NaCl]$



5.2 Evaluación de parámetros de producción en la estabilidad de ácido hipocloroso.

Los resultados obtenidos son ilustrados en la gráfica 6 A, no hay relación aparente entre la estabilidad del ácido y los parámetros evaluados de producción, puesto que, en promedio, las soluciones experimentaron una degradación máxima del 60% en los días 5-6. Después de este punto, la degradación comenzó a estabilizarse, llegando a un promedio del 70% del contenido de cloro libre (CLL) en el día 15. Es importante tener en cuenta que el HClO, al ser una molécula altamente inestable, puede degradarse de dos formas: evaporación hacia el ambiente o degradación autoinducida, dependiendo de las condiciones de almacenamiento a las que se someta el ácido (Ampiauw et al., 2021).

No se observaron cambios significativos en el valor del pH de la solución en ninguna de las variaciones estudiadas, como se muestra en la gráfica 6 B. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por (S. Y. Hsu & Kao, 2004), quienes investigaron el efecto de las condiciones de almacenamiento en las propiedades fisicoquímicas de diferentes tipos de aguas electrolizadas. Sus hallazgos indican que propiedades como el pH, el potencial de reducción-oxidación (ORP) y la conductividad eléctrica no varían considerablemente con las condiciones de almacenamiento.

Hallazgos similares también se encontraron en el estudio realizado por (Robinson et al., 2013), donde se investigaron los cambios en el pH, el ORP y el cloro libre en soluciones activadas electroquímicamente mediante electrolisis de NaCl acuoso y almacenadas en diferentes temperaturas y envases. Sus resultados

Nota: La letra P hace referencia a las pruebas experimentales en las que se varió el potencial de hidrógeno (pH) y la concentración de NaCl; para P1(pH:5) y P2(pH:3) [NaCl=15g/mL], P3(pH:5) y P4(pH:3) [NaCl=30g/mL], P5(pH:5) y P6(pH:3) [NaCl=50g/mL], con tiempos de electrólisis de 180 minutos. P7(pH:5) y P8(pH:3) [NaCl=15g/mL], P9(pH:5) y P10(pH:3) [NaCl=30g/mL], P11(pH:5) y P12(pH:3) [NaCl=50g/mL], con tiempo de electrólisis de 90 minutos.

El ácido hipocloroso es una molécula inestable debido a su alta reactividad con otras moléculas circundantes, como iones metálicos y compuestos orgánicos. Según la literatura, las condiciones de almacenamiento, la exposición a la luz, la agitación, el pH, la temperatura y la concentración de cloro son factores que afectan la estabilidad de la solución de ácido hipocloroso obtenida (Imran AL-HAQ et al., 2005).

El cloro libre en la solución puede descomponerse a través de dos mecanismos, dependiendo de las condiciones de almacenamiento. El primero sigue una cinética de primer orden y corresponde a la evaporación del cloro disuelto. Este mecanismo ocurre cuando la solución se almacena abierta al ambiente. La velocidad de evaporación se ve significativamente afectada por la agitación, ya que una mayor velocidad de agitación aumentará la transferencia de masa en la interfase de la solución, acelerando así la evaporación. El segundo mecanismo ocurre en condiciones cerradas, cuando la solución está tapada o en un entorno cerrado. En estas condiciones, la degradación del cloro libre se produce mediante su autodegradación (Len et al., 2002).

La forma en que el cloro libre se presenta en la solución (Cl_2 , HClO o ClO^-) depende del pH. En un rango de pH menor a 3, la forma predominante es Cl_2 . Para un pH comprendido entre 4 y 7, predomina el HClO, mientras que para un pH mayor

a 8, predomina el ClO^- (Nagamatsu et al., 2002). Por lo tanto, el pH puede afectar la estabilidad de la solución, ya que las especies de cloro libre tienen diferente estabilidad en el siguiente orden: $\text{ClO}^- > \text{HClO} > \text{Cl}_2$. Así, al ajustar el pH para que la forma predominante no sea Cl_2 , se puede reducir la velocidad de descomposición del cloro libre en la solución. Se recomienda almacenar las soluciones obtenidas en condiciones frías, protegidas de la luz y con el menor contacto posible con el ambiente. Además, se debe utilizar agua libre de materia orgánica o iones metálicos en la preparación, para evitar la descomposición mediante reacciones de oxidación (Block & Rowan, 2020).

5.3 Evaluación de actividad biocida del ácido hipocloroso.

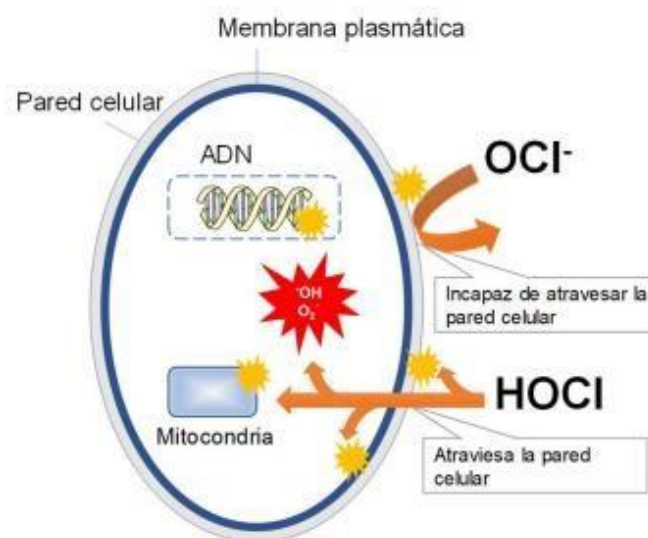
La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del ácido hipocloroso para el microorganismo *Escherichia coli* ATCC25922 se determinó mediante el método de microdilución en caldo, y se obtuvo una CMI de 6,2 $\mu\text{g/mL}$. Esta concentración relativamente baja refleja la poderosa capacidad bactericida de la solución estudiada. Estos resultados se comparan con los expuestos por (Wang L et al., 2007), donde se resume el amplio rango de microorganismos en los cuales el ácido hipocloroso puede actuar, mostrando una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,7 $\mu\text{g/mL}$ para la misma cepa de *E. coli*. Además, (Hernández, 2020) investigó la actividad bactericida del ácido hipocloroso en un cultivo mixto de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. infantis*, con el objetivo de evaluar los efectos del agua electrolizada neutra (AEN) en un anaquel de carne de pollo. La AEN demostró una CMI de 90 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica una capacidad considerable para tratar el cultivo

evaluado.

Es importante destacar que la capacidad antimicrobiana de las soluciones cloradas dependedel pH. Se debe procurar que el pH se encuentre en un rango donde el HClO predomine, ya que esta forma muestra una actividad bactericida superior a la forma de ClO⁻. Esto se debe a que el HClO es una especie eléctricamente neutra y de tamaño similar al agua, lo que le permite penetrarla pared celular y la membrana plasmática de las células microbianas, afectando tanto el interior como el exterior de la bacteria. Por el contrario, la forma de ClO⁻ solo puede afectar a la bacteria externamente debido a que la membrana celular está compuesta por una bicapa lipídica que es impermeable a moléculas y iones polarizados como el ClO⁻ (Laura et al., s/f). Esto puede explicar la diferencia en los resultados obtenidos en comparación con los mostrados por (Wang L et al., 2007), como se muestra en la figura 3.

Figura 3

Modelo que ilustra el mecanismo de acción germicida del HOCl y del ion ClO⁻, basado en su capacidad de penetrar la membrana de la célula microbiana. Nota: adaptado de (Laura et al., 2017)



5. Conclusiones.

- Basado en el análisis de varianza (ANOVA), se determinó que los factores estudiados, como la concentración de sal, el tiempo de electrolisis y el pH, tienen una significancia estadística en los cambios de las propiedades fisicoquímicas de las soluciones de ácido hipocloroso generadas, incluyendo la concentración de Cloro Libre (CLL), el pH y el Potencial de Oxidación-Reducción (ORP). Entre estos factores, se encontró que el tiempo de electrolisis es el más significativo en el proceso.
- Las condiciones óptimas para la generación de las soluciones fueron determinadas mediante gráficas de contorno, y los resultados indicaron que las condiciones óptimas en este estudio son una concentración de 50 g/L de solución acuosa de NaCl, 180 minutos de electrolisis y un pH de 5. Bajo estas condiciones, se obtuvo una solución de CLL de 6750 ppm, con un pH de 8.4 y un ORP de 788.5 mV.
- En cuanto a la degradación del cloro, los factores estudiados no mostraron influencia significativa en la cantidad de cloro degradado durante el período de monitoreo de 15 días. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de degradación de CLL en las soluciones generadas bajo diferentes condiciones.
- Adicionalmente, se comprobó que la solución generada de ácido hipocloroso posee una buena actividad inhibitoria, ya que demostró una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 6.2 $\mu\text{g/mL}$ en el microorganismo *E. coli*.

Referencias Bibliográficas.

- Ampiauw, R. E., Yaqub, M., & Lee, W. (2021). Electrolyzed water as a disinfectant: A systematic review of factors affecting the production and efficiency of hypochlorous acid. *Journal of Water Process Engineering*, 43.
- Block, M., & Rowan, B. (2020). Hypochlorous acid – a review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1–14.
- Calderón, Justo Leonardo. (2010). Ácido hipocloroso (HOCl) “Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección desarrollada en Colombia”. *laboratorio actual*, 42, 27–31.
- Castillo Torres, M. E. (2020). *Efecto inhibitorio del ácido hipocloroso al 0,020% y 0,050% de concentración a diferentes tiempos de inoculación sobre cepas de *Cándida albicans**. Universidad Central de Ecuador.
- Cevallos Guerrero, R. (2014). *INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DEL BIOASEPSIA A BASE DE ÁCIDO HIPOCLOROSO EN LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN*. Universidad Nacional de Colombia.
- Erices, C. (2018). *DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PARA-CLOROANILINA EN VIVO PRODUCIDO EN TRATAMIENTO ENDODÓNTICO TRAS LA UTILIZACIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO 5%, CLORHEXIDINA 2% Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO 3%*. Universidad de Chile.
- Fuentes Lagla, A. (2018). *“EFECTO DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA SOBRE LA ENDOMETRITIS BOVINA POSPARTO.”*.
- HERNÁNDEZ SALAMANCA, A. C., & TAFUR LOGREIRA, J. S. (2018). *OBTENCIÓN DE UN AGENTE DESINFECTANTE A PARTIR DE LA ELECTRÓLISIS DE CLORURO DE SODIO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA POTABLE*. Fundación Universidad de América.
- Hernández, V. (2020). *“Estudio de la composición y estabilidad química del agua electrolizada neutra, así como la formación de trihalometanos, actividad antimicrobiana y su impacto en vida de anaquel en carne de pollo”*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Hsu, G. S. W., Lu, Y. F., & Hsu, S. Y. (2017). Effects of electrolysis time and electric potential on chlorine generation of electrolyzed deep ocean water. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.001>
- Hsu, S. Y. (2005). Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.003>
- Hsu, S. Y., & Kao, H. Y. (2004). Effects of storage conditions on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering*, 65(3), 465–

471. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.02.009>
- Imran AL-HAQ, M., Sugiyama, J., & Isobe, S. (2005). *Review Applications of Electrolyzed Water in Agriculture & Food Industries*. 135–150.
- Ishihara, M., Murakami, K., Fukuda, K., Nakamura, S., Kuwabara, M., Hattori, H., Fujita, M., Kiyosawa, T., & Yokoe, H. (2017). Stability of Weakly Acidic Hypochlorous Acid Solution with Microbicidal Activity. En *Note Biocontrol Science* (Vol. 22, Número 4).
- Khalid, N. I., Sulaiman, N. S., Aziz, N. A., Taip, F. S., Sobri, S., & Ab Rashid, N. K. M. (2020). Optimization of electrolysis parameters for green sanitation chemicals production using response surface methodology. *Processes*, 8(7).
<https://doi.org/10.3390/pr8070792>
- Laura, P., Luciani Giacobbe, C., Bustos Fierro, C., Gavelli, M. E., & Olivera, M. E. (s/f). *Aspectos químicos, regulatorios y prácticos de la lavandina*.
- Len, S. V., Hung, Y. C., Chung, D., Anderson, J. L., Erickson, M. C., & Morita, K. (2002). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 209–212.
<https://doi.org/10.1021/jf010822v>
- Mantilla, S., & Yupanqui, E. (2018). *Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Minthostachys mollis “muña” sobre el crecimiento de Listeria monocytogenes y Staphylococcus aureus*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.
- Nagamatsu, Y., Chen, K.-K., Tajima, K., Kakigawa, H., & Kozono, Y. (2002). Original paper Durability of Bactericidal Activity in Electrolyzed Neutral Water by Storage. En *Dental Materials Journal* (Vol. 21, Número 2).
- Nakagawara, Shunji, Goto, Takeshi, Nara, M., Ozawa, Youichi, Hotta, Kunimoto, & Arata, Y. (1998). Spectroscopic Characterization and the pH Dependence of Bactericidal Activity of the Aqueous Chlorine Solution. *Analytical Sciences*, 14, 691–698.
- Noval Gómez, L. (2017). *EL CLORO, PRODUCCIÓN E INDUSTRIA*. Universidad nacional de educación a distancia.
- Nurul Aniyah, M. S., Idhamnulhadi, Z., Azharin Shah, A. A., Lili Shakirah, H., Suhaila, A., Norazlina, H., & Hajaratul Najwa, M. (2022). Electrolysis Study Effect on Electrolyzed Water as Disinfectant and Sanitizer. *Journal of Physics: Conference Series*, 2266(1).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/2266/1/012004>
- Rahman, A., & Alagha, M. A. (2010). *Hypochlorite Generation on Some Modified Electrodes for Treatment of Wastewater Pollutants*.
- Rahman, S. M. E., Park, J. H., Wang, J., & Oh, D. H. (2012). Stability of low concentration electrolyzed water and its sanitization potential against foodborne pathogens. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 548–553.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.011>

- Robinson, G., Thorn, R., & Reynolds, D. (2013). The effect of long-term storage on the physiochemical and bactericidal properties of electrochemically activated solutions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 457–469. <https://doi.org/10.3390/ijms14010457>
- Romero Pineda, M. F. (2021). *Efecto Antimicrobiano y Citotóxico de Nanopartículas de Cobre y Plata Sintetizadas Usando Extractos de Moringa oleífera Contra Patógenos Implicados en Infecciones Asociadas a Dispositivo Médico y Sitio Quirúrgico*. Universidad de Santander.
- Saldarriaga, E. (2016). “Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja) variedad Tangelo en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.” Universidad nacional de Trujillo.
- Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, Hong W, Barati E, Belisle B, Celeri C, & Mc, R. (2007). *Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent Part I. Stabilized Hypochlorous Acid: A Component of the Inorganic Armamentarium of Innate Immunity*.
- Whangchai, k, & Uthaibutra, j. (2013). EFFECTS OF NA CL CONCENTRATION, ELECTROLYSIS TIME, AND ELECTRIC POTENTIAL ON EFFICIENCY OF ELECTROLYZED OXIDIZING WATER ON THE MORTALITY OF PENICILLIUM DIGITATUM IN SUSPENSION. *Acta horticulturae*, 973, 193–198. <https://sci-hub.se/10.17660/ActaHortic.2013.973.26>
- Yaquub, M., Woo, C., & Lee, W. (2021). Optimization of hypochlorous acid generation by HCl electrolysis through response surface methodology and artificial neural networks. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9.

Apéndices

Apéndice A.

Análisis de varianza ANOVA para el diseño experimental realizado para la concentración de clorolibre (CLL).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	61705907	5609628	5,01	0,005
Lineal	4	60480963	15120241	13,49	0,000
[NaCl]	2	16899601	8449800	7,54	0,008
Trxn	1	36555036	36555036	32,62	0,000
pH	1	7026326	7026326	6,27	0,028
Interacciones de 2 términos	5	1052680	210536	0,19	0,962
[NaCl]*trxn	2	108996	54498	0,05	0,953
[NaCl]*pH	2	286576	143288	0,13	0,881
trxn*pH	1	657107	657107	0,59	0,459
Interacciones de 3 términos	2	172264	86132	0,08	0,926
[NaCl]*trxn*pH	2	172264	86132	0,08	0,926
Error	12	13446191	1120516		
Total	23	75152098			