



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA: INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**TEMA**

---

**“ESTUDIO DE REDUCCIÓN DE CARGA  
MICROBIANA INICIAL DE LECHE CRUDA  
ENTERA APLICANDO PULSOS ELÉCTRICOS DE  
ALTO VOLTAJE”.**

---

Trabajo de Investigación (Graduación). Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTOR: Diego Israel Carrillo Ampudia

TUTOR: Ing. Gladys Navas Miño

Ambato - Ecuador

2010

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de tutor del trabajo de investigación sobre el tema:

“ESTUDIO DE REDUCCIÓN DE CARGA MICROBIANA INICIAL DE LECHE CRUDA ENTERA APLICANDO PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE”,  
Diego Israel Carrillo Ampudia, egresado e la Carrera de Ingeniería en Alimentos, de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, certifico que le trabajo fue realizado por la persona indicada y considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Julio del 2010.

EL TUTOR

.....

Ing. Gladys Navas Miño

## **AUTORÍA**

El presente trabajo de investigación: “ESTUDIO DE REDUCCIÓN DE CARGA MICROBIANA INICIAL DE LECHE CRUDA ENTERA APLICANDO PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Julio del 2010.

EL TUTOR

AUTOR

.....  
Ing. Gladys Navas Miño

.....  
Diego Israel Carrillo Ampudia

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOQUÍMICA**

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Julio del 2010.

Para constancia firman.

1ª MIEMBRO CALIFICADOR  
CALIFICADOR

2ª MIEMBRO

.....

.....

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo a mi Madre Isabel, por su sacrificio y amor. Su ejemplo forjó en nosotros respeto, valores y fe para ser hombres de bien.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios Todo Poderoso por la vida, todo lo que infinitamente tengo y permitir la conclusión de una etapa más de mi vida.

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato por otorgarme el título de Ingeniero en Alimentos.

A mis profesores por impartir su conocimiento en los años de estudio, en especial a Ing. Mayra Paredes e Ing. María Rodríguez, a mi padres Isabel y Edison por su apoyo y amor especialmente a mi madre por sus cuidados desde que nacimos, a mi hermano Andrés por su apoyo, a mis tías Angeline, Marisol, Silvia, mi abuelita Angelita, mis primos y primas por su apoyo y cariño, a Dr. Albán por guía y consejos, Gabriel que gentilmente colaboró en el presente trabajo, a mis amigos y amigas Anita, Charito, Lily, Adri, Gaby N., Gaby A., CrisFe, Mayra, Migue, Santy, Oscar, a mis amigos de siempre Ricardo, Mauricio, Jairo, Paulo, Marlon, Verito y Maestro Duque.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| <b>A. PÁGINAS PRELIMINARES</b>        | <b>i</b> |
| TEMA.                                 | i        |
| APROBACIÓN DEL TUTOR                  | ii       |
| AUTORÍA                               | iii      |
| APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO      | iv       |
| DEDICATORIA                           | v        |
| AGRADECIMIENTO                        | vi       |
| ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS          | vii      |
| ÍNDICE DE ANEXOS                      | xii      |
| ANEXO A (TABLAS)                      | xii      |
| ANEXO B (GRÁFICOS)                    | xiv      |
| ANEXO C (ECUACIONES)                  | xv       |
| ANEXO D (FIGURAS)                     | xv       |
| ANEXO E (MÉTODOS Y PROGRAMAS)         | xvi      |
| RESUMEN EJECUTIVO                     | xvii     |
| <br>                                  |          |
| <b>B. INTRODUCCIÓN</b>                |          |
| <br>                                  |          |
| <b>CAPITULO I. EL PROBLEMA</b>        |          |
| <br>                                  |          |
| <b>1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN</b>      | <b>1</b> |
| <b>1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> | <b>1</b> |
| <b>1.2.1 CONTEXTUALIZACIÓN</b>        | <b>1</b> |
| 1.2.1.1 Contextualización Macro       | 1        |
| 1.2.1.2 Contextualización Meso        | 1        |
| 1.2.1.3 Contextualización Micro       | 2        |
| <b>1.2.2 ANÁLISIS CRÍTICO</b>         | <b>2</b> |
| 1.2.2.1. ÁRBOL DE PROBLEMAS.          | 5        |

|  |    |
|--|----|
| 1.2.2.2. RELACIÓN CAUSA-EFECTO   | 6  |
| <b>1.2.3 PROGNOSIS</b>   | 6  |
| <b>1.2.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b>  | 6  |
| <b>1.2.5 INTERROGANTES</b>   | 6  |
| <b>1.2.6 DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN</b>  | 7  |
| <b>1.3 JUSTIFICACIÓN</b>   | 7  |
| <b>1.4 OBJETIVOS</b>   | 10 |
| 1.4.1 OBJETIVO GENERAL   | 10 |
| 1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 10 |
| <br>   |    |
| <b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>  |    |
| <br>   |    |
| <b>2.1 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN</b>   | 11 |
| 2.1.1 Calidad microbiológica y problemas sanitarios en la leche                                  | 11 |
| 2.1.2 Efecto nocivo de tratamientos térmicos   | 14 |
| 2.1.3 Aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje  | 13 |
| 2.1.4 Efectos de los pulsos eléctricos en los microorganismos                                    | 19 |
| 2.1.5 Parámetros que pueden alterar el tratamiento con pulsos eléctricos                         | 21 |
| 2.1.6 Generación de pulsos eléctricos  | 23 |
| <b>2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA</b>   | 25 |
| <b>2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL</b>  | 26 |
| <b>2.4. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES</b>   | 38 |
| 2.4.1. Variable independiente: Alta carga microbiana inicial de leche cruda entera               | 29 |
| 2.4.1.1. Calidad de leche cruda entera   | 29 |
| 2.4.1.2. Calidad de leche cruda entera tratada   | 29 |
| 2.4.1.3. Normas INEN de calidad microbiológica   | 29 |
| 2.4.2. Variable dependiente: Reducción parcial de carga microbiana inicial en leche cruda entera | 29 |
| 2.4.2.1. Construcción y calibración de equipo prototipo  | 30 |
| 2.4.2.2. Aplicación de tecnología de pulsos eléctricos   | 30 |



|   |    |
|---|----|
| 2.4.2.3. Eficiencia del tratamiento con pulsos eléctricos | 30 |
| <b>2.5 HIPÓTESIS.</b>                                     | 30 |
| 2.5.1 Hipótesis nula ( $H_0$ )                            | 30 |
| 2.5.2 Hipótesis alternativa ( $H_1$ )                     | 30 |
| <b>2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES</b>                      | 31 |
| 2.6.1 Variable independiente                              | 31 |
| 2.6.2 Variable dependiente                                | 31 |

### **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

|   |    |
|---|----|
| <b>3.1 MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN</b>   | 32 |
| <b>3.2 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN</b>  | 32 |
| <b>3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA</b>  | 32 |
| <b>3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES</b>  | 34 |
| 3.4.1 Variable independiente  | 34 |
| 3.4.2 Variable dependiente  | 35 |
| <b>3.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN</b>   | 36 |
| 1.5.1 Obtención y calibración del equipo prototipo generador de pulsos eléctricos y la cámara de tratamiento utilizados | 36 |
| 3.5.1.1 Sistema electrónico   | 36 |
| 3.5.1.1.1 Primera parte : “control”   | 37 |
| 3.5.1.1.2 Segunda parte: “potencia”   | 38 |
| 3.5.1.1.3 Tercera Etapa: “alto voltaje”   | 39 |
| 3.5.2 Características de la cámara de tratamiento   | 40 |
| 3.5.3. Diagrama de flujo  | 41 |
| 3.5.3.1 Recepción   | 42 |
| 3.5.3.2 1ª Análisis microbiológico  | 42 |
| 3.5.3.3 Llenado de la cámara de tratamiento   | 43 |
| 3.5.3.4 Tratamiento con pulsos eléctricos   | 44 |
| 3.5.3.4.1 Preparación de los pulsos eléctricos  | 44 |
| 3.5.3.5 Toma de la muestra  | 44 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.3.6 2ª análisis microbiológicos  | 45        |
| 3.5.3.7 Análisis y procesamiento de datos  | 45        |
| <b>3.6. PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN</b>  | <b>46</b> |
| 3.6.1 CÁLCULOS   | 46        |
| ANOVA.   | 48        |
| Prueba organoléptica   | 49        |
| Consumo de energía eléctrica   | 50        |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b>  |           |
| <br>   |           |
| <b>4.1 DISCUSIÓN (ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE DATOS)</b>  | <b>52</b> |
| 4.1.1 Leche vacuna   | 52        |
| 4.1.2 Campo eléctrico aplicado   | 52        |
| 4.1.3 Eficiencia de campos eléctricos pulsados.  | 53        |
| 4.1.4 Eficiencia de campos eléctricos pulsados, relación descenso microbiano (ln[s]) vs campo eléctrico aplicado $E_p$ [kV/cm] vs, constante = tiempo de tratamiento               | 54        |
| 4.1.5 Eficiencia de campos eléctricos pulsados, relación descenso microbiano ln [s] vs tiempo de tratamiento (ln t=[s] ó n) vs, constante = campo eléctrico aplicado $E_p$ [kV/cm] | 55        |
| 4.1.6 ANOVA  | 56        |
| 4.1.7 Tratamiento con pulsos eléctricos en muestras con gradiente de temperaturas  | 57        |
| 4.1.8 Pruebas Organoléptica  | 58        |
| 4.1.9 Comparación de tratamiento con pulsos eléctricos con un tratamiento de pasteurización  | 59        |
| <b>4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS</b>   | <b>60</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>  |           |
| <b>5.1 CONCLUSIONES</b>  | <b>61</b> |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>5.2 RECOMENDACIONES</b> | 62 |
|----------------------------|----|

## **CAPÍTULO VI. PROPUESTA**

|  |    |
|--|----|
| <b>6.1 DATOS INFORMATIVOS</b>                                  | 64 |
| <b>6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA</b>                        | 64 |
| <b>6.3 JUSTIFICACIÓN</b>                                       | 65 |
| <b>6.4 OBJETIVOS</b>   | 65 |
| <b>6.4.1 OBJETIVOS GENERAL</b>                                 | 65 |
| <b>6.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>                             | 65 |
| <b>6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD</b>                            | 66 |
| <b>6.6 FUNDAMENTACIÓN</b>                                      | 66 |
| <b>6.7 METODOLOGÍA – MODELO OPERATIVO</b>                      | 67 |
| 6.7.1 MATERIALES DIRECTOS                                      | 67 |
| 6.7.2 MATERIALES INDIRECTOS                                    | 67 |
| 6.7.3 EQUIPOS  | 67 |
| 1.- Recepción  | 67 |
| 2.- 1ª Análisis microbiológico                                 | 68 |
| 3.- Descremado   | 68 |
| 4.- Bombeo de materia prima y llenado de las cámaras coaxiales | 68 |
| 5. Tratamiento con pulsos eléctricos                           | 68 |
| 5.1. Sistema electrónico                                       | 68 |
| 6.- Enfundado  | 68 |
| 7.- 2ª análisis microbiológico y determinación de vida útil    | 68 |
| <b>6.8 ADMINISTRACIÓN</b>                                      | 69 |
| <b>6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN</b>                          | 69 |

## **C. MATERIALES DE REFERENCIA**

|                     |    |
|---------------------|----|
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> | 70 |
| <b>ANEXOS</b>       | 77 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>ANEXO A (Tablas)</b>                 | 78  |
| <b>ANEXO B (Gráficos)</b>               | 97  |
| <b>ANEXO C (Ecuaciones)</b>             | 108 |
| <b>ANEXO D (Figuras)</b>                | 111 |
| <b>ANEXO E (Métodos y Programación)</b> | 125 |

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

### **ANEXO A (TABLAS)**

|   |    |
|---|----|
| 1. Análisis comparativo de los resultados de los censos de 1974 y 2000.<br>Evolución de la producción diaria de leche por provincias                    | 79 |
| 2. Estadísticas de la comunidad andina (1990 - 2003). Producción de leche vacuna (en miles de toneladas métricas)                                       | 80 |
| 3. Costos estimados de producción de producción de un litro de leche (1999-2001)  | 80 |
| 4. Recuentos microbiológicos en diferentes muestras de leche procesada y semi-procesada   | 81 |
| 5. Evolución de los °Brix de la muestra para tratamiento osmótico en tratamiento convencional y tratamiento osmótico combinado con calentamiento óhmico | 82 |
| 6. Datos experimentales de tratamientos con campos de pulsos eléctricos   | 82 |
| 7. Datos bibliográficos de tratamientos y ciclos de descenso estudiados   | 83 |
| 8. Datos bibliográficos de características generales de microorganismos patógenos comunes en alimentos  | 83 |
| 9. Datos bibliográficos de inactivación de E. coli por campos eléctricos pulsados   | 84 |
| 10. Viscosidad (centipoises) de leche y otros productos a diferentes  | 86 |
| 11. Resistividad y conductividad eléctrica en varios alimentos y fluidos  | 86 |
| 12. Norman NTE INEN 702. “Leche descremada y semidescremada, pasteurizada”  | 87 |
| 13. Norman NTE INEN 004. “Muestreo”   | 87 |
| 14. Norman NTE INEN 10:2009 4 <sup>ta</sup> revisión. “Leche pasteurizada, requisitos. 1 <sup>ra</sup> edición”   | 87 |

|  |    |
|--|----|
| 15. Norma NTE INEN 10:2009 4 <sup>ta</sup> revisión. “Requisitos microbiológicos de leche pasteurizada para lotes o partidas”                    | 88 |
| 16. Recuento de microorganismos en caja petrifil.  | 88 |
| 17. Contenido de ufc/ml en productos lácteos   | 88 |
| 18. Acidez titulable como ácido láctico en muestras de leche cruda entera, según método de Norma INEN 13.  | 89 |
| 19. Densidad 20°C  | 89 |
| 20. Campos eléctricos aplicados  | 89 |
| 21. Datos experimentales obtenidos, con una dilución $10^{-3}$ (Ufc/ml; coliformes totales)  | 90 |
| 22. Datos experimentales para gráficos de la relación $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm] constante: $t=0.25$ [s]   | 90 |
| 23. Datos experimentales para gráficos de la relación $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t=0.4$ [s]   | 90 |
| 24. Datos experimentales para gráficos de la relación $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t=0.5$ [s]   | 91 |
| 25. Ecuaciones de regresión lineal de los gráficos # 3, 4, 5   | 91 |
| 26. Datos experimentales para gráficos de la relación $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante: $E_p=26,33$ [kV/cm]                                     | 91 |
| 27. Datos experimentales para gráficos de de la relación $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante: $E_p=33,33$ [kV/cm]                                  | 91 |
| 28. Datos experimentales para gráficos de la relación $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante: $E_p=40$ [kV/cm]  | 92 |
| 29. Ecuaciones de regresión lineal de los gráficos #9, 10, 11  | 92 |
| 30. Factores de modelo estadístico   | 92 |
| 31. $ij$   | 92 |
| 32. Matriz   | 93 |
| 33. ANOVA  | 93 |
| 34. Comparación de Tukey   | 93 |
| 35. Datos experimentales $a_2b_2$ ( $E=12$ kV; $E_p= 40$ [kV/cm]; $n=500$ ; $t=0.5$ s), evaluado a diferentes temperaturas, (coliformes totales) | 94 |

|   |    |
|---|----|
| 36. Resultados de la valuación sensorial (1° ensayo ) | 94 |
| 37. Resultados de la valuación sensorial (2° ensayo ) | 94 |
| 38: Tabla de significancia para la prueba de una cola | 94 |
| 39: % de significancia para la prueba de dos colas    | 94 |
| 40: Encuesta de catación para la prueba Duo-Trío      | 95 |
| 41: Lista de catadores                                | 96 |

## ANEXO B (GRÁFICOS)

|  |     |
|--|-----|
| 1. Curvas de crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y actividad proteásica a 6°C  | 98  |
| 2. Representación general de la tasa de muerte de microorganismos (coliformes totales), en la relación $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante= $t$ [s]  | 99  |
| 3. $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t=0,25$ [s]   | 100 |
| 4. $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t=0,4$ [s]  | 100 |
| 5. $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t=0,5$ [s]  | 101 |
| 6. $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t$ [s]  | 101 |
| 7. $\ln s$ vs $E_p$ [kV/cm], constante: $t$ [s], ciclos logarítmicos de descenso   | 102 |
| 8. Representación general de la tasa de muerte de microorganismos (coliformes totales) en la relación $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante $E_p$ [kV/cm]  | 103 |
| 9. $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante: $E_p=26,33$ [kV/cm]  | 104 |
| 10. $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante: $E_p=33,33$ [kV/cm]   | 104 |
| 11. $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante: $E_p=40$ [kV/cm]  | 105 |
| 12. $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante $E_p$ [kV/cm]  | 105 |
| 13. $\ln s$ vs $\ln t$ [s], constante $E_p$ [kV/cm], ciclos logarítmicos de descenso   | 106 |
| 14. Tabla anova (Stat Grafics)   | 107 |
| 15. $a_2b_2$ ( $E=12$ kV; $E_p= 40$ [kV/cm]: $n=500$ ; $t=0.5$ s), evaluado a diferentes temperaturas [°C]   | 107 |
| 16. Representación de la tasa de muerte de microorganismos (coliformes totales) al aplicar el tratamiento $a_2b_2$ ( $E=12$ kV; $E_p= 40$ [kV/cm]: $n=500$ ; $t=0.5$ s), evaluado a diferentes temperaturas (2, 8, 15, 20, 35, 45, 65°C) | 108 |

## ANEXO C (ECUACIONES)

|  |     |
|--|-----|
| 1. Determinación de Acidez, INEN 013   | 110 |
| 2. Determinación de campo eléctrico aplicado   | 110 |
| 3. Número promedio de ufc/ml de muestra. (guía de interpretación de placas Petrifilm 3M) | 110 |
| 4. Modelo estadístico matemático AxB.  | 111 |
| 5. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del tratamiento                             | 111 |
| 6. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del residuo                                 | 111 |
| 7. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del error                                   | 111 |
| 8. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del factor A (kV)                           | 111 |
| 9. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del factor B (n)                            | 111 |
| 10. Modelo estadístico AxB, comparación de Tukey   | 111 |
| 11. Cálculo de consumo eléctrico   | 111 |

## ANEXO D (FIGURAS)

|  |     |
|--|-----|
| 1. Pioneros en el desarrollo de la tecnología de conservación por pulsos eléctricos  | 113 |
| 2. Canales de distribución de la leche en el Ecuador   | 113 |
| 3. (a) Microfotografías del daño de la membrana celular de <i>S. cerevisiae</i> después de ser tratadas con campos eléctricos pulsados (izq = control, dere=tratamiento); (b). Descripción de cargas en membrana celular microbiana  | 114 |
| 4. (a) Microfotografías del daño de la membrana celular de <i>L. brevis</i> después de ser tratadas con campos eléctricos pulsados (izq = control, dere=tratamiento)<br>(b) Electroporación de la membrana microbiana, (a) crecimiento del número de poros, (b) reordenamiento de cargas y de la membrana, (c) expansión del tamaño del poro resultado de la ruptura mecánica de la membrana | 115 |
| 5. Acidez de valoración  | 116 |

|  |     |
|--|-----|
| 6. Pulso de onda cuadrada  | 116 |
| 7. Sistema generador de pulso eléctrico  | 117 |
| 8. Determinación de densidad, “Ecomilk, milk analyzer, milkana kam98 -2A”  | 117 |
| 9. Determinación de pH (20°C)  | 118 |
| 10. Placas Petrifilm 3M  | 118 |
| 11. Inoculación  | 119 |
| 12. Cubrir con el film   | 119 |
| 13. Distribución de la muestra   | 119 |
| 14. Incubadora   | 120 |
| 15. Interpretación de siembras microbiológicas   | 120 |
| 16. Partes de la cámara de tratamiento   | 121 |
| 17. Llenado y extracción de la cámara de tratamiento   | 121 |
| 18. Sistema electrónico  | 122 |
| 19. Pantalla LED   | 123 |
| 20. Bobina de transformación   | 123 |
| 21. Adaptadores de energía empleados   | 123 |
| 22. Cámara metálica  | 124 |
| 23. Partículas extrañas contenidas en leche  | 124 |
| 24. Planta piloto de tratamiento, para inactivación de microorganismos y enzimas   | 124 |
| 25. Placas Petrifilm utilizados en los conteos microbianos (ejemplos de los tratamientos, a <sub>2</sub> b <sub>0</sub> , a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> , a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> y blanco ) | 125 |

## **ANEXO E (MÉTODOS Y PROGRAMAS)**

|  |     |
|--|-----|
| Método #1. INEN 013, “Determinación de la acidez titulable   | 127 |
| Método #2. Determinación de pH   | 127 |
| Método #3. Inoculación en placas Petrifilm   | 127 |
| Programa 1. Programación electrónica (software) utilizado, para el control y generación de pulsos eléctricos | 128 |



## RESUMEN

Se trabajó con muestras de leche cruda entera, obtenidas en las mismas condiciones que ésta llega a las plantas procesadores de lácteos y al consumidor final (densidad promedio de  $1030 \text{ kg/m}^3$ ; acidez titulable como ácido láctico 0,23%; materia grasa 3,7%)

Para el presente estudio se construyó y calibró un equipo prototipo generador de pulsos eléctricos de onda cuadrada que consta de una placa electrónica generadora de pulsos eléctricos de bajo voltaje (8, 10, 12V) y que por medio de inducción magnética – eléctrica (auto-transformador de energía eléctrica o bobina) la energía eléctrica de voltios es amplificada a kilovoltios (8, 10, 12kV). Que a diferencia de equipos encontrados en bibliografía, donde los pulsos eléctricos son obtenidos a partir de grandes transformadores eléctricos costoso y de difícil acceso.

Para el presente estudio se diseñó y construyó una cámara de tratamiento tipo estática o batch, que consta con dos electrodos circulares de aluminio macizo de 2 pulgadas de diámetro y un soporte de PVC circular, con una separación de electrodos de 3mm.

La energía eléctrica (8, 10, 12kV) al atravesar el espacio entre los electrodos forma el llamado campo eléctrico (resultado del voltaje empleado [kV], dividido para el espacio entre los electrodos [cm] de la cámara de tratamiento), así  $8[\text{kV}] \rightarrow 26.67 [\text{kV}/\text{cm}]$ ;  $10[\text{kV}] \rightarrow 33.33 [\text{kV}/\text{cm}]$ ;  $12[\text{kV}] \rightarrow 40[\text{kV}/\text{cm}]$ .

En el presente trabajo se colocó un líquido eléctricamente apto para conducir energía eléctrica (por contenido de iones y minerales como el caso de leche cruda entera), entre dos electrodos separados 3mm y se hizo circular un número determinado de pulsaciones eléctricas (250, 400, 500n) de alto voltaje (8, 10, 12kV), formándose en el intercepto de las muestras de leche cruda entera un campo eléctrico (26.67, 33.33, 40[kV/cm]), esto genera

en los microorganismos (coliformes totales) una deformación mecánica en la membrana citoplasmática (formación de poros) por el desequilibrio de potencial trans-membrana y finalmente se produce descompensación osmótica de sólidos entre el interior de la célula y el medio que los rodea.

En éste trabajo la combinación de tres niveles de pulsación eléctrica (250, 400, 500n; ancho de pulso 1ms), y tres niveles de voltaje (8, 10, 12[kV]), provocó un descenso parcial en la carga microbiana inicial ( $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml;  $N=1,4 \cdot 10^4$  ufc/ml), obteniéndose dos reducciones logarítmicas. Además no se detectó ningún incremento de temperatura en las muestras de leche cruda entera tratadas con pulsos eléctricos.

Con las características de proceso del mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12$ kV,  $E_p=40$  kV/cm, 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas 3mm,  $V= 6.08$ ml, a temperatura ambiente  $20^\circ\text{C}$ ), aplicado a muestras de leche cruda entera se realizaron experimentos con la combinación de bajas temperaturas (tecnología de barreras), obteniéndose un incremento de eficiencia del tratamiento ( $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml;  $N=3.0 \cdot 10^2$  ufc/ml;  $T^\circ\text{C}=2$ ), así con ésta variante se consigue 4 reducciones logarítmicas.

Después del análisis sensorial los catadores no detectaron ningún cambio significativo en las propiedades organolépticas del producto tratado.

# **CAPITULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN:**

“Estudio de reducción de carga microbiana inicial de leche cruda entera aplicando pulsos eléctricos de alto voltaje”.

### **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.2.1 CONTEXTUALIZACIÓN**

##### **1.2.1.1 Contextualización Macro**

La leche se ha convertido en el alimento por excelencia en la nutrición humana, es consumida en todas las regiones del mundo y en especial en la región andina. En la Tabla 2 se resume la producción de leche en diversos países andinos.

Sica (2009), la comunidad andina tiene un promedio de producción hasta el año 2003 de 9’360.000 toneladas métricas de leche. La alta producción de un alimento y materia prima de consumo masivo, demanda el desarrollo de tecnologías avanzadas para su conservación.

##### **1.2.1.2 Contextualización Meso**

En Ecuador, en el artículo del diario “El Comercio” (23 de Octubre del 2008), el Consejo Consultivo de la Leche, manifiesta que en el país hay un excedente de 200.000 litros diarios debido a la baja demanda y alta productividad. Se ratificó el precio oficial para leche pero ésta disposición, por lo general no se cumple.

Este excedente, sumado el alto precio de leche, provoca el encarecimiento de calidad de vida de la población, disminuye el consumo de un producto natural y nutritivo, además hay una contradicción “si hay un excedente del producto el precio no debería ser elevado, al contrario esta sobreproducción supone la accesibilidad mayor por un precio más bajo.

Este excedente, en nuestro país, provoca que a los productores se les pague menos que el precio oficial fijado, aproximadamente 0.35 USD por cada litro.

En el Ecuador hay una producción de leche de 4,5 millones de litros diarios, “El comercio” (4 de Octubre del 2008) según el “Servicio de Información y Censo Agropecuario (Sica)”, señala que existen 4’486.020 reses productoras de leche. De las cuales 2’274.177 se ubican en la Sierra, y la mayor producción de leche dan las provincias de Azuay, Cañar, Chimborazo, Tungurahua, Carchi y Pichincha.

### **1.2.1.3 Contextualización Micro**

En la Tabla 1, según las estadísticas del INEC se observa la producción diaria de leche, en las diferentes provincias de la sierra.

La producción en las provincias de Azuay, Cotopaxi y Chimborazo comparten el 8% de la producción nacional, el 6% de producción en la provincia de Tungurahua y la provincia con mayor consumo y producción es la de Pichincha. Es frecuente que en cada provincia haya un excedente de producción posiblemente desperdiciado.

### **1.2.2 ANÁLISIS CRÍTICO**

La leche es un alimento muy importante en la nutrición de los seres humanos y animales mamíferos, para su desarrollo corporal, aporte de anticuerpos, material de información sobre enfermedades, calcio y demás componentes que vuelven a la leche un alimento completo y complejo por ser una emulsión muy estable de agua, grasa y proteínas.

La Tabla de Composición Nutricional de Alimentos Ecuatorianos (1978), señala que la leche en cien gramos de producto tiene 87.8g de humedad (agua), 3.1g de proteínas, 5.4g de carbohidratos totales, 0.91mg de calcio, 0.90mg de fósforo, 0.2mg de hierro, 0.01mg de carotenos, 0.02mg de tiamina, y otros componentes que lo hacen un alimento único.

La leche es el alimento y materia prima más utilizada y más consumida de todos los existentes. La producción de leche, en cualquier escala (mayorista o minorista), se ve

afectada en nuestro país por el mal manejo, irrespeto del precio oficial, alto precio de leche procesada (procedimientos térmicos agresivos de conservación), y sus sub productos provocando disminución en el consumo de productos lácteos.

Gutiérrez J. (2006), los procedimientos comunes de conservación están sujetos a la utilización del calor como forma de reducción o eliminación de microorganismos, con pérdidas de nutrientes como: vitamina C, B1, B6 y B12, alteración y desnaturalización de la estructura proteínica tornándola insoluble, liberación de ácido sulfhídrico dando un sabor y olor a cocido y precipitación de minerales especialmente fosfato de calcio.

En el mercado la leche se la puede encontrar en varias presentaciones; líquida, en polvo, condensada, evaporada, entera, descremada, semidescremada y deslactosada, y sus subproductos como el queso, yogur y mantequilla. Siendo la leche fluida el inicio de toda la cadena de producción que puede sufrir contaminación cruzada por el desconocimiento sobre el cuidado que se debe tener hacia los animales y el producto obtenido.

En la Figura 2, se observa los tipos de comercialización nacional que existen, la línea de los distribuidores “clandestinos” es casi directa, pero la solución no es quitarles su medio de ingresos, sino es estudiar y aplicar sistemas de conservación alternativos no lacerantes para productos de tan alto consumo.

En nuestro país aparentemente no hay razón que justifique el incremento del precio de leche e inclusive tenemos un excedente de 200.000 litros de leche diarios, sin duda los procesos por los cuales son transformados son los culpables directos del aumento de precio de la leche, los diversos insumos y maquinaria utilizada.

En la Tabla 3, según las estadísticas del INEC se considera todos los recursos que intervienen en la producción por cada litro de leche y su precio de venta.

Según la Tabla 3, en el año 2000 se estima que el costo de producción es de 14 centavos de dólar, en el 2001 de 18 centavos de dólar, y progresivamente el precio sigue

aumentando por los otros costos que se involucran con la producción de leche, como lo son insumos, fertilizantes, entre otros.

El excedente indica claramente que la población está dejando de consumir productos lácteos y a futuro menoscaba su salud, los productores se han quedado estancados y no pueden evolucionar y la sobre oferta ha disminuido inclusive el precio oficial.

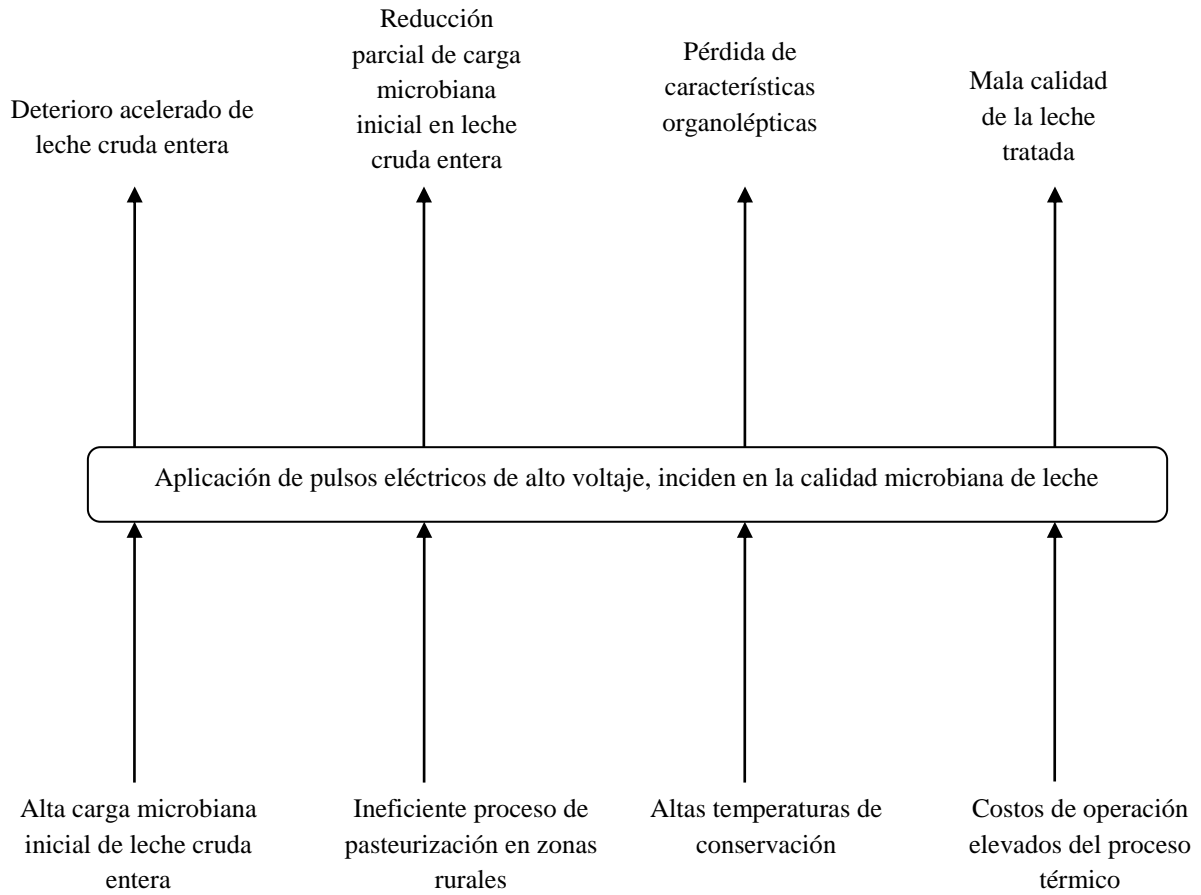
La solución está en generar métodos eficaces, sencillos, rápidos, y de bajo costo que permitan conservar éste tipo de productos muy perecible por su gran cantidad de nutrientes, sin alterarlos ni usar métodos térmicos severos. Las necesidades en nuestro país son grandes y el aporte de ideas nos dará soluciones a corto y largo plazo.

Según Sampedro (2008), “la creciente demanda de alimentos con características lo más parecidas al producto fresco, está impulsando el desarrollo de nuevas tecnologías “no térmicas” de conservación.

Según Sampedro (2008), dentro de las tecnologías alternativas más prometedoras se encuentran el tratamiento por “pulsed electric field” (PEF) y la tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP). Estas tecnologías permiten conservar, en mayor medida que los tratamientos térmicos, la calidad (sabor, aroma, color y vitaminas) de determinados alimentos frescos mediante la inactivación de microorganismos y enzimas”.

### 1.2.2.1. ÁRBOL DE PROBLEMAS.

Efectos



Causas

Elaborado por: Carrillo D.

### **1.2.2.2. RELACIÓN CAUSA-EFECTO**

La alta carga microbiana inicial de leche cruda entera es el inicio de problemas sanitarios y de calidad de productos tratados sumado los procesos precarios de manipulación de reses y materia prima hace necesario el estudio y la implementación de tecnologías innovadoras y eficaces.

La alta carga microbiana inicial de leche cruda entera ha emplazado al desarrollo de tecnologías nuevas, y en nuestro medio aún más.

### **1.2.3 PROGNOSIS.**

El no estudio de la aplicación de nuevas tecnologías emergentes, como la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje y campo eléctrico, mantendrá estancado el avance tecnológico y la continua utilización de procesos agresivos para los alimentos, tal es el caso de los procesos térmicos.

El no estudio de la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje, hacia un producto de tan alto consumo humano como leche vacuna, detendrá una tecnología capaz de tratar este alimento sin incremento de temperatura y datos descritos en el presente trabajo que servirán para futuras investigaciones.

### **1.2.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿La alta carga microbiana inicial de leche cruda entera puede ser reducida total o parcialmente con la aplicación pulsos eléctricos de alto voltaje?

### **1.2.5 INTERROGANTES.**

- ¿El tratamiento con pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), al ser aplicados a muestras de leche cruda entera, pueden provocar una reducción significativa e importante de la carga microbiana inicial?
- ¿El tratamiento con pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV) al ser aplicados a muestras de leche cruda entera, es capaz de tornar a la leche cruda entera, microbiológicamente viable para su consumo?



- ¿El tratamiento con pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), en muestras de leche cruda entera, incrementan la temperatura al igual que un proceso térmico común (pasteurización abierta: 65°C x 30 min.)?
- ¿El tratamiento con pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV) al ser aplicados a muestras de leche cruda entera, tiene mayor efectividad respecto a la estabilización microbiológica que los procesos térmicos comunes (pasteurización abierta: 65°C x 30 min.)?
- ¿El tratamiento con pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV) al ser aplicados a muestras de leche cruda entera, tienen menor costo económico que los procesos térmicos comunes (pasteurización abierta: 65°C x 30 min.)?
- ¿El tratamiento con pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), es capaz de reemplazar a los procesos térmicos comunes (pasteurización abierta: 65°C x 30 min.)?

### **1.2.6 DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN.**

|                      |  |
|----------------------|--|
| Área                 | : Investigación en ingeniería de procesos de alimentos |
| Sub-área             | : Investigaciones tecnológicas emergentes.             |
| Sector               | : Lácteo   |
| Sub sector           | : Tratamientos alternativos no térmicos.               |
| Situación geográfica | : Ambato - Tungurahua                                  |
| Espacial             | : Año 2010   |

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

El interés por investigar modifica los paradigmas generales, nos hemos sometido a ideas que no permiten nuestro avance, la idea de que existe “alguna forma” distinta a lo que

conocemos alienta a investigar, buscar y encontrar las soluciones requeridas, un dicho popular señala “es mejor intentar y fallar que morir sin hacer nada”.

El estudio de aplicación de pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), tiene su importancia teórica en las técnicas alternativas no térmicas.

Raventos (2005), los tratamientos con pulsos eléctricos no son tóxicos, porque el efecto físico que se produce es una deformación de la membrana o pared celular de los microorganismos por una diferencia de potencial en ambos lados de la membrana, y cuando éste potencial alcanza un valor crítico la formación de poros es irreversible con lo que se consigue la permeabilización de microorganismo y su muerte por desequilibrio osmótico.

Barbosa (1999), cuando un campo eléctrico es aplicado, la resistencia de la membrana microbiana desciende rápidamente mientras la conductancia o conductividad se incrementa más allá del umbral crítico de potencial en ambos lados de la membrana, Figura 4(a), Figura 5(a), debido a la polarización de la membrana donde la acumulación de cargas negativas y positivas en ciertas partes, que actúan como un cátodo y ánodo, y si el stress es suficiente las dos cargas se unen y provocan la deformación mecánica de la membrana y la muerte del microorganismo, Figura 4(b), Figura 5(b).

Hui y col. (2006), tiene su importancia práctica porque es posible y viable el desarrollo de un sistema de conservación fría y en un futuro reemplazar maquinaria costosa como un pasteurizador e inclusive a maquinaria de UHT.

Raventos (2005), “la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo es una técnica desarrollada para la conservación de alimentos mediante un proceso no térmico, con lo que se obtiene un producto de gran calidad parecido al producto fresco y debe su importancia a la capacidad de estabilizar alimentos sin variar la calidad original”.

Por eso se debe investigar más ésta tecnología para mejorarla y tener datos concluyentes y en el futuro reemplazar, en lo posible, a los tratamientos térmicos.

Esta tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje se basa en la capacidad de los alimentos fluidos por ser buenos conductores eléctricos, debido las altas concentraciones de iones que contienen.

La leche por ser uno de los alimentos más completos de la naturaleza requiere de procesos de conservación, no agresivos para su composición natural, obtener productos de calidad y en lo posible lo menos manipulados.

Costa y col. (2001), la conservación de alimentos, y en especial de leche, obedece en su mayoría al control de la población microbiana, porque estos microorganismos tienen una producción de enzimas que pueden dañar el producto a corto y largo plazo, por ejemplo la producción de enzimas proteolíticas termorresistentes que soportan tratamientos térmicos. Los cambios que cada vez son más acelerados en el mundo, obliga a que se de un cambio en las formas arcaicas de producción, las fábricas deben utilizar tecnologías nuevas y alternativas, más baratas y rápidas con posterior incremento de rentabilidad, sin olvidar al ecosistema evitando que no haya residuos industriales como la emisión de gases nocivos, desperdicio de agua o desechos tóxicos.

Su factibilidad se basa en el deseo de investigar nuevas alternativas de conservación no térmica, además los nuevos investigadores podrán tomar otras líneas tecnológicas o potenciar los resultados descritos en el presente estudio de aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar la reducción de la carga microbiana inicial en muestras de leche cruda entera al aplicar pulsos eléctricos de alto voltaje.

### **1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar ajustes y calibrar el equipo prototipo para la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje y determinar el mejor tratamiento, al aplicar tres niveles de pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), y tres niveles de voltaje (8, 10, 12 kV), para provocar una reducción total o parcial de la población microbiana inicial de muestras de leche cruda entera.
- Describir gráficamente mediante curvas de muerte microbiana, el efecto de la aplicación de tres niveles de pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), y tres niveles de voltaje (8, 10, 12 kV), sobre la población inicial de microorganismos en nuestras leche cruda entera.
- Comparar si el mejor tratamiento de la aplicación tres niveles de pulsos eléctricos (250, 400, 500 pulsos), y tres niveles de voltaje (8, 10, 12 kV) es eficiente y puede reemplazar a métodos comunes de pasteurización.
- Proponer una alternativa de estudio (propuesta) tomando la experiencia investigativa como guía y potenciar el estudio a niveles avanzados de experimentación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1 Calidad microbiológica y problemas sanitarios en leche.

Para el estudio de aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje, se debe señalar los problemas sanitarios y de contaminación que afectan la calidad microbiológica de éste alimento de consumo masivo.

También hay casos más graves de contaminación, manipulación y distribución, que se conoce de su existencia sin haber pruebas escritas, que no solo afectan al Ecuador sino a todas las regiones de América Latina.

Reuben y col. (2003), señala que “de acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria a incrementado su frecuencia en un 300% más de lo que se indica en reportes anteriores.

Reuben y col. (2003), entre los principales patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., que junto con *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii*, que son causantes de 3,3 a 12,3 millones de casos en Estados Unidos y alrededor de 3.900 muertes.”

Costa y col. (2002), señala un problema sanitario en la producción de leche en el sur de Chile, *Pseudomonas fluorescens* es la especie de bacteria psicrotrofica que permanece intacta en los periodos de refrigeración de leche previa transformación y que produce la formación de enzimas termo-resistentes causantes del deterioro de productos lácteos procesados de larga vida.

Costa y col. (2002), el Gráfico 1 señala la relación entre el desarrollo de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y la producción de enzimas proteolíticas perjudiciales para la calidad de leche, su efecto consisten en la hidrólisis de  $\beta$ -caseína posteriormente la coagulación, gelificación y desarrollo de sabores desagradables y amargos.

Medina y col. (2001), en el sector de Maracaibo – Venezuela, señala que las bacterias ácido lácticas también representan un problema, algunas especies pueden sobrevivir a procesos de pasteurización, presentando un problema potencial en los jugos concentrados y refrigerados de naranja.

Medina y col. (2001), la leche por su contenido elevado de nutrientes es un muy buen medio de cultivo para microorganismos patógenos, destacándose no solo los de origen fecal, sino también *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, aunque éstos no son comunes que se transmitan por los alimentos, el ganado puede convertirse en una “incubadora” de entero-cocos resistentes a los antibióticos y a procesos de pasteurización.

Si llegan a introducirse en cadenas alimentarias humanas las consecuencias sanitarias y de salud pública serían severas y perjudiciales.

Calvo (2004), en su estudio en la prevalencia de parásitos y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos en la feria del agricultor del Valle Central de Costa Rica, determina que diversos cuadros infecciosos de importancia se relacionan con la invasión de parásitos como *Lambliia intestinalis* y *Entamoeba histolítica*, *Cyclospora cayetanensis*, *Criyptosporidium sp.* y los *Microsporidios* (ooquistes esporulados) han hecho su aparición como patógenos vinculados al consumo de alimentos.

Dávila y col. (2006), los productos derivados de leche, en condiciones no favorables de fabricación, por citar un ejemplo el del queso, que se lo ha asociado como un portador de bacterias y diversas enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), por la presencia de *Staphylococcus aureus*, bacterias patógenas como *Salmonella sp*, levaduras,

coliformes totales, coliformes fecales, Tabla 4, se presenta recuentos microbiológicos determinados en leche procesada y semi procesada.

Rojas y col. (2006) señala que, “en la actualidad se reconocen cinco clases de *Escherichia coli* enterovirulentas las cuales frecuentemente causan trastornos gastrointestinales en el hombre y otros animales por distintos mecanismos de patogenicidad, de estos grupos es quizás el enterohemorrágico el que mayor peligrosidad representa, por cuanto pueden causar trastornos tan severos que incluso ocasionan la muerte”, los alimentos con mayor importancia que sirven de transporte para éste tipo de bacterias son carne molida, leche no pasteurizada y sus derivados, jugos de frutas no pasteurizados, vegetales crudos y agua no tratada.

### **2.1.2 Efecto nocivo de tratamientos térmicos.**

Quitral (2001), su estudio en carne de jaiba mora (*Homalaspis plana*) de la V Región en Chile, indica que los tratamientos térmicos provocan desnaturalización de proteínas, alteraciones químicas que forman residuos de aminoácidos con formación de nuevos enlaces covalentes intra o intermoleculares.

Quitral y col. (2001), lisina se considera nutricionalmente disponible solamente si su grupo amino esta libre, así los 0.25 gr/100gr del contenido de lisina en la leche de vaca se pueden ver seriamente afectados en su contenido, reacciones entre aminoácidos y azúcares reductores, conocida como “reacción de Maillard” que disminuye el valor nutritivo de los alimentos y disponibilidad de aminoácidos en especial de lisina que es el aminoácido más reactivo en el pardeamiento.

### **2.1.3 Aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje.**

Raventos (2005), cada vez las tecnologías alternativas son estudiadas y perfeccionadas, los estudios recientes sobre campos de pulsos eléctricos llama mucho la atención porque tienen la capacidad de estabilizar alimentos sin alteraciones significativas en características nutricionales y organolépticas de los alimentos tratados, aprovechando el contenido de iones que favorecen la conductividad eléctrica.

Barbosa y col. (1999), la aplicación de campos eléctricos pulsados tiene su fundamento en que los alimentos al igual que otros materiales como los metales, tienen una conductividad eléctrica, en menor o mayor proporción. La Figura 1, muestra los pioneros de ésta tecnología.

Barbosa y col (1999), la leche es un alimento líquido que actúa como un conductor de energía eléctrica por su gran contenido de iones y minerales, en general los alimentos con alta conductividad eléctrica son difíciles de tratar con pulsos eléctricos debido a su baja resistividad eléctrica.

Ochoa (2007), en sus estudios de conductividad eléctrica sobre tejidos cárnicos, da los siguientes valores: para carne de cerdo 0.76 [S/m], res 0.55 [S/m], y pavo 1.10 [S/m], todas las muestras se le aplicaron un voltaje de 6.8[V/cm] de corriente alterna y 60 Hz de frecuencia.

Beattie y Lewis en 1924, citados por Barbosa y col (2001), demostraron el efecto nocivo de las descargas eléctricas, de 3000 a 4000V, en suspensiones de microorganismos y alimentos.

Sale y Hamilton en 1967, citados por Barbosa y col (2001), dan una descripción del efecto de los campos eléctricos (25[kV/cm], pulsos de 2 a 20 $\mu$ s), en la membrana celular de los microorganismos observando los “poros irreversibles” que se producen.

Otros autores como Vega-Mercado en 1996, citado por Raventos (2005), señalan que la velocidad de inactivación de los microorganismos depende de la fuerza iónica del medio y del pH, a valores más bajos de pH en muestras de leche la inactivación es mejor, pero se corre el riesgo que la leche “corte” por la pérdida del punto isoeléctrico de la caseína.

Jeantet en 1999, citado por Raventos (2005), señala en sus estudios con *Salmonella enteritidis* que a un pH más alto se obtiene un mejor resultado.



Sale y Hamilton en 1968, citados por Raventos (2005), señalan que no hay influencia por parte del pH del alimento tratado.

Raventos (2005), la población bacteriana también tiene su efecto, a más concentración de microorganismos menor eficacia del tratamiento, a mayor fuerza iónica mayor inactivación de microorganismos.

Los datos no son suficientes y concluyentes para dar un lineamiento definitivo, sino que la acumulación y aporte de información, da mejores referencias.

Las Tablas 6 y 7, dan un resumen, de varios trabajos realizados por diferentes científicos, dando a conocer algunos parámetros de tratamientos como; tipo de alimento tratado, tipo de microorganismo estudiado, reducciones logarítmicas microbianas y condiciones de tratamiento.

La Tabla 9 señala las siguientes reducciones logarítmicas de microorganismos (en referencia a coliformes totales y *Esterichia coli.*) en muestras de leche previamente tratada UHT 1,5% grasa, ultra filtrada; las condiciones de tratamiento; cámara estática (batch)  $V=25\text{ml}$ ,  $d=0,5\text{cm}$ ,  $E_p= 22,4[\text{kV/cm}]$ ,  $n=5\mu\text{s}$  onda cuadrada, dan máximo 1 ciclo logarítmico.

Leche UHT 1,5% grasa, ultra filtrada, cámara estática,  $V=25\text{ml}$ ,  $d=0,5\text{cm}$ ,  $E_p= 22,4[\text{kV/cm}]$ ,  $n=10\mu\text{s}$  onda cuadrada, dan 2 reducciones logarítmicas.

Leche UHT 1,5% grasa, ultra filtrada, cámara estática,  $V=25\text{ml}$ ,  $d=0,5\text{cm}$ ,  $E_p= 22,4[\text{kV/cm}]$ ,  $n=15\mu\text{s}$  onda cuadrada, dan 3 reducciones logarítmicas y leche UHT 1,5% grasa, ultra filtrada, cámara estática,  $V=25\text{ml}$ ,  $d=0,5\text{cm}$ ,  $E_p= 22,4[\text{kV/cm}]$ ,  $n=20\mu\text{s}$  onda cuadrada, dan 4 reducciones logarítmicas.

Estudios en un producto llamado SMUF (siglas inglesas “simulated milk ultra filtrate”), con 0% grasa, cámara continua,  $V=8.5\text{ml}$ ,  $d=0,51\text{cm}$ ,  $E_p= 50[\text{kV/cm}]$ ,  $n=48$ ,  $t=2\mu\text{s}$  onda cuadrada, dan 3,6 reducciones logarítmicas.

Leche descremada, cámara continua,  $E_p = 50$ [kV/cm],  $n=48$ ,  $t=2\mu s$  onda cuadrada, dan 3,5 reducciones logarítmicas.

Leche descremada, cámara estática,  $V=14$ ml,  $E_p = 50$ [kV/cm],  $n=62$  onda cuadrada,  $t=2\mu s$  dan 2,5 reducciones logarítmicas.

SMUF, cámara continua coaxial,  $V=29$ ml,  $d=0,6$ cm,  $E_p = 25$ [kV/cm],  $n = \pm 300$ , onda de caída exponencial, da hasta 7 reducciones logarítmicas.

En “modified SMUF”, cámara estática de placas paralelas,  $V= 14$ ml,  $d=0,51$ cm, obtiene 9 reducciones logarítmicas.

Chalise y col. (2006), los dos factores más importantes que se deben considerar para el diseño de un tratamiento con campos eléctricos pulsados, corresponden a la intensidad de campo eléctrico [kV/cm] y el número de pulsos, por lo general se acepta que la duración superior a un segundo y de alta intensidad de campo eléctrico puede provocar daño irreversible o la llamada electroporación, en los microorganismos no deseados en los alimentos.

Piug y col. (2006), con campos eléctricos pulsados sobre mostos para tratamiento de poblaciones de levaduras, bacterias lácticas y acéticas como: *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Gluconobacter oxydans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* dan reducciones microbianas superiores a 4 ciclos y 2.5 ciclos logarítmicos para el caso de las levaduras y bacterias acéticas respectivamente.

Raventos (2005), estudios anteriores demuestran que la destrucción de población microbiana depende del tipo de microorganismos (Tabla 8), así las células eucariotas, y más aún en la fase logarítmica de crecimiento, ofrecen menos resistencia a condiciones adversas que las células procariotas.

Raventos (2005), las bacterias Gram negativas tienen un valor crítico trans-membrana más bajos que las Gram positivas, también las levaduras son más resistentes a la inactivación con pulsos eléctricos de baja intensidad de campo por su constante-cinética que es más baja que el de las bacterias.

La Tabla 8, señala algunas características de microorganismos patógenos presentes en alimentos.

Grahl y Märkl (1996), en su estudio comparan un tratamiento por ultrasonido contra tratamiento por campos eléctricos pulsados, dando como resultados que el ultrasonido destruye un 47% del contenido proteínico en levaduras y el tratamiento por pulsos eléctricos un 4.7%.

Grahl y Märkl (1996), corroborando que la tecnología de pulsos eléctricos no destruye bacterias sino tan solo forma poros en las membranas celular provocando el desbalance osmótico. Estudio muy importante para confirmar que las pulsaciones de campo eléctrico no destruyen proteínas en alimentos tratados.

Gutiérrez De Piñeres y col. (2007), en su estudio, al aplicar campos eléctricos en muestras de uchuva (*Physalis peruviana*) de 15[kV/cm] en tratamientos de 20 segundos, describe que el proceso es capaz de detener el crecimiento fúngico por mas de 10 días (tratamiento aplicado a *Fusarium sp*), disminuyendo las pérdidas pos-cosecha de ésta fruta.

Juárez (2007), aplica pulsos eléctricos en “salsas mexicanas” con 9 y 12 kV por 20 y 40s, la inactivación microbiana fue efectiva en un 99.99%. El tiempo de almacenamiento máximo fue de treinta días refrigeración y temperatura ambiente. A los 45 días a temperatura ambiente hay desarrollo de 9 ufc/g de mesófilos, 1 ufc/g de mohos, 6 ufc/g de levaduras, y 2 ufc/g de colonias mesófilas en las muestras en refrigeración.

Un efecto combinado entre procesos de calor y pulsación eléctrica, lo señala Simpson y col. (2007), cuando el tratamiento se realiza con voltaje bajos ( $<100\text{V/cm}$ ) y periodos largos de tiempo se produce un efecto térmico llamado “calentamiento óhmico” (el alimento actúa como resistencia), el cual eleva la temperatura desde el interior del alimento, se producen cambios estructurales importantes en la membrana celular alterando su permeabilidad, “electroporación”, éste efecto es aprovechado en el rendimiento de procesos de extracción y secado de alimentos.

Simpson y col. (2007), la variación de la intensidad del campo eléctrico ( $104 - 105\text{ V/cm}$ ) proporciona en mayor o menor grado una reducción de la población microbiana, pero una intensidad de campo menor a  $100\text{ V/cm}$  la permeabilización de la membrana es reversible.

Simpson y col. (2007), señala que éste efecto de “electropermeabilización” forma poros en las membranas biológicas, a su vez éstos poros degeneran el balance o equilibrio osmótico entre los volúmenes y sustratos internos y externos de las células.

Simpson y col. (2007), la electropasmólisis en tejidos biológicos de verduras aumenta la conductividad eléctrica, difusividad, coeficientes de transferencia de calor y de masa, esto disminuye la compresibilidad y la fuerza de los tejidos biológicos.

El efecto de electropermeabilización, se muestra en la Tabla 5, donde la diferencia en el contenido de sólidos solubles entre el tratamiento de deshidratación osmótica común y la deshidratación ayudada por el calentamiento óhmico.

Tabla 5, muestra el efecto de la electropermeabilización, desestabiliza el equilibrio osmótico, permitiendo la introducción más rápida de sólidos en el interior de las células biológicas.

Con un tratamiento óhmico en la deshidratación de frambuesa, se alcanza los  $50\text{ }^\circ\text{Brix}$  en 120 minutos de tratamiento, frente a los 420 minutos que el tratamiento convencional para obtener los mismos  $50\text{ }^\circ\text{Brix}$ .

#### **2.1.4 Efectos de los pulsos eléctricos en los microorganismos.**

Sampedro (2007), “el principio básico de ésta tecnología consiste en generar un alto voltaje en el alimento contenido en medio de dos electrodos separados por una distancia determinada. Los rangos de operación son; un tiempo de tratamiento de 1 – 2500 $\mu$ s y campo eléctrico de 10 – 80 [kV/cm]”. Y el objetivo que persigue ésta tecnología es conservar los alimentos a través del tiempo manteniendo las características nutricionales y organolépticas iniciales del alimento sin tratar”.

Da-Wen Sun y varios autores (2005), señalan otros parámetros de operación: DC voltaje 2.5 – 43 kV;  $E_f$  0.6 – 100[kV/cm], distancia de los electrodos 3 - 77mm, ancho del pulso 1 $\mu$  - 10 ms, frecuencia de pulso 0.2 – 50 Hz, número de pulsos aplicados 1 – 120, volumen de alimento procesado 0.5ml – 1.6 l. y los resultados que pueden esperar son: de 1- 3 ciclos logarítmicos en la reducción de la población microbiana que equivalen a > 6 ciclos logarítmicos.

Sampedro (2007), “esta tecnología es una alternativa prometedora, indicada especialmente para evitar los procesos térmicos de pasteurización en alimentos que tienen componentes nutritivos termolábiles tal es el caso de zumos y jugos de frutas y vegetales, leche, huevo líquido, entre otros”.

Sampedro (2007), señala una restricción en referencia al “quiebre dieléctrico o arco dieléctrico”, este fenómeno es producido cuando el campo eléctrico excede la fuerza dieléctrica del alimento causando la interrupción del tratamiento. Otros factores también producen la interrupción del proceso como una intensidad eléctrica muy elevada, alta conductividad eléctrica del alimento y presencia de burbujas de aire.

Chalise y col. (2006), señala que la resistencia de la membrana celular microbiana, actúa como aislante dejando zonas sin cargas eléctricas, pero en las zonas que si hay “la acumulación de carga superficial” se forman los “poros”, lisis celular, desequilibrio de gradientes de concentración de solutos y muerte de los microorganismos.

Raventos (2005), los campos eléctricos provocan una deformación o destrucción de la membrana celular (acumulación de carga superficial y aumento en la diferencia de potencial a través de la membrana) debido a la formación de una diferencia de potencial en ambos lados de la membrana generando poros. Cuando el “potencial transmembrana” alcanza un valor determinado, que facilita y altera la permeabilidad de la membrana (atracción física de las cargas un lado y del otro de la membrana produciendo compresiones mecánicas y la formación de poros), Figura 3(a)(b) y 4(a)(b).

Raventos (2005), dichos poros pueden ser irreversibles o reversibles, dependiendo si la intensidad del campo eléctrico excede o no el umbral requerido para la destrucción del microorganismo.

Barbosa (1999), los parámetros más importantes son el voltaje y el número de pulsos del tratamiento, también hay otros factores como la amplitud del pulso por el número de pulsos, temperatura del tratamiento, conductividad, pH, fuerza iónica del alimento y del tipo y tamaño del microorganismo, concentración y etapa de crecimiento, además los alimentos actúan como una resistencia al paso de la corriente eléctrica, debido al contenido de minerales, triglicéridos, vitaminas, entre otros, que ayudan o resisten el paso de las descargas eléctricas. Figura 3(a) y 4(b), indica la destrucción física de la membrana citoplasmáticas antes y después de los tratamientos.

Barbosa (2001), la electro-poración es un proceso que se puede definir en tres pasos, (1) formación del poro  $3\mu\text{s}$  después de la aplicación de la pulsación, (2) expansión del poro formado  $20\mu\text{s}$  después de la aplicación de la pulsación cuando la expansión es de 20 a 120 nm de diámetro y (3) encogimiento del poro formado varios segundos después del tratamiento.

Barbosa (1999), si el campo eléctrico se mantiene, el tamaño y número de poros aumenta. Se cree que el número de poros aumenta a medida que el campo eléctrico incrementa y el radio del poro crece cuando se alarga la duración del pulso.

### **2.1.5 Parámetros que pueden alterar el tratamiento con pulsos eléctricos.**

Sampedro (2008), señala las siguientes variables de las cuales depende la eficacia del tratamiento con campos eléctricos pulsados:

**La caída di eléctrica** o la alteración dieléctrica de los alimentos al ser tratados con campos eléctricos pulsados, provoca la interrupción del tratamiento, por la alta conductividad que se genera en las burbujas de aire dentro del alimento formando el llamado arco dieléctrico.

**La conductividad eléctrica** del alimento mientras más alta sea el tratamiento es menos efectivo. Así un descenso en la conductividad eléctrica producirá alto diferencial de resistividad eléctrica entre los microorganismos y el medio en el que están inmersos, creando un flujo osmótico y iónico de sustancias a través de la membrana bacteriana, permeabilidad y sensibilidad a los tratamientos.

Barbosa y col. (1999), en dicha membrana la resistividad decrece mientras incrementa el potencial trans-membrana hasta que la acumulación de cargas negativas y positivas a manera de ánodo y cátodo forma poros (electropermeabilidad).

Barbosa y col. (1999), una conductividad eléctrica que aumenta de 2,3 a 4 mS/cm, la inactivación de bacterias como *S.senftenberg* y *L. monocytogenes*, también incrementa la tasa de descenso microbiano.

**El pH** ayuda al estrés de las membranas celulares, la alta concentración de iones  $H^+$  aceleran la permeabilización de la membrana después del tratamiento.

Alais (1985), el pH puede caer a valores bajos por la acidificación natural que sufre la leche, es decir por factores de caseína, materias minerales (fosfatos,  $CO_2$ , entre otros), overrun, entre otros. Pero en casos de contaminación microbiana ésta acidificación aumenta por presencia de ácidos orgánicos, Figura 5.

**La actividad de agua** puede reducir la efectividad del tratamiento, así con una actividad de agua del 0.99 a 0.93, el tratamiento se ve afectado por el aumento de la conductividad eléctrica, aunque hay otros autores que señalan que la actividad de agua dependiendo del microorganismo influye en menor o mayor grado.

**La viscosidad**, Tabla 10, es el factor más influye en la eficacia de los tratamientos con pulsos eléctricos, la presencia de partículas puede inducir el cambio de la conductividad eléctrica del alimento y esto puede provocar la interrupción del tratamiento.

Alais (1985), leche vacuna tiene una viscosidad superior a la del agua debido a materia grasa en estado globular, macromoléculas proteicas y otras sustancias disueltas influyen en menor grado. También el pH tiene su impacto en la viscosidad un valor por debajo de 6 incrementa éste valor y cualquier alteración o modificación en la materia grasa o proteínas.

Barbosa y col. (1999), el efecto de ésta tecnología disminuye en alimentos con alta viscosidad (materia grasa) y partículas en suspensión debido a ruptura dieléctrica, puesto que las partículas suspendidas tienen una conductividad y resistividad eléctrica distinta a la del medio, el avance de las cargas eléctricas a través de la superficie de éstas partículas en suspensión y su tamaño hace que el efecto de los campos eléctricos pulsados sea menor.

Sampedro (2008), **el tipo de microorganismo**, los Gram+ son más resistentes a los tratamientos con campos eléctricos por la composición de su membrana y las esporas son casi indestructibles.

Sampedro (2008), las levaduras son las más sensibles por el gran tamaño celular (9µm), porque los pulsos eléctricos afectan directamente a las estructuras. Los autores señalan que la combinación de algunos tratamientos (**acumulación de barreras**) se logra un efecto mayor en la destrucción de microorganismos.



Raventos (2005), **Las bacterias Gram negativas** tienen un valor de potencial transmembrana más bajo que las Gram positivas por esa razón las bacterias Gram negativas son menos resistentes.

**El contenido inicial de microorganismos** también es un factor importante puesto que en concentraciones muy elevadas se forman agregados de microorganismos que disminuyen el efecto del tratamiento.

La **etapa de crecimiento** en la que se encuentran los microorganismos determina la resistividad de la membrana y eficacia del tratamiento. La fase logarítmica de crecimiento, en que la membrana celular se encuentra en constantes divisiones, se ha identificado como la menos resistente al tratamiento con pulsos eléctricos, en contraste con la etapa estacionaria o formación de esporas donde presentan la mayor resistencia.

En la Tabla 8, se aprecia *E. coli* y coliformes totales *Salmonella spp.* Son bacterias Gram negativas, el tipo de bacterias de control sanitario.

Ho y col. (1995), en su estudio señala que a  $>25$ [kV/cm], el número de pulsos eléctricos ( $\geq 10$ ), el periodo de aplicación ( $\geq 2$  s) no fueron los parámetros que más influyen en la muerte de microorganismos (*Pseudomona fluorescens*) sino lo que en verdad distingue a un tratamiento del otro es la **distancia de los electrodos**, y se obtienen mejores resultados si se incrementa el estrés en la membrana celular en conjunto con el tratamiento de campos eléctricos pulsados.

Barbosa (2001), la constante dieléctrica de los alimentos incrementa con el contenido de agua y decrece con el aumento de temperatura, aunque en alimentos la conductividad eléctrica incrementa con el aumento de temperatura.

### **2.1.6 Generación de pulsos eléctricos.**

Ravéntos (2005), los **pulsos eléctricos de onda cuadrada** son los más utilizados, puesto que al principio generan un aumento brusco del voltaje hasta el valor establecido y después descienden a cero, se los utiliza porque el voltaje máximo del pulso se

mantiene por más tiempo, estos pulsos ahorran energía y evitan el aumento de la temperatura (efecto del calentamiento óhmico).

En la Figura 6, se observa las etapas de carga y descarga de los pulsos, en la etapa 1, la energía eléctrica llega a su punto máximo de carga, después es expulsada en un determinado tiempo y cae hasta la segunda etapa, un valor de 0 “descaso” hasta que se nuevamente inicie la primera etapa.

Barbosa (1999), tradicionalmente las cámaras de tratamientos para los campos eléctricos pulsados, consisten en dos electrodos aislados por un material no conductor de la electricidad. Los electrodos pueden ser placas paralelas, cables paralelos, cilindros concéntricos, conos concéntricos, tubos, etc, dependiendo del modo de operación (continuo o en etapas).

Barbosa (1999), la configuración más utilizada son los electrodos en formas de placas por la uniformidad del campo de fuerza eléctricos que ésta proporciona, ésta configuración se utiliza cuando el proceso de tratamiento es en forma de paradas o discontinua. La cámara debe ser de fácil lavado y esterilizado y resistente a la temperatura que se genere, si es posible su construcción debe dar las facilidades para aumentar o disminuir volúmenes, vaciado o llenado de la misma, transporte, entre otros.

Bushnell en 1993, citado por Barbosa (1999) señala que los electrodos deben reducir en lo máximo la localización de de la fuerza de campo eléctrico en algún punto focalizado para evitar la ruptura dieléctrica. Algunos autores señalan que lo mejor es utilizar electrodos de materiales eléctricamente inertes como el oro, platino y carbono.

Grall y Märkl (1996), la fracción de supervivencia de microorganismos “s”, se obtiene de la división del número de supervivientes después del tratamiento “N”, sobre el número inicial de carga microbiana antes del tratamiento “N<sub>0</sub>”, así:  $s=N/N_0$

Grall y Märkl (1996), el coeficiente de relación  $m_E$ , se obtiene al graficar la relación de campo eléctrico aplicado “ $E_p$ [kV/cm]” (eje x) contra el logaritmo natural de la fracción de descenso microbiano ( $\ln s=N/N_0$ ) (eje y).

Grall y Märkl (1996), el coeficiente de relación  $m_t$ , se obtiene al graficar la relación del logaritmo natural del tiempo en segundos “ $\ln t$ [s]” (eje x) contra el logaritmo natural de la fracción de descenso microbiano ( $\ln s=N/N_0$ ) (eje y). Señalan que la pendiente del descenso microbiano, tanto en las relaciones de  $\ln s(N/N_0)$  vs  $E_p$ [kV/cm] y  $\ln s(N/N_0)$  vs  $\ln t$ [s], da una idea de la susceptibilidad de los microorganismos a los tratamientos con pulsos eléctricos. Los valores bajos indican un alto efecto de inactivación y valores altos sugiere que las condiciones de tratamiento, naturaleza del alimento y otros factores tienen un efecto protector hacia los microorganismos.

Zhang en 1994, en la Tabla 11, citado por Barbosa (1999), señala valores de resistividad eléctrica para varios alimentos y sustancias evaluados a diferentes temperaturas, las cuales deben tomarse en cuenta para determinar si el alimento es apto para ésta tecnología. En la Tabla 11, citado por Barbosa (1999), valores de resistividad eléctrica para leche cruda de 2.2; 2.3; 2.6( $\Omega$ .m), con sus respectivos valores de conductividad eléctrica de 0.455; 0.435; 0.385 ( $S/m^{-1}$ ), para leche descremada 3.1( $\Omega$ .m) y 0.323( $S/m^{-1}$ ).

## **2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA**

Augusto Comte, citado por Gutierrez A. (1985), el investigador no puede salir de los límites del conocimiento “positivo”, la ciencia no puede alcanzar la esencia material tan solo describe los nexos externos entre los fenómenos observados, sin dilucidar las leyes que rigen su cambio.

El reemplazo de las fuerzas sobrenaturales relativas por abstracciones personificadas y esencias metafísicas que son la base de todos los fenómenos observados, genera que las teorías o fenómenos cognoscibles de la realidad objetiva tornen el pensamiento humano a “establecer el vínculo entre los diversos fenómenos particulares”.

El espíritu positivismo huye de todo absolutismo, no importa el “que” sino el “como” de las cosas, y la ciencia ha de conocer las “leyes”, entendiendo como tales la formulación de las relaciones funcionales de sucesión y semejanzas observadas.

### **2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL.**

En este estudio el objetivo primordial es la eliminación de microorganismos existentes en muestras de leche cruda entera, por lo que se tomará como control la normativa nacional INEN, y los métodos de AOAC para el recuento microbiano en placas Petrifilm 3M.

En la Tabla 12, la norma INEN 702, muestra los contenidos máximos de microorganismos permitidos en leche descremada, semidescremada y pasteurizada.

En la Tabla 13, la norma INEN 004, muestra el número de muestras a tomarse dependiendo de los lotes de productos elegidos.

En la Tabla 14, la norma INEN 10, muestra los requisitos de contenido microbiológico de leche pasteurizada.

En la Tabla 15, la norma INEN 10, muestra los requisitos microbiológicos de leche pasteurizada para lotes o partidas.

En la Tabla 16, muestra los métodos utilizados por la AOAC para la utilización de placas Petrifilm 3M.

En la Tabla 17, muestra los conteos esperados al utilizar placas Petrifilm 3M.

INEN 013, “Determinación de la acidez titulable”, Método 1.

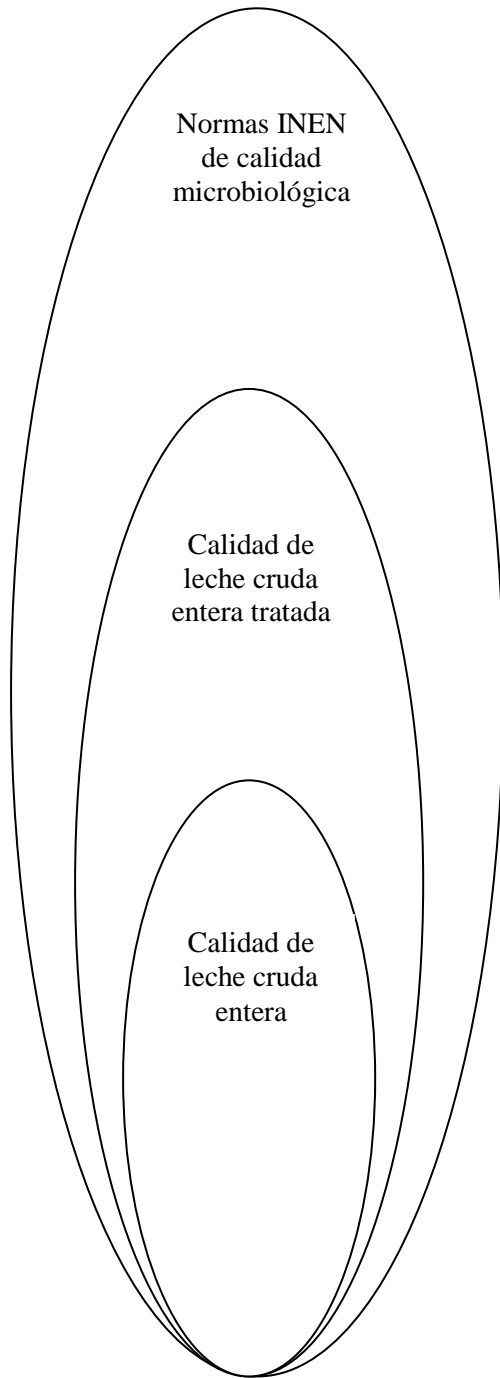
Las placas Petrifilm 3M constan de la certificación de la AOAC (AOAC 986.33, AOAC 989.10, AOAC 991,14), son métodos reconocidos mundialmente. Los mismos simplifican y evitan la contaminación involuntaria de los medios de cultivo

tradicionales, además su utilización simplifica y ahorra tiempo en la preparación de medios de cultivos tradicionales difíciles de obtener.

En la guía de identificación de colonias de *E. coli* y coliformes son de color rojo, producen gas, y en ocasiones depósitos de color azul. Los coliformes deben tener un recuento inferior a 10 ufc/ml o gramo.

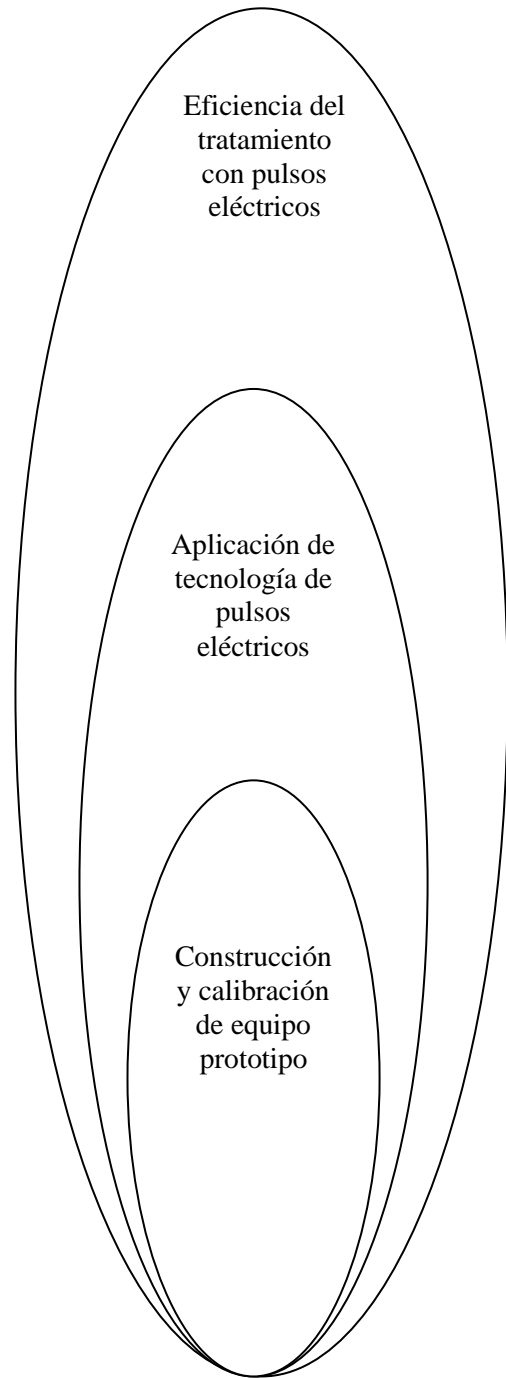
La Tabla 21 muestra el conteo o el resultados que se obtuvieron experimentalmente utilizando placas Petrifilm 3M.

## 2.4. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES



### Variable independiente

Alta carga microbiana inicial de leche cruda entera



### Variable dependiente

Reducción parcial de carga microbiana inicial en leche cruda entera

**2.4.1. Variable independiente:** Alta carga microbiana inicial de leche cruda entera

**2.4.1.1. Calidad de leche cruda entera.**

En nuestro medio, sin haber pruebas escritas o gráficas, se conoce que hay el riesgo de adulteración de materia prima por parte de los productores. Alteraciones que van desde agregación de agua no potable, hasta sustitución de algún componente con otro no apto para el consumo (sustitución de materia grasa propia de leche por manteca vegetal, carbonatos de calcio, óxidos de zinc, etc).

Esto por años a generado una problemática social, entre los consumidores que desean un producto de alta calidad a bajo precio y los productores que tratan de obtener más ingresos por el bajo precio de materia prima y alto costo que implica obtener la misma.

**2.4.1.2. Calidad de leche cruda entera tratada.**

Los problemas que se presentan cuando existen adulteraciones en materia prima, afectan a todos los estratos de procesamiento y conservación de leche.

En el caso de la tecnología de pulsos eléctricos el aumento de agua, por citar un ejemplo, provoca que la conductividad del medio aumente → la del microorganismo disminuya, la resistividad del medio disminuya → la del microorganismo incrementa, y en conjunto estos factores casi inutilizan la tecnología de pulsos eléctricos.

Una correcta y responsable obtención y manipulación de materia prima genera condiciones más favorables para el éxito de tecnologías de pulsación eléctrica.

**2.4.1.3. Normas INEN de calidad microbiológica**

En nuestro país, las normas INEN son los parámetros ineludibles que todo producto alimenticio debe tener para su aprobación hacia la venta pública y consumo humano.

**2.4.2. Variable dependiente:** Reducción parcial de carga microbiana inicial en leche cruda entera.

#### **2.4.2.1. Construcción y calibración de equipo prototipo**

Siguiendo estudios bibliográficos pasados, se construyó y se calibró un equipo prototipo de tratamiento con campos eléctricos pulsados, con la colaboración de otros profesionales.

La calibración del equipo prototipo, y la aparición de variantes propia de ésta tecnología, proporcionaron experiencia de trabajo investigativo.

#### **2.4.2.2. Aplicación de tecnología de pulsos eléctricos**

La tecnología de campos eléctricos pulsados, conjuntamente con la tecnología de altas presiones hidrostáticas, prometen ser las tecnologías del futuro que remplazarán a los procesos térmicos de conservación de alimentos.

#### **2.4.2.3. Eficiencia del tratamiento con pulsos eléctricos**

La eficiencia de ésta tecnología está ligada a muchos factores, por ejemplo la calidad del producto a tratarse, la población microbiana inicial, el tipo de alimento y su constitución propia, tipo de cámara de tratamiento, tipo flujo del alimento, microorganismo de control, superficie y material de los electrodos, conductancia; resistividad del medio y de los microorganismos, entre otros

### **2.5 HIPÓTESIS.**

#### **2.5.1 Hipótesis nula ( $H_0$ ):**

$H_0$ : ¿Los pulsos eléctricos (250, 400, 500n pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), no provocan un descenso total o parcial en el contenido inicial de microorganismos en muestras de leche cruda entera?

#### **2.5.2 Hipótesis alternativa ( $H_1$ ):**

$H_1$ : ¿Los pulsos eléctricos (250, 400, 500n pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), provocan un descenso total o parcial en el contenido inicial de microorganismos en muestras de leche cruda entera?



## **2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES.**

### **2.6.1 Variable independiente:**

Alta carga microbiana inicial de leche cruda entera.

### **2.6.2 Variable dependiente:**

Reducción parcial de carga microbiana inicial en leche cruda entera.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN**

La modalidad de investigación empleada es cuantitativa, el objetivo principal de la investigación es estudiar la efectividad de los pulsos eléctricos (250, 400, 500n pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12kV) en la destrucción de microorganismos iniciales en muestras de leche cruda entera, que afectan la calidad de la leche, que se encuentran de forma natural en la misma.

#### **3.2 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El presente estudio, en primera instancia, es de tipo bibliográfico por tratarse de tecnologías nuevas de difícil acceso a la información y escasos recursos bibliográficos.

El presente estudio es de tipo experimental, puesto que todos los resultados fueron obtenidos por medio de experimentos preparados *in situ* sobre las muestras del alimento a tratarse.

El presente estudio es de tipo exploratorio–descriptivo, por el uso de tecnologías nuevas alternativas dándose su interpretación y descripción de los resultados y datos obtenidos.

#### **3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA**

Como se ha descrito anteriormente los dos factores más importantes en la eficacia de los pulsos eléctricos en la destrucción de microorganismos, es el voltaje y el número de pulsos aplicados, con éste conocimiento el diseño experimental aplicado corresponde a un modelo matemático A x B, siendo las variables las siguientes:

FACTOR A: “Voltaje (kilo voltios)”

$a_0$ : 8 kV

$a_1$ : 10 kV

$a_2$ : 12 kV

FACTOR B: “Número de pulsos eléctricos” (n).

$b_0$ : 250 pulsos eléctricos.

$b_1$ : 400 pulsos eléctricos.

$b_2$ : 500 pulsos eléctricos.

Los tratamientos quedan descritos de la siguiente forma:

**$a_0b_0$** : 8 kV y 250 pulsos eléctricos.

**$a_0b_1$** : 8 kV y 400 pulsos eléctricos.

**$a_0b_2$** : 8 kV y 500 pulsos eléctricos.

**$a_1b_0$** : 10 kV y 250 pulsos eléctricos.

**$a_1b_1$** : 10 kV y 400 pulsos eléctricos.

**$a_1b_2$** : 10 kV y 500 pulsos eléctricos.

**$a_2b_0$** : 12 kV y 250 pulsos eléctricos.

**$a_2b_1$** : 12 kV y 400 pulsos eléctricos.

**$a_2b_2$** : 12 kV y 500 pulsos eléctricos.

### 3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

#### 3.4.1 Variable independiente.

##### Alta carga microbiana inicial de leche cruda entera.

| CONCEPTUALIZACIÓN   | VARIABLES CONTENIDAS  | INDICADORES   | ÍTEMS BÁSICOS   | TÉCNICAS E INSTRUMENTOS   |
|---|---|---|---|---|
| <p>Los problemas sanitarios que afectan la calidad de los alimentos potencian la investigación y desarrollo de tecnologías nuevas emergentes, que están en vías de desarrollo para el procesamiento y estabilización microbiológica de alimentos de consumo masivo, conservando las características originales del producto fresco.</p> | <p>Obtención del voltaje deseado (voltajes en estudio 8, 10, 12 kV).</p> <p>Obtención del número de pulsos eléctricos ( 250, 400, 500 pulsos)</p> | <p>Diseño del equipo prototipo generador de pulsos eléctricos de alto voltaje.</p> <p>Calibración manual del equipo y fijación de los parámetros.</p> <p>Revisión y análisis de datos bibliográficos documentados para conseguir efecto esperado.</p> | <p>¿Cuál es el número de pulsos eléctricos y voltaje que genere una reducción parcial o total de microorganismos contenidos leche cruda entera?</p> <p>¿Bibliográficamente cuáles parámetros de número de pulsos y voltaje se necesitan para obtener el efecto deseado?</p> <p>¿La tecnología con la que se dispone será suficiente para diseñar y obtener pulsos eléctricos de alto voltaje?</p> | <p>Equipo prototipo de generador de pulsos eléctricos de alto voltaje.</p> <p>Curvas de muerte microbiana y análisis estadístico de los recuentos microbiológicos (modelo estadístico AxB).</p> <p>Revisiones bibliográficas y consultas con otros especialistas.</p> |

Elaborado por: Carrillo D.

### 3.4.2 Variable dependiente.

#### Reducción parcial de carga microbiana inicial en muestras leche cruda entera.

| CONCEPTUALIZACIÓN  | VARIABLES CONTENIDAS  | INDICADORES  | ÍTEMS BÁSICOS  | TÉCNICAS E INSTRUMENTOS   |
|--|---|--|--|---|
| Nuevas tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje dan una alternativa de estabilización microbiológica y conservación de alimentos. | Estabilidad microbiológica del alimento en estudio.<br><br>Evitar el rechazo por alteración de características sensoriales. | Número de sobrevivientes de la población microbiana inicial después del tratamiento.<br><br>Aceptación organoléptica de las muestras tratadas. | ¿La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje puede tornar a la leche cruda entera microbiológicamente viable para el consumo humano?<br><br>¿Después del tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje, habrá un cambio significativo en las características organolépticas que haga que el producto tratado sea rechazado? | Recuento microbiológico (Placas Petrifilm 3M para recuento de <i>Coliformes</i> y <i>E. coli</i> ).<br><br>Norma INEN 4, 10, 13, 702.<br>Norma AOAC 986.33, 989.10 y 991.14.<br><br>Evaluación sensorial con catadores voluntarios. |

Elaborado por: Carrillo D.

### **3.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN**

El diseño experimental empleado (modelo estadístico Ax<sub>B</sub>), con tres niveles de pulsaciones eléctricas (250, 400, 500n pulsos), y tres niveles de voltaje (8, 10,12 kV), se estableció nueve experimentos con dos réplicas cada uno, en total 27 ensayos.

Los datos del conteo microbiológico se tomaron según la recomendación de la AOAC, Official MethodsSM (986.33, 989.10 y 991.14) para el conteo en cajas de siembras microbiológicas “PetriFilm” de la marca 3M (Método 3).

Los datos obtenidos corresponden a la supervivencia de microorganismos después de la aplicación del tratamiento, esto permitió elaborar gráficos de curvas de muerte microbiana, descripción y análisis.

El análisis de los datos correspondientes proporcionó el mejor tratamiento. La evaluación sensorial determinó que no se produce ningún cambio significativo en cuanto a las características organolépticas de muestras de leche tratadas.

Se realizaron experimentos, en primera instancia, con la aplicación de bajas temperaturas a las muestras de leche cruda entera y las características del mejor tratamiento (tecnología de barreras).

**A continuación se explica más detalladamente el proceso.**

#### **3.5.1 Obtención y calibración del equipo prototipo generador de pulsos eléctricos y la cámara de tratamiento, utilizados.**

##### **3.5.1.1 Sistema electrónico**

Se construyó y se calibró un sistema electrónico que proveyó pulsos eléctricos de onda cuadrada de bajo voltaje de 8, 10, 12V, Figura 6, después los pulsos eléctricos de onda

cuadrada de bajo voltaje pasan por un auto-transformador, del mismo los pulsos eléctricos salen amplificados por un factor de conversión 1:1000 es decir el pulso eléctrico de 8 voltios, es amplificado hasta 8000 voltios.

A diferencia de los sistemas descritos en bibliografía, en los cuales el voltaje, pulsaciones y descarga de los pulsos eléctricos se los obtiene directamente desde una celda eléctrica o un transformador de alto voltaje, costosos y de difícil acceso.

La tarjeta electrónica consta de 3 partes, explicadas a continuación.

#### **3.5.1.1.1 Primera parte: “control”**

**Bornera#1** (VCC), Figura 18(a): alimentación de energía que hace funcionar el circuito de control (5V, 500 mA), el flujo eléctrico se dirige a un regulador de voltaje (RG1-7805), Figura 18(b).

**Microprocesador:** (ATMEGA 164-P), Figura 18(c), nombrado U1, fue cargado con un programa computacional que describe y dicta los parámetros de los pulsos eléctricos (ancho de pulso = 1ms, ancho intermedio entre cada pulso = 1ms, Hz=500). Programa 1.

**Pantalla LCD,** Figura 19, recibe la señal de los pulsadores y se visualizan en la misma, aquí se escogen el voltaje y número de pulsos determinados y sirve de interfaz entre el usuario y el circuito.

**4 Opto acopladores (4N35),** Figura 18(d): nombrados como U2, U3, U4, U5, sirven de enlace entre la etapa de control y la de potencia, entre el microprocesador y los transistores de potencia (“tipo sombrero”).

**Botonera:** Figura 18(e): consta de 5 pulsadores nombrados, reset, inicio, bajar, subir y aceptar, dan la señal al microprocesador para elegir la tarea que se indica en la pantalla LCD.

La tarjeta electrónica tiene 5 botones denominados de izquierda a derecha: “Reset” Figura 18(e.1); “Inicio y #1” Figura 18(e.2); “subir y #2” Figura 18(e.3); “bajar y #3” Figura 18(e.4); y “aceptar” Figura 18(e.5).

Desde la tarjeta electrónica se seleccionó el número de pulsos para cada experimento (250, 400, 500n) con los botones subir y bajar; se aceptó el número de pulsos requerido (botón “aceptar”), se seleccionó el voltaje requerido (botón #1 para 8kV, #2 para 10kV y #3 para 12kV), y se aceptó toda la programación específica para cada experimento con el botón “aceptar”.

Con el botón de “inicio” se envió la señal, y los pulsos eléctricos fueron liberados desde la tarjeta electrónica hacia la bobina, en la cual se elevó el voltaje del pulso y pasó a la cámara de tratamiento y su posterior descarga a tierra.

#### **3.5.1.1.2 Segunda parte: “potencia”**

**4 Transistores (2N3055)**, Figura 18(f): nombrados T1, T2, T3, T4, transistores de potencia tipo NPN que al trabajar en sus zonas de corte y saturación sirve como interruptor para activar y desactivar los RELAYS,.

**4 Diodos (4007)**, Figura 18(g), nombrados D1, D2, D3, D4, sirven para proteger a los transistores de potencia de corrientes que circulen en el sentido inverso o corrientes inversas.

**Bornera #2: (VDD)**, Figura 18(h), alimentación de energía para la etapa de potencia (24V, 1500 mA),

**Regulador de voltaje RG2 (7806)**, Figura 18(i), de la salida de éste regulador sirve para dar la señal de activación hacia los RELAYS.



**RELAYS (6VDC)**, Figura 18(j), nombrados RL1, RL2, RL3, al enviar la señal de activación de los RELAYS desde la etapa de control, éstos a su salida envían la energía proveniente de VDD.

**Reguladores de voltaje**, Figura 18(k), RG3, RG4, RG5: reciben el voltaje de la salida de los RELAYS para limitar el voltaje de los pulsos.

Regulador (7808) RG3: regula la amplitud del pulso a 8V.

Regulador (7810) RG4: regula la amplitud del pulso a 10V.

Regulador (7812) RG5: regula la amplitud del pulso a 12V.

**4 Diodos, (1N4004)**, Figura 18(l), D5, D6, D7: impiden que las señales provenientes de los reguladores interfieran entre si, evitan la retroalimentación.

**Bornera #3**, Figura 18(m), nombrada T1: después de que la señal de los reguladores ha pasado por los diodos, se unen en un punto en común para la salida hacia la auto transformados o “bobina”.

### 3.5.1.1.3 Tercera Etapa: “alto voltaje”

**Auto transformador “Bobina”**, Figura 20: eleva el voltaje, recibe las señales de la bornera #2, nombrada T1, y por medio de inducción magnética-eléctrica eleva los pulsos en una relación 1 a 1000.

La Figura 21, muestra los adaptadores de energía utilizados.

La medida de frecuencia es  $f=500$  Hz, indica cuantos ciclos o repeticiones por segundo se repite los pulsos eléctricos. El software que fue diseñado y cargado al microprocesador se detalla en anexo C.

Barbosa (1999), la tecnología de **pulsos eléctricos** tradicionalmente utiliza cámaras de tratamiento de configuración paralela para sus electrodos y a nivel de laboratorio las más

utilizadas son las cámaras estáticas o batch donde el alimento a ser tratado no fluyen dentro de la misma. Las cámaras de tratamiento pueden ser de placas paralelas, cables paralelos, cilindros concéntricos, conos concéntricos, campo eléctrico dentro de un tubo, placas de aguja y placas de varilla.

Barbosa (2001), las placas paralelas producen una distribución de campo eléctrico uniforme, ofrecen factibilidad en su construcción y limpieza posterior. Las piezas involucradas deben ofrecer facilidad de limpieza y esterilización, con el fin de evitar contaminaciones persistentes de los alimentos tratados, en casos como agregados de productos o colonias de bacterias.

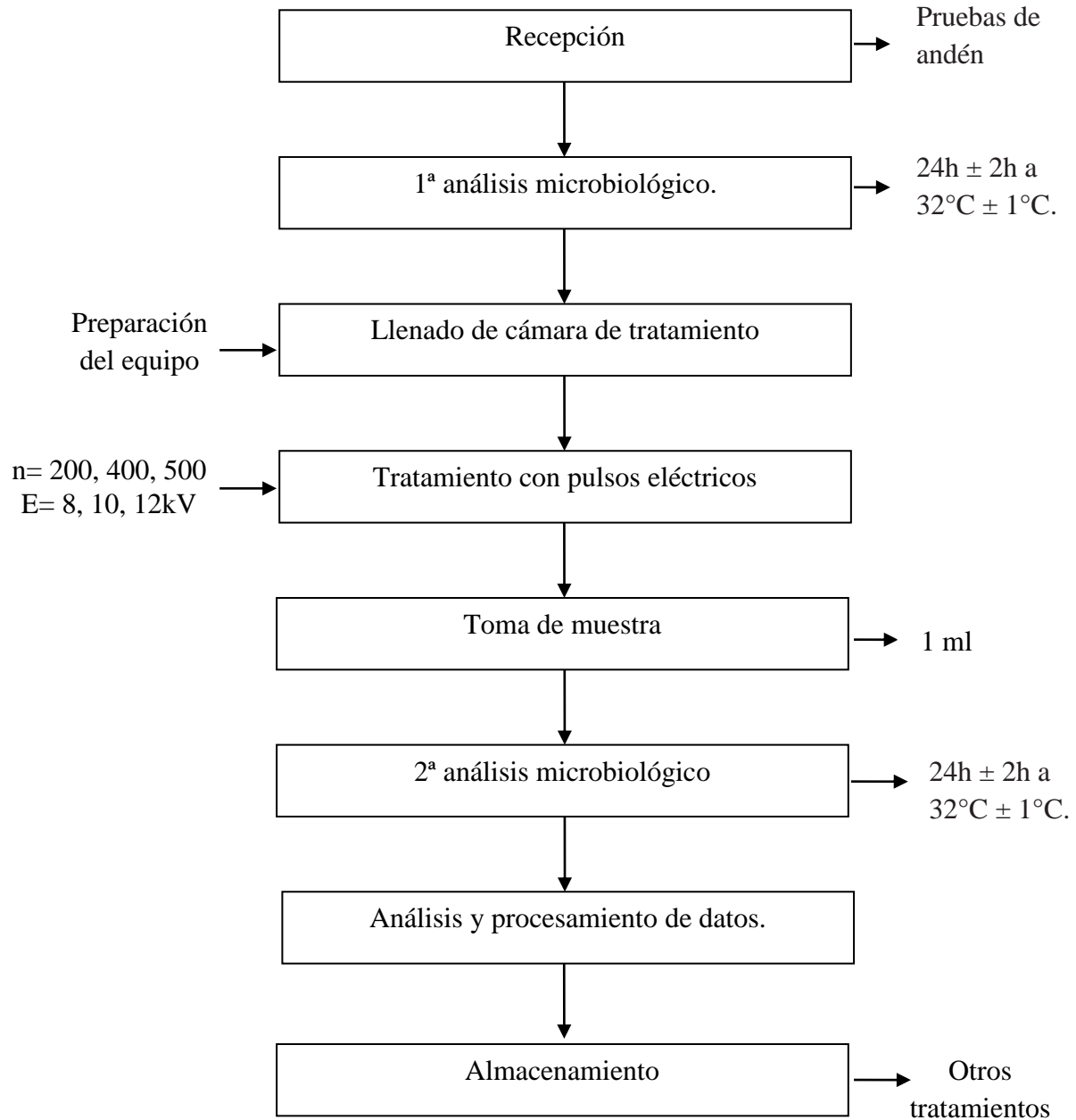
**3.5.2 Características de la cámara de tratamiento** utilizada son: dos placas paralelas circulares de aluminio macizo, diámetro de 2 pulgadas, separadas por 3 milímetros, soporte de PVC de 2 pulgadas cilíndrico.

En la parte superior con un agujero “llenado-extracción” para el ingreso de muestras de leche cruda entera y salida del producto tratado. Cada placa de aluminio tiene 8 contactos tanto para la entrada y descarga de la energía eléctrica, conexión a tierra completándose el circuito, con capacidad de 6,08ml por batch. Figura 16.

La cámara de tratamiento, para su esterilización se aplico un tratamiento con agua a ebullición por 30 minutos.

### 3.5.3 Diagrama de flujo:

#### Estudio de reducción de carga microbiana inicial de leche cruda entera aplicando pulsos eléctricos de alto voltaje



### **3.5.3.1 Recepción.**

La recepción de las muestras de leche cruda entera, sin descremado previo, evaluadas provinieron del sector Salache - Quilajalo productor de leche vacuna, del Cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi. El volumen obtenido es 1 litro de leche cruda entera por cada corrida de experimentos planteados en el modelo experimental.

El envase usado fue esterilizado con agua a ebullición (92°C) por 30 minutos, después de esto se lo vacía y sella herméticamente para provocar vacío por condensación de vapor contenido, esto evitó el desarrollo de bacterias aerobias.

Una vez en el sector señalado se procedió a la breve apertura del envase para obtener la muestra de estudio y se selló herméticamente el envase para evitar cualquier contaminación cruzada.

Las muestras de leche cruda entera fueron trasladadas a la Universidad Técnica de Ambato, hacia el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y se procedió con los experimentos programados.

Para determinar la calidad de muestras de leche cruda entera obtenidas se realizó: según la Norma INEN 013 “Determinación de acidez titulable”, Ecuación 1. Para la determinación de pH se utilizó un “pH metro” de marca “Fisher 107”, Método 2 y Figura 9.

Para determinación de densidad y % materia grasa se utilizó un equipo “Ecomilk, milk analyzer, milkana kam98 – 2A”.

### **3.5.3.2 1ª Análisis microbiológico.**

Ésta primera siembra se la realizó con la muestra de leche cruda entera sin ningún tratamiento, con una dilución de  $10^{-3}$  para disminuir la carga microbiana por tratarse de un producto sin ningún procesamiento y de alta concentración de microorganismos.

La siembra de leche cruda entera se realizó en cajas Petrifilm de la marca 3M (Placas para recuento de *E. coli* y *coliformes*), se incubó de la siguiente manera: para Coliformes totales según el método Petrifil 3M (2008), para leche cruda entera y otros productos lácteos por  $24\text{h} \pm 2\text{h}$  a  $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , Figura 10.

El método y la técnica de incubación <sup>[1], [2], [3]</sup>, se indica en el Método 3 y Figuras 11, 12, 13, 14 y 15.

### **3.5.3.3 Llenado de la cámara de tratamiento.**

Previamente la muestra de leche cruda entera fue agitada manualmente en el envase contenedor, constantemente por 3 minutos para obtener una distribución homogénea del contenido microbiano. Las bacterias al encontrarse en suspensión en las muestras de leche cruda entera tienden a precipitar o formar agregados.

Para tapar la cámara de tratamiento se giró el segundo tapón de aluminio hasta su tope, por el agujero de llenado-extracción, se insertó con una pipeta previamente esterilizada o una jeringuilla esterilizada desechable la muestra de leche cruda entera para su tratamiento. Figura 17.

Para cada ensayo se aseguró la inexistencia de burbujas de aire tanto en el intercepto del producto como adherida a la superficie de los electrodos, esto causa un fenómeno llamado “arco dieléctrico” o “ruptura eléctrica”.

Éste fenómeno provoca que el campo eléctrico no se forme y la energía circule por el aire contenido, sin que haya el efecto destructor hacia las bacterias. Ésta “ruptura eléctrica” se caracteriza por formación de luminosas chispas, acompañada de un sonido explosivo, propio de energía eléctrica cuando atraviesa el aire.

Cuando se logra el correcto llenado de la cámara y conexiones eléctricas, el sonido producido es completamente uniforme.

#### **3.5.4.4 Tratamiento con pulsos eléctricos.**

##### **3.5.3.4.1 Preparación de los pulsos eléctricos.**

En la tarjeta electrónica se conectó la fuente de corriente eléctrica de 5V (cable azul-), esta fuente sirve únicamente para el funcionamiento de la misma tarjeta y la pantalla LED).

Se conectó la fuente de corriente eléctrica de 24V a la tarjeta electrónica, la cual genera los pulsos eléctricos de de 8, 10 y 12 V.

Se conectó en la salida de la tarjeta electrónica un cable, el mismo que se dirigió al transformador de energía eléctrica (bobina).

De dicha bobina salió un cable de descarga (cable negro), el cual se conectó a la primera placa de aluminio de la cámara de tratamiento (placa fija).

De la segunda placa de aluminio hay una conexión a tierra para evitar la generación de ondas electro-magnéticas que puedan afectar a cualquier aparato electrónico que se encuentre cerca e inclusive la misma placa electrónica generadora de pulsos.

Los equipos generadores y liberadores de energía eléctrica (bobina y cámara de tratamiento) fueron colocados dentro de otra cámara metálica, Figura 22, para que se absorban las ondas electro magnéticas generadas por el alto voltaje.

##### **3.5.3.5 Toma de la muestra.**

Después del tratamiento se cortó la energía con un interruptor de la tarjeta electrónica Figura 18(n), con una pipeta o una jeringuilla esterilizada desechable, por el agujero de llenado-extracción se tomó una muestra de 1 ml y se realizó una dilución de  $10^{-3}$ .

#### **3.5.3.4 2ª análisis microbiológicos.**

De la dilución  $10^{-3}$  se tomó una muestra de 1ml, y se sembró en la placa Petrifilm 3M para recuento de *E. coli* y coliformes. El método y técnica es el mismo descrito anteriormente (1ª análisis microbiológico).

Se incubó la muestra utilizando las placas Petrifil 3M, específico para recuento de *E. coli* y coliformes totales, se contó todas las colonias rojas con gas que corresponden a coliformes totales, 3M petrifil (2008).

#### **3.5.4.7 Análisis y procesamiento de datos.**

Después de los respectivos conteos microbiológicos de los tratamiento (T y 2 réplicas; 27 ensayos en total), se establece una media, (Ecuación 4). Con ésta media se procede a los respectivos gráficos.

Los datos de recuentos microbiológicos fueron analizados mediante gráficas de curvas de descenso de población microbiana inicial, las dos relaciones establecidas son  $\ln s$  vs  $E_p$ [kV/cm]; y  $\ln s$  vs  $\ln t$ [s], y se dió una interpretación de los resultados.

Mediante los procedimientos estadísticos, se obtuvo una respuesta al modelo estadístico seleccionado (AxB), y de ésta manera se determinó que el mejor tratamiento es  $a_2b_2$  ( $E=12$ kV,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento = 0,5s, distancia entre placas 3mm y  $V= 6,08$ ml), la curva de muerte microbiana de éste tratamiento describe de mejor manera el efecto de pulsos eléctricos a las condiciones específicas de procesamiento, y materia prima utilizada.

Se realizó experimentos aplicando bajas temperaturas ( $2^\circ\text{C}$ ) a muestras de leche cruda entera y utilizando las características del mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12$ kV,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas 3mm,  $V= 6.08$ ml).

Muestras de leche cruda entera tratadas con las características del mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm],  $500\text{n}$ , ancho de pulso  $1\text{ms}$ ,  $2000\text{mA}$ ,  $500\text{Hz}$ , tiempo total de tratamiento  $0.5\text{s}$ , distancia entre placas  $3\text{mm}$ ,  $V=6.08\text{ml}$ ) fueron sometidas a una evaluación sensorial tipo duo-trio, y se determinó que la aplicación de éste proceso no afecta a la calidad organoléptica de leche.

### **3.6 PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.**

El sistema electrónico fue construido (software), en los programas computacionales, “Proteus 7” y “BASCOM -AVR”, la calibración se la realizó en un “protoboard”.

Las gráficas y todos los datos obtenidos se los procesó en los programas computacionales Word, Excel y Statgraphics.

Las diferentes combinaciones de tratamientos proporcionaron datos secuenciales de reducción de carga microbiana inicial, los datos se procesaron con gráficas para obtener curvas de muerte microbiana y se dio una interpretación matemática de los experimentos realizados.

#### **3.6.1. CÁLCULOS.**

Las características de las muestras de leche cruda entera que se utilizaron según la Norma INEN 013 “Determinación de acidez titulable”, Ecuación 1, son:

1° ensayo.

$$V_{\text{NaOH}} = 5.3\text{ml}$$

$$N=0.1$$

$$M= 87.3798\text{gr.}$$

$$M_1= 107.4746\text{gr.}$$

2° ensayo.

$$V_{\text{NaOH}} = 5.1\text{ml}$$

$$N=0.1$$



M= 119.7014gr.

M<sub>1</sub>= 139.7114gr.

1° *Ensayo*

$$A = \frac{0,090 * V * N}{M_1 - M} * 100$$

$$A = \frac{0,090 * 5.3 * 0,1}{107,4746 - 87,3798} * 100$$

$$A = 0,2373 \% \text{ ácidolácti co}$$

2° *Ensayo*

$$A = \frac{0,090 * V * N}{M_1 - M} * 100$$

$$A = \frac{0,090 * 4,6 * 0,1}{139,7114 - 119,7014} * 100$$

$$A = 0,2293 \% \text{ ácidolácti co}$$

Promedio: 0,2333 % ácido láctico; °D=23,3. Los valores se tabulan en la Tabla 18.

Promedio general: 0,23% ácido láctico y 23°D.

Promedio de tres mediciones para densidad a 20°C (lectura tomada en el equipo “Ecomilk, milk analyzer, milkana kam98 – 2A”): 1030 kg/m<sup>3</sup>, Tabla 19 y Figura 8.

pH: utilizando un potenciómetro, (“Fisher 107”) promedio de tres mediciones: pH= 6,6 Figura 9.

% materia grasa (promedio de tres mediciones, lectura tomada en el equipo “Ecomilk, milk analyzer, milkana kam98 – 2A”): 3,7% (m/m), Tabla 19 y Figura 8.

Los alimentos líquidos son considerados buenos conductores eléctricos, por su gran cantidad de iones que actúan como conductores de cargas eléctricas. Cuando la electricidad es conducida a través de dos placas o electrodos paralelos la fuerza de campo eléctrico esta dado por Ecuación 2.

La Tabla 20, muestra los campos eléctricos aplicados, para los diferentes tratamientos.

Para los conteos microbiológicos en placas Petrifilm 3M (2008), la interpretación del conteo microbiológico se realiza como indica la Ecuación 3.

Ejemplo:

$$ufc / ml = \frac{\sum_{ufc} \left( \frac{1}{F} \right)}{ml \text{ muestra}}$$

$$ufc / ml = \frac{(57 + 58 + 61)ufc * \left( \frac{1}{10^{-3}} \right)}{3ml}$$

$$ufc / ml = 5,9 * 10^4$$

Los datos de las ecuaciones y el coeficiente de regresión describen la linealización de la curva de destrucción microbiana a las condiciones específicas de procesamiento, características de la leche cruda entera o del alimento tratado, espacio entre placas, volumen de muestra, voltaje utilizado y campo eléctrico aplicado. Tabla 25.

El número de pulsos eléctricos utilizados tienen un ancho o tiempo de duración que generalmente está en microsegundos ( $\mu s$ ), en el presente trabajo se utilizó un ancho de pulso de un milisegundo (ms) cada uno. Estos valores se deben expresar en unidades de segundos (s), para facilitar los cálculos respectivos.

El tiempo de tratamiento tiene su equivalente con el número de pulsos aplicados, así 250 pulsos eléctricos (n), cada pulso eléctrico tiene una duración de 1 milisegundo (ms), entonces la transformación es 250.000 microsegundos ( $\mu s$ ), 250 milisegundos (ms), y 0,25 segundos (s) de tratamiento.

El tiempo total de tratamiento viene dado por el producto del número de pulsos eléctricos y el tiempo de duración de que cada uno.

### **ANOVA.**

Para el análisis estadístico se establecen las siguientes hipótesis.

Ho: Todos los tratamientos tienen el mismo efecto de descenso microbiano.

Hi: Todos los tratamientos no tienen el mismo efecto de descenso microbiano

El modelo matemático (AxB) mostrado en Ecuación 4, conjuntamente con los factores mostrados en Tabla 30, 31, 32, permitieron los cálculos respectivos.

Las ecuaciones 5, 6, 7, 8, 9, muestran los respectivos cálculos para suma de cuadrados totales, tratamiento, residuo, error, interacción del factor A ( $a_0=8\text{kV}$ ;  $a_1=10\text{kV}$ ;  $a_2=12\text{kV}$ ), interacción del factor B ( $b_0=250\text{n}$ ;  $b_1=400\text{n}$ ;  $b_2=500\text{n}$ ), e interacción AB.

Los resultados se muestran en la Tabla de resumen ANOVA, Tabla 33, corroboradas por tabla estadística ANOVA obtenida en el programa computacional Stat Graphics, Gráfico 14

En la comparación de Tukey, el valor T de Tablas es 2,8916324, Ecuación 10. Este valor es contrastado con promedio de medias. Tabla 34.

Por los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa (Hi), estableciéndose que todos los tratamientos tienen un efecto diferente al ser aplicados.

Obtenido las características del mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas 3mm,  $V= 6.08\text{ml}$ ), se evaluó sobre muestras de leche cruda aplicadas previamente un gradiente de temperatura (2, 8, 15, 20, 35, 45, 65°C), en la Tabla 35, Gráficos 15 y 16, se observan los resultados de la aplicación del mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas 3mm,  $V= 6.08\text{ml}$ ), a diferentes temperaturas, en cuanto a descenso microbiano.

### **Prueba organoléptica.**

La prueba organoléptica realizada, corresponde a una prueba duo-trío, los resultados se muestran en las Tablas 36 y 37.

La codificación de las muestras es: 521: Leche cruda entera tratada con pulsos eléctricos, 238: leche pasteurizada UHT, R<sub>1</sub>: Leche cruda entera y R<sub>2</sub>: Leche pasteurizada (65°C; 30min), en un total de 40 catadores. Todas las muestras se presentaron a temperatura de refrigeración (±5°C).

**Nivel de significancia de 1 cola.**

**Resultado Experimental de muestra 521, en ensayo N°1 = 15 respuestas correctas.**

A un nivel de probabilidad de 5%, el resultado de los catadores muestra que a estos niveles de significancia no detectaron diferencia alguna entre las muestras tratadas con pulsos eléctricos y el patrón R<sub>1</sub>(leche cruda entera).

**Resultado Experimental de muestra 521, en ensayo N°2 = 17 respuestas correctas.**

A un nivel de probabilidad valor de 5%, 1%, el resultado de los catadores muestra que a estos niveles de significancia no detectaron diferencias entre leche tratada con pulsos eléctricos y el patrón R<sub>2</sub> (leche pasteurizada 65°C; 30min)

La Ecuación 11, muestra el cálculo de **consumo de energía eléctrica** ocupada en el proceso, así:

$$W = P * t$$

*Adaptador 24V; para 6,08ml*

$$W_1 = P * t$$

$$W_1 = 36W * 0,5s$$

$$W_1 = 0,036kW * 1,389 * 10^{-4} h$$

$$W_1 = 5,0004 * 10^{-6} \frac{kW}{h}$$

$$W = W_1 + W_2$$

$$W = 5,0004 * 10^{-6} \frac{kW}{h} + 3,4725 * 10^{-6} \frac{kW}{h}$$

$$W = 8,4729 * 10^{-6} \frac{kW}{h}$$

*Adaptador 5V; para 6,08ml*

$$W_2 = P * t$$

$$W_2 = 25W * 0,5s$$

$$W_2 = 0,025kW * 1,389 * 10^{-4} h$$

$$W_2 = 3,4725 * 10^{-6} \frac{kW}{h}$$

Costo kW/h en Ecuador = 0,081 usd.

Costo del proceso para 6,08ml =  $7,4646 \cdot 10^{-5}$ ctvs.

\*Para el procesamiento de 1 lt.

$$\begin{array}{ccc} 0,5s & 6,08^{-3}lt & \\ x & 1lt & = 82,23s \\ 0,5s & 6,08^{-3}lt & \\ x & 100lt & = 2,28hs \\ 0,5s & 6,08^{-3}lt & \\ x & 1000lt & = 22,84h \end{array}$$

*Adaptador 24V; para 1lt*

$$W_1 = P * t$$

$$W_1 = 36W * 82,23s$$

$$W_1 = 0,036kW * 0,02284h$$

$$W_1 = 8,223 * 10^{-4} \frac{kW}{h}$$

*Adaptador 5V; para 1lt*

$$W_2 = P * t$$

$$W_2 = 25W * 82,23s$$

$$W_2 = 0,025kW * 0,02284h$$

$$W_2 = 5,71 * 10^{-4} \frac{kW}{h}$$

$$W = W_1 + W_2$$

$$W = 8,223 * 10^{-4} \frac{kW}{h} + 5,71 * 10^{-4} \frac{kW}{h}$$

$$W = 1,3933 * 10^{-3} \frac{kW}{h}$$

Costo del proceso para 1 lt = 0,011ctvs.

Costo del proceso para 100 lt = 1,1285 ctvs.

Costo del proceso para 1000 lt = 112,85 ctv.

En la Tabla 40 se observa el resumen de costos y tiempos de operación.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

#### 4.1 DISCUSIÓN (ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE DATOS)

##### 4.1.1 Leche vacuna

En la Tabla 19, se observan los resultados de densidad y acidez de muestras de leche cruda entera que se utilizaron, a 20°C de 1030 kg/m<sup>3</sup>, los mismos que se encuentran dentro de los límites mínimos permitidos en la norma INEN 09, así: para 20°C es de 1026 a 1032kg/cm<sup>3</sup>.

La Tabla 18, muestra los datos de acidez titulable como ácido láctico, según el método propuesto en la norma INEN 13, con un promedio general de 0,23%.

Figura 23 se puede observar los resultados del contenido de partículas extrañas. Es posible que existan alteraciones de la materia prima por las malas condiciones en que la leche cruda entera es transportada hacia las plantas pasteurizadoras y procesadoras de productos lácteos, sino también al consumidor final por la comercialización directa que existe.

En las siembras microbiológicas de leche cruda entera sin tratar con una dilución de 10<sup>-3</sup>, el recuento es incontables (NTC); la alta concentración de microorganismos da como resultado un olor ácido ( $N_0=5.0*10^6$  ufc/ml).

##### 4.1.2 Campo eléctrico aplicado

En la Tabla 20, se observan los campos eléctricos aplicados a muestras de leche cruda entera. El aumento o descenso del campo eléctrico afecta directamente a la eficiencia del proceso, Ejemplo: el tratamiento a<sub>0</sub>b<sub>0</sub> (E=8kV, E<sub>p</sub>=26,67 [kV/cm]; 250n) y a<sub>2</sub>b<sub>0</sub> (E=12kV, E<sub>p</sub>=40 kV; 250n), pese a que las condiciones del tratamiento son las mismas (n=250,

$t=0.25s$ ,  $d=0,3cm$ ,  $V=6,08ml$ ), la variación de intensidad de campo eléctrico de 26,67 a 40[kV/cm], provoca un descenso en el recuento microbiano, de  $5,9*10^4$  ufc/ml a  $2,6*10^4$  ufc/ml, respectivamente.

Se construyó un equipo prototipo, que genera pulsos eléctricos de onda cuadrada de bajo voltaje (8, 10, 12V), los cuales pasan a un autotransformador con un factor de conversión 1:1000, que a diferencia de los equipos encontrados en bibliografía donde los pulsos eléctricos son obtenidos a partir de celdas eléctricas o transformadores de alto voltaje, (2.5 [kV/cm] - 80 [kV/cm])<sup>[14, 36]</sup>. De ésta forma se pretende optimizar y se ahorrar recursos.

#### **4.1.3 Eficiencia de campos eléctricos pulsados**

En la Tabla 9, se muestran datos de varias investigaciones realizadas con pulsos eléctricos por diferentes científicos, referentes a suspensiones utilizadas, reducción en el contaje de microorganismos, características de la cámara de tratamiento, y las condiciones de proceso.

En bibliografía se muestra condiciones de tratamiento “ideales”, en alimentos tratados previamente, con productos como el llamado “SMUF” (simulated milk ultra filtrate).

La eficiencia del tratamiento de campos eléctricos pulsados aplicado a muestras de leche cruda entera fue parcial, el descenso microbiano se ve afectado por las condiciones de alta carga microbiana ( $N_0=5.0*10^6$  ufc/ml) de las muestras tratadas. Se obtuvieron 2 ciclos logarítmicos de reducción microbiana a temperatura de 20°C ( $N=1,4*10^4$  ufc/ml), y 4 reducciones logarítmicas a una temperatura de 2°C ( $N=3.0*10^2$  ufc/ml) (“tecnología de barreras”).

El conjunto de características naturales de leche cruda entera, genera la una eficiencia limitada del proceso. La cantidad de materia grasa (3.7%), tiene un efecto protector muy alto, incrementa la viscosidad de leche, posiblemente partículas en suspensión generen un gradiente de conductividad eléctrica diferente a la conductividad eléctrica del medio y componentes de la leche.

No se detectó ningún incremento de temperatura en las muestras de leche cruda tratada después del tratamiento con pulsos eléctricos.

#### **4.1.4 Eficiencia de campos eléctricos pulsados, relación descenso microbiano ( $\ln s$ ) vs campo eléctrico aplicado ( $E_p$ =[kV/cm]), constante = tiempo de tratamiento**

Las Tablas 22, 23, 24 y los Gráficos 3, 4, 5, señalan la relación de descenso entre el campo eléctrico aplicado ( $E_p$  [kV/cm]), contra el  $\ln s(N/N_0)$ , manteniendo como constante para cada caso el tiempo de tratamiento ( $t=s$ ).

En la Tabla 25 se muestra los coeficientes de regresión lineal ( $m_E$ ), este valor indica la eficiencia del tratamiento a las condiciones indicadas de campo eléctrico aplicado, número de pulsos, volumen de la cámara de tratamiento, tipo de flujo y condiciones del producto tratado. Valores  $m_E^{[17]}$  bajos indican una alta eficiencia del tratamiento.

En la Tabla 25 y Gráficos 5, 6, y 7, se muestra que el mejor tratamiento es  $a_2b_2$  ( $E=12kV$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas  $d=3mm$ ,  $V= 6.08ml$ ), en cuanto a descenso microbiológico ( $N_0=5.0*10^6$ ufc/ml;  $N=1,4*10^4$ ufc/ml;  $T^\circ C=20$ ), aunque tiene el mayor  $m_E$  y línea de tendencia uniforme, se cree que éste descenso tardío pero homogéneo, describe el verdadero efecto de tres niveles de pulsos eléctricos (250, 400, 500n) de alto voltaje (8, 10, 12kV), aplicados en muestras de leche cruda entera utilizadas, a las condiciones del alimento (contenido de grasa, partículas en suspensión, pH del medio, entre otros), y parámetros establecidos de tratamiento.

El mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12kV$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas 3mm,  $V= 6.08ml$ ), que contiene el máximo voltaje y campo eléctrico aplicado ( $E=12kV$ ;  $E_p=40$  [kV/cm]) y mayor número de pulsos (500n;  $t=0.5s$ ), la pendiente muestra un valor muy alto, posiblemente por una ruptura dieléctrica. Es posible que el aumento de la conductividad eléctrica por el alto



campo eléctrico aplicado haya sesgado el efecto, (los alimentos tienen un máximo potencial de transporte de energía).

Grall y Märkl (1996), señalan un valor de  $m_E = -0,475$  donde consiguen 5 ciclos logarítmicos de reducción microbiana, en comparación con  $m_E$  obtenido experimentalmente es  $-0,025$  que da 2 ciclos logarítmicos de descenso microbiano.

#### **4.1.5 Eficiencia de campos eléctricos pulsados, relación descenso microbiano (ln s) vs tiempo de tratamiento (ln t=[s] ó n), constante = campo eléctrico aplicado ( $E_p$ [kV/cm])**

Las Tablas 26, 27, 28 y los Gráficos 9, 10, 11, señalan la relación descenso microbiano (ln s) vs tiempo de tratamiento (ln t[s]), manteniendo como constante para cada caso el campo eléctrico ( $E_p$ [kV/cm]).

Grall y Märkl (1996), señalan un valor de  $m_t = -5,968$  donde consiguen 5 ciclos logarítmicos de reducción microbiana, en comparación con  $m_t$  obtenido experimentalmente es  $-0,833$  que da 2 ciclos logarítmicos de descenso microbiano.

Las Tablas 29 y Gráficos 11, 12, 13, en la relación ln s vs ln t[s], el mejor tratamiento es  $a_2b_2$  ( $E=12$ kV,  $E_p=40$  [kV/cm],  $500n$ , ancho de pulso  $1ms$ ,  $2000mA$ ,  $500Hz$ , tiempo total de tratamiento  $0.5s$ , distancia entre placas  $d=3mm$ ,  $V=6.08ml$ ), obteniéndose un descenso microbiano de  $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml a  $N=1,4 \cdot 10^4$  ufc/ml;  $T^\circ C=20$ , en el Gráfico 13 se señala el descenso de dos ciclos logarítmicos.

Las características naturales de muestras de leche cruda entera utilizadas en estos experimentos denotan que el descenso de microorganismos es tardío ( $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml;  $N=1,4 \cdot 10^4$  ufc/ml;  $T^\circ C=20$  y  $N=3.0 \cdot 10^2$  ufc/ml;  $T^\circ C=2$ ), obteniéndose dos y cuatro reducciones logarítmicas respectivamente, se necesitan cantidades mayores de campo eléctrico y menos pulsos eléctricos para provocar descensos microbianos más importantes, evitando la ruptura eléctrica.

Se considera que la cantidad de grasa (3,7%) de leche cruda entera, posibles aglomerados de microorganismos y partículas en suspensión actúen como la máxima barrera que impide la formación correcta del campo eléctrico, muchas pulsaciones tal vez no logren completar todo el circuito y el efecto del campo eléctrico sea afectado.

En los Gráficos 2, 5, 6, 7, 8, 11, 12 y 13, las tablas 24, 25, 28 y 29, se muestran las líneas de tendencia y el coeficiente de correlación  $m_E$  correspondientes al tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12kV$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas  $d=3mm$ ,  $V= 6.08ml$ ), para los dos casos en las relaciones de  $\ln s=(N/N_0)$  vs  $E_p[kV/cm]$  y  $\ln t[s]$  tienen la particularidad que es uniforme sin picos prolongados ni caídas bruscas, es decir el tratamiento es más armónico y letal.

En los Gráficos 6 y 11, se observa que el tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12kV$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas  $d=3mm$ ,  $V= 6.08ml$ ), es quien mejor describe el descenso microbiano, en las muestras de leche cruda entera con las características naturales y malas condiciones de manipulación de nuestro medio.

En los Gráficos 2 y 8, se cree que la caída vertiginosa de las curvas de muerte microbiana hacia un punto dado del tratamiento, el efecto de letalidad va a ser el mismo para cualquier campo eléctrico aplicado y número de pulsos, y el método específico aquí descrito ya no será el más apropiado. Un incremento de campo eléctrico y mejores condiciones de leche podrían dar mejores resultados.

#### **4.1.6 ANOVA**

En la Tabla 33, el análisis de varianza, señala que el efecto de tratamientos, del factor A ( $E=kV$ ;  $E_p=[kV/cm]$ ), y del factor B ( $n$  ó  $t[s]$ ), y el efecto combinado de AB influyen considerablemente y que la variación de cualquier factor afecta el contenido bacteriano inicial de leche cruda entera.

Por la comparación de TUKEY se determinó que el F calculado es mayor al F de Tablas a  $\alpha=0.5\%$  por lo que se determina que el mejor tratamiento es  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas  $d=3\text{mm}$ ,  $V= 6.08\text{ml}$ ).

Generalmente se toma el tratamiento que no sobrepase el valor T, puesto que en otras circunstancias, por ejemplo en sustitución de edulcorantes, si un valor sobrepasa el valor de T se identifica que dicho edulcorante acarrea una característica no deseada y que es organolépticamente detectable o que su variación produce cambios significativos en la influencia de otros factores involucrados en los tratamientos.

En éste caso se elige al tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas  $d=3\text{mm}$ ,  $V= 6.08\text{ml}$ ), por ser el tratamiento que tiene el valor experimental T más se alejado del valor de T de tablas, es decir es el tratamiento con más influencia en cuanto a letalidad.

#### **4.1.7 Tratamiento con pulsos eléctricos en muestras con gradiente de temperaturas.**

En la Tabla 35, identificado el mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento = 0,5s, distancia entre placas  $d=3\text{mm}$  y  $V= 6,08\text{ml}$ ), en conjunto con gradiente de temperaturas aplicado a muestras de leche cruda entera, la eficiencia del tratamiento con pulsos eléctrico aumenta. A una temperatura de  $2^\circ\text{C}$  la reducción microbiana inicial ( $N_0$ ) de  $5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml disminuye a  $N=3.0 \cdot 10^2$  ufc/ml.

A una temperatura de  $35^\circ\text{C}$  la efectividad disminuye, con un conteo de  $N=6.3 \cdot 10^4$  ufc/ml, probablemente ésta temperatura es ideal para el desarrollo de coliformes totales y ayudó al proceso de multiplicación celular.

Barbosa (1999), señala que la formación de poros puede ser reversible a temperaturas promedios de  $36^\circ\text{C}$ , pero de la misma manera a temperaturas bajas promedio de  $3^\circ\text{C}$  los

poros formados en la membrana microbiana pueden permanecer abiertos hasta 24 horas antes que la membrana retorne a su estado normal, si el tratamiento no fue lo suficientemente fuerte para provocar la formación irreversible de poros en la membrana microbiana

A una temperatura de 65°C, “temperatura de pasteurización”, el efecto nuevamente se torna efectivo con  $N=1.8 \cdot 10^4$  ufc/ml, pero esto traería el problema de los tratamientos térmicos (desnaturalización de componentes nutricionales termo sensibles).

Los Gráficos 15 y 16, en papel semilogarítmico señalan 4 ciclos logarítmicos de descenso microbiano, a bajas temperaturas. Con éste gráfico se denota el efecto de bajas temperaturas en la eficiencia del proceso.

Todos éstos fenómenos tienen circunstancias combinadas, factores que elevan la viscosidad (temperatura bajas y alta acidez) y factores que la disminuyen (altas temperaturas), cuando se eleva el campo eléctrico, la resistencia del medio disminuye, incrementa la conductividad eléctrica y fuerza iónica, la baja temperatura disminuye la cinética de reacciones de los microorganismos, elevado contenido de grasa (efecto protector) y gran contenido de microorganismos iniciales.

#### **4.1.8 Pruebas Organolépticas.**

En la Tabla 36 y 37, se muestran las respuestas por parte de los catadores (Tabla 40 y 41), esto indica que los catadores no encontraron ninguna diferencia a un nivel de significancia-prueba a una cola (Tabla 38) de 5% para el ensayo N°1; 5 y 1% para el ensayo N°2, entre el tratamiento con pulsos eléctricos y las muestras patrón R<sub>1</sub> (leche cruda entera; ±5°C) y R<sub>2</sub> (leche pasteurizada; 65°C por 30min y enfriada a ±5°C).

Es decir que el proceso de tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje, no altera las características organolépticas en conjunto de los productos tratados, porque el efecto de

reducción de microorganismos es un efecto mecánico sin cambio ni alteración de sus componentes iniciales<sup>[6], [7], [14], [17], [21], [22], [23], [24], [25] [34], [39]</sup>.

#### **4.1.9 Comparación de tratamiento con pulsos eléctricos con un tratamiento de pasteurización.**

En la Tabla 14, se muestra la norma INEN 10 “leche pasteurizada, requisitos”, la cual señala que el contenido máximo para coliformes totales ufc/cm<sup>3</sup> es  $5.0 \cdot 10^0$ , y para coliformes fecales y *Escherichia coli* ufc/cm<sup>3</sup> es de  $<3.0 \cdot 10^0$ , en comparación con los datos obtenidos experimentalmente (20°C;  $1,4 \cdot 10^4$  ufc/ml y 2°C;  $3.0 \cdot 10^2$  ufc/ml), el proceso de pasteurización que utiliza calor es más eficiente.

La tecnología de pulsos eléctricos no ha sido desarrollada en su totalidad, la eficiencia del proceso depende en gran parte de las características y calidad de los alimentos a tratarse. El perfeccionamiento de los procesos térmicos (UHT) a partir de los años 50, dejó de lado al tratamiento con PEF, pero el estudio se retomó después de los problemas que trae un proceso térmico severo.

En cuanto a **costos**, (producción), Gutiérrez J. (2006), señala que en la planta de procesamiento del colegio Luis A. Martínez de la ciudad de Ambato (CAL), el costo por cada parada de producción de 1000 litros de leche pasteurizada, es aproximadamente de 80 dólares. Dicho costo asume los gastos de insumos, combustibles del caldero, servicios básicos, pago a operarios, fundas de empaque, entre otros

En la Tabla 39, se muestra el costo y tiempo de producción, en los cuales el costo económico es muy bajo (1.1 dólares por cada 1000 litros), pero se contrasta con el tiempo empleado (1000 litros requieren 22,4h), ésta trae un problema para la industria puesto que la leche al ser un alimento perecible, en ese tiempo se descompondrá totalmente.

Éste tiempo se debe a que la cámara de tratamiento es de configuración estática o batch, pero con sistemas continuos el proceso es más rápido.

#### 4.2. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.

Mediante la comparación de Tukey, en la cual se aprecia que la combinación del factor A(voltaje) y el factor B(pulsos), generan una reducción parcial de carga microbiana inicial de muestras de leche cruda entera, cada combinación el resultado varía siendo la mejor combinación o tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12\text{kV}$ ,  $E_p=40$  [kV/cm],  $500\text{n}$ , ancho de pulso  $1\text{ms}$ ,  $2000\text{mA}$ ,  $500\text{Hz}$ , tiempo total de tratamiento  $0.5\text{s}$ , distancia entre placas  $d=3\text{mm}$ ,  $V=6.08\text{ml}$ ,  $N_0=5*10^6$  ufc/ml, a  $N=1,43*10^4$  ufc/ml;  $T^\circ\text{C}=20$  y a  $N=3*10^2$  ufc/ml;  $T^\circ\text{C}=2$ ).

Se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), la cual señala que “los pulsos eléctricos (250, 400, 500n pulsos), de alto voltaje (8, 10, 12 kV), provocan un descenso parcial en el contenido inicial de microorganismos en muestras de leche cruda entera”.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

- El equipo prototipo generador de pulsos eléctricos de alto voltaje construido tiene su diferencia con los instrumentos bibliográficos, en que el pulso eléctrico primeramente es generado en bajo voltaje (8, 10, 12V) y que por medio de inducción magnética – eléctrica (auto-transformador de energía eléctrica o bobina) es amplificado (8, 10, 12kV), de ésta manera se optimiza energía y recursos, puesto que lo convencional es generar la energía y pulsaciones eléctricas desde celdas o transformadores de alta tensión, más costosos y difíciles de obtener.
- La tecnología de campos eléctricos pulsados puede provocar descensos microbiológicos importantes (de  $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml, a  $N=1,4 \cdot 10^4$  ufc/ml;  $T^\circ C=20$  y a  $N=3.0 \cdot 10^2$  ufc/ml;  $T^\circ C=2$ , con dos y cuatro reducciones logarítmicas respectivamente), siempre y cuando las características del proceso sean las más acordes a cada tipo de microorganismo y alimento tratado.
- La eficiencia de la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje se vio sesgada por el alto contenido de grasa (3,7%) y población microbiana inicial ( $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml principios de deterioro), contenido ácidos orgánicos, partículas en suspensión, posible adulteración del producto, entre otros.
- El mejor tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12kV$ ,  $E_p=40$  [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas  $d=3mm$ ,  $V= 6.08ml$ ), en conjunto con la llamada tecnología de barreras (reducción de temperatura del producto a  $2^\circ C$ ), se obtiene un mejor resultado de  $N_0=5.0 \cdot 10^6$  ufc/ml, a  $N=3.0 \cdot 10^2$  ufc/ml;  $T^\circ C=2$ ), con 4 reducciones logarítmicas.

- Los gráficos de descenso microbiano muestran la disminución parcial y continua de los tres niveles de pulsación (n=250, 400, 500) y tres niveles de voltaje eléctrico (8, 10, 12kV), siendo el tratamiento a<sub>2</sub>b<sub>2</sub> (E=12kV, E<sub>p</sub>=40 [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento 0.5s, distancia entre placas 3mm, V= 6.08ml), quien describe mejor el descenso y el efecto de éstos niveles de voltaje eléctrico (kV) y tiempo de tratamiento (s), bajo las condiciones y características de leche cruda entera que circula, se consume, y se tratada en plantas lecheras.
- El tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje no genera ningún incremento de temperatura en las muestras tratadas.
- Después del análisis sensorial los catadores no detectaron ningún cambio significativo en las propiedades organolépticas del producto tratado.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que los equipos tanto prototipos como los equipos para plantas pilotos y los de mayor escala se los debe construir para trabajar de manera continua para mejorar la eficiencia del proceso.

Se cree que debido al flujo turbulento generado dentro de la cámara continua, la probabilidad del efecto letal del campo eléctrico aumenta, es decir cada microorganismo presente tiene mayor riesgo de mortalidad, puesto que se encuentra circundando por todo el volumen de la cámara y ser alcanzado por alguna pulsación eléctrica, que viaja y rebota por cada partícula óptimamente conductora de electricidad, formándose una “red eléctrica”.

- El sistema que regula la cantidad de energía aplicada sea de mayor voltaje y es posible con programaciones de mayor escala de selección.



- Los rangos de campo eléctrico, número de pulsos y ancho del pulso se los debe ampliar a mayores intensidades para conseguir mejores resultados de descenso de la carga microbiana.
- Las muestras de leche cruda entera deben ser descremadas en primera instancia y se las debe obtener de sitios en los cuales haya confianza de la buena calidad del producto.
- Se recomienda que para materias primas que contengan alta carga microbiana inicial se utilice tecnología de barreras, como por ejemplo la disminución de temperatura.
- Se recomienda la continuidad de la investigación de estas nuevas tecnologías para que en el futuro se cuente con datos más concluyentes y directrices que permitan mejorar los procesos, adecuados para las diversas materias primas con cargas microbianas altas las que pueden ser tratadas con estas nuevas tecnologías.
- Se recomienda nuevos estudios con la tecnología de pulsos eléctricos direccionados a la inactivación de bacterias que representa mayor riesgo patológico como: *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetti*, que son mas termoresistentes en un proceso de pasteurización principalmente en un proceso de pasteurización . Además la inactivación de enzimas perjudiciales en la conservación de alimentos como: fosfatasa alcalina y polifenoloxidasa en el caso de jugos.

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1 DATOS INFORMATIVOS**

**Nombre** : Diego Israel Carrillo Ampudia.  
**Entidad** : Universidad Técnica de Ambato.  
**Dirección** : Ingahurco, entre las calles México y Salvador - Campus Huachi.  
**Provincia** : Tungurahua.  
**Cantón** : Ambato – Ecuador.  
**Título** : Pasteurización de leche utilizando campos eléctricos pulsados de alta intensidad.

#### **6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

En este tipo de tecnología no se reportan trabajos investigativos previos al presente. Por los tanto se cita las cuatro fuentes bibliografías con más relevancia que se consultaron para el presente trabajo.

1. BARBOSA-CÁNOVAS G., GONGORA-NIETO M., POTHAKAMURY U. SWANSON B. (1999). “Preservation of Foods with Pulses Electric Fields”. Editorial: Acedemic Press., USA.
2. BARBOSA-CÁNOVAS G., HOWARD ZHANG Q., TABILO-MUNIZAGA G. (2001). “Pulsed Electric Fields in Food Processing – Fundamental Aspects and Applications”. Editorial: Technomic Publishing Company Inc. USA.
3. GRAHL T., MÄRKEL H. (1996). “Killing of microorganisms by pulse electric fields”. Appl Microbiol Biotechnol”, Editorial: Espringer-Verlag vol. 45. Hamburg, Germany.
4. HO S., MITTAL G., CROSS J., GRIFFITHS M. (1995). “Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses”. Editorial: Journal of Food Science, Vol 60, No. 6, 1995.

### **6.3 JUSTIFICACIÓN**

La presente propuesta de investigación tiene su fundamento en que la carga microbiana inicial de leche cruda es susceptible al tratamiento con campos eléctricos pulsados.

Tomando en cuenta que el éxito del proceso no depende enteramente del equipo utilizado, es necesario implementar sistemas más asépticos de obtención de la materia prima, lo que permitirá a futuro obtener productos nutricionales mínimamente procesados y conservando todas las características originales del producto, tanto nutricional como organolépticamente.

### **6.4 OBJETIVOS**

#### **6.4.1 OBJETIVOS GENERAL**

- Pasteurizar leche cruda descremada, hasta valores aptos para el consumo humano.

#### **6.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir y calibrar un equipo generados de pulsos eléctricos de alto campo eléctrico y cámara de tratamiento de flujo continuo, capaz de procesar leche cruda en forma continua.
- Determinar parámetros; microbiológicos de control (eliminación de microorganismos patógenos como *Coxiella burnetti*, *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros), enzimáticos de control (eliminación de fosfatasa alcalina, polifenoloxidasas, entre otros), y producción-proceso para la tecnología de campos eléctricos pulsados de alta intensidad.
- Obtener productos lácteos (leche fluida enfundada) estable microbiológicamente en el tiempo, a través de la combinación de otros factores como bajas temperaturas (tecnología de barreras).

## **6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

La presente propuesta de investigación es factible porque en estudios bibliográficos, si la materia prima es obtenida de mejor forma, se puede obtener descensos microbiológicos casi totales, además se demostró como el efecto de bajas temperaturas ayuda a la letalidad del proceso.

Éste parámetro (bajas temperaturas), combinado crea la llamada “tecnología de barreras” que darán mejores resultados en el futuro.

## **6.6 FUNDAMENTACIÓN**

Barbosa y col (1999), la aplicación de campos eléctricos pulsados tiene su fundamento en que los alimentos al igual que otros materiales como los metales, tienen una conductividad eléctrica, en menor o mayor proporción.

Barbosa y col (1999), la leche es un alimento líquido que actúa como un conductor de energía eléctrica por su gran contenido de iones y minerales, en general los alimentos con alta conductividad eléctrica son difíciles de tratar con pulsos eléctricos debido a su baja resistividad eléctrica.

Raventos (2005), los campos eléctricos provocan una deformación o destrucción de la membrana celular (acumulación de carga superficial y aumento en la diferencia de potencial a través de la membrana) debido a la formación de una diferencia de potencial en ambos lados de la membrana generando poros.

Barbosa (1999), la electro-poración es un proceso que se puede definir en tres pasos, (1) formación del poro  $3\mu\text{s}$  después de la aplicación de la pulsación, (2) expansión del poro formado  $20\mu\text{s}$  después de la aplicación de la pulsación cuando la expansión es de 20 a 120 nm de diámetro y (3) encogimiento del poro formado varios segundos después del tratamiento.

## **6.7 METODOLOGÍA – MODELO OPERATIVO**

Los descenso microbiológicos se muestran en la Tabla 19, en los cuales se determina que el mejor tratamiento a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>. Dicho tratamiento corresponde a E=12kV, E<sub>p</sub>=40 [kV/cm], 500n, ancho de pulso 1ms, 2000mA, 500Hz, tiempo total de tratamiento = 0,5s, distancia entre placas 3mm y V= 6,08ml.

### **6.7.1 MATERIALES DIRECTOS**

1. Leche cruda descremada.

### **6.7.2 MATERIALES INDIRECTOS**

1. Envases (fundas)

### **6.7.3 EQUIPOS**

1. Nuevo programa computacional (software de la tarjeta electrónica) que permita escoger entre un número determinado de pulsos eléctricos o pulsaciones continuas infinitas.
2. Auto-transformador de mayor amplitud (1:10000).
3. Varias cámaras de tratamiento, de flujo continuo (cámaras coaxiales).
4. Bombas de flujo.
5. Sistema de enfriamiento.
6. Enfundadora.
7. Cuartos Fríos.
8. Equipos y materiales para pruebas de andén y estudios microbiológicos.

El proceso operativo tiene el mismo sistema descrito anteriormente:

#### **1.- Recepción.**

El producto una vez receptado se lo someterá a un control de calidad (pruebas de anden), como determinación de acidez titulable, densidad relativa a 20°C, pH, prueba de alcohol, entre otros.

## **2.- 1ª Análisis microbiológico.**

Para determinar la calidad microbiológica de la materia prima a tratarse. Dicho contenido microbiológico inicial tiene que ser el menor posible, para que el tratamiento con campos eléctricos pulsados sea 100% eficiente con los microorganismos patógenos.

La siembra de leche cruda descremada se la puede realizar en cajas Petrifilm de la marca 3M (Placas para recuento de *E. coli* y *coliformes*).

## **3.- Descremado.**

Con el fin de eliminar la barrera y protección natural que tienen los microorganismos, se debe descremar la materia prima. Después de ese proceso la temperatura debe bajar a 3 o 4°C.

## **4.- Bombeo de materia prima y llenado de las cámaras coaxiales.**

La materia prima una vez enfriada y descremada, se la bombeará hasta el banco de cámaras coaxiales de tratamiento.

El bombeo será calibrado para mantener un flujo y caudal constante en todo el proceso.

## **5. Tratamiento con pulsos eléctricos.**

### **5.1. Sistema electrónico**

El sistema electrónico permitirá escoger un número determinado o continuo de pulsaciones y una amplia intensidad de corriente eléctrica (voltaje).

## **6.- Enfundado.**

Una vez que la leche cruda descremada haya sido sometida al tratamiento, se la enfundará y se la almacenará en cuartos fríos.

## **7.- 2ª análisis microbiológico y determinación de vida útil.**

Se realizarán los respectivos análisis microbiológicos y se procederá a un estudio más detallado de tiempo de vida útil.

## **6.8 ADMINISTRACIÓN**

La tecnología desarrollada al máximo, podrá ser el inicio de una microempresa con una gran visión de expansión. El proceso tecnológicamente puede abaratar costos de procesamiento si se lo combina con otros tratamientos (tecnología de barreras).

## **6.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN**

Se prevé que, con el estudio constante y perseverante éste nuevo equipo sugerido será capaz a través de la implementación de más cámaras de tratamiento, convertirse en una maquinaria a escala industrial y en el futuro reemplazar máquinas de procesamiento térmico (pasteurizadores y máquina UHT).

## BIBLIOGRAFÍA

1. 3M PETRIFILM (2008). “Guía de interpretación para placas alta sensibilidad para recuento de coliformes” (on line) disponible en: [www.3m.com.es](http://www.3m.com.es) (fecha de consulta 06/03/2009, hora 3:40pm).
2. 3M PETRIFILM (2008). “Guía de interpretación de placas para recuento rápido de coliformes” (on line) disponible en: [www.3m.com.es](http://www.3m.com.es) (fecha de consulta 06/03/2009, hora 3:42pm).
3. 3M PETRIFILM (2008). “Guía de interpretación de placas para recuento de coliformes” (on line) disponible en: [www.3m.com.es](http://www.3m.com.es) (fecha de consulta 06/03/2009, hora 3:45pm).
4. ALAIS CH. (1985).”Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera”. Editorial Reverté SA. España, reimpresso en 2003. (on line) disponible en : [http : // books . google.com.ec/books?id=bW\\_ULacGBZMC&pg=PA259&dq=viscosidad+de+la+leche&cd=1#v=onepage&q=viscosidad%20de%20la%20leche&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=bW_ULacGBZMC&pg=PA259&dq=viscosidad+de+la+leche&cd=1#v=onepage&q=viscosidad%20de%20la%20leche&f=false) (fecha de consulta 08/01/2009, hora 10:12am).
5. ANZALDUA – MORALES, (1994). “La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica”. Editorial Acribia, Primera Edición, Zaragoza – España, pag: 82, 141, 142, 143, 161.
6. BARBOSA-CÁNOVAS G., HOWARD ZHANG Q., TABILO-MUNIZAGA G. (2001). “Pulsed Electric Fields in Food Processing – Fundamental Aspects and Applications”. Editorial: Technomic Publishing Company Inc. USA, pag: Capítulos 1 y 2.



7. BARBOSA-CÁNOVAS G., GONGORA-NIETO M., POTHAKAMURY U. SWANSON B. (1999). "Preservation of Foods with Pulses Electric Fields". Editorial: Academic Press., USA, pag: Capítulos 1, 2, 3 y 4.
8. BOYLESTAD R., NASHESKY L. (2003). "Electrónica: Teoría de circuitos y dispositivos electrónicos". Editorial Person, 8<sup>va</sup> edición. México. pag: Capítulos 6 y 7, 8 y 9.
9. CASTORENA J., y colaboradores (2007). "Aplicación de campos eléctricos pulsados para inactivación de polifenoloxidasa comercial". " CIVIA VI, Alimentos Ciencia e Ingeniería. Vol.16(3), pags: 119, 120, Ambato – Ecuador.
10. CALVO M. CARAZO M., ARIAS M., CHAVES C., MONGE R., CHINCHILLA M. (2004). "Prevalencia de *Cyclospora sp.*, *Cryptosporidium sp.*, *microsporidios* y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica" Editorial: ALAN v.54 n.4 Caracas-Venezuela (on line) disponible en [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0004-06222004000400009&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0004-06222004000400009&lng=es&nrm=iso) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 9:50am).
11. CHALISE P., SHAMA S., NOVAC B. (2006). "Letalidad en los mecanismos de la *Escherichia coli* inducidos por pulsos eléctricos en micro segundos". Base EBSCO: Appl. Phys, Lett. **89** , 153902 2006.
12. COSTA M., GOMEZ M., MOLINA L, ROMERO A. (2001). "Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración" Editorial: ALAN v.51 n.4 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222006000400007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000400007&lng=es&nrm=iso) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 10:02am).

13. COSTA M., GOMEZ M., MOLINA L., SIMPSON R., ROMERO A. (2002). “Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche ” Editorial: ALAN v.52 n.2 supl.2 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222002000400007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000400007&lng=es&nrm=iso) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 10:10am).
14. DA-WEN S., MITTAL S., GRIFFITHS M. (2005). “Emerging Technologies for Food Processing”. Editorial: Elsevier Ltd. USA, pag: Capítulo 4.
15. DÁVILA J., REYES G., CORZO O. (2006). “Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda en un Industria Venezolana” Editorial: ALAN v.56 n.1 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-0622\\_2006000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-0622_2006000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 10:15am).
16. FARÍA J., GARCIA A., IZQUIERDO P., ALLARA M., VALERA K. (2002). “Aislamiento de bacterias Gramm positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos”. Editorial ALAN v.52 n.1 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-0622\\_20020001000&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-0622_20020001000&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 10:19am).
17. GRAHL T., MÄRKL H. (1996). “Killing of microorganisms by pulse electric fields”. Appl Microbiol Biotechnol”, Editorial: Espringer-Verlag vol. 45, pags:148-157. Hamburg, Germany.
18. GUTIEREZ De PIÑERES, y colaboradores (2007). “Aplicación de pulsos eléctricos de baja intensidad para controlar ataques fúngicos en una fruta tropical” CIVIA VI, Alimentos Ciencia e Ingeniería. Vol.16(3), pags: 113, 114, Ambato – Ecuador.

19. GUTIÉRREZ A. (1985). “Lecciones de historia de la filosofía, Filosofía moderna, contemporánea y latinoamericana”. Editorial: Siembra, pags: 257-259. Quito-Ecuador
20. GUTIERREZ J. (2006). “Tecnología de Lácteos”. Universidad Técnica de Ambato UTA-FCIAL, pags: 9-12.
21. HO S., MITTAL G., CROSS J., GRIFFTHS M. (1995). “Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses”. Editorial: Journal of Food Science, Vol 60, No. 6, 1995, pags: 1337-1340.
22. HUI Y.H., CULBERTSON J., DUNCAN S., GUERRERO-LEGARRETA I., LI-CHAN E., MA C., MANLEY C., McMEEKIN T., NIP W., NOLLET L., RAHMAN M., TOLDR F., XIONG Y. (2006). “Handbook of Food Science, Technology, and Engineering”. Editorial: Taylor & Francis Group, LLC Vol 1. CRC Press. USA, pags: Capítulo 126.
23. JUÁREZ G., y colaboradores (2007). “Conservación de salsa mexicana por pulsos eléctricos de alta intensidad de campo”. CIVIA VI, Alimentos Ciencia e Ingeniería. Vol.16(3), pags: 124-126, Ambato – Ecuador.
24. MARTIN O. (2007). “Técnica de pulsos eléctricos para la conservación de alimentos”. Congreso de ingeniería y biología de alimentos, Universidad de Lleida - España. (on line) disponible en: [http://www.cresca.upc.edu/EBA2007/docs/pdf/P9.Olga\\_Martin.pdf](http://www.cresca.upc.edu/EBA2007/docs/pdf/P9.Olga_Martin.pdf) (fecha de consulta 02/22/2009, hora 9:21am).
25. MÓNICO A., MARTIN O., PORTELA M., LANGINI S., WEISSTAUD A., GRECO C., RONAYNE P. 2006. “Aceptabilidad y calidad nutricional de una bebida a base de zumo de naranja y suero de leche, conservado con calor o campos eléctricos pulsados de alta intensidad”. Editorial ALAN v.56 n.4 Caracas-Venezuela

(on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222006000400007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000400007&lng=es&nrm=iso) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 11:10am)

26. NORMA NTE INEN 702. (2008). “Leche descremada y semidescremada, pasteurizada”
27. NORMA NTE INEN 004. (2008). “Muestreo”.
28. NORMA NTE INEN 009. (2003). “Leche cruda. Requisitos”, Primera edición, tercera revisión.
29. NORMA NTE INEN 10 (2009). “Leche pasteurizada, requisitos”. 1<sup>ra</sup> edición, 4<sup>ta</sup> revisión.
30. NORMA NTE INEN 013 (2003). “Acidez titulable como ácido láctico”. 3<sup>a</sup> revisión. 2003.
31. NORMA NTE INEN 10 (2009) “Requisitos microbiológicos de leche pasteurizada para lotes o partidas” . 4<sup>ta</sup> revisión.
32. OCHOA O. y colaboradores (2007). “Conductividad eléctrica de la carne de res, cerdo y pavo”. CIVIA VI, Alimentos Ciencia e Ingeniería. Vol.16(2), pags: 77-79, Ambato – Ecuador.
33. MURRAY S. (1991). “Estadística-Schaum”. 2<sup>a</sup> edición, Editorial McGraw Hill. España, pags: 91-98.
34. RAVENTOS M. (2005). “Industria alimentaria, tecnologías emergentes” Ediciones UPC – España. (on line) disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id>

≡MNuk-7jKExIC&pg=PA18&dq=tecnologías+emergentes+en+alimentos (fecha de consulta 18/02/2009, hora 11:49am)

35. REUBEN A., TREMINIO H., ARIAS M., CHAVES C. 2003 “Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica” Editorial: ALAN v.53 n.4 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-060020020001100&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-060020020001100&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (fecha de consulta 02/21/2009, hora 1:32pm).
36. MEDINA Z., SULBARAN B., FERRER A., OJEDA G. (2001). “Resistencia térmica de levaduras en jugo de naranja a diferentes concentraciones de sólidos solubles” Editorial ALAN v.51 n.2 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: <http://www.scielo.org.ve/img/fbpe/Alan/v51n2&lng=es&nrm=iso&tlng=es> (fecha de consulta 02/21/2009, hora 1:38pm).
37. PUIG A. y colaboradores (2006). “Inactivación de la población microbiana de los mostos mediante tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad de campo”. Universidad de Lleida, España, (on line) disponible en: [www.gencat.net/salut-acsa-Du12-html-ca-dir1311-dd16608-p\\_puig3\\_pdf.htm](http://www.gencat.net/salut-acsa-Du12-html-ca-dir1311-dd16608-p_puig3_pdf.htm) (fecha de consulta 03/10/2009, hora 8:22pm).
38. QUITRAL V., ABUGOCH J., VINAGRE J., LARRAIN M.(2001). “Efecto de tratamientos térmicos sobre el contenido de lisina disponible en carne de jaiba mora (*Homalaspis plana*)”. Editorial ALAN v.51 n.4 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222001000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (fecha de consulta 02/25/2009, hora 11:11am)
39. SAMPEDRO F. (2008). “Impacto del tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad y altas presiones hidrostáticas sobre la calidad y seguridad

- microbiológica de un alimento mezcla de zumo de naranja y leche”. Tesis doctoral europea, Universidad Politecnica de Valencia. (on line) disponible en: [http://dspace.upv.es/manakin/bitstream/handle/10251/1992/tesisUPV2760\\_Indice.pdf?sequence=5](http://dspace.upv.es/manakin/bitstream/handle/10251/1992/tesisUPV2760_Indice.pdf?sequence=5) (fecha de consulta 02/02/2009, hora 1:53pm).
40. SICA (2009). “Análisis comparativo de los resultados de los censos de 1974 y 2000” (on line) disponible en [http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/docs/analisis\\_produccion.htm#finca](http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/docs/analisis_produccion.htm#finca) (fecha de consulta 12/02/2009, hora 9:39am).
41. SICA (2009). “Análisis comparativo de los resultados de los censos de 1974 y 2001” (on line) disponible en [http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/docs/analisis\\_provincias\\_hato.htm#significativos](http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/docs/analisis_provincias_hato.htm#significativos) (fecha de consulta 12/02/2009, hora 9:40am).
42. SICA (2009). “Costos estimados de producción de un litro de leche” (on line) disponible en <http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/index.html> (fecha de consulta 12/02/2009, hora 9:35am).
43. SICA (2009). “Diagrama de Comercialización de la leche” (on line) disponible en [http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/docs/comercializacion\\_de\\_leche.htm#significativos](http://www.sica.gov.ec/cadenas/leche/docs/comercializacion_de_leche.htm#significativos) (fecha de consulta 12/02/2009, hora 9:41am).
44. SIMPSON R., JIMENEZ M., CAREVIC E., GRANCELLI R. (2007). “Aceleración de la deshidratación osmótica de frambuesas (*Rubus idaeus*) por medio de calentamiento óhmico”. Editorial: ALAN v.57 n.2 Caracas-Venezuela, (on line) disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000200014&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200014&lng=es&nrm=iso&tlng=es) fecha de consulta 02/21/2009, hora 4:12pm).

# ANEXOS

# **ANEXO A**

## **(Tablas)**



**Tabla # 1. Análisis comparativo de los resultados de los censos de 1974 y 2000**  
**Evolución de la producción diaria de leche por provincias**

| Provincia.            | Producción diaria leche censo 1974 (lt.) | Aporte porcentual 1974 | Producción diaria leche censo 2000 (lt.) | Aporte porcentual 2000 |
|-----------------------|--|------------------------|--|------------------------|
| AZUAY                 | 79.142                                   | 6%                     | 281.984                                  | 8%                     |
| BOLÍVAR               | 56.091                                   | 4%                     | 177.197                                  | 5%                     |
| CAÑAR                 | 39.740                                   | 3%                     | 173.767                                  | 5%                     |
| CARCHI                | 72.370                                   | 5%                     | 168.816                                  | 5%                     |
| COTOPAXI              | 157.388                                  | 12%                    | 264.591                                  | 8%                     |
| CHIMBORAZO            | 99.983                                   | 7%                     | 277.294                                  | 8%                     |
| IMBABURA              | 61.746                                   | 5%                     | 92.551                                   | 3%                     |
| LOJA                  | 51.083                                   | 4%                     | 190.533                                  | 5%                     |
| PICHINCHA             | 340.897                                  | 25%                    | 720.666                                  | 20%                    |
| TUNGURAHUA            | <b>71.631</b>                            | <b>5%</b>              | <b>218.173</b>                           | <b>6%</b>              |
| EL ORO                | 26.653                                   | 2%                     | 60.905                                   | 2%                     |
| ESMERALDAS            | 26.659                                   | 2%                     | 83.810                                   | 2%                     |
| GUAYAS                | 70.323                                   | 5%                     | 132.336                                  | 4%                     |
| LOS RIOS              | 31.418                                   | 2%                     | 40.988                                   | 1%                     |
| MANABI                | 121.235                                  | 9%                     | 331.586                                  | 9%                     |
| MORONA SANTIAGO       | 26.758                                   | 2%                     | 105.086                                  | 3%                     |
| NAPO                  | 12.697                                   | 1%                     | 36.476                                   | 1%                     |
| PASTAZA               | 3.106                                    | 0%                     | 13.281                                   | 0%                     |
| ZAMORA CHINCHIPE      | 17.175                                   | 1%                     | 92.655                                   | 3%                     |
| SUCUMBIOS             | -  | -                      | 24.246                                   | 1%                     |
| ORELLANA              | -  | -                      | 17.806                                   | 1%                     |
| GALAPAGOS             | -  | -                      | 4.939                                    | 0%                     |
| ZONAS NO ASIGNADAS *  | -  | -                      | 20.297                                   | 1%                     |
| <b>TOTAL NACIONAL</b> | <b>1`366.095</b>                         | <b>100%</b>            | <b>3`525.027</b>                         | <b>100%</b>            |

Fuente: MAG, INEC

\* Las Zonas no asignadas se refieren a aquellas zonas que se encuentran en conflicto limítrofe interprovincial, y que aun no han sido delimitadas, que corresponden a: Las Golondrinas, La Concordia, La Manga del Cura y El Piedrero.

**Tabla #2. Estadísticas de la comunidad andina (1990 - 2003)**  
**Producción de leche vacuna (en miles de toneladas métricas)**

| PAÍS             | 1996  | 1997  | 1998   | 1999  | 2000  | 2001  | 2002  | 2003   | PROMEDIO |
|------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| BOLIVIA          | 195   | 202   | 191    | 231   | 232   | 232   | 232   | 240    | 184      |
| COLOMBIA         | 5,332 | 5,492 | 5,712  | 5,734 | 5,629 | 5,742 | 5,750 | 6,050  | 5,178    |
| ECUADOR          | 1,730 | 1,714 | 1,680  | 1,646 | 1,287 | 1,343 | 1,378 | 1,530  | 1,599    |
| PERU             | 905   | 948   | 998    | 1,013 | 1,067 | 1,115 | 1,118 | 1,200  | 942      |
| VENEZUELA        | 1,405 | 1,431 | 1,485  | 1,352 | 1,415 | 1,400 | 1,400 | 1,450  | 1,457    |
| COMUNIDAD ANDINA | 9,567 | 9,787 | 10,066 | 9,977 | 9,630 | 9,832 | 9,878 | 10,470 | 9,360    |

Fuente: INEC.

**Tabla # 3. Costos estimados de producción de producción de un litro de leche (1999 – 2001)**

|                                   | 1999        | 2000        | 2001        | Contribución % promedio (**) |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|
| Rubros del costo                  | dólares     | dólares     | dólares     |                              |
| Insumos                           | 0,1325      | 0,08        | 0,103       | 57,43%                       |
| Semillas *                        | 0,0065      | 0,004       | 0,005       | 2,80%                        |
| Fertilizantes *                   | 0,0206      | 0,012       | 0,016       | 8,92%                        |
| Herbicidas *                      | 0,0028      | 0,002       | 0,002       | 1,23%                        |
| Alimentación ganado *             | 0,0569      | 0,035       | 0,044       | 24,69%                       |
| Inseminación artificial *         | 0,0039      | 0,002       | 0,003       | 1,69%                        |
| Sanidad animal *                  | 0,0183      | 0,011       | 0,014       | 7,92%                        |
| Combustibles *                    | 0,0067      | 0,004       | 0,005       | 2,89%                        |
| Lubricantes *                     | 0,0016      | 0,001       | 0,001       | 0,70%                        |
| Reparaciones y mantenimiento      | 0,0043      | 0,003       | 0,003       | 1,87%                        |
| Transporte de leche               | 0,0005      | 0           | 0           | 0,22%                        |
| Arriendo maquinaria               | 0,0001      | 0           | 0           | 0,04%                        |
| Veterinario                       | 0,0027      | 0,002       | 0,002       | 1,17%                        |
| Electricidad                      | 0,0052      | 0,003       | 0,004       | 2,24%                        |
| Teléfono y gastos administrativos | 0,0016      | 0,001       | 0,001       | 0,69%                        |
| Control lechero                   | 0,0005      | 0           | 0           | 0,20%                        |
| AGSO                              | 0,0001      | 0           | 0           | 0,03%                        |
| Otros servicios                   | 0,0003      | 0           | 0           | 0,12%                        |
| Mano de obra                      | 0,0371      | 0,022       | 0,029       | 16,07%                       |
| Depreciación de maquinaria        | 0,0158      | 0,01        | 0,012       | 6,86%                        |
| Depreciación de infraestructura   | 0,0117      | 0,007       | 0,009       | 5,09%                        |
| Impuestos                         | 0,0028      | 0,002       | 0,002       | 1,23%                        |
| Gastos financieros                | 0,0054      | 0,003       | 0,004       | 2,34%                        |
| Gerencia -administración          | 0,0253      | 0,015       | 0,02        | 10,98%                       |
| <b>COSTO TOTAL</b>                | <b>0,23</b> | <b>0,14</b> | <b>0,18</b> | <b>100,00%</b>               |

Fuente: AGSO, Productores

(\*) Rubro que tiene una relación directa con la cotización del US dólar.

El 30% de casos corresponden a ganaderos grandes, el 56% a medianos y el 14% a pequeños

(\*\*) Estos porcentajes corresponden a la contribución de cada rubro del costo al costo total a un litro de leche, y fueron utilizados para ponderar el valor correspondiente a cada rubro para el año 2000 y 2001 partiendo de costos totales reales.

Ganaderos grandes = número de vacas en producción > 100; Ganaderos medianos = número de vacas en producción > 20 y < 100

Ganaderos pequeños = número de vacas en producción < 20

**Tabla #4. Recuentos microbiológicos en diferentes muestras de leche procesada y semi procesada**

NMP de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso en el proceso de elaboración del queso tipo Gouda.

| Muestras         | Leche Cruda<br>(NMP/ml) |                   | Leche<br>Pasteurizada<br>(NMP/ml) |        | Cuajada<br>(NMP/g) |                    | Queso<br>Madurado<br>(NMP/g) |        |
|------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------|
|                  | CT                      | CF                | CT                                | CF     | CT                 | CF                 | CT                           | CF     |
|                  | 1                       | $4,6 \times 10^4$ | $2,4 \times 10^3$                 | <3     | <3                 | $>2,4 \times 10^3$ | 460                          | 9      |
| 2                | $1,1 \times 10^4$       | $1,1 \times 10^3$ | <3                                | <3     | $>2,4 \times 10^3$ | 460                | 14                           | 9      |
| 3                | $2,4 \times 10^4$       | $2,4 \times 10^3$ | <3                                | <3     | $>2,4 \times 10^3$ | 460                | 20                           | 9      |
| 4                | $2,4 \times 10^5$       | $2,4 \times 10^3$ | 23                                | <3     | $1,1 \times 10^3$  | $1,1 \times 10^3$  | 460                          | 39     |
| 5                | $2,4 \times 10^5$       | $2,4 \times 10^3$ | <3                                | <3     | 2400               | $1,1 \times 10^3$  | 460                          | 43     |
| $\log \bar{X}^*$ | 4,969a                  | 3,312a            | 0,654b                            | 0,477b | 3,312c             | 2,814c             | 1,745d                       | 1,147d |
| DE               | 0,443                   | 0,152             | 0,396                             | 0      | 0,152              | 0,207              | 0,847                        | 0,449  |

$\log \bar{X}$  es el logaritmo del valor promedio de NMP, DE es la desviación estándar

\*En la comparación por pares de  $\log \bar{X}$  de leche pasteurizada con leche cruda, cuajada con leche pasteurizada y queso con cuajada, letras diferentes en la fila indican diferencias significativas ( $P=0,05$ ) con respecto al valor de NMP de CT y CF de la etapa anterior. No se realizan comparaciones entre los valores de NMP de CT y CF dentro de una misma etapa.

Fuente: Dávila y col. (2006)

**Tabla #5. Evolución de los °Brix de la muestra para tratamiento osmótico en tratamiento convencional y tratamiento osmótico combinado con calentamiento óhmico**

| Tiempo [min.] | Tratamiento convencional<br>°Brix Frambuesa | Tratamiento óhmico<br>°Brix Frambuesa |
|---------------|---|---------------------------------------|
| 0             | 10  | 10                                    |
| 30            | -   | 29                                    |
| 60            | -   | 37                                    |
| 90            | 24  | 34                                    |
| 120           | -   | 50                                    |
| 130           | 28  | -                                     |
| 150           | -   | 47                                    |
| 180           | -   | 50                                    |
| 190           | 40  | -                                     |
| 230           | 44  | -                                     |
| 300           | 47  | -                                     |
| 420           | 52  | -                                     |

Fuente: Simpson y colaboradores (2007).

**Tabla # 6. Datos bibliográficos experimentales de tratamientos con campos de pulsos eléctricos**

| Alimento               | Población microbiana                     | Reducción                                | Tratamiento   | Fuente<br>año             |
|------------------------|--|--|---|---------------------------|
| Leche                  | E. coli                                  | 10 <sup>9</sup>                          | 20°C, 64 pulsos de 2 μs a 70[kV/cm]                         | Zhang – 1994              |
| Alimento sólido modelo | E. coli, S. aureus, S. cervisiae.        | 5-6 ciclos logarítmicos                  | 15°C, pulsos de 3 μs a 40[kV/cm]                            | Zhang – 1994              |
| Zum de naranja y leche | E. coli, S. cervisiae, L. brevis         | 4-5 ciclos logarítmicos                  | -   | Grahl - 1992              |
|                        | Cl. ryobutyricum                         | 0  | -   | Grahl – 1992              |
| Leche                  | E. coli                                  | 10 <sup>7</sup> - 10 <sup>3</sup> ufc/ml | 15°C, pulsos de 1.5 μs a 30[kV/cm]                          | Martín Belloso – 1996     |
| Leche                  | E. coli                                  | 10 <sup>7</sup> - 10 <sup>3</sup> ufc/ml | 43°C, 23 pulsos de 20[kV/cm]                                | Dunn y Pearlman 1987-1989 |
| Huevo liquido          | Microorganismo inoculado sin especificar | 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>5</sup> ufc/ml | 39°C (max), pulsos de caída esponencial de 4 μs a 37[kV/cm] | Martín Belloso 1996       |
| Crema de guisantes     | E. coli                                  | 10 <sup>7</sup> – 0 ufc/ml               | 30 pulsos de 2μs a 30[kV/cm]                                | Vega y Mercado - 1996     |
|                        | B. subtilis                              | 5 D                                      | 33 [kV/cm] a 4.3 Hz y 0.5 ml/min de velocidad de flujo      |                           |
| Zumo de manzana        | S. cervisiae                             | 10 <sup>6</sup> ufc/ml                   | Pulsos de 2.5 μs a 50 [kV/cm]                               | Harrison - 1996           |

Fuente: Raventos (2005).

**Tabla # 7. Datos bibliográficos de tratamientos y ciclos de descenso estudiados**

| Microorganism     | Log <sub>10</sub> reductions | Food              | Φ   | Cell shape | E  | n  | Type          | T  | Reference                        |
|-------------------|------------------------------|-------------------|-----|------------|----|----|---------------|----|----------------------------------|
| <i>E. coli</i>    | 4.0                          | SMUF <sup>a</sup> | 1.0 | Rod        | 16 | 50 | Gram negative | 30 | Pothakamury <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>S. aureus</i>  | 3.0                          | SMUF <sup>a</sup> | 0.9 | Spherical  | 16 | 50 | Gram negative | 30 | Pothakamury <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>E. coli</i>    | 3.5                          | SMUF <sup>a</sup> | 1.0 | Rod        | 60 | 10 | Gram negative | 40 | Qin <i>et al.</i> , 1998         |
| <i>S. aureus</i>  | 2.5                          | SMUF <sup>a</sup> | 0.9 | Spherical  | 36 | 10 | Gram positive | 40 | Qin <i>et al.</i> , 1998         |
| <i>E. coli</i>    | 3.4                          | Skim milk         | 1.0 | Rod        | 41 | 35 | Gram negative | 37 | Dutruex <i>et al.</i> , 2000     |
| <i>L. innocua</i> | 2.3                          | Skim milk         | 0.8 | Rod        | 41 | 35 | Gram positive | 37 | Dutruex <i>et al.</i> , 2000     |

E: electric field strength (kV/cm)

n: number of pulses

T: treatment temperature (°C)

<sup>a</sup> SMUF : simulate milk ultrafiltrated

Φ : cellular diameter (μm)

Fuente: Mosqueda (2007)

**Tabla # 8. Datos bibliográficos de características generales de microorganismos patógenos comunes en alimentos**

| Characteristics                  | <i>E. coli</i><br>O157:H7                | <i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i>  | <i>Salmonella</i><br>spp.                | <i>S. aureus</i>                         | <i>Bacillus</i><br><i>cereus</i>         | <i>C. jejuni</i>           | <i>Yersinia</i><br><i>enterocolitica</i> |
|----------------------------------|--|--|--|--|--|----------------------------|--|
| Shape                            | Rod                                      | Short rod                                | Rod                                      | Spherical                                | Rod                                      | Spiral rod                 | Rod                                      |
| Diameter (μm)                    | 0.9 to 1.5                               | 0.5 to 0.8                               | 1.0                                      | 0.5 to 1.0                               | 1.0 to 2.0                               | 0.2 to 0.9                 | 0.5 to 1.0                               |
| Length (μm)                      | 2.0 to 6.0                               | 1.0 to 2.0                               | 4.0                                      | -  | 3.0 to 5.0                               | 0.5 to 5.0                 | 1.0 to 2.0                               |
| Type                             | Gram-negative                            | Gram-positive                            | Gram-negative                            | Gram-positive                            | Gram-positive                            | Gram-negative              | Gram-negative                            |
| Temperature <sup>1</sup><br>(°C) | 7 to 46<br>37*                           | -1.5 to 45<br>37*                        | 2 to 50<br>37*                           | 7 to 48<br>37*                           | 4 to 55<br>35*                           | 30.5 to 45<br>42*          | 4 to 44<br>29*                           |
| Oxygen<br>conditions             | Aerobic or<br>facultatively<br>anaerobic | Aerobic or<br>facultatively<br>anaerobic | Aerobic or<br>facultatively<br>anaerobic | Aerobic or<br>facultatively<br>anaerobic | Aerobic or<br>facultatively<br>anaerobic | Facultatively<br>anaerobic | Aerobic or<br>facultatively<br>anaerobic |
| pH <sup>2</sup>                  | 4.0 to 9.0<br>7.0*                       | 4.3 to 9.6<br>7.0*                       | 3.6 to 9.6<br>7.0*                       | 4.2 to 9.5<br>7.0*                       | 4.3 to 9.3<br>7.0*                       | 4.9 to 9.0<br>7.0*         | 4 to 10<br>7.3*                          |
| Water activity <sup>3</sup>      | 0.95                                     | 0.92                                     | 0.93                                     | 0.86                                     | 0.912                                    | 0.987                      | 0.95                                     |
| Spore-forming                    | Not                                      | Not                                      | Not                                      | Not                                      | Yes                                      | Not                        | Not                                      |

<sup>1</sup> Growth temperature range

<sup>2</sup> Growth pH range

<sup>3</sup> Minimal water activity of growth

\* Optimum values of growth

Fuente: Mosqueda (2007)

Tabla # 9. Datos bibliográficos de inactivación de *E. coli* por campos eléctricos pulsados

***E. coli* Inactivation with PEF<sup>a</sup>**

| Source  | Suspension media  | Log reduction (max)                            | Treatment vessel <sup>b</sup>                  | Process conditions <sup>c</sup>                                    |
|---|---|--|--|--|
| Sale and Hamilton (1967)                              | 0.1% NaCl   | 2  | B  | 20°C, 1.95 V/ $\mu$ m, 20 $\mu$ sec, 10 pulses                     |
| Hülsheger and Niemann (1980)                          | 17.1 mM saline, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0 | 3-4  | B, 4 ml, d = 0.5 cm                            | < 30°C, 2.0 V/ $\mu$ m, 30 $\mu$ sec, 10 pulses, t = 300 $\mu$ sec |
| Hülsheger <i>et al.</i> (1983)                        | Phosphate buffer, pH 7.0  | three stationary cells, four logarithmic cells | B, 4 ml, d = 0.5 cm                            | 2.0 V/ $\mu$ m, 36 $\mu$ sec, 30 pulses, t = 1080 $\mu$ sec        |
| Dunn and Pearlman (1987)                              | Milk  | 3  | B  | 43°C, 3.3 V/ $\mu$ m, 35 pulses                                    |
| Matsumoto <i>et al.</i> (1991)                        | Phosphate buffer  | 5  | B  | 4.0 V/ $\mu$ m, 4-10 $\mu$ sec, exponential decay                  |
| Grahl <i>et al.</i> (1992);<br>Grahl and Märkl (1996) | Sodium alginate   | 4-5  | B, 25 ml, d = 0.5 cm                           | < 45-50°C, 2.5 V/ $\mu$ m, 5 pulses                                |
| Grahl <i>et al.</i> (1992);<br>Grahl and Märkl (1996) | UHT milk (1.5% fat)   | 1  | B, 25 ml, d = 0.5 cm                           | < 45-50°C, 2.24 V/ $\mu$ m, 5 pulses, 5.0 $\mu$ F                  |
| Grahl <i>et al.</i> (1992);<br>Grahl and Märkl (1996) | UHT milk (1.5% fat)   | 2  | B, 25 ml, d = 0.5 cm                           | < 45-50°C, 2.24 V/ $\mu$ m, 10 pulses, 5.0 $\mu$ F                 |
| Grahl <i>et al.</i> (1992);<br>Grahl and Märkl (1996) | UHT milk (1.5% fat)   | 3  | B, 25 ml, d = 0.5 cm                           | < 45-50°C, 2.24 V/ $\mu$ m, 15 pulses, 5.0 $\mu$ F                 |
| Grahl <i>et al.</i> (1992);<br>Grahl and Märkl (1996) | UHT milk (1.5% fat)   | 4  | B, 25 ml, d = 0.5 cm                           | < 45-50°C, 2.24 V/ $\mu$ m, 20 pulses, 5.0 $\mu$ F                 |
| Zhang <i>et al.</i> (1994b)                           | Potato dextrose agar  | 3  | B, 14 ml                                       | 15 $\pm$ 1°C, 4.0 V/ $\mu$ m, 3 $\mu$ sec, 16 pulses               |
| Zhang <i>et al.</i> (1994b)                           | Potato dextrose agar  | 6  | B, 14 ml                                       | 15 $\pm$ 1°C, 4.0 V/ $\mu$ m, 3 $\mu$ sec, 64 pulses               |
| Zhang <i>et al.</i> (1994b)                           | Skim milk   | 0.5  | B  | 15 $\pm$ 1°C, 4.0 V/ $\mu$ m, 3 $\mu$ sec, 16 pulses               |
| Zhang <i>et al.</i> (1994b)                           | Skim milk   | 3  | B  | 15 $\pm$ 1°C, 4.0 V/ $\mu$ m, 3 $\mu$ sec, 64 pulses               |
| Zhang <i>et al.</i> (1994c)                           | SMUF  | 3  | 604 J, B, parallel plate, 25.7 ml, d = 0.95 cm | < 25°C, 2.5 V/ $\mu$ m, 20 pulses                                  |

**Tabla # 9 (continuación). Datos bibliográficos de inactivación de *E. coli* por campos eléctricos pulsados**

|                                     |   |          |  |   |
|-------------------------------------|---|----------|--|---|
| Pothakamury <i>et al.</i> (1995b)   | SMUF                                    | 4        | B, parallel plate, 1 ml,<br>d = 0.1 cm                                 | < 30°C,<br>1.6 (1.2, 1.4, 1.6 tested) V/μm,<br>20–300 μsec,<br>60 (20, 30, 40, 50, 60) pulses |
| Qin <i>et al.</i> (1994)            | SMUF                                    | 1.5      | 80 J/pulse, B,<br>parallel plate                                       | < 30°C, 4.0 V/μm, 8 pulses,<br>oscillatory decay  |
| Qin <i>et al.</i> (1994)            | SMUF                                    | 3        | 80 J/pulse, B,<br>parallel plate                                       | < 30°C, 4.0 V/μm, 8 pulses,<br>oscillatory decay  |
| Qin <i>et al.</i> (1994)            | SMUF                                    | 3        | 60 J/pulse, B,<br>parallel plate                                       | < 30°C, 4.0 V/μm, 4 pulses,<br>monopolar  |
| Qin <i>et al.</i> (1994)            | SMUF                                    | 3        | 60 J/pulse, B,<br>parallel plate                                       | < 30°C, 4.0 V/μm, 4 pulses, bipolar   |
| Qin <i>et al.</i> (1995a)           | Skim milk                               | 2.5      | B, parallel plate, 14 ml   | < 30°C, 5.0 V/μm, 2 μsec,<br>62 pulses, square wave   |
| Qin <i>et al.</i> (1995a)           | Skim milk                               | 3.5      | C, parallel plate  | < 30°C, 5.0 V/μm, 2 μsec,<br>48 pulses, square wave   |
| Qin <i>et al.</i> (1995a)           | SMUF                                    | 3.6      | C, parallel plate 8 cm <sup>3</sup> ,<br>d = 0.51 cm                   | < 30°C, 5.0 V/μm, 2 μsec,<br>48 pulses, square wave   |
| Qin <i>et al.</i> (1995a)           | SMUF                                    | 7        | C, coaxial, 29 ml,<br>d = 0.6 cm, 0.2 μF, 1 Hz                         | < 30°C, 2.5 V/μm,<br>± 300 pulses, exponential decay  |
| Martín-Belloso <i>et al.</i> (1994) | Skim milk diluted<br>with water (1:2:3) | Nearly 3 | B, Parallel plate, 13.8 ml, 0.51 cm                                    |   |
| Martín-Belloso <i>et al.</i> (1994) | Skim milk                               | 2        | C, parallel plate with flow-through<br>capability, 45 ml/sec, v = 8 ml |   |
| Martín-Belloso <i>et al.</i> (1994) | Liquid egg                              | 6        | C, coaxial, 11.9 ml, d = 0.6 cm,<br>0.5 l/min                          |   |
| Vega-Mercado <i>et al.</i> (1996a)  | Pea soup                                | 6.5      | C, coaxial, 0.5 l/min  |   |
| Zhang <i>et al.</i> (1995)          | Modified SMUF                           | 9        | B, parallel plate, 14 ml, d = 0.51 cm                                  |   |
| Pothakamury <i>et al.</i> (1996)    | SMUF                                    | 3        | B, parallel plate, 12.5 ml, d = 0.5 cm                                 |   |
| Pothakamury <i>et al.</i> (1996)    | SMUF                                    | 5        | C, parallel plate  |   |

<sup>a</sup> Reprinted from Wouters and Smelt (1997), pp. 193–229 by courtesy of Marcel Dekker, Inc.

<sup>b</sup> B, batch; C, continuous.

<sup>c</sup> Temperature, peak electric field, pulse width, number of pulses and shape, and total treatment time (t).

**Tabla # 10. Viscosidad (centipoises) de leche y otros productos a diferentes temperaturas**

| Temperatura | Leche completa | Leche desnatada | Solución de lactosa al 5% | Agua  |
|-------------|----------------|-----------------|---------------------------|-------|
| 5           | 3,2            | 3,9             | 1,8                       | 1,53  |
| 10          | 2,8            | 2,5             | 1,5                       | 1,30  |
| 20          | 2,2            | 1,9             | 1,2                       | 1,006 |
| 30          | 1,65           | 1,35            | 0,9                       | 0,80  |
| 50          | —              | 0,6             | 0,4                       | 0,55  |

Fuente: Alais Ch.(1985)

**Tabla # 11. Resistividad y conductividad eléctrica en varios alimentos y fluidos**

| Foods/fluids                             | Electric resistivity ( $\Omega.m$ ) | Conductivity ( $S/m^{-1}$ ) | Testing temperature ( $^{\circ}C$ ) |
|--|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Apple juice <sup>c</sup>                 | 5.7                                 | 0.175                       | 15                                  |
| Distilled water (100%, w/w) <sup>a</sup> | 9,090.90                            | 0.00011                     | —                                   |
| Egg white <sup>c</sup>                   | 1.55                                | 0.645                       | 15                                  |
| Fluid egg product <sup>b</sup>           | 1.7                                 | 0.588                       | 21                                  |
| Milk (raw) <sup>c</sup>                  | 2.2                                 | 0.455                       | 25                                  |
| Milk (raw) <sup>c</sup>                  | 2.3                                 | 0.435                       | 20                                  |
| Milk (raw) <sup>c</sup>                  | 2.6                                 | 0.385                       | 15                                  |
| Milk (skim) <sup>c</sup>                 | 3.1                                 | 0.323                       | 15                                  |
| Orange juice <sup>b</sup>                | 2.34                                | 0.427                       | 42                                  |
| Orange juice concentrate <sup>c</sup>    | 3.0                                 | 0.333                       | 15                                  |
| Pea soup <sup>c</sup>                    | 3.8                                 | 0.263                       | 15                                  |
| Peptone (0.1%, w/w) <sup>a</sup>         | 16.67                               | 0.065                       | —                                   |
| Potato dextrose agar <sup>c</sup>        | 7.9                                 | 0.127                       | 15                                  |
| Sodium chloride (0.1%, w/w) <sup>a</sup> | 4.17                                | 0.24                        | —                                   |
| Sodium chloride (0.2%, w/w) <sup>a</sup> | 2.38                                | 0.42                        | —                                   |
| Sodium chloride (0.3%, w/w) <sup>a</sup> | 1.64                                | 0.615                       | —                                   |
| Sodium chloride (0.4%, w/w) <sup>a</sup> | 1.23                                | 0.81                        | —                                   |
| Sodium chloride (0.5%, w/w) <sup>a</sup> | 0.98                                | 1.02                        | —                                   |
| Sucrose (10%, w/w) <sup>a</sup>          | 555.56                              | 0.0018                      | —                                   |
| Sucrose (15%, w/w) <sup>a</sup>          | 540.54                              | 0.00185                     | —                                   |
| Sucrose (20%, w/w) <sup>a</sup>          | 588.23                              | 0.0017                      | —                                   |
| Sucrose (25%, w/w) <sup>a</sup>          | 588.23                              | 0.0017                      | —                                   |
| Sucrose (30%, w/w) <sup>a</sup>          | 606.06                              | 0.00165                     | —                                   |
| Sucrose (35%, w/w) <sup>a</sup>          | 606.06                              | 0.00165                     | —                                   |
| Tomato ketchup <sup>c</sup>              | 0.42                                | 2.38                        | 15                                  |
| Yogurt <sup>b</sup>                      | 1.69                                | 0.592                       | 23                                  |
| Xanthan gum (0.2%, w/w) <sup>a</sup>     | 45.45                               | 0.022                       | —                                   |
| Xanthan gum (0.4%, w/w) <sup>a</sup>     | 25.0                                | 0.04                        | —                                   |
| Xanthan gum (0.6%, w/w) <sup>a</sup>     | 20.0                                | 0.05                        | —                                   |
| Xanthan gum (0.8%, w/w) <sup>a</sup>     | 14.29                               | 0.07                        | —                                   |
| Xanthan gum (1.0%, w/w) <sup>a</sup>     | 11.11                               | 0.09                        | —                                   |

Fuente: Ho<sup>a</sup> y col.1995, Dunn y Pearlman<sup>b</sup> 1987, Zhang<sup>c</sup> 1994, citados por Barbosa (1999).



**Tabla # 12. Norma NTE INEN 702**  
**“Leche descremada y semidescremada, pasteurizada”**

| Microorganismos       | Contenido máximo.                  |
|-----------------------|------------------------------------|
| Bacterias activas.    | < 30 000 bacterias/cm <sup>3</sup> |
| Bacterias coliformes. | 5 coliformes / cm <sup>3</sup>     |
| Bacterias patógenas.  | 0 bacterias / cm <sup>3</sup>      |
| Bacterias colifecales | 0 bacterias / cm <sup>3</sup>      |

Fuente: Norma NTE INEN 702.

**Tabla # 13. Norma NTE INEN 004**  
**“Muestreo”**

| Tamaño del lote | Unidad de muestreo |
|-----------------|--------------------|
| 1               | 1                  |
| 2 – 5           | 2                  |
| 6 – 60          | 3                  |
| 61 – 80         | 4                  |
| 81 - 100        | 5                  |
| + de 100        | *                  |

Fuente: Norma NTE INEN 702.

\* Dependiendo de las necesidades de tomar muestras el número puede variar.

**Tabla # 14. Norma NTE INEN 10:2009 4<sup>ta</sup> revisión**  
**“Leche pasteurizada, requisitos. 1<sup>ra</sup> edición”**

| Requisito   | Límite máximo          | Método de ensayo |
|---|------------------------|------------------|
| REP ufc/cm <sup>3</sup> ( recuento total de microorganismos aerobios mesófilos) | 3.0*10 <sup>4</sup>    | INEN 1529 - 5    |
| Coliformes totales NMP/cm <sup>3</sup>  | 3.6*10 <sup>0</sup>    | INEN 1529 - 6    |
| Coliformes totales REP ufc/cm <sup>3</sup>                                      | 5.0*10 <sup>0</sup>    | INEN 1529 – 7    |
| Coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> NMP/cm <sup>3</sup>                | <3.0*10 <sup>0</sup> * | INEN 1529 – 8    |

Fuente: Norma NTE INEN 10.

\* no existirá ningún tubo positivo en la técnica de NMP con tres tubos de ensayo.

**Tabla # 15. Norma NTE INEN 10:2009 4<sup>ta</sup> revisión  
“Requisitos microbiológicos de leche pasteurizada para lotes o partidas”**

| Requisitos  | N | c | m                   | M                   | Método de ensayo |
|---|---|---|---------------------|---------------------|------------------|
| REP ufc/cm <sup>3</sup> recuento total de microorganismos aerobios, mesófilos | 5 | 2 | 3*10 <sup>4</sup>   | 1*10 <sup>5</sup>   | 1529-5           |
| Coliformes totales NMP/cm <sup>3</sup>  | 5 | 1 | 3.6*10 <sup>0</sup> | 2.3*10 <sup>1</sup> | 1529-6           |
| Coliformes totales REP ufc/cm <sup>3</sup>                                    | 5 | 1 | 5*10 <sup>0</sup>   | 5*10 <sup>1</sup>   | 1529-7           |
| <i>E. coli</i> NMP/ cm <sup>3</sup> (coliformes fecales)                      | 5 | 0 | < 3*10 <sup>0</sup> | -                   | 1529-8           |

Fuente: Norma NTE INEN 10.

N = # de muestras del lote que deben analizarse.

c = número de muestras de defectuosas aceptables, en el rango de m y M.

m = límite de aceptación.

M= límite de rechazo.

**Tabla # 16. Recuento de microorganismos en caja petrifil**

| Detección de microorganismos  | Método AOAC*                              |
|---|---|
| Conteo de microorganismos aerobios, mesófilos, <i>E. coli</i> , coliformes totales y fecales. | AOAC 986.33<br>AOAC 989.10<br>AOAC 991.14 |

Fuente: AOAC 986.33, AOAC 989.10, AOAC 991,14

\* Para el conteo de las colonias se utilizarán cajas de petrifil de la marca 3M, las mismas constan en su pagina web los instructivos necesarios para identificar y cuantificar las colonias que se deseen estudiar.

**Tabla # 17. Contenido de ufc/ml en productos lácteos**

| Producto                     | ufc/ml o ufc/gr |
|------------------------------|-----------------|
| Leche cruda de vaca.         | Hasta 1'000.000 |
| Leche de oveja y cabra cruda | 1'500.000       |
| Leche pasteurizada           | 30.000          |
| Leche UHT                    | 1               |
| Helado                       | 50.000          |

Fuente: 3M Petrifil, (2008)

**Tabla # 18. Acidez titulable como ácido láctico en muestras de leche cruda entera, según método de Norma INEN 13**

| N° ensayo | M              | W (gr)   | ml Na(OH) 0,1N | Acidez % | Acidez % (promedio) | °D    |
|-----------|----------------|----------|----------------|----------|---------------------|-------|
| 1.1       | M              | 87.3798  | 5.3            | 0.234    | 0.23                | 23.33 |
|           | M <sub>1</sub> | 107.4746 |                |          |                     |       |
| 1.2       | M              | 119.7014 | 5.1            | 0.229    |                     |       |
|           | M <sub>1</sub> | 139.7114 |                |          |                     |       |
| 2.1       | M              | 87.327   | 5.3            | 0.236    |                     |       |
|           | M <sub>1</sub> | 107.5001 |                |          |                     |       |
| 2.2       | M              | 119.4171 | 5.2            | 0.230    |                     |       |
|           | M <sub>1</sub> | 139.7016 |                |          |                     |       |
| 3.1       | M              | 87.3462  | 5.2            | 0.237    | 0.24                | 24.03 |
|           | M <sub>1</sub> | 107.0328 |                |          |                     |       |
| 3.2       | M              | 119.7102 | 5.4            | 0.242    |                     |       |
|           | M <sub>1</sub> | 139.7204 |                |          |                     |       |
|           |                |          |                | Promedio | 0.23                | 23.6  |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 19. Densidad a 20°C\***

| Ensayo   | T°C leche cruda entera | d (kg/m <sup>3</sup> ) | % materia grasa |
|----------|------------------------|------------------------|-----------------|
| 1        | 19.8                   | 1030,01                | 3.7             |
| 2        | 20.0                   | 1030                   | 3.7             |
| 3        | 19.9                   | 1030                   | 3.6             |
| Promedio |                        | 1030                   | 3.7             |

\*: Equipo "Ecomilk, milk analyzer, milkana kam98 - 2A", planta de procesamiento de productos lácteos "San Pablo" Pillaro-Tunhuragua.

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 20. Campos eléctricos aplicados**

| Voltaje (kV) | Campo eléctrico aplicado<br>E <sub>p</sub> =(kV/cm) |
|--------------|---|
| 8            | 26.7  |
| 10           | 33.3  |
| 12           | 40.0  |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 21. Datos experimentales obtenidos, con una dilución  $10^{-3}$  (ufc/ml; coliformes totales)**

| Tratamiento                       | T  | 1R | 2R | Promedio | ufc/ml (N)          |
|-----------------------------------|----|----|----|----------|---------------------|
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>0</sub></b> | 57 | 58 | 61 | 58,7±1   | 5,9*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>1</sub></b> | 31 | 36 | 34 | 33,7±1   | 3,4*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>2</sub></b> | 15 | 24 | 21 | 20.0±1   | 2.0*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>0</sub></b> | 43 | 47 | 48 | 46.0±1   | 4,6*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>1</sub></b> | 25 | 31 | 32 | 29,3±1   | 2,9*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>2</sub></b> | 16 | 18 | 16 | 16,7±1   | 1,7*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>0</sub></b> | 26 | 28 | 23 | 25,7±1   | 2,6*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>1</sub></b> | 17 | 20 | 16 | 17,7±1   | 1,8*10 <sup>4</sup> |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>2</sub></b> | 15 | 18 | 10 | 14,3±1   | 1,4*10 <sup>4</sup> |

$N_0=5*10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 22. Datos experimentales para gráficos de la relación  $\ln s$  vs  $E_p$ [kV/cm], constante:  $t=0.25$ [s]**

| Tratamiento                       | $N_0$ (ufc/ml) (coliformes totales) | N (ufc/ml) (coliformes totales) | $s = (N/N_0)$ | $\ln s$  | $E_p$ [kV/cm] |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------|----------|---------------|
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>0</sub></b> | $5*10^6$                            | 5,9*10 <sup>4</sup>             | 0,0117        | -4,44532 | 26,67         |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>0</sub></b> |                                     | 4,6*10 <sup>4</sup>             | 0,0092        | -4,68855 | 33,33         |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>0</sub></b> |                                     | 2,6*10 <sup>4</sup>             | 0,0051        | -5,27200 | 40            |

$N_0=5*10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 23. Datos experimentales para gráficos de la relación  $E_p$ [kV/cm] vs  $\ln s$ , constante:  $t=0.4$ [s]**

| Tratamiento                       | $N_0$ (ufc/ml) (coliformes totales) | N (ufc/ml) (coliformes totales) | $s = (N/N_0)$ | $\ln s$  | $E_p$ [kV/cm] |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------|----------|---------------|
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>1</sub></b> | $5*10^6$                            | 3,4*10 <sup>4</sup>             | 0,0067        | -5,00068 | 26,67         |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>1</sub></b> |                                     | 2,9*10 <sup>4</sup>             | 0,0058        | -5,13846 | 33,33         |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>1</sub></b> |                                     | 1,8*10 <sup>4</sup>             | 0,0035        | -5,64551 | 40            |

$N_0=5*10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 24. Datos experimentales para gráficos de la relación  $E_p$ [kV/cm] vs  $\ln s$ , constante:  $t=0.5$ [s]**

| Tratamiento | $N_0$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $N$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $s = (N/N_0)$ | $\ln s$  | $E_p$ [kV/cm] |
|-------------|--|--------------------------------------|---------------|----------|---------------|
| $a_0b_2$    | $5 \cdot 10^6$                         | $2.0 \cdot 10^4$                     | 0,0040        | -5,52146 | 26,67         |
| $a_1b_2$    |  | $1,7 \cdot 10^4$                     | 0,0033        | -5,70378 | 33,33         |
| $a_2b_2$    |  | $1,4 \cdot 10^4$                     | 0,0028        | -5,85460 | 40            |

$N_0=5 \cdot 10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #25. Ecuaciones de regresión lineal de los gráficos # 3, 4, 5**

| Gráfico # | n (constante) | Ecuaciones de regresión lineal | $m_E^*$ | $R^2$ |
|-----------|---------------|--------------------------------|---------|-------|
| 3         | 250           | $y = -0,062x - 2,735$          | -0,062  | 0,946 |
| 4         | 400           | $y = -0,048x - 3,649$          | -0,048  | 0,901 |
| 5         | 500           | $y = -0,025x - 4,860$          | -0,025  | 0,997 |

$m_E^*$  = coeficiente de regresión.  
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 26. Datos experimentales para gráficos de la relación  $\ln t$ [s] vs  $\ln s$ , constante:  $E_p=26,33$ [kV/cm]**

| Tratamiento | $N_0$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $N$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $s = (N/N_0)$ | $\ln s$  | $t$ [s] | $\ln t$ [s] |
|-------------|--|--------------------------------------|---------------|----------|---------|-------------|
| $a_0b_0$    | $5 \cdot 10^6$                         | $5,9 \cdot 10^4$                     | 0,0117        | -4,44532 | 0,25    | -1,38629    |
| $a_0b_1$    |  | $3,4 \cdot 10^4$                     | 0,0067        | -5,00068 | 0,4     | -0,91629    |
| $a_0b_2$    |  | $2.0 \cdot 10^4$                     | 0,0040        | -5,52146 | 0,5     | -0,69314    |

$N_0=5 \cdot 10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 27. Datos experimentales para gráficos de de la relación  $\ln t$ [s] vs  $\ln s$ , constante:  $E_p=33,33$ [kV/cm]**

| Tratamiento | $N_0$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $N$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $s = (N/N_0)$ | $\ln s$     | $t$ [s] | $\ln t$ [s] |
|-------------|--|--------------------------------------|---------------|-------------|---------|-------------|
| $a_1b_0$    | $5 \cdot 10^6$                         | $4,6 \cdot 10^4$                     | 0,0092        | -4,68855179 | 0,25    | -1,38629    |
| $a_1b_1$    |  | $2,9 \cdot 10^4$                     | 0,00586667    | -5,13846867 | 0,4     | -0,91629    |
| $a_1b_2$    |  | $1,7 \cdot 10^4$                     | 0,00333333    | -5,70378247 | 0,5     | -0,69314    |

$N_0=5 \cdot 10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 28. Datos experimentales para gráficos de de la relación  $\ln t[s]$  vs  $\ln s$ , constante:  $E_p=40[kV/cm]$**

| Tratamiento | $N_0$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $N$ (ufc/ml)<br>(coliformes totales) | $s = (N/N_0)$ | $\ln s$  | $t[s]$ | $\ln t[s]$ |
|-------------|--|--------------------------------------|---------------|----------|--------|------------|
| $a_2b_0$    | $5 \cdot 10^6$                         | $2,6 \cdot 10^4$                     | 0,00051333    | -7,57458 | 0,25   | -1,38629   |
| $a_2b_1$    |  | $1,8 \cdot 10^4$                     | 0,00035333    | -7,94809 | 0,4    | -0,91629   |
| $a_2b_2$    |  | $1,4 \cdot 10^4$                     | 0,00028667    | -8,15719 | 0,5    | -0,69314   |

$N_0=5 \cdot 10^6$   
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #29. Ecuaciones de regresión lineal de los gráficos #9, 10, 11**

| Gráfico # | $E_p$ ([kV/cm]) constante | Ecuaciones de regresión lineal | $m_t$  | $R^2$ |
|-----------|---------------------------|--------------------------------|--------|-------|
| 9         | 26,67                     | $y=-1,495x-6,482$              | -1,495 | 0,966 |
| 10        | 33,33                     | $y=-1,386x-6,561$              | -1,386 | 0,929 |
| 11        | 40                        | $y=-0,833x-8,725$              | -0,833 | 0,998 |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #30. Factores de modelo estadístico**

| Factor A: $E_p$ ([kV/cm]) |       | Factor B: $t(\mu s)$ |        |
|---------------------------|-------|----------------------|--------|
| Nivel $a_0$               | 26,67 | Nivel $b_0$          | 250000 |
| Nivel $a_1$               | 33,33 | Nivel $b_1$          | 400000 |
| Nivel $a_2$               | 40    | Nivel $b_2$          | 500000 |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #31. ij**

| TRAT.            | T*    | R1*   | R2*   | Suma ij | ij <sup>2</sup> |
|------------------|-------|-------|-------|---------|-----------------|
| $a_0b_0$         | 57    | 58    | 61    | 176     | 30976           |
| $a_0b_1$         | 31    | 36    | 34    | 101     | 10201           |
| $a_0b_2$         | 15    | 24    | 21    | 60      | 3600            |
| $a_1b_0$         | 43    | 47    | 48    | 138     | 19044           |
| $a_1b_1$         | 25    | 31    | 32    | 88      | 7744            |
| $a_1b_2$         | 16    | 18    | 16    | 50      | 2500            |
| $a_2b_0$         | 26    | 28    | 23    | 77      | 5929            |
| $a_2b_1$         | 17    | 20    | 16    | 53      | 2809            |
| $a_2b_2$         | 15    | 18    | 10    | 43      | 1849            |
| suma ..k         | 245   | 280   | 261   |         |                 |
| ..k <sup>2</sup> | 60025 | 78400 | 68121 | Y..=786 |                 |

\* Conteo de ufc/ml estimado

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #32. Matriz**

|               | <b>b0</b> | <b>b1</b> | <b>b2</b> | <b>Yij</b> | <b>Yij^2</b> |
|---------------|-----------|-----------|-----------|------------|--------------|
| <b>a0</b>     | 176       | 101       | 60        | 337        | 113569       |
| <b>a1</b>     | 138       | 88        | 50        | 276        | 76176        |
| <b>a2</b>     | 77        | 53        | 43        | 173        | 29929        |
| <b>Y.j.</b>   | 391       | 242       | 153       | 786        | 617796       |
| <b>y.j.^2</b> | 152881    | 58564     | 23409     |            |              |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 33. ANOVA**

| <b>FV</b>    | <b>SC</b> | <b>GL</b> | <b>SCM</b> | <b>F calculado</b> | <b>F Tabla</b> |
|--------------|-----------|-----------|------------|--------------------|----------------|
| <b>CTr</b>   | 5336      | 26        | 205,23077  | 39,11457           | 2,1335021      |
| <b>CA</b>    | 1526,8889 | 2         | 763,44444  | 145,50353          | 3,5545571      |
| <b>CB</b>    | 3213,5556 | 2         | 1606,7778  | 306,23294          | 3,5545571      |
| <b>C(AB)</b> | 595,55556 | 4         | 148,88889  | 28,376471          | 2,9277442      |
| <b>CE</b>    | 162.6666  | 18        | 9.0370444  | -                  | -              |
| <b>CT</b>    | 5498,6667 | -         | -          | -                  | -              |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla # 34. Comparación de Tukey**

|          |      |
|----------|------|
| <b>q</b> | 4,96 |
| <b>n</b> | 9    |
| <b>r</b> | 3    |

|                                   | <b>a<sub>2</sub>b<sub>2</sub></b> | <b>a<sub>1</sub>b<sub>2</sub></b> | <b>a<sub>2</sub>b<sub>1</sub></b> | <b>a<sub>0</sub>b<sub>2</sub></b> | <b>a<sub>2</sub>b<sub>0</sub></b> | <b>a<sub>1</sub>b<sub>1</sub></b> | <b>a<sub>0</sub>b<sub>1</sub></b> | <b>a<sub>1</sub>b<sub>0</sub></b> | <b>a<sub>0</sub>b<sub>0</sub></b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                                   | 14,33                             | 16,67                             | 17,67                             | 20,00                             | 25,67                             | 29,33                             | 33,67                             | 46,00                             | 58,67                             |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>2</sub></b> | 14,33                             | 0,00                              | 2,33                              | 3,33                              | 5,67                              | 11,33                             | 15,00                             | 19,33                             | 31,67                             |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>2</sub></b> | 16,67                             | 0,00                              | 1,00                              | 3,33                              | 9,00                              | 12,67                             | 17,00                             | 29,33                             | 42,00                             |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>1</sub></b> | 17,67                             |                                   | 0,00                              | 2,33                              | 8,00                              | 11,67                             | 16,00                             | 28,33                             | 41,00                             |
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>2</sub></b> | 20,00                             |                                   |                                   | 0,00                              | 5,67                              | 9,33                              | 13,67                             | 26,00                             | 38,67                             |
| <b>a<sub>2</sub>b<sub>0</sub></b> | 25,67                             |                                   |                                   |                                   | 0,00                              | 3,67                              | 8,00                              | 20,33                             | 33,00                             |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>1</sub></b> | 29,33                             |                                   |                                   |                                   |                                   | 0,00                              | 4,33                              | 16,67                             | 29,33                             |
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>1</sub></b> | 33,67                             |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   | 0,00                              | 12,33                             | 25,00                             |
| <b>a<sub>1</sub>b<sub>0</sub></b> | 46,00                             |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   | 0,00                              | 12,67                             |
| <b>a<sub>0</sub>b<sub>0</sub></b> | 58,67                             |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   | 0,00                              |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #35. Datos experimentales  $a_2b_2$  (  $E=12\text{kV}$ ;  $E_p= 40[\text{kV}/\text{cm}]$ ;  $n=500$ ;  $t=0.5\text{s}$ ), evaluado a diferentes temperaturas, (coliformes totales)**

| T [°C] | T/ufc*10 <sup>3</sup> | R1/ufc*10 <sup>3</sup> | R2/ufc*10 <sup>3</sup> | Promedio | ufc/ml              |
|--------|-----------------------|------------------------|------------------------|----------|---------------------|
| 2      | 3*                    | 2*                     | 3*                     | 3*±1     | 3.0*10 <sup>2</sup> |
| 8      | 4                     | 6                      | 6                      | 6±1      | 6.0*10 <sup>3</sup> |
| 15     | 8                     | 9                      | 8                      | 8±1      | 8.0*10 <sup>3</sup> |
| 20     | 13                    | 14                     | 14                     | 14±1     | 1.4*10 <sup>4</sup> |
| 35     | 60                    | 65                     | 63                     | 63±1     | 6.3*10 <sup>4</sup> |
| 45     | 32                    | 33                     | 33                     | 33±1     | 3.3*10 <sup>4</sup> |
| 65     | 20                    | 18                     | 17                     | 18±1     | 1.8*10 <sup>4</sup> |

\*Dilución 10<sup>-2</sup>  
Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #36. Resultados de la valuación sensorial (1° ensayo)**

| Parámetro | Igual a R <sub>1</sub> | Diferente a R <sub>1</sub> |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| 521       | 15                     | -                          |
| 238       | -                      | 5                          |
| Total     | 20                     |                            |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #37. Resultados de la valuación sensorial (2° ensayo)**

| Parámetro | Igual a R <sub>2</sub> | Diferente a R <sub>2</sub> |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| 521       | 17                     | -                          |
| 238       | -                      | 3                          |
| R         | 20                     |                            |

Elaborado por: Diego Carrillo

521= Leche cruda entera tratada con pulsos eléctricos.

238= Leche UHT.

R<sub>1</sub> = Leche cruda entera

R<sub>2</sub> = Leche pasteurizada (65°C; 30min).

Total: 40 catadores.

Todas las muestras se fueron presentadas a temperatura de refrigeración ( ±5°C )

**Tabla #38: Tabla de significancia para la prueba de una cola**

| Número de juicios                        | Nivel de probabilidad |     |       |
|--|-----------------------|-----|-------|
|  | 5 %                   | 1 % | 0.1 % |
| 1° ensayo : 20 (15 respuestas correctas) | 15                    | 16  | 18    |
| 2° ensayo : 20 (17 respuestas correctas) | 15                    | 16  | 18    |

Elaborado por: Diego Carrillo



**Tabla 39. Costos de producción y tiempo empleado al utilizar el equipo prototipo generador de pulsos eléctricos de alto voltaje**

| V           | Costo promedio de kW/h, (centavos de dólar) | t     |
|-------------|---|-------|
| 6,08ml      | $7,4 \cdot 10^{-5}$                         | 0,5s  |
| 1 litro     | 0,01  | 82,2s |
| 10 litros   | 1,13  | 2,3h  |
| 1000 litros | 112,85                                      | 22,4h |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #40: Encuesta de catación para la prueba Duo-Trío.**

| Evaluación sensorial de “leche cruda entera tratada con pulsos eléctricos de alto voltaje”.              |                        |               |                              |
|--|------------------------|---------------|------------------------------|
| Fecha: .....   |                        | Nombre: ..... |                              |
| Producto: leche  |                        |               |                              |
| Tarea: DETERMINE CUAL DE LAS DOS MUESTRAS ES IGUAL AL PATRÓN (R)<br>MARQUE CON UNA “X” LAS MUESTRA IGUAL |                        |               |                              |
| RESPUESTA  | CÓDIGO DE LAS MUESTRAS |               | Comentarios: .....           |
|  | 521                    | 238           |                              |
| IGUAL AL PATRÓN  |                        |               | Gracias por su colaboración. |

Elaborado por: Diego Carrillo

**Tabla #41: Lista de catadores.****Ensayo N°1**

| #  | Nombre              | Muestras |      |
|----|---------------------|----------|------|
|    |                     | 521*     | 238* |
| 1  | Gabriela Cali       | x        |      |
| 2  | Gabriela Quispilema | x        |      |
| 3  | Abigail Poveda      | x        |      |
| 4  | Mayra Vera          | x        |      |
| 5  | Sonia Agurto        | x        |      |
| 6  | Lara Jácome         | x        |      |
| 7  | Edgar Pasquel       | x        |      |
| 8  | Vinicio Solis       | x        |      |
| 9  | Santiago Montachana | x        |      |
| 10 | Vinicio Romero      | x        |      |
| 11 | Washington Ramirez  | x        |      |
| 12 | Andrés Alvarez      | x        |      |
| 13 | Bolívar Nuñez       | x        |      |
| 14 | Gabriela Bassante   | x        |      |
| 15 | Johanna Fiallos     | x        |      |
| 16 | Belén Aguilar       |          | x    |
| 17 | Estefanía García    |          | x    |
| 18 | Emilia Sánchez      |          | x    |
| 19 | María Calderón      |          | x    |
| 20 | Rodrigo Valle       |          | x    |

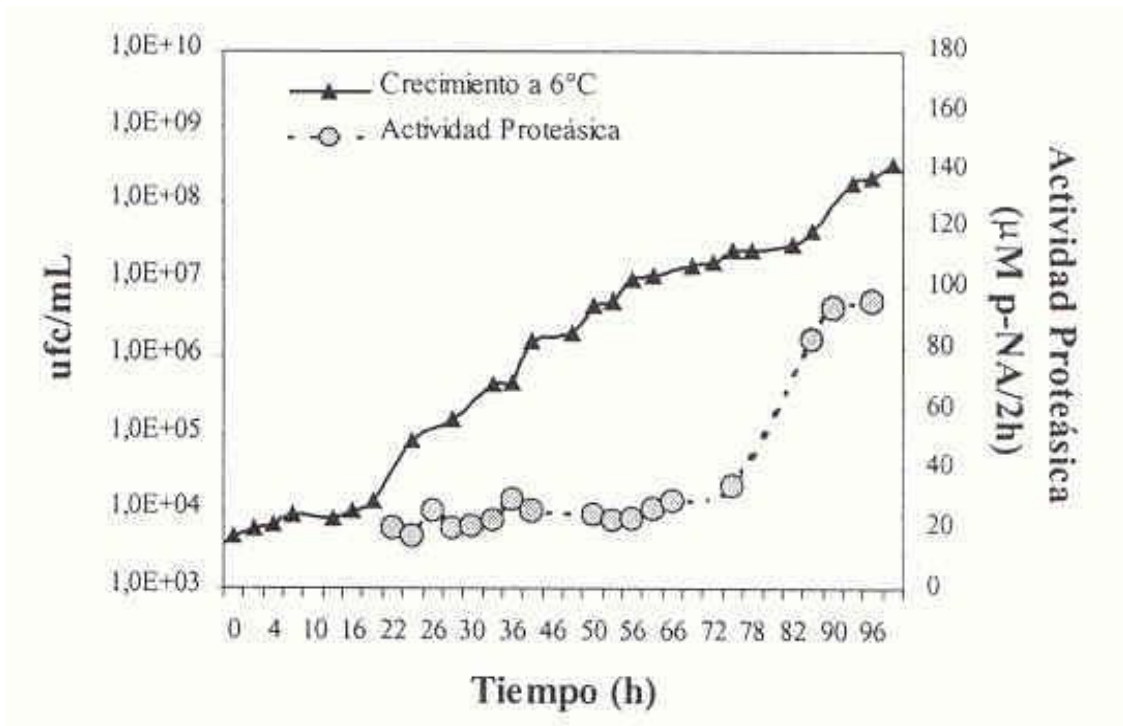
**Ensayo N°2**

| #  | Nombre              | Muestras |      |
|----|---------------------|----------|------|
|    |                     | 521*     | 238* |
| 1  | Susana Moreira      | x        |      |
| 2  | María Correa        | x        |      |
| 3  | Gabriela Yáñez      | x        |      |
| 4  | Carolina Marín      | x        |      |
| 5  | Paola Pérez         | x        |      |
| 6  | Viviana Montesdeoca | x        |      |
| 7  | Andrés Lozada       | x        |      |
| 8  | Gabriela Bassante   | x        |      |
| 9  | Cristina Acosta     | x        |      |
| 10 | Daysi Minchala      | x        |      |
| 11 | Estefanía Moya      | x        |      |
| 12 | Jessica Chamorro    | x        |      |
| 13 | Santiago Alcocer    | x        |      |
| 14 | Lizeth Villalba     | x        |      |
| 15 | Érica Cortéz        | x        |      |
| 16 | Marcelo Calvache    | x        |      |
| 17 | Gisella Pallango    | x        |      |
| 18 | Pamela Males        |          | x    |
| 19 | Yessenia Velasco    |          | x    |
| 20 | Doris Bautista      |          | x    |

Elaborado por: Diego Carrillo

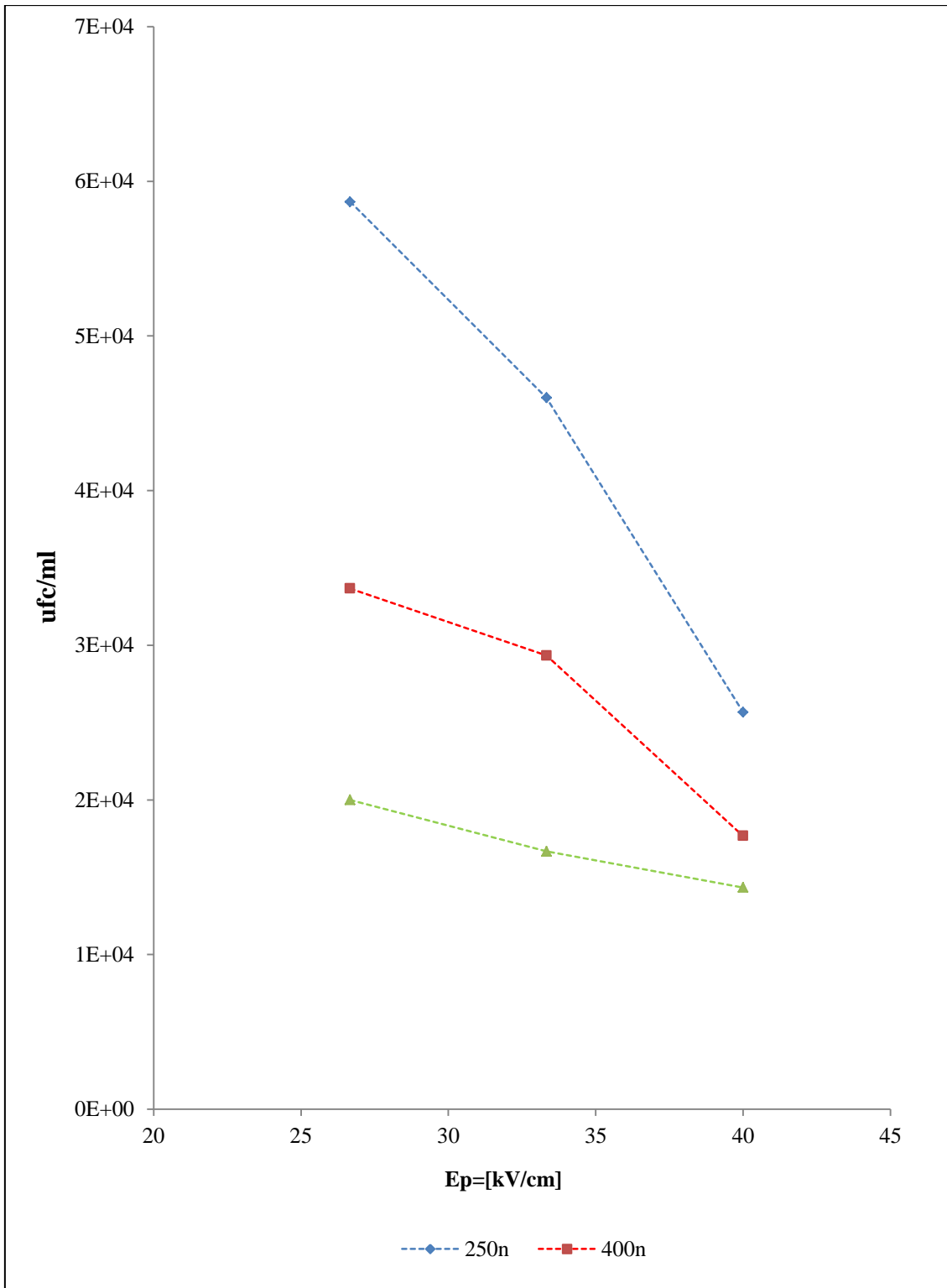
# **ANEXO B**

## **(Gráficos)**

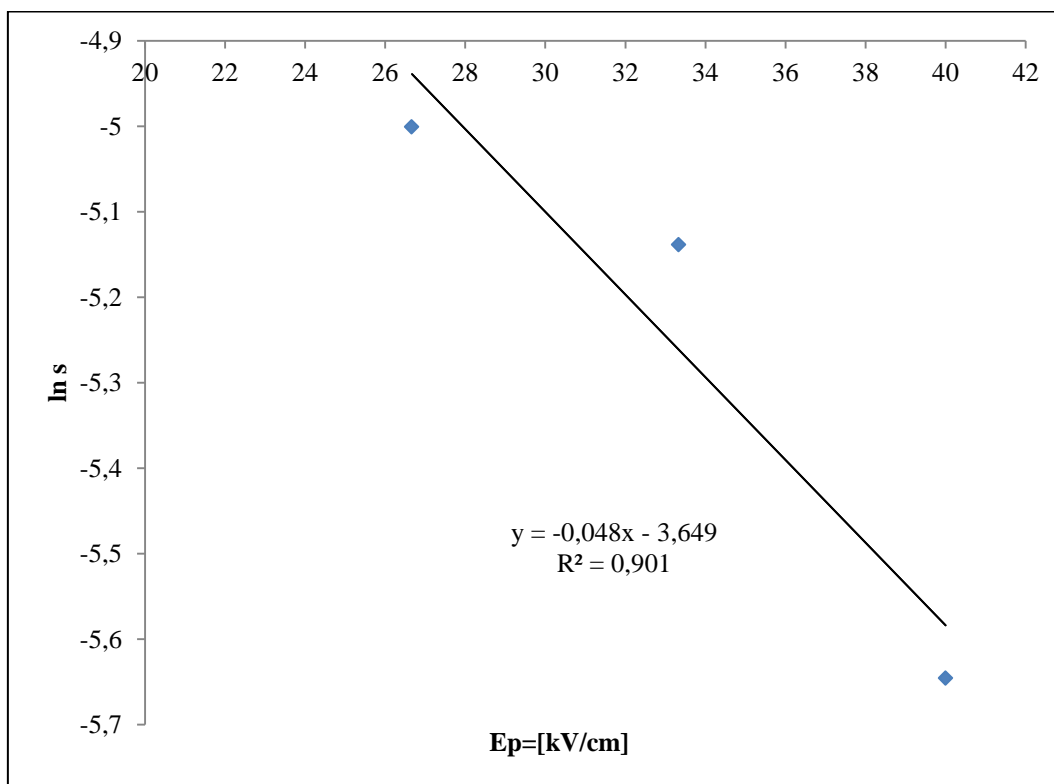
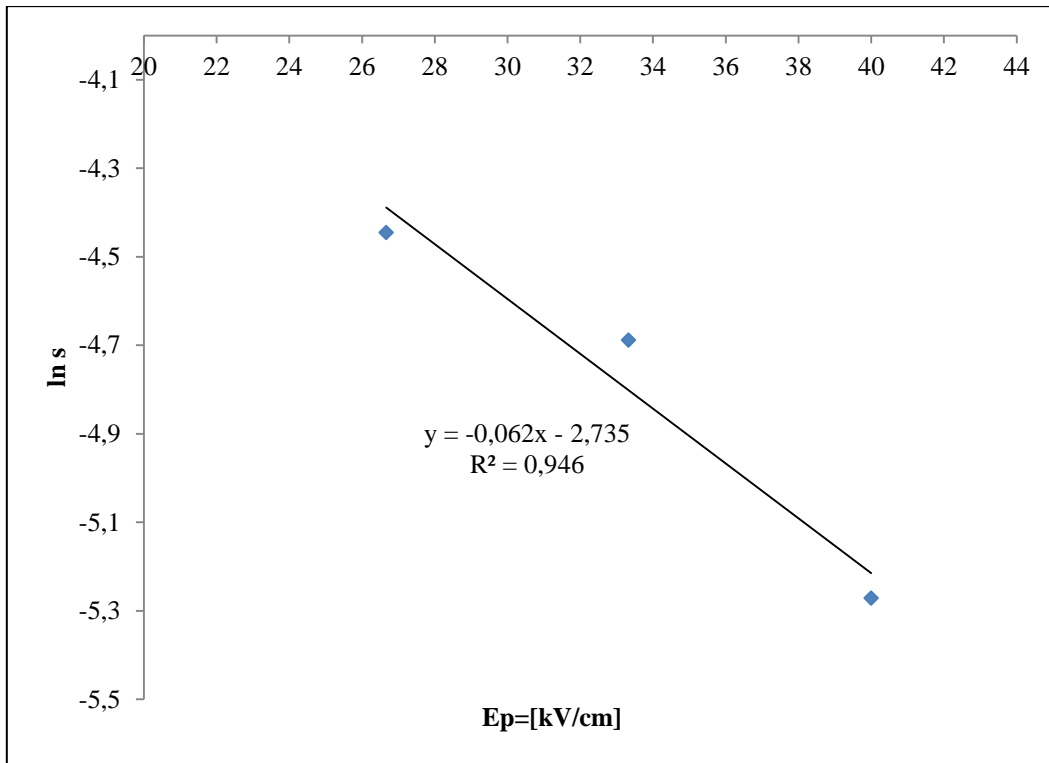


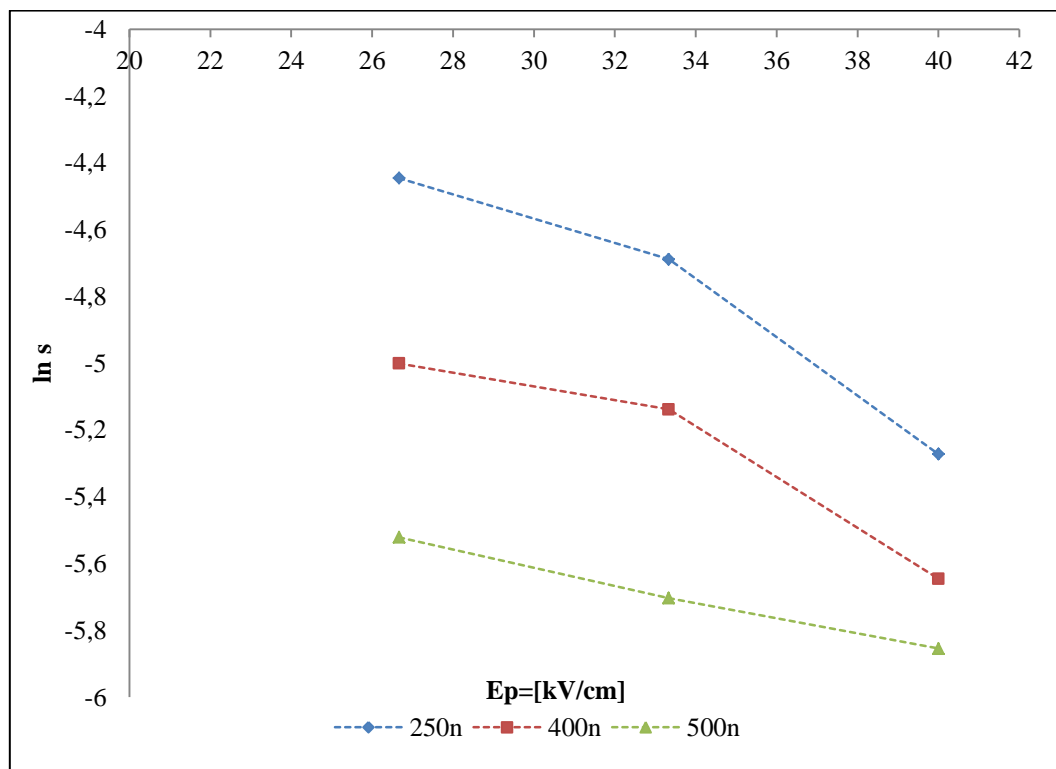
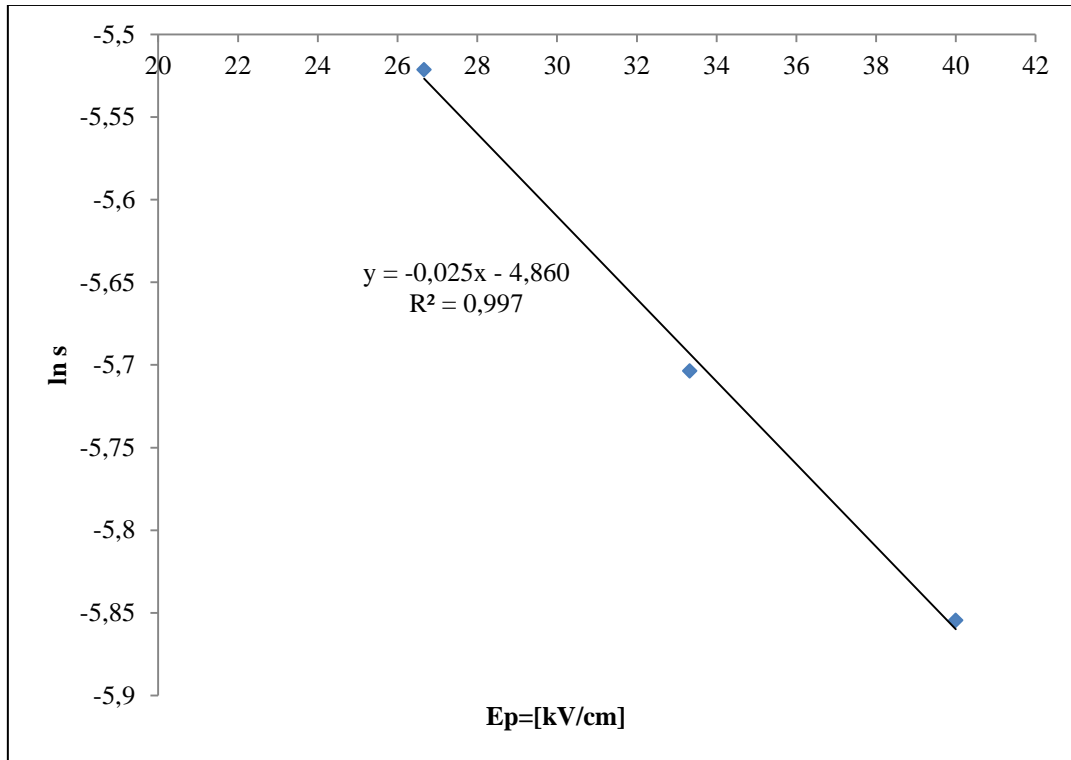
Fuente: Costa y col., 2002

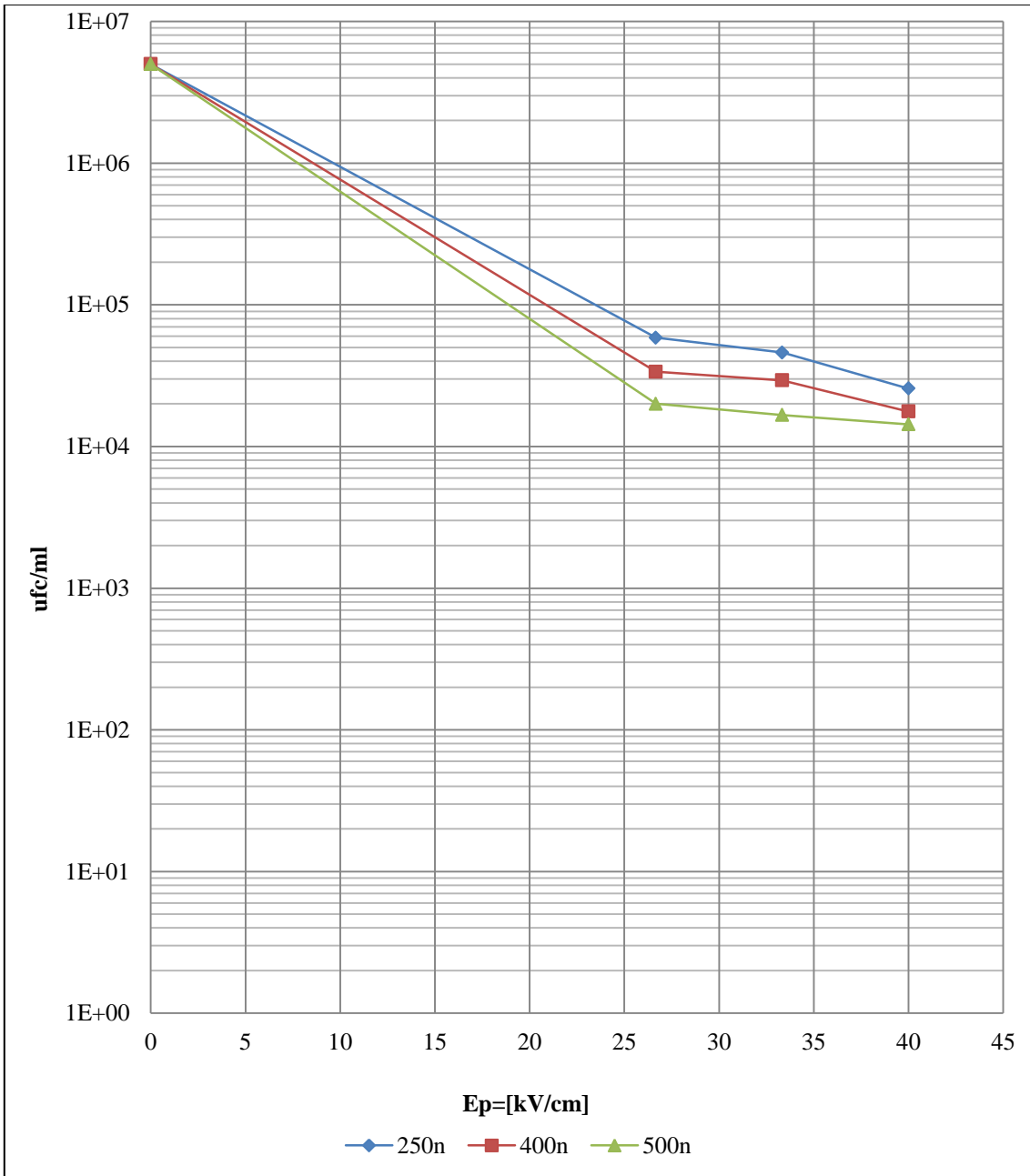
**Gráfico # 1. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y actividad proteásica a 6°C**



**Gráfico #2. Representación general de la tasa de muerte de microorganismos (coliformes totales), en la relación  $\ln s$  vs  $E_p$  [kV/cm], constante  $t$  [s]**  
 Elaborado por: Diego Carrillo.

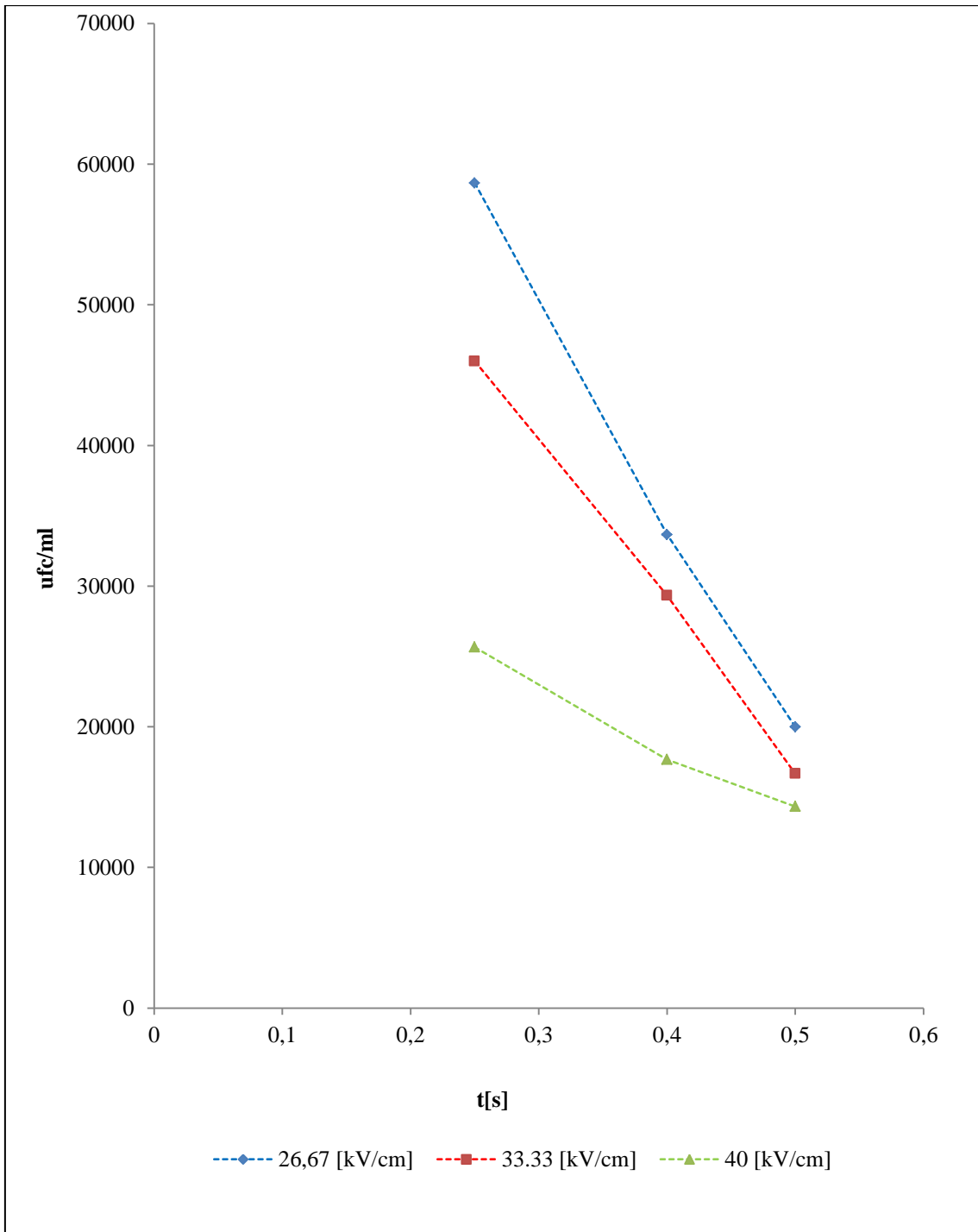




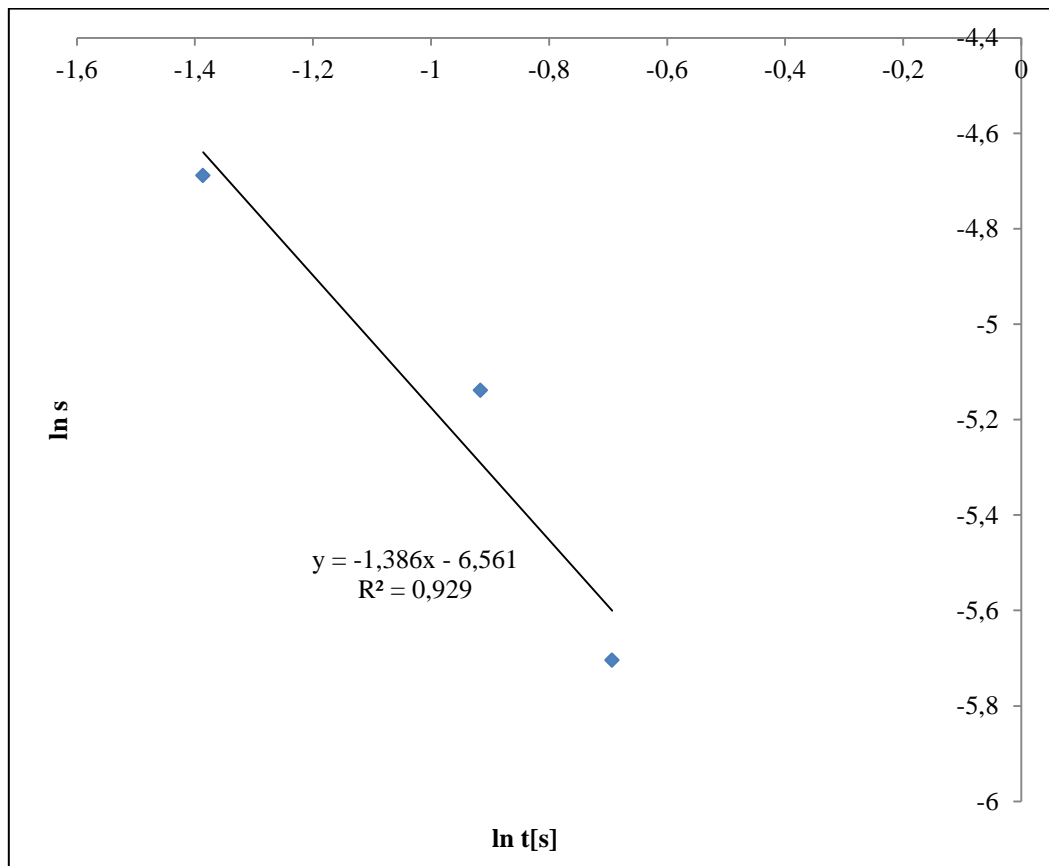
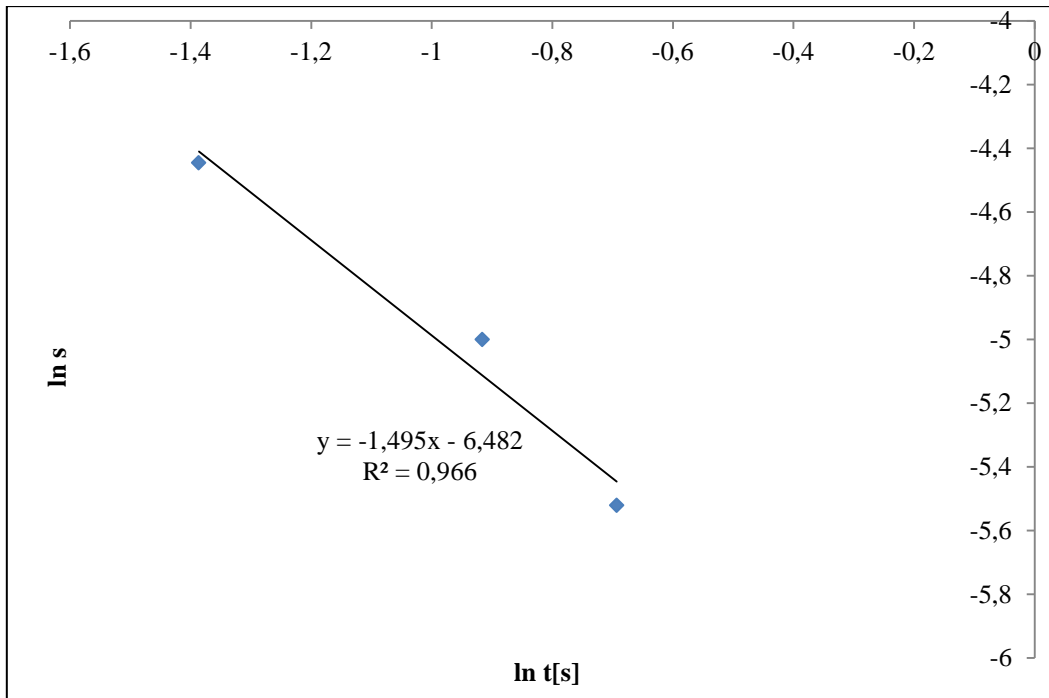


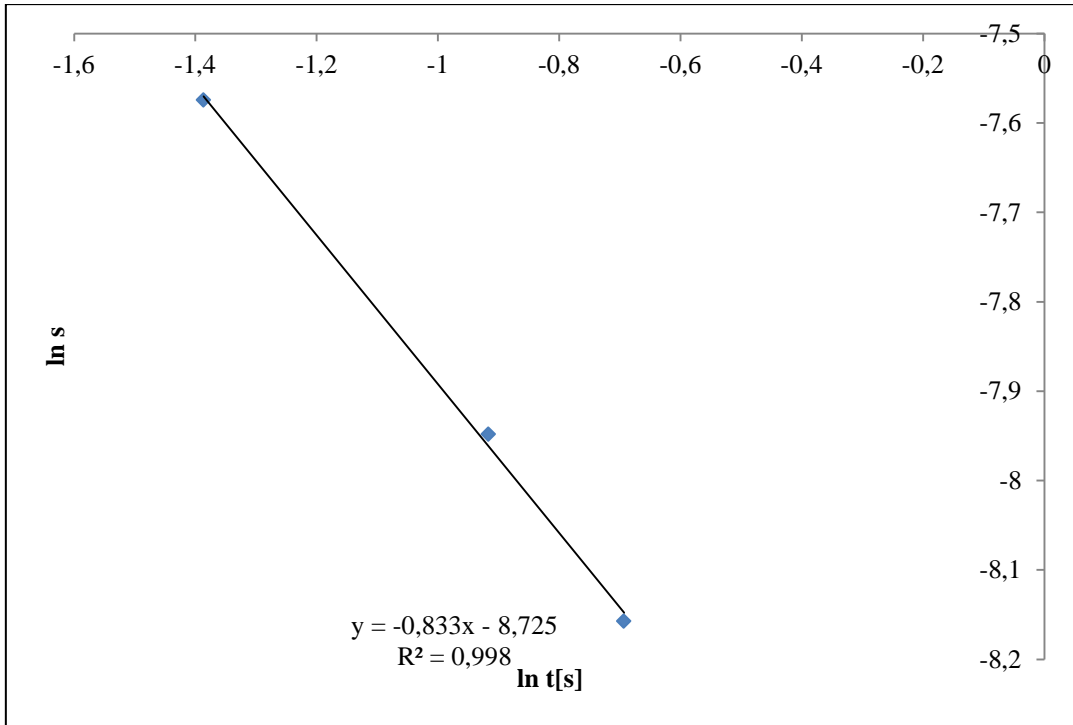
**Gráfico #7.  $\ln s$  vs  $E_p$ [kV/cm], constante:  $t$ [s], ciclos logarítmicos de descenso**  
 Elaborado por: Diego Carrillo



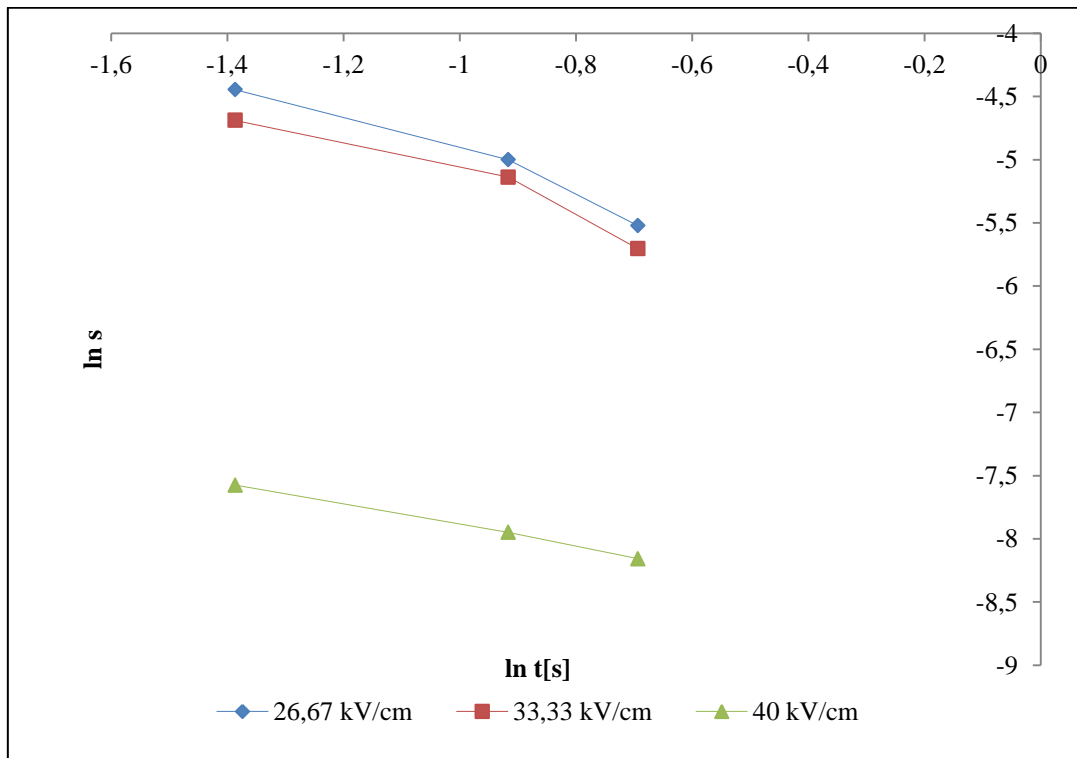


**Gráfico #8. Representación general de la tasa de muerte de microorganismos (coliformes totales) en la relación  $\ln s$  vs  $\ln t[s]$ , constante  $E_p[kV/cm]$**   
 Elaborado por: Diego Carrillo

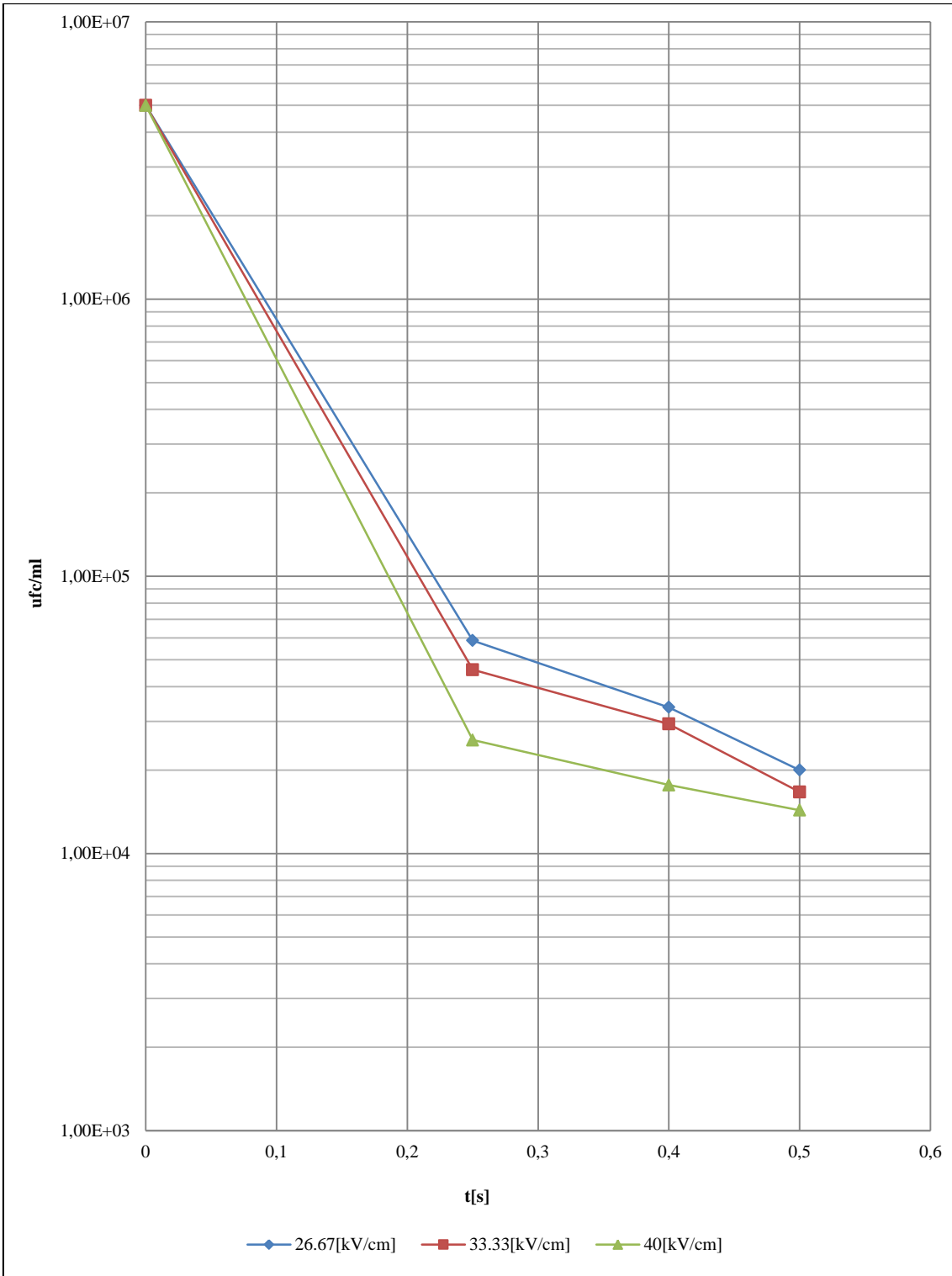




**Gráfico #11.  $\ln s$  vs  $\ln t[s]$ , constante:  $E_p=40$  [kV/cm]**  
Elaborado por: Diego Carrillo



**Gráfico #12:  $\ln s$  vs  $\ln t[s]$ , constante  $E_p$ [kV/cm]**



**Gráfico #13. ln s vs ln t[s], constante  $E_p$  [kV/cm], ciclos logarítmicos de descenso**

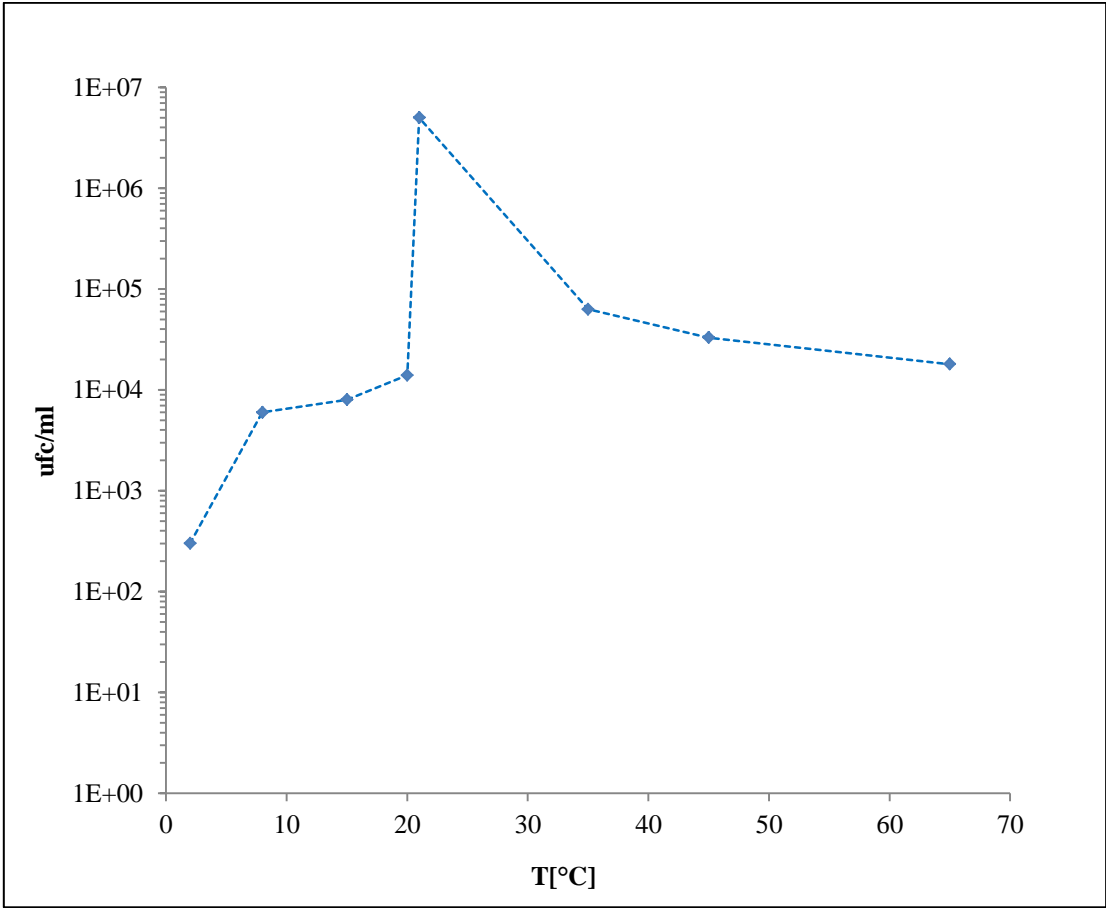
Elaborado por: Diego Carrillo

Analysis of Variance for ufc - Type III Sums of Squares

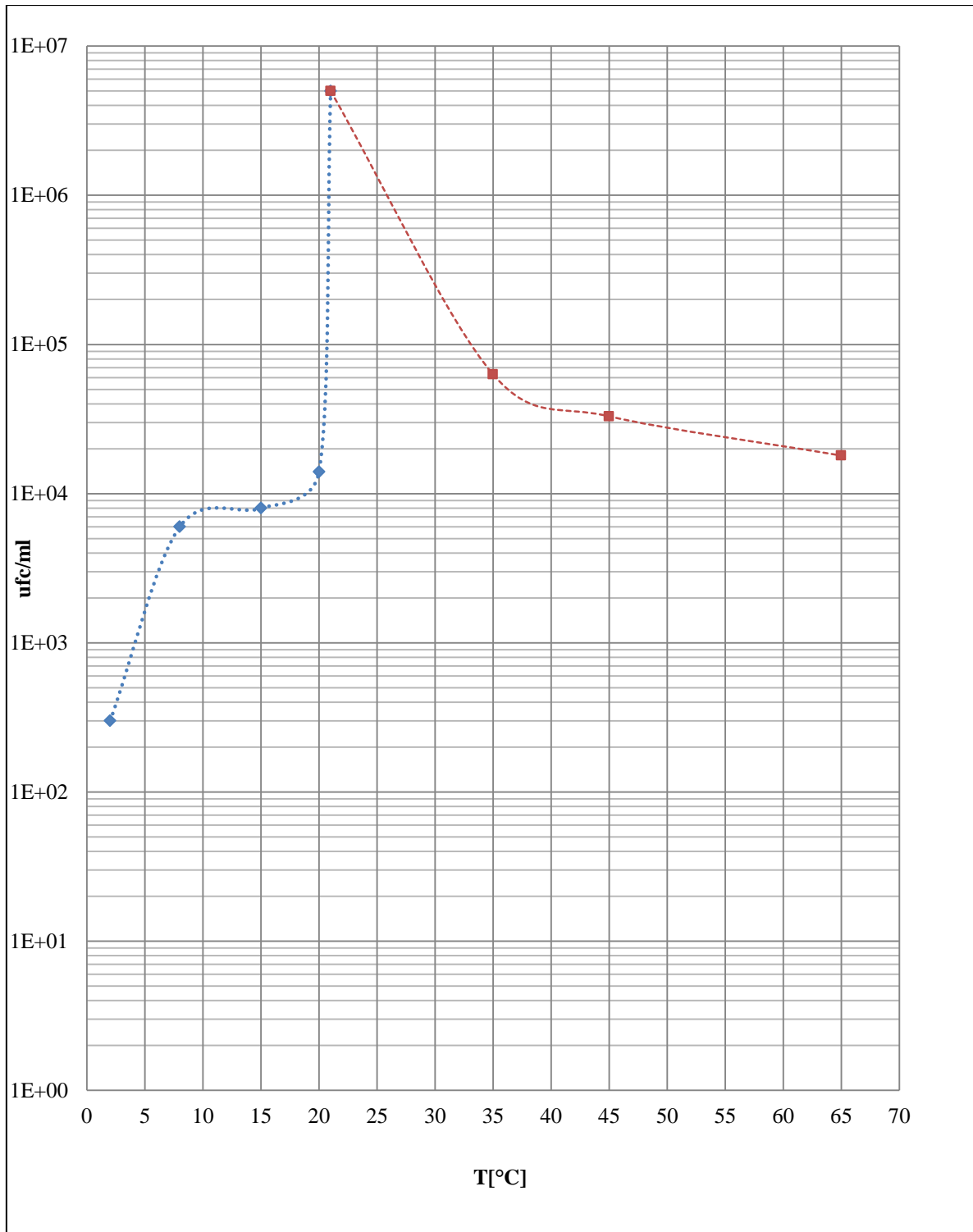
---

| Source              | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| <b>MAIN EFFECTS</b> |                |    |             |         |         |
| A:Factor_A          | 1526,89        | 2  | 763,444     | 84,48   | 0,0000  |
| B:Factor_B          | 3213,56        | 2  | 1606,78     | 177,80  | 0,0000  |
| <b>INTERACTIONS</b> |                |    |             |         |         |
| AB                  | 595,556        | 4  | 148,889     | 16,48   | 0,0000  |
| RESIDUAL            | 162,667        | 18 | 9,03704     |         |         |

**Gráfico #14: Tabla anova (Stat Graphics)**  
 Elaborado por: Diego Carrillo



**Gráfico #15: a<sub>2</sub>b<sub>2</sub> (E=12kV; E<sub>p</sub>= 40[kV/cm]: n=500; t=0.5s), evaluado a diferentes temperaturas [°C]**  
 Elaborado por: Diego Carrillo



**Gráfico #16. Representación de la tasa de muerte de microorganismos (coliformes totales) al aplicar el tratamiento  $a_2b_2$  ( $E=12kV$ ;  $E_p= 40[kV/cm]$ ;  $n=500$ ;  $t=0.5s$ ), evaluado a diferentes temperaturas (2, 8, 15, 20, 35, 45, 65°C)**

Elaborado por: Diego Carrillo

# **ANEXO C**

## **(Ecuaciones)**

### **Ecuación #1. Determinación de Acidez, INEN 013**

$$A = \frac{0,090 * V * N}{M_1 - M} * 100$$

Donde:

A= acidez expresada en % de ácido láctico.

V= volumen en mililitros de de hidróxido de sodio consumido.

N= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

0,090 = Equivalente del ácido láctico.

M= Masa del Erlenmeyer vacío en g.

Para calcular la acidez titulable en °Dornic debe multiplicarse por 100 el resultado obtenido con la formula anterior.

### **Ecuación #2. Determinación de campo eléctrico aplicado. Barbosa (1999)**

$$E_p = \frac{V}{d}$$

Dónde:

V = voltaje utilizado expresado en kilo voltios (kV).

d = espacio de separación entre electrodos expresado en centímetros (cm).

### **Ecuación #3. Número promedio de ufc/ml de muestra, guía de interpretación de placas petrifil 3M (2008)**

$$ufc / ml = \frac{\sum_{ufc} \left( \frac{1}{F} \right)}{ml \text{ muestra}}$$

Dónde:

ufc/ml = número estimado de bacterias contenidas en la muestra estudiada.

$\sum_{ufc}$  = sumatoria de todos los conteos realizados en las placas Petrifilm de la misma dilución.

(1/F) = inverso del factor de dilución.

ml muestra = ml que se utilizaron para la siembra.



**Ecuación#4 . Modelo estadístico matemático AxB**

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (AB)_{ij} + T_k + \epsilon_{ijk}$$

**Ecuación# 5. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del tratamiento**

$$SCTr = \frac{1}{r} \sum ij.^2 - \frac{(Y...)^2}{a * b * r}$$

**Ecuación #6. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del residuo**

$$SCR = \frac{1}{a * b} \sum Y_{..k^2} - \frac{(Y...)^2}{a * b * r}$$

**Ecuación #7. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del error**

$$SCE = SCT - SCTr - SCR$$

**Ecuación #8. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del factor A(kV)**

$$SCA = \frac{1}{b * r} \sum Y_{ij}^2 - \frac{(Y...)^2}{a * b * r}$$

**Ecuación #9. Modelo estadístico AxB, suma de cuadrados del factor B(n)**

$$SCB = \frac{1}{a * r} \sum Y_{.j}^2 - \frac{(Y...)^2}{a * b * r}$$

**Ecuación #10. Modelo estadístico matemático AxB, comparación de Tukey**

$$T = q \sqrt{\frac{CME}{n}}$$

**Ecuación #11. Cálculo de consumo eléctrico**

$$W = P * t$$

Donde:

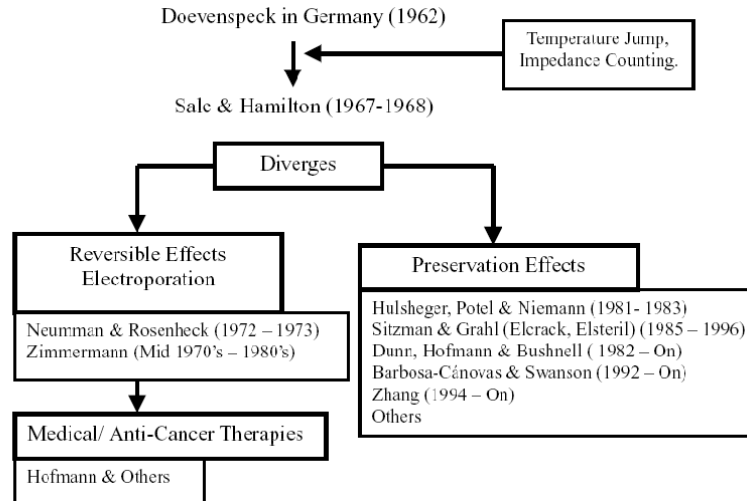
W= trabajo o energía gastada.

P=potencia

t= tiempo.

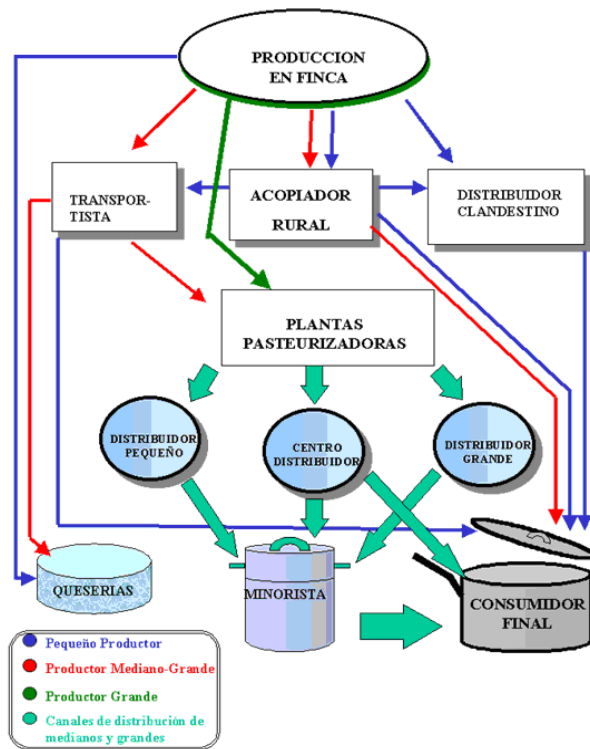
# **ANEXO D**

## **(Figuras)**



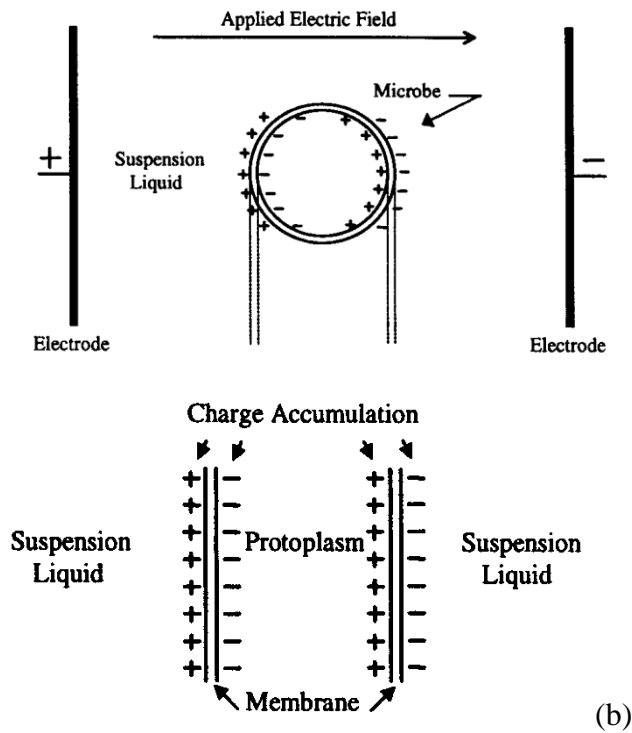
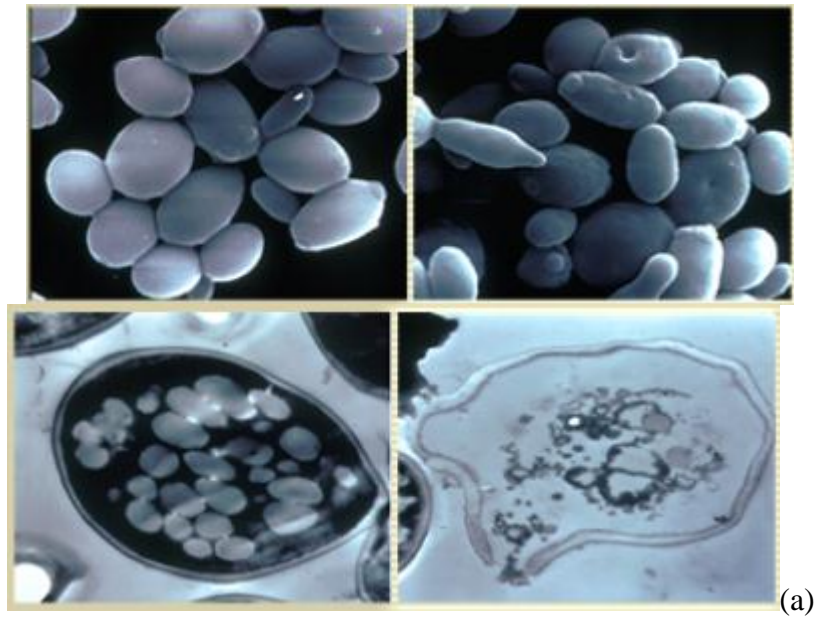
**Figura # 1. Pioneros en el desarrollo de la tecnología de conservación por pulsos eléctricos**

Fuente: Barbosa y col (2001)



**Figura #2. Canales de distribución de leche en el Ecuador**

Fuente: INEC, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Proyecto SICA-BIRF/MAG- Ecuador.

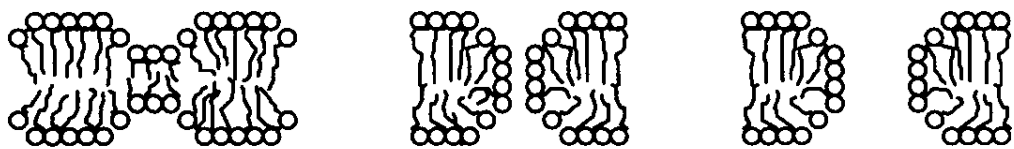
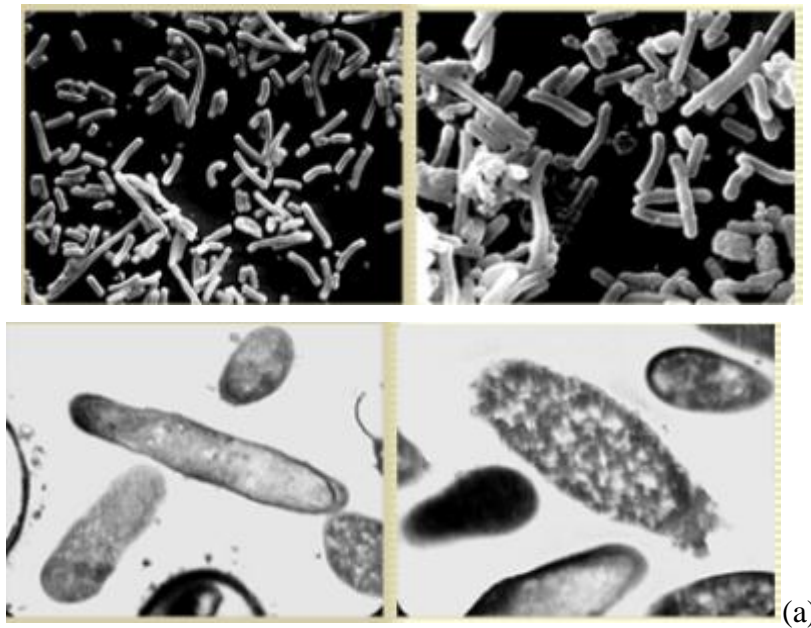


**Figura # 3. (a) Microfotografías del daño de la membrana celular de *S. cerevisiae* después de ser tratadas con campos eléctricos pulsados (izq = control, dere=tratamiento)**

**(b). Descripción de cargas en membrana celular microbiana**

Fuente (a): Elez – Martínez 2004 – 2005, citados por Martín O. (2007).

(b): Barbosa y col.(1999).



(a)

(b)

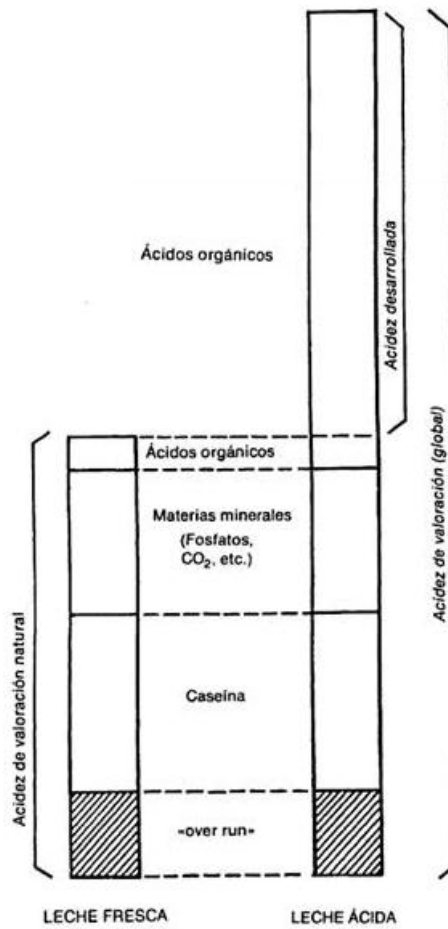
(c)

(b)

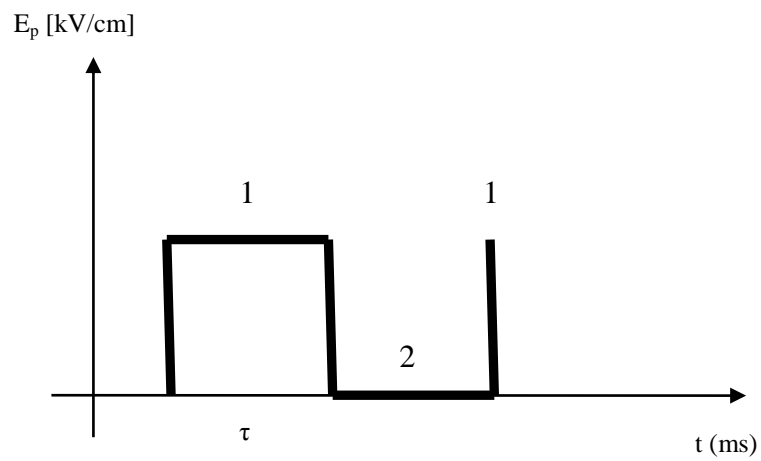
**Figura # 4. (a) Microfotografías del daño de la membrana celular de *L. brevis* después de ser tratadas con campos eléctricos pulsados (izq = control, dere=tratamiento)**  
**(b) Electroporación de la membrana microbiana, (a) crecimiento del número de poros, (b) reordenamiento de cargas y de la membrana, (c) expansión del tamaño del poro resultado de la ruptura mecánica de la membrana**

Fuente: (a) Elez – Martínez 2004 – 2005, citados por Martín O. (2007)

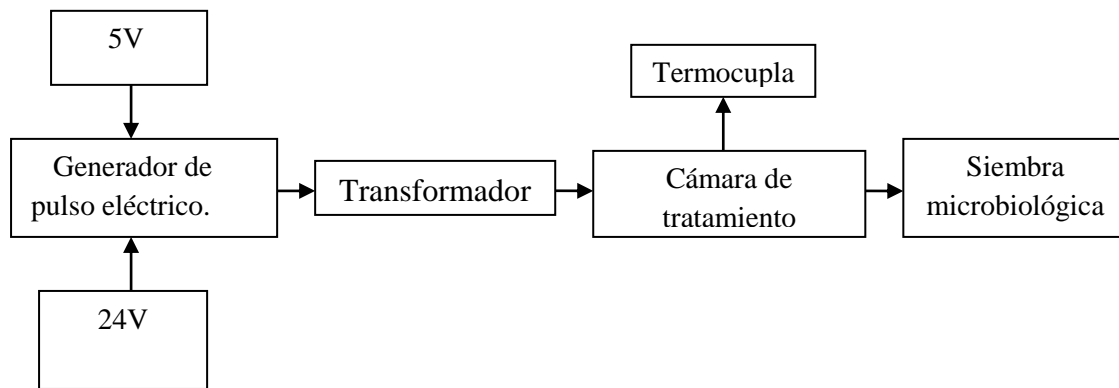
(b) Dimitrov 1984, citado por Barbosa (1999)



**Figura # 5. Acidez de valoración**  
Fuente: Alais Ch.(1985).



**Figura 6 #. Pulso de onda cuadrada**  
Fuente: Boylestad y Nashelsky (2003).



**Figura # 7. Sistema generador de pulso eléctrico**

Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 8. Determinación de densidad, “Ecomilk, milk analyzer, milkana kam98–2A”**

Elaborado por: Carrillo D. Equipo proveniente de la planta de procesamiento de productos lácteos “San Pablo- Pillaro”

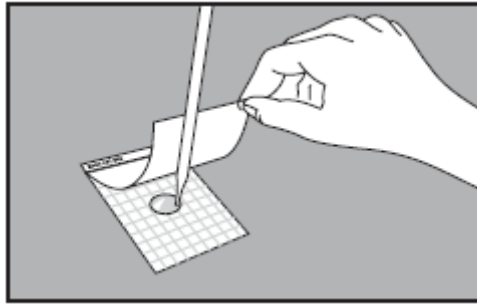


**Figura # 9. Determinación de pH (20°C)**  
Elaborado por: Carrillo D.

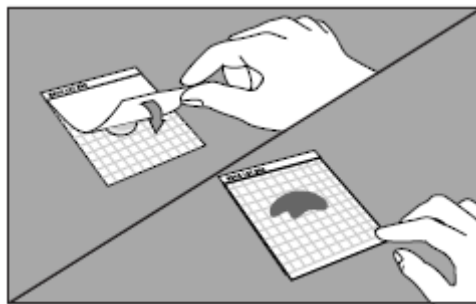


**Figura # 10. Placas Petrifilm 3M.**  
Elaborado por: Carrillo D.

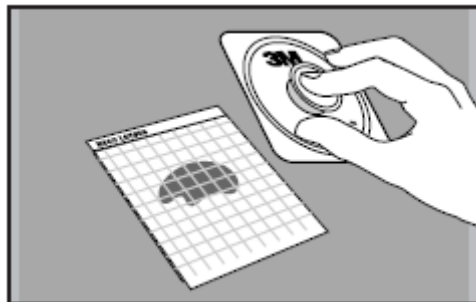




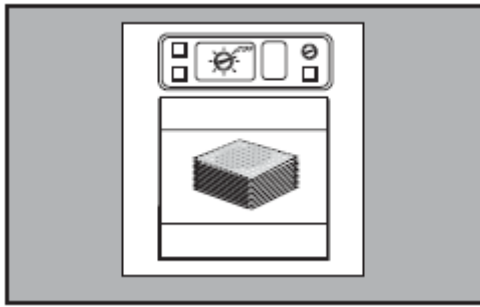
**Figura #11. Inoculación**  
Fuente: 3M Petrifilm (2008)



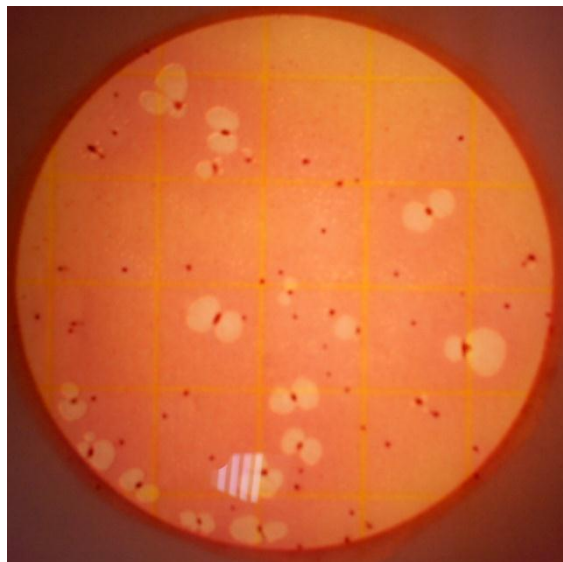
**Figura #12. Cubrir con el film**  
Fuente: 3M Petrifilm (2008)



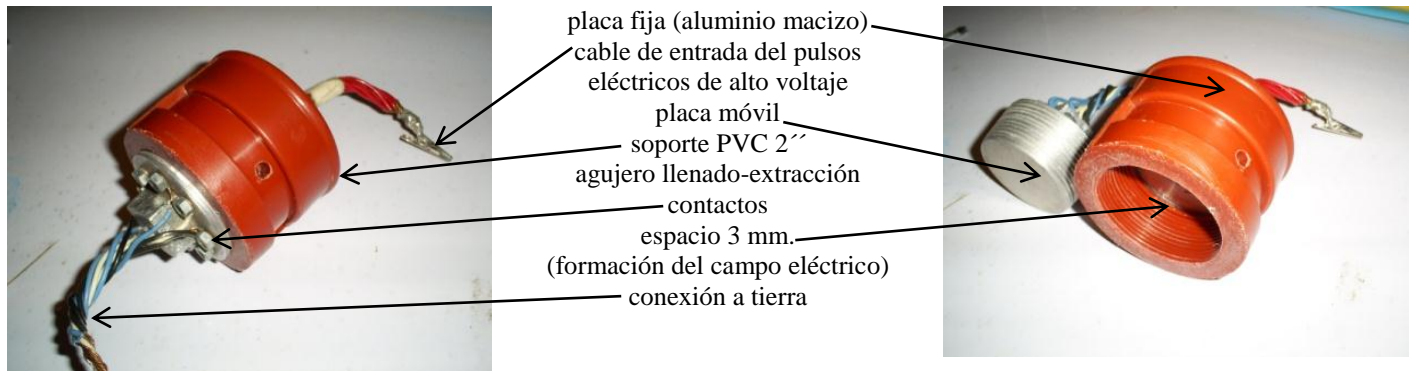
**Figura #13. Distribución de la muestra**  
Fuente: 3M Petrifilm (2008)



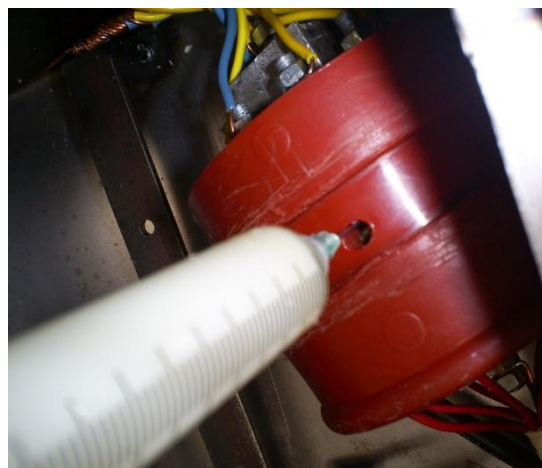
**Figura #14. Incubadora**  
Fuente: 3M Petrifilm (2008)



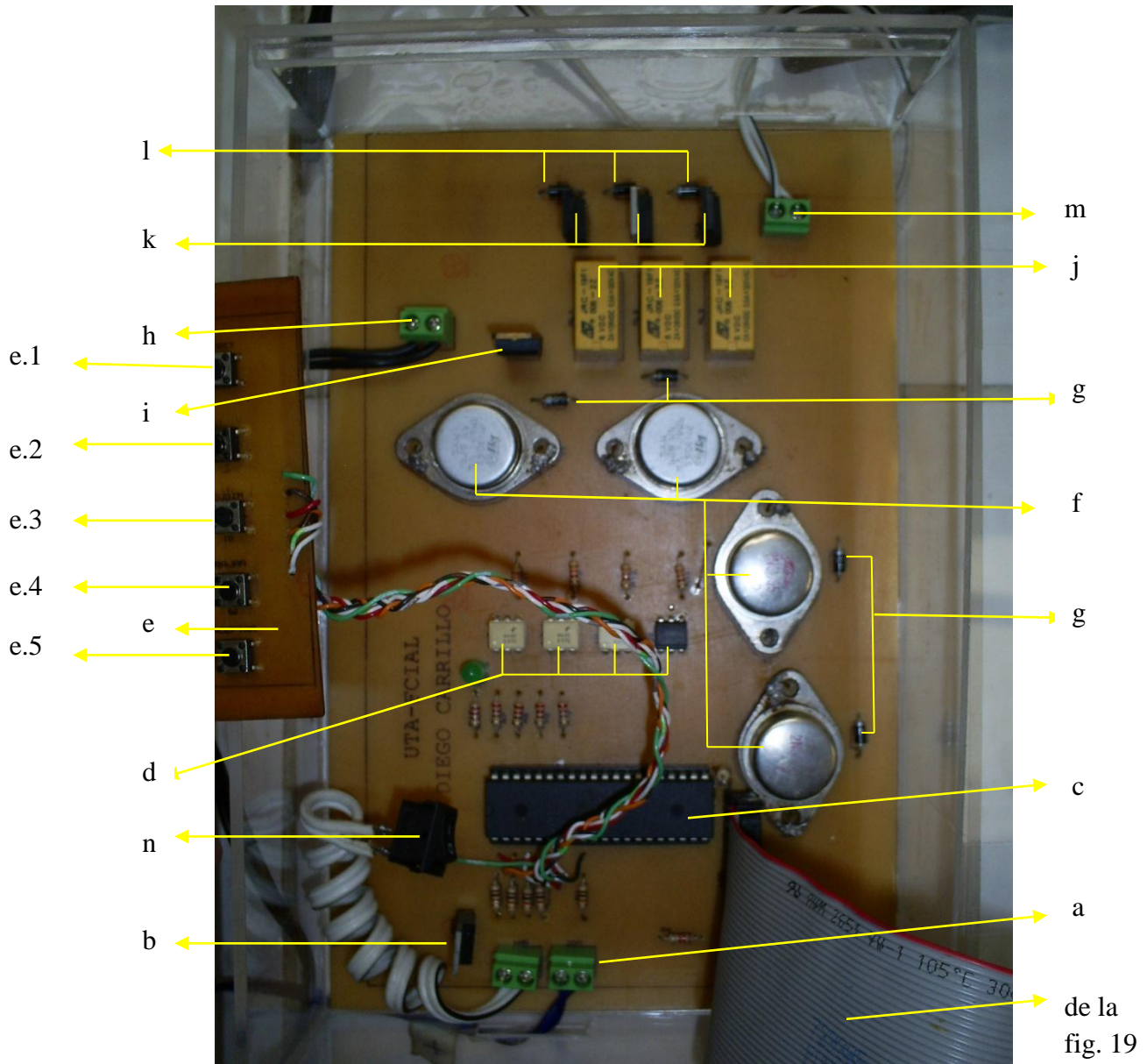
**Figura #15. Interpretación de siembras microbiológicas.**  
Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 16. Partes de la cámara de tratamiento**  
 Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 17. Llenado y extracción de la cámara de tratamiento**  
 Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 18. Sistema electrónico**

Elaborado por: Ing. Andrés Carrillo, Ing. Gabriel Martínez. EPN (2009).



**Figura # 19. Pantalla LED**  
Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 20. Bobina de transformación**  
Elaborado por: Carrillo D.



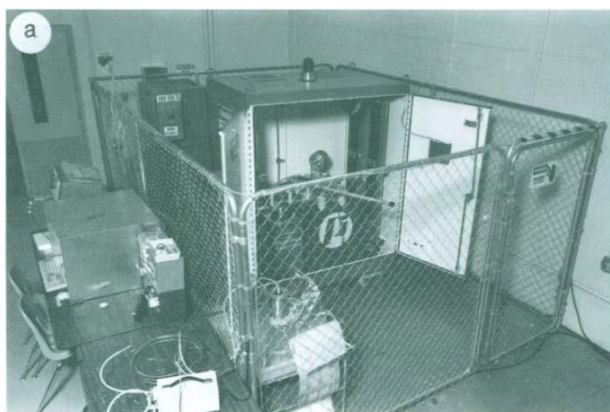
**Figura # 21. Adaptadores de energía empleados**  
Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 22. Cámara metálica**  
Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 23. Partículas extrañas contenidas en leche cruda entera**  
Elaborado por: Carrillo D.



**Figura # 24. Planta piloto de tratamiento, para inactivación de microorganismos y enzimas, Universidad de Washington-USA**  
Fuente: Barbosa y col.(1999).



**Figura # 25. Placas Petrifilm utilizados en los conteos microbianos (ejemplos de los tratamientos, a<sub>2</sub>b<sub>0</sub>, a<sub>2</sub>b<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>b<sub>2</sub> y blanco)**

Elaborado por: Carrillo D.

# **ANEXO E**

## **(Métodos y Programación)**



### **Método#1. INEN 013, “Determinación de la acidez titulable**

- 1.- La muestra debe encontrarse a 20°C y estar homogénea.
- 2.- La determinación se realiza por duplicado sobre una misma muestras.
- 3.- Pesar un erlenmeyer bien seco y limpio con aproximación de 0,1mg, a continuación pesar aproximadamente 20gr de muestra.
- 4.- Agregar 2 gotas de solución indicadora de fenolftaleína.
- 5.- Añadir o titular con solución de hidróxido de sodio 0,1N; hasta que el punto de viraje a rosa tenue persista pr 30 segundos.
- 6.- La acidez de leche se determina aplicando la Ecuación #1.

### **Método#2. Determinación de pH**

- 1.- En un vaso de precipitación de 100ml colocar 50ml de leche que debe estar a 20°C.
- 2.- Calibrar el potenciómetro utilizando solución tampón de pH4.
- 3.- Introducir el electrodo directamente a la muestra hasta cubrir el bulbo sensible al pH.
- 4.- Dejar el electrodo en contacto con la muestra por lo menos 45 segundos, antes de tomar la lectura.

### **Método#3. Inoculación en placas Petrifilm**

- 1.- Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior. Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa Petrifilm, colocar 5 ml. de la muestra en el centro del film inferior.
- 2.- Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.
- 3.- Colocar el aplicador para en el film superior sobre el inoculo. Distribuir la muestra ejerciendo una ligera presión sobre el mango del aplicador. No girar ni deslizar el aplicador. Levantar el aplicador. Esperar de 2 a 5 minutos a que solidifique el gel.
- 4.- Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 10 placas. El tiempo de incubación y la temperatura varía según el método. Incubar 24h ± 2h a 32°C ± 1°C (productos lácteos), Incubar 24h ± 2h a 35°C ± 1°C (todos los alimentos, excepto productos lácteos).

5.- Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento iluminada. Para el recuento de E. coli y coliformes totales se cuentan las colonias de color rojo con burbuja.

6.- Las colonias pueden aislarse para una posterior identificación

### **Programa #1. Programación electrónica (software) utilizado, para el control y generación de pulsos eléctricos**

```
$crystal = 8000000
Ddrb = &B00000000
Portb = &B11111111
```

```
Ddra = &B11111111
Porta = &B00000000
```

```
Dim C As Byte
Dim D As Byte
Dim E As Byte
Dim Seteo As Byte
Dim Opcion As Byte
```

```
Salida1 Alias Porta.0
Salida2 Alias Porta.1
Salida3 Alias Porta.2
Salida4 Alias Porta.3
Iniciar Alias Pinb.0
Subir Alias Pinb.1
Bajar Alias Pinb.2
Aceptar Alias Pinb.3
```

```
'$sim 'is used for faster simulation
```

```
Inicio:
```

```
Config Lcdpin = Pin , Db4 = Portd.4 , Db5 = Portd.5 , Db6 = Portd.6 , Db7 = Portd.7 , E = Portd.3 , Rs = Portd.2
```

```
'These settings are for the STK200 in PIN mode
```

```
'Connect only DB4 to DB7 of the LCD to the LCD connector of the STK D4-D7
```

```
'Connect the E-line of the LCD to A15 (PORTC.7) and NOT to the E line of the LCD connector
```

```
'Connect the RS, V0, GND and =5V of the LCD to the STK LCD connector
```

```
Rem with the config lcdpin statement you can override the compiler settings
```

```
'Dim A As Byte
```

```
Config Lcd = 16 * 2 'configure lcd screen
```

```
'other options are 16 * 4 and 20 * 4, 20 * 2 , 16 * 1a
```

```
'When you dont include this option 16 * 2 is assumed
```

```
'16 * 1a is intended for 16 character displays with split addresses over 2 lines
```

```
'$LCD = address will turn LCD into 8-bit databus mode
```

```
' use this with uP with external RAM and/or ROM
```

```
' because it aint need the port pins !
```

```
'BORRO PANTALLA
```

```
Cls
```

```
'APAGO EL CURSOR
```

```
Cursor Off
```

```
'POSICIONO EL CURSOR EN EL INICIO DE LA PRIMERA LINEA
```

```
Home U
```

```

' ESCRIBO EN EL LCD
Lcd ; " UTA-FCIAL. "           'display this at the top line
Wait 2

Lowerline                       'select the lower line
Lcd ; " DIEGO CARRILLO "
Wait 2
Cls
Home U
Lcd ; " PROYECTO DE "
Wait 1
Lowerline
Lcd ; " CONSERVACION "
Wait 1
Cls
Home U
Lcd ; "DE LECHE USANDO"
Wait 1
Cls
Home U
Lcd "  PULSOS  "
Lowerline
Lcd ; " ELECTRICOS "
Wait 1
Cls

Do                               'INICIO PROGRAMA PRINCIPAL
  Seteo = 100
  Opcion = 1
  D = 0
  ' Waitms 200
  Cls
  Home U
  Lcd ; " INDIQUE EL "
  Lowerline
  Lcd ; "# DE PULSOS"
  Locate 2 , 13
  Lcd ; Seteo
  Wait 1
  Gosub Configurar
  Cls
  Home U
  Lcd ; " INDIQUE EL "
  Lowerline
  Lcd ; "VALOR DE VOLTAJE"
  Wait 1
  Gosub Intensidad
  Do
  If Iniciar = 0 Then           'Iniciar = 0
    C = 0
    Gosub Conteo
    D = 1
  End If
  Loop Until D = 1
Loop
End                               'FIN PROGRAMA PRINCIPAL
Conteo:
  If Opcion = 1 Then
    Set Salida2

```

```

Waitms 150
Do
Set Salida1
Waitms 1
Reset Salida1
Waitms 1
C = C + 1
Loop Until C = Seteo
Reset Salida2
End If
If Opcion = 2 Then
Set Salida3
Waitms 150
Do
Set Salida1
Waitms 1
Reset Salida1
Waitms 1
C = C + 1
Loop Until C = Seteo
Reset Salida3
End If
If Opcion = 3 Then
Set Salida4
Waitms 150
Do
Set Salida1
Waitms 1
Reset Salida1
Waitms 1
C = C + 1
Loop Until C = Seteo
Reset Salida4
End If
Waitms 100
' Wend
Return
Configurar:
Cls
Lcd ; "Numero de pulsos"
Lowerline
Lcd Seteo
Do

Waitms 20
' Do
If Bajar = 0 Then
Decr Seteo
Lowerline
Lcd " "
Locate 2 , 1
Lcd ; Seteo
Waitms 150
End If
' Loop
Waitms 20
' Do
If Subir = 0 Then
Incr Seteo

```

'Locate 2 , 13

```

Lowerline
Lcd "  "
Locate 2 , 1          'Locate 2 , 13
Lcd ; Seteo
Waitms 150
End If
' Loop

Waitms 100
Loop Until Aceptar = 0
Return
Intensidad:
Cls
Lcd ; "1)8000V 2)10000V"
Lowerline
Lcd ; "3)12000V      "
Locate 2 , 13
Lcd Opcion
Do

Waitms 20
' Do
If Iniciar = 0 Then
Opcion = 1
Lowerline
Locate 2 , 13          'Locate 2 , 13
Lcd ; Opcion
Waitms 150
End If
If Subir = 0 Then
Opcion = 2
Lowerline
Locate 2 , 13          'Locate 2 , 13
Lcd ; Opcion
Waitms 150
End If
' Loop
Waitms 20
' Do
If Bajar = 0 Then
Opcion = 3
Lowerline
Locate 2 , 13          'Locate 2 , 13
Lcd ; Opcion
Waitms 150
End If
' Loop

Waitms 100
Loop Until Aceptar = 0
Return          'end program

```

Elaborado por: Ing. Andres Carrillo, Ing. Gabriel Martínez, EPN (2009)