



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Química

Diseño y evaluación de un esterilizador de leche que utilice energía eléctrica como agente esterilizador

Heyward Toledo Villatoro  
Asesorado por Ing. Zenón Much Santos

Guatemala, enero de 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN ESTERILIZADOR DE LECHE QUE UTILICE ENERGÍA  
ELÉCTRICA COMO AGENTE ESTERILIZADOR

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

HEYWARD TOLEDO VILLATORO  
ASESORADO POR ING. ZENÓN MUCH SANTOS  
AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO

Guatemala, enero de 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Sydney Alexander Samuels Milson
VOCAL I	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL II	Lic. Amahán Sánchez Álvarez
VOCAL III	Ing. Julio David Galicia Celada
VOCAL IV	Br. Kenneth Issur Estrada Ruiz
VOCAL V	Br. Elisa Yazminda Vides Leiva
SECRETARIO	Ing. Carlos Humberto Pérez Rodríguez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Herbert René Miranda Barrios
EXAMINADOR	Ing. Julio Rivera Palacios
EXAMINADOR	Inga. Hilda Palma de Martini
EXAMINADOR	Ing. Orlando Posadas
SECRETARIO	Inga. Gilda Marina Castellanos Baiza de Illescas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

Diseño y evaluación de un esterilizador de leche que utilice energía eléctrica como agente esterilizador

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química con fecha 11 de febrero de 2002.

Heyward Toledo Villatoro

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	III
LISTA DE SÍMBOLOS.....	V
GLOSARIO.....	VII
RESUMEN.....	X
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	XII
1. ANTECEDENTES.....	01
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	05
3. LECHE: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS.....	07
4. TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	09
5. PASTEURIZACIÓN POR ELECTRICIDAD.....	13
6. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE LA INACTIVACIÓN	
MICROBIAL EN CAMPOS ELÉCTRICOS.....	15
6.1 Potencial transmembránico.....	16
6.2 Inestabilidad y compresión mecánica.....	17
7. CAMBIOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS POR UN CAMPO	
ELÉCTRICO.....	19
7.1 Electropermeabilización.....	19
7.2 Electrofusión.....	21
8. DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL ESTERILIZADOR.....	23
9. RESULTADOS.....	27
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIONES.....	37

BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXOS	
ANEXO A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
ANEXO B. PRUEBA DE AZUL DE METILENO.....	50
ANEXO C. FOTOGRAFÍAS.....	51

# ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

## FIGURAS

1	Diseño de esterilizador de pulsos eléctricos.....	23
2	Placa de pulsos eléctricos.....	24
3	Diseño de esterilizador de corriente directa.....	25
4	Vista lateral del esterilizador.....	51
5	Esterilizador abierto.....	51
6	Interior del esterilizador.....	52
7	Vista lateral del depósito.....	52
8	Vista superior del depósito.....	52
9	Tubos de ensayo con muestras de leche.....	53
10	Baño de María.....	53
11	Pasteurización por pulsos eléctricos.....	40
12	Pasteurización por corriente eléctrica.....	41
13	Polígono de frecuencias para leche cruda.....	42

## TABLAS

I	Leche cruda.....	27
II	Tratamiento por pulsos eléctricos durante 10 minutos.....	28
III	Tratamiento por pulsos eléctricos durante 15 minutos.....	28
IV	Tratamiento por pulsos eléctricos durante 20 minutos.....	28
V	Tratamiento por pulsos eléctricos durante 30 minutos.....	29
VI	Tratamiento por corriente eléctrica directa durante 10 minutos.....	29
VII	Tratamiento por corriente eléctrica directa durante 15 minutos.....	29

VIII	Tratamiento por corriente eléctrica directa durante 20 minutos.....	30
IX	Tratamiento por corriente eléctrica directa durante 30 minutos.....	30
X	Tiempos promedios para pulsos eléctricos.....	30
XI	Tiempos promedios para corriente directa.....	30
XII	Datos obtenidos del proceso de pasteurización por pulsos eléctricos	39
XIII	Datos ordenados por tiempo de tratamiento por pulsos eléctricos con sus promedios.....	39
XIV	Datos obtenidos del proceso de pasteurización por corriente directa	40
XV	Datos ordenados por tiempo de tratamiento por corriente directa con sus promedios.....	40
XVI	Análisis estadístico para la leche cruda.....	41



## LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
E	Constante dieléctrica
C	Leche cruda
P	Leche pasteurizada
X	Dato
F	Frecuencia
F*X	Frecuencia por dato
Ho	Hipótesis de prueba o trabajo
Ha	Hipótesis alternativa o de investigación
N	Datos totales
n	Dato parcial
$\Sigma$	Sumatoria
$\Sigma c^2$	Valor correspondiente al inter o al intra
Sc	Fuente de variación
Gl	Grados de libertad
Inter.	Interacción
Intra	Interacción parcial
Sct	Sumatoria de control total
F	Análisis de varianza de un factor
sw <sup>2</sup>	Cuadro medio intra
Fp	Prueba posterior
HT	Transformador de alto voltaje
HR	Rectificador de voltaje
C	Capacitor

Símbolo Significado

PP	Placa de pulsos
CT	Cámara de tratamiento
R	Resistencia

## **GLOSARIO**

<b>Agentes antimicrobianos</b>	Son los que interfieren el crecimiento y actividad de los microorganismos. Los agentes antimicrobianos que se utilizan en el tratamiento de las infecciones se denominan agentes terapéuticos. (9)
<b>Antiséptico</b>	Es toda sustancia que tiene o impide el desarrollo o acción de los microorganismos inhibiendo su actividad sin destruirlos necesariamente. Generalmente se refiere a sustancias aplicadas al cuerpo. (7, 9)
<b>Bactericida</b>	Es el agente que mata bacterias. El término bacteriostático se refiere a todo lo que detenga o retarde la proliferación de las bacterias. De la misma manera, los fungistáticos se refieren a los hongos. (9)
<b>Desinfección</b>	Proceso para eliminar el potencial de infección destruyendo los microorganismos, pero no las esporas de las bacterias comunes. Este término suele usarse para designar los resultados de la aplicación de agentes químicos en objetos inanimados. (9)

<b>Esterilización</b>	Es el proceso de destruir todas las formas de vida microbiana. Un objeto esterilizado, en el sentido microbiológico, está libre de microorganismos vivos. Por lo tanto, los términos estéril, esterilizar y esterilización se refieren a la ausencia o destrucción completa de los microorganismos y no se usan en un sentido relativo. Una sustancia o un objeto están estériles o no, pero no semiestériles o casi estériles a menos que se refiera a una esterilización comercial. (9)
<b>Germicida</b>	Sustancia que mata microorganismos que causan enfermedades, pero no las esporas de las bacterias; se utiliza en cualquier tipo de gérmenes y en cualquier tipo de aplicación. (9)
<b>Micróbico/a</b>	Perteneiente o relativo a los microorganismos. (1)
<b>Microorganismo</b>	Forma de vida de dimensiones microscópicas. (1)
<b>Pasteurización</b>	Proceso de calentamiento, a temperatura controlada, de líquidos o bebidas para conservar su calidad y destruir microorganismos patógenos. (1)
<b>Patógeno</b>	Capaz de producir enfermedad. (1)
<b>Producto aséptico</b>	Es el producto que se encuentra libre de microorganismos capaces de causar infección o contaminación. (3)

**Saneamiento**

Consiste en reducir la población microbiana a niveles no peligrosos por medio de un agente, según los requerimientos de salud pública. Por lo regular, es un agente químico que mata 99.9% de las bacterias en crecimiento. Los agentes para el saneamiento se aplican casi siempre en objetos inanimados, generalmente para el cuidado diario de equipos, utensilios de lecherías, plantas de alimentos, vajillas y cubiertos de los restaurantes.

(9)

## **RESUMEN**

Debido a la gran importancia que tiene la esterilización y la pasteurización en la conservación de varios productos, tales como alimentos procesados, bebidas, cosméticos, etc., se hace necesario realizar investigaciones para encontrar métodos alternos a los tradicionales, los cuales no afecten las propiedades del producto. Con base en esto se investigó y analizó el empleo de energía eléctrica como agente esterilizador.

En este caso en particular se utilizaron dos métodos de aplicación de energía eléctrica: corriente directa y campos de pulsos eléctricos. Estos consisten en aplicar energía eléctrica a la sustancia que se va a tratar por medio de electrodos de acero inoxidable.

Se investigó y analizó el empleo de energía eléctrica como agente esterilizador porque es un método no térmico, el cual no afecta las propiedades organolépticas del producto, que en este caso es la leche.

Este estudio se realizó para comprobar la acción germicida de la corriente eléctrica a través de la leche y comprobar cómo afecta el grado de contaminación en el proceso de pasteurización con corriente eléctrica.

Se utilizó la prueba de azul de metileno para el análisis de calidad de la leche. Esta prueba consiste en agregar, en una cantidad de leche, un ml de azul de metileno y controlar en cuanto tiempo se decolora para verificar la calidad de la leche. Los resultados obtenidos de las pruebas de azul de metileno sirven para confirmar la hipótesis en la que se sustenta este estudio.

# OBJETIVOS

## **General:**

Diseñar y evaluar un esterilizador de leche que utilice energía eléctrica como agente esterilizador.

## **Específicos:**

1. Realizar una revisión bibliográfica acerca de la esterilización y pasteurización de la leche, en la que se utilice la energía eléctrica como agente esterilizador.
2. Diseñar el esterilizador de leche.
3. Realizar un análisis microbiológico a la leche antes y después de realizar el proceso de esterilización.
4. Evaluar los resultados obtenidos para comprobar la eficiencia del esterilizador.

# HIPÓTESIS

La acción germicida de la corriente eléctrica a través de la leche dependerá del tiempo de aplicación de la electricidad, así como del grado de contaminación inicial de la leche.

# INTRODUCCIÓN

La investigación de nuevas técnicas para pasteurizar y esterilizar deben ser la prioridad en el estudio de la elaboración y conservación de productos perecederos, en especial productos alimenticios, tales como leche y sus derivados, conservas de vegetales y frutas y otros. Una técnica poco conocida y utilizada es el uso de energía eléctrica como agente esterilizador. Esta puede ser aplicada en diferentes formas, tales como corriente directa, corriente alterna y campos de pulsos eléctricos.

La principal ventaja del uso de la corriente eléctrica en el campo de la pasteurización es que es una técnica que no afecta las propiedades organolépticas del producto, ya que el calor que se produce no afecta sus propiedades pues se incrementa muy poco. Además, los cambios que se dan son más a nivel biológico, como la electroporación y la electrofusión de los microorganismos dañinos.

El diseño y evaluación de un esterilizador de leche que utilice energía eléctrica como agente esterilizador es importante, ya que es un campo poco estudiado. Además, para su evaluación se usó la prueba de Reductasa o azul de metileno y con base en los datos obtenidos de esta prueba se comprobó la acción germicida de la corriente eléctrica a través de la leche y se demostró la dependencia del tiempo de aplicación, así como del grado de contaminación de la leche.

La evaluación de la esterilización se realizó en las instalaciones del laboratorio de Química y Microbiología Sanitaria de la Escuela Regional de Ingeniería Sanitaria y Recursos Hidráulicos ubicado en el Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería.



# 1. ANTECEDENTES

La esterilización microbiológica es probablemente la más importante operación para el control del crecimiento de las poblaciones de microorganismos, en especial en las áreas de salud y elaboración de alimentos.

Debido a lo importante que es el proceso de esterilización para el ser humano, se debe conocer cuáles son las principales razones para llevarla a cabo y controlar que otras personas las cumplan para prevenir:

- 1) la infección y la transmisión de la enfermedad
- 2) la contaminación o la proliferación de microorganismos perjudiciales
- 3) el deterioro o destrucción de materiales por los microorganismos. (9)

Estas son, en forma general, las principales razones para llevar a cabo la esterilización de cualquier objeto o material, tanto desde el punto de vista de salud pública como de la industria de los alimentos. Pero en la industria de los alimentos los resultados de esterilizar algún producto a veces conlleva la pérdida de las propiedades organolépticas del producto, tales como alteración de su sabor, color o apariencia.

Por eso en la industria de los alimentos se buscan formas de preservar o conservar los alimentos libres de microorganismos. Los principales métodos de conservación de alimentos son los siguientes:

- 1) Asepsia es decir, impedir que los microorganismos lleguen al alimento.
- 2) Eliminación de microorganismos.
- 3) Mantenimiento de condiciones anaeróbicas.
- 4) Empleo de temperaturas altas.

- 5) Empleo de temperaturas bajas.
- 6) Desecación, en la que se incluye la retención del agua por solutos, coloides hidrófilos, etc.
- 7) Empleo de conservadores químicos, producidos por microorganismos o adicionados al alimento.
- 8) Irradiación.
- 9) Destrucción mecánica de microorganismos. (3)

Los anteriores métodos de conservación se basan en los siguientes principios:

- 1) Prevención o retraso del crecimiento microbiano:
  - a. Manteniendo los alimentos sin gérmenes (asepsis).
  - b. Eliminando los existentes.
  - c. Obstaculizando el crecimiento y actividad microbianos.
  - d. Destruyendo los microbios.
- 2) Prevención o retraso de la autodescomposición de los alimentos:
  - a. Destruyendo o inactivando las enzimas alimenticias.
  - b. Previendo o retrasando las reacciones puramente químicas.
- 3) Prevención de las alteraciones ocasionadas por insectos, animales superiores, causas mecánicas, etc. (3)

Con base en lo anterior, se previene la descomposición de los alimentos si se destruyen (o eliminan) todos los microorganismos alterantes y se evita la recontaminación. (3)

La destrucción de los microorganismos por casi todos los métodos es más fácil cuando el número inicial de gérmenes contaminantes presentes es pequeño que cuando es grande. Esto permite destacar la importancia que el grado de contaminación del producto tiene cuando se trata de conservar o esterilizar. (3)

De esto se puede concluir que las formas vegetativas en fase de crecimiento logarítmico son menos resistentes a los agentes destructores; la máxima resistencia la presentan cuando se encuentran en los últimos períodos de la fase de latencia o punto cumbre de su fase estacionaria. (3)



## 2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1907, Leffman intentó esterilizar agua pasando una corriente eléctrica a través de ella. En 1909, Stone estudió la influencia de la electricidad en los microorganismos y encontró que una corriente muy débil (0.1 a 0.6 miliamperios) estimulaba el desarrollo de bacterias, mientras que una corriente eléctrica fuerte disminuía el número de bacterias. (8)

Cuando en 1912 Thornton utilizó electrodos de platino, obtuvo una marcada acción germicida contra la *E. typhi* y otras bacterias utilizando una corriente eléctrica de 80 ciclos con 60 voltios. Sin embargo, la temperatura en su experimento estuvo entre 55 a 65° C, que es una temperatura letal para estos microorganismos. (8)

Kleiber, en 1925, reportó haber esterilizado mosto de cerveza por medio de electricidad (8), aunque es probable que los componentes tóxicos formados por la corriente eléctrica directa y la alta temperatura fueron los responsables del efecto letal.

En 1931 Tracy reportó que células de levaduras suspendidas en jugo de uva pudieron ser eliminadas en un minuto por medio del uso de la electricidad a una temperatura de 2 a 3° C debajo de su punto térmico de muerte. (8)

En los siguientes años, Tracy reportó que él tuvo éxito en eliminar levaduras con una corriente eléctrica cuando estas estaban suspendidas en el jugo de uva a una temperatura letal de 42° C. Él sugirió la posibilidad de que el efecto de eliminación se debiera a la formación temporal de sustancias tóxicas, tales como cloro libre. (8)

Dunn y Pearlman, en 1987, trabajaron homogenizando y pasteurizando leche con análisis de vida media de muestras de leche inoculadas con *Salmonella dublin* y fueron tratadas con 40 pulsos de 36.7 kV por un periodo de 25 minutos. La bacteria patógena no fue detectada después del tratamiento, ni después de que la leche se enfrió y almacenó a 7 – 9° C por ocho días. (2)

Prescott investigó una instalación de tratamiento de leche en la cual la leche era calentada a una temperatura de 47.8° C en un refrigerador regenerativo con una corriente alterna de 220 voltios, 60 ciclos. La leche tratada no tenía sabor de leche cocida y mantuvo su excelente calidad. (4)

### **3. LECHE: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS**

Debido a que la leche es uno de los principales productos alimenticios de mayor consumo, tanto en el ámbito nacional como internacional, es importante conservarla en buen estado para el consumo humano el mayor tiempo posible. Generalmente la leche sufre un tratamiento llamado pasteurización (o pasterización), para prolongar su vida útil.

La leche es un líquido opaco, blanquecino o amarillento dependiendo del tipo de raza de la vaca lechera. Normalmente su gravedad específica varía entre 1.027 a 1.035, pero su porcentaje se encuentra en 1.032 a 68° F, teniéndose en cuenta que la gravedad específica tiende a variar con respecto a la temperatura. (5, 6, 11)

El punto normal de congelación de la leche es  $-0.55^{\circ}\text{C}$  y su punto de ebullición es mayor que el del agua: aproximadamente  $100.17^{\circ}\text{C}$  a nivel del mar. El índice de refracción de la leche es algunas veces utilizado como indicativo de su alteración, especialmente con agua. (5, 6, 11)

La leche se expande cuando se calienta y se contrae cuando se enfría, por lo que el radio de incremento del volumen por grado de temperatura incrementado es conocido como el coeficiente de expansión. (5, 11)

El pH de la leche depende de la temperatura y de la raza de la vaca lechera, como se muestra a continuación. (11)

Raza	pH
Holstein	.....6.71
Guernsey	.....6.65
Jersey	.....6.66
Pooled	.....6.66

Tres tipos de microorganismos son encontrados en la industria de la leche fluida: bacterias, levaduras y mohos. Las bacterias son las más importantes desde el punto de vista de salud pública y control de calidad de la producción de leche fluida y derivados de la leche pues son muy resistentes. (5)

Debido a que la leche es un medio líquido que fácilmente se contamina, la industria de la leche y sus derivados lleva un estricto control sobre su manejo, realizando pruebas de olor, sabor, contenido de bacterias por medio de análisis microbiológicos y otra serie de análisis para verificar que la leche no esté alterada. Todos estos análisis se realizan tanto al recibir la leche como cuando la leche es procesada, especialmente para verificar la pasteurización, el envasado y su posterior almacenamiento.



## 4. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

La pasteurización o pasterización de la leche es un proceso que involucra un cambio térmico. Consiste primeramente en calentar la leche a una temperatura suficientemente alta por un tiempo suficientemente largo para matar a la mayor parte de bacterias, seguido de un enfriamiento a una temperatura baja. (4, 5)

En la industria de la leche hay dos tipos de pasteurización: 1) baja temperatura por largo tiempo o método de calentamiento y 2) alta temperatura por tiempo corto de aplicación. (4, 5, 9)

El método de pasteurización con baja temperatura y por largo tiempo tiene la característica de que se realiza a  $61.7^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 30 minutos, luego de lo cual se enfría rápidamente a  $10^{\circ}\text{C}$  para su envasado. En la pasteurización de alta temperatura en corto tiempo se emplea un equipo que es capaz de calentar la leche a una temperatura de  $72^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos. (4, 5)

Cualquiera que sea el método empleado es indispensable que el equipo esté diseñado y opere de manera que todas las partículas del lácteo sean calentadas a la temperatura indicada y mantenidas así durante el tiempo estipulado. Además, se deben tomar precauciones para evitar la recontaminación después de la pasteurización. El producto final debe ser almacenado a baja temperatura para retardar el desarrollo de los microorganismos que sobreviven a la pasteurización. (4, 5, 9)

Actualmente hay otro método de pasteurización, el cual es conocido como uperización o proceso UHT (por sus siglas en ingles) que significa ultra alta temperatura.

En la uperización, la temperatura del líquido sube hasta 150° C por inyección de vapor saturado o seco durante 1 o 2 segundos y produce la destrucción de todas las bacterias y esporas.

Después pasa por un proceso de fuerte enfriamiento a 4° C. El líquido esterilizado se puede conservar, teóricamente, durante un largo periodo de tiempo. La fecha límite de uso es de meses, ya que se pueden producir alteraciones en el interior del embalaje. Este método se utiliza sobre todo con la leche natural. Las pérdidas vitamínicas son mínimas: menos del 10% para las vitaminas C y B<sub>1</sub> y menos del 20% para la vitamina B<sub>2</sub>. El valor biológico de las [proteínas](#) no disminuye. (12)

¿Que es la esterilización de los alimentos? Consiste en colocar el alimento en recipiente cerrado y someterlo a elevada temperatura durante bastante tiempo para asegurar la destrucción de todos los gérmenes y enzimas. Cuanto más alta sea la temperatura de esterilización menor será el tiempo. A 140° C el proceso dura solamente unos segundos. (12)

El valor nutritivo de las conservas, debido a las condiciones de fabricación y el reducido tiempo de calor, es bastante óptimo, ya que no existe alteración de proteínas, carbohidratos y lípidos. La vitamina C de las verduras se conserva en más del 50% y en el 95% en las frutas y zumos de frutas. (12)

Las vitaminas del grupo B se preservan en un 80% y las vitaminas liposolubles A, D, E y K, sensibles a la luz y al aire, quedan protegidas en los recipientes opacos y herméticos (los envases de vidrio, debido a que dejan pasar los rayos ultravioletas, perjudican a las vitaminas en su conjunto). (12)

La esterilización de la leche es importante, ya que cuando la leche es estéril tiene varias propiedades útiles:

1. No necesita refrigeración
2. Tiene un tiempo indefinido de vida. (9)

En el pasado, la leche perdía un poco su sabor, pero por medio del proceso de uperización la situación ha cambiado. Sin embargo, la duración del producto sigue siendo de un tiempo definido: algunos meses. (9, 12)



## 5. PASTEURIZACIÓN POR ELECTRICIDAD

En la actualidad hay investigaciones sobre el uso de las corrientes eléctricas de alta y baja frecuencia como medios para destruir microorganismos. Tanto la utilización de la corriente eléctrica directa como la corriente eléctrica alterna han sido investigadas como medios físicos de esterilización de microorganismos. (9)

La forma en que se utiliza la corriente eléctrica para esterilizar consiste en hacer que la corriente eléctrica pase a través de un líquido que contiene los microorganismos; el paso de la corriente eléctrica en el líquido produce una serie de cambios complejos, tanto a nivel físico como químico. Estos cambios tienen un marcado efecto sobre los microorganismos, ya que matan a un gran porcentaje de estos. (10)

La causa de la muerte de las bacterias se puede atribuir a dos razones principales:

1. Al alza de temperatura producida por la corriente eléctrica cuando pasa a través de alguna sustancia. En este proceso se tiene un amperaje alto producido por la corriente eléctrica y una resistencia alta producida por la sustancia; de donde se obtiene una elevada producción de calor, que conlleva una alza de la temperatura de la sustancia y que afecta a las bacterias por su acción germicida. (9, 10)
2. A los cambios químicos iniciados por la corriente eléctrica en el fluido, en el cual la bacteria prácticamente está suspendida estos fluidos comúnmente contienen sales, las cuales son disociadas por la electricidad y se produce sodio y cloro.

Estos agentes químicos poseen una amplia acción germicida la cual afecta a las bacterias. En el proceso también se forma ozono, que tiene una acción germicida sobre las bacterias. (8, 9, 10)

Ahora bien, el uso de campos de pulsos eléctricos conlleva otros efectos sobre los microorganismos, tales como electroporación o electrofusión. La electroporación es la permeabilización de las membranas de células y organelos; la electrofusión es la conexión de dos células separadas en una sola. (2)

Los pulsos de campos eléctricos pueden influir en la formación y la rotación de cadenas de células. Cuando la célula es expuesta al campo eléctrico, la membrana de la célula pierde sus propiedades de semipermeabilidad, lo cual puede ser reversible, si es que la célula recobra su permeabilidad al apagar el campo eléctrico. Si no la membrana de la célula presenta un daño estructural, lo que resulta en una desactivación celular. (2)

## **6. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE LA INACTIVACIÓN MICROBIAL EN CAMPOS ELÉCTRICOS**

Una de las partes más importantes de la célula es su membrana, ya que esta desarrolla las siguientes funciones:

- a) Actúa como una barrera semipermeable.
- b) Expulsa fuera de la célula enzimas y material de las paredes de la célula.
- c) Es un lugar de mucha actividad compleja, incluye RNA, proteínas, síntesis de la pared celular, transporte de electrodos, etc.
- d) Juega un importante papel en el control de la síntesis del DNA.

Por eso cualquier daño a la membrana celular afecta sus funciones y puede conducir a la inhibición de la reproducción celular.

Los campos eléctricos pueden inducir a la formación de cadenas y la rotación de las células en el campo eléctrico. Cuando la membrana de la célula es expuesta a un campo eléctrico pierde sus propiedades de semipermeabilidad, lo cual puede ser reversible. Si lo es, la célula recupera la permeabilidad cuando el campo eléctrico es apagado; si no es reversible, la membrana de la célula es estructuralmente dañada y resulta inactiva.

Los cambios en la propiedad eléctrica se deben a la polarización de la membrana, que es lugar de la célula donde se acumulan cargas negativas y positivas, en áreas de la membrana cercanas al cátodo y al ánodo. Si la fuerza es lo suficientemente grande, la membrana puede romperse mecánicamente. Sin embargo, la descomposición eléctrica ocurre cuando las células son sometidas a pulsos eléctricos con duración de microsegundos y el campo eléctrico es aplicado de forma indirecta.

El aumento del intercambio molecular entre células, su medio ambiente y la fuerza celular llevan a un desbalance químico que causa la muerte celular, debido al aumento de la corriente eléctrica que genera la descomposición dieléctrica de la membrana.

Los electroporos pueden ser identificados como defectos de la membrana, grietas, cráteres o estructuras que aparecen al azar en la membrana, como ampollas. Algunos investigadores dicen que la base de la poración se debe al incremento del potencial transmembránico, la compresión electromecánica de la membrana y el aumento de defectos estructurales.

### **6.1 Potencial transmembránico**

En biología celular, la membrana actúa como un escudo aislador del citoplasma, cuya conductividad eléctrica es 6 a 8 veces más grande que el de la membrana. La membrana de la célula puede entonces ser vista como un capacitor cargado con una constante dieléctrica  $\epsilon = 2$ .

Cuando una célula es expuesta a un campo eléctrico, los iones en el interior de la célula se mueven a lo largo del campo eléctrico hasta que ellos son finalmente detenidos por la membrana celular.

Como resultado, se acumula cargas libres en ambas superficies de la membrana. La acumulación de más cargas en la superficie de la membrana aumenta la fuerza electromecánica o potencial transmembránico. El potencial transmembránico bajo la influencia de un campo eléctrico externo puede ser aproximadamente 500 veces más grande que el aplicado por el campo.



La acumulación de estas cargas en la superficie de la membrana provocan una fuerza de compresión que causa que el grueso de la membrana disminuya. Por lo tanto el aumento de la intensidad del campo eléctrico y de la fuerza de compresión conllevan a un potencial crítico de la membrana y subsecuentemente a una descomposición de la membrana o formación de poros. Entre más grande es la fuerza del campo, mucho más grandes serán las áreas de la membrana expuestas a descomposición. Si el tamaño y el número de los poros se vuelven más grandes en relación con la superficie de la membrana, la descomposición irreversible asociada con la destrucción mecánica de la célula ocurrirá.

## **6.2 Inestabilidad y compresión mecánica**

La primera consideración de la descomposición de la membrana es como consecuencia de una disminución del grueso de la membrana debido a la fuerza de compresión, donde la membrana experimenta un aumento en área por lípido, lo cual desestabiliza la membrana. Esta teoría de inestabilidad y compresión mecánica es la que justamente describe la suposición de que la membrana actúa como un capacitor que tiene una dieléctrica constante.



## **7. CAMBIOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS POR UN CAMPO ELÉCTRICO**

Algunos de los cambios inducidos por el campo eléctrico incluyen electropermeabilización, electrofusión y otros. Y con base en lo expuesto en los capítulos anteriores se tiene que el efecto principal de la exposición de la célula biológica a un campo eléctrico es el incremento del potencial transmembránico, el cual resulta en electroporación.

La formación de poros en la membrana de la célula induce a una descomposición reversible (eléctrica) o irreversible (mecánica) que depende de la magnitud del potencial transmembránico.

El campo eléctrico induce cambios estructurales en las células microbicas y en las membranas de diferentes microorganismos que dan soporte al principio de la inactivación microbica, que según parece es diferente de un microorganismo a otro.

### **7.1 Electropermeabilización**

La electropermeabilización es la llave de paso en el proceso de electrofusión o transferencia de DNA libre suspendido en la célula. Si la membrana es considerada como un capacitor, la carga del campo eléctrico hace que el potencial de la membrana induzca un incremento del potencial intrínseco de la membrana.

Cuando el potencial de membrana excede su valor crítico, ocurre la electropermeabilización o descomposición eléctrica reversible.

El primer efecto del campo eléctrico es que causa perturbaciones en la estructura de la membrana y conduce a un incremento en la permeabilidad de la membrana. Como efecto secundario ocurren cambios de las propiedades de la membrana y también en el interior de la célula. Se sabe que estos cambios dependen del tamaño y diámetro de la célula y del tiempo de exposición al campo eléctrico que provoca la descomposición eléctrica de las células. Células tales como los protoplastos, levaduras o células bacteriales se descomponen con pulsos eléctricos de una duración aproximadamente de 40 microsegundos.

Cuando las condiciones de descomposición celular a electroporación son las ideales, la ruptura de la membrana celular puede ocurrir permanentemente y los daños irreversibles en transpiración y división son inevitables.

Por lo tanto, la electroporación es un proceso que puede ser definido por una secuencia de tres etapas.

1. Formación de poro, 3 milisegundos después de aplicar el campo eléctrico o pulso.
2. Expansión del poro, 20 milisegundos después de aplicado el campo eléctrico, cuando la expansión es de 20 a 120 nanómetros en diámetro.
3. Disminución del poro y resellamiento del mismo segundos después del tratamiento eléctrico.

Si el campo persiste, el tamaño y el número de poros se incrementara manteniendo el potencial de membrana en un valor crítico. En conclusión el área de un poro formado puede aumentar al aumentar la duración del tratamiento.

## 7.2 Electrofusión

El concepto de fusión celular fue introducido a principios del año 1909, pero este concepto tenía severas limitaciones. En 1986 el investigador Zimmermann dio a conocer el método de electrofusión. Esta investigación expuso células dentro de una membrana impermeable a un campo eléctrico y consiguió fusionar las células en pares o múltiples por la aplicación de pulsos de corta duración en un campo eléctrico de alta intensidad.

La electrofusión suministró los avances de selectividad requeridos para la fusión de productos con un control eficiente del proceso de fusión y un alto grado de rendimiento de híbridos viables.

En la técnica de electrofusión con campo eléctrico homogéneo de baja intensidad, las células acaban moviéndose cercanamente a contacto de membrana, en orientación y alineación. Este movimiento de cuerpos celulares en el campo eléctrico es llamado dielectroporosis.

La presencia del campo eléctrico genera un dipolo en la célula porque pone en acción una fuerza neta, la cual estira la célula en la dirección de la alta intensidad del campo. Si las células se aproximan unas a otras durante la migración, es por que las fuerzas de atracción son mucho más grandes que las fuerzas de repulsión de la carga neta de la superficie de la membrana.

Todo esto resulta en la formación de cadenas lineales en las cuales las células microbiales están en un contacto muy cercano unas con otras.

Si la fuerza del campo es lo suficientemente grande, induce a la electropermeabilización. Entonces ocurre la descomposición eléctrica, predominantemente en el área de contacto, lo cual genera la fusión celular.

Finalmente durante el tratamiento eléctrico se presentan los cambios químicos, pero dependen del tipo y concentración inicial de microorganismos, volumen del medio utilizado, distribución de los radicales químicos y del material del electrodo utilizado. Debido a que las interacciones de estas variables son muy complejas, un alto control puede ser llevado a cabo para minimizar algunos cambios.

Cuando un campo eléctrico es aplicado en la forma de descargas de alto voltaje, la inactivación microbica ocurre principalmente por la acción química, la cual incluye la formación de oxígeno libre, hidrógeno, hidroxilo, radicales de hidroperóxidos y iones de metal de los electrodos.

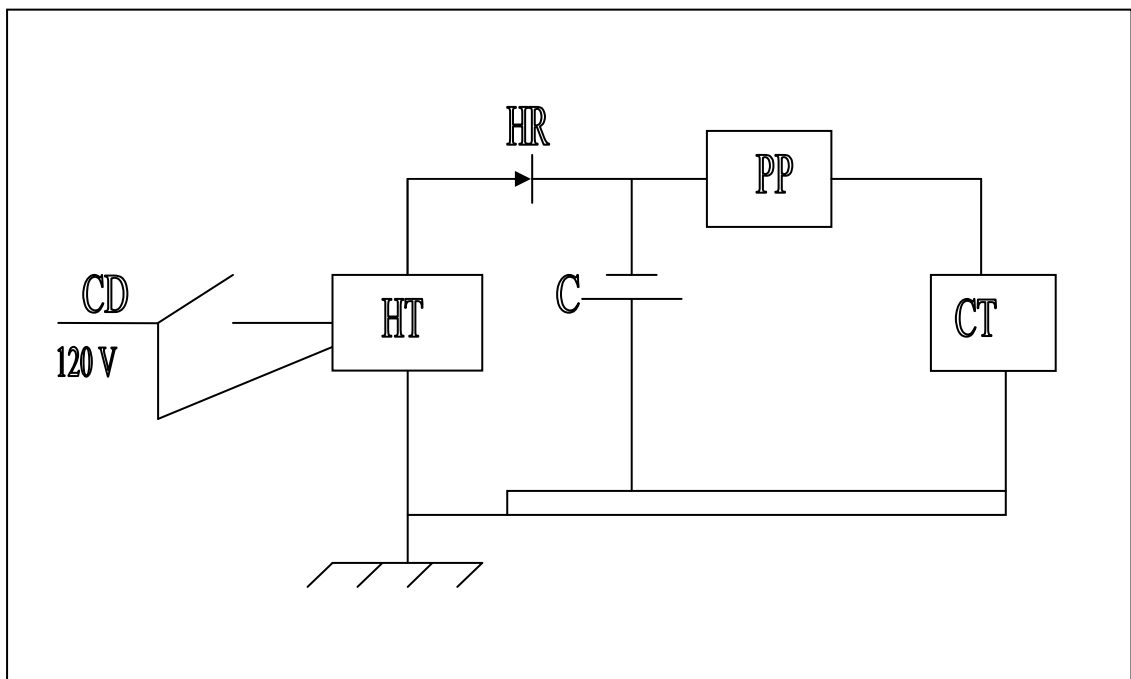
Investigaciones recientes han conducido a verificar que algunos cambios dieron un insignificante decremento de los atributos de calidad y en algunos casos se encontró que se preservaban mejor las características que con los métodos tradicionales de pasteurización. Pero una de las mayores razones para utilizar campos eléctricos es su naturaleza no térmica, especialmente cuando el producto a tratar no puede ser tratado térmicamente.

## 8. DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL ESTERILIZADOR

Para elaborar el diseño del esterilizador se investigaron varios diseños ya contruidos, algunos de ellos eran de corriente directa, corriente alterna y de pulsos eléctricos. Otros diseños eran a volumen constante y otros a flujo continuo. Todos presentaban ventajas y desventajas tanto en su fabricación como en el volumen que puede tratar.

Con base en la información obtenida, se elaboró un diagrama (figura 1), el cual muestra la forma en que se construyó el circuito eléctrico.

Figura 1. Diseño de esterilizador de pulsos eléctricos



La figura 1 muestra los siguientes elementos que conforman el esterilizador.

CD = Corriente directa

HT = Transformador de alto voltaje

HR = Rectificador de alto voltaje

C = Capacitor

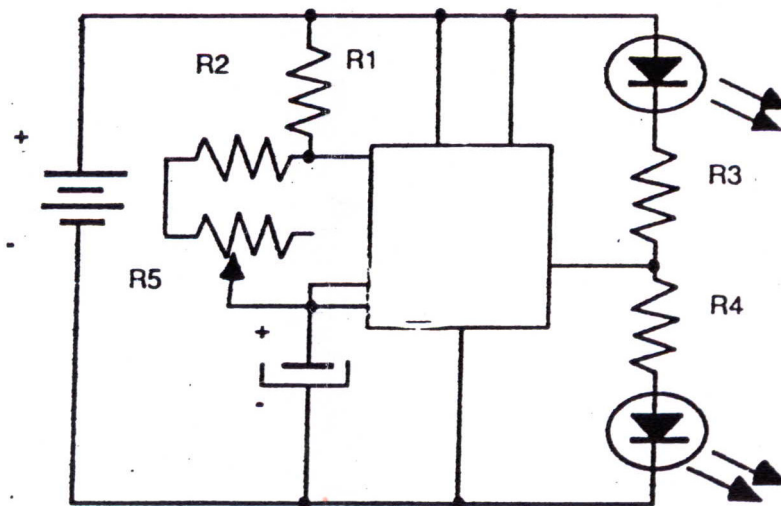
PP = Placa de pulsos

CT = Cámara de tratamiento

La figura 1 representa el diseño que se utilizó primero durante la evaluación del esterilizador. Para ello se puso a funcionar en los siguientes lapsos de tiempo: 10, 15, 20 y 30 minutos, en los que se observó cómo funcionaba la energía eléctrica como agente esterilizador.

En la figura 2 se puede apreciar el diseño de la placa generadora de los pulsos eléctricos, la cual era la encargada de generar los pulsos eléctricos que llegaban a la cámara de tratamiento, en donde se encontraba la leche.

Figura 2. Placa de pulsos electrónicos

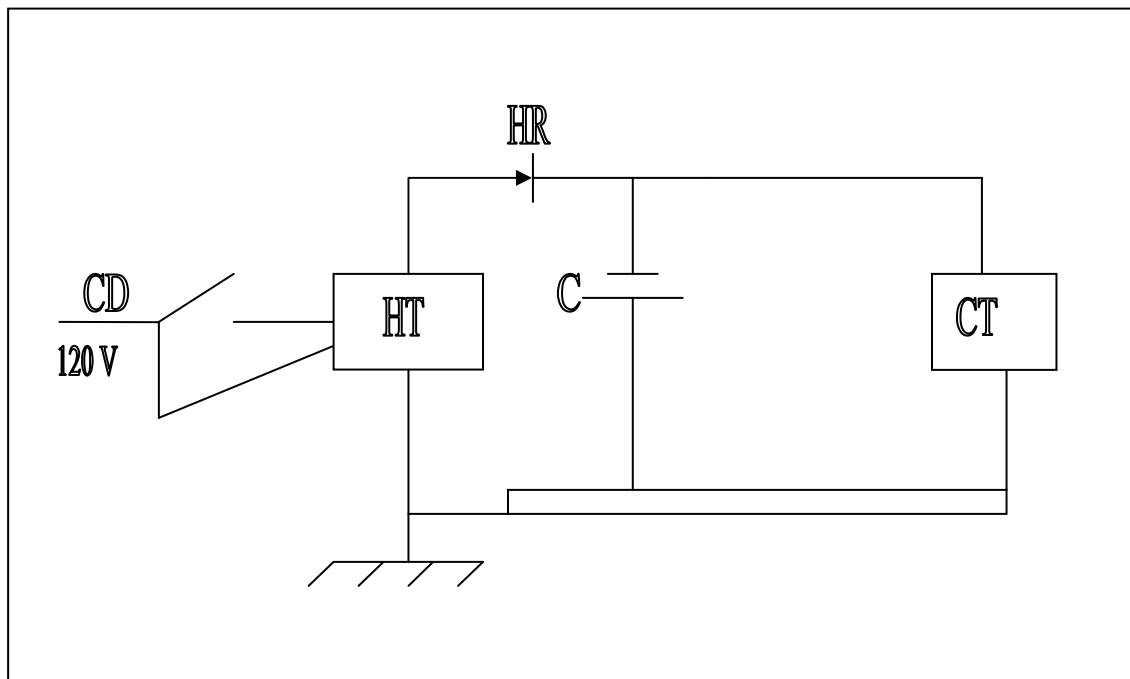




El símbolo R, en la figura 2, es la representación de resistencia. En el diagrama se cuenta con un total de cinco, que conforman el circuito principal de la placa de pulsos.

El primer diseño fue modificado para poder comprobar la efectividad de la energía eléctrica. Se eliminó la placa de pulsos eléctricos y se dejó que la corriente fuera directa a la cámara de tratamiento. Esto se observa en la figura 3.

Figura 3. Diseño de esterilizador de corriente continua



En ambos diseños del esterilizador se cuenta con un transformador de alto voltaje de 10,000 voltios, trabaja a cuatro amperios y con una frecuencia de 60 Hz.

La placa de pulsos dispara pulsos con una duración de  $5 \times 10^{-9}$  segundos y cuenta con una batería de 9 voltios como fuente de energía.

Finalmente, en el anexo C – Fotografías, se puede observar el esterilizador ya instalado en el laboratorio de Química y Microbiología Sanitaria, así como también algunas fotografías del depósito y de los tubos de ensayo utilizados para realizar las pruebas de azul de metileno.

## 9. RESULTADOS

La prueba microbiológica utilizada para poder comprobar la hipótesis del esterilizador eléctrico para la leche fue la prueba de azul de metileno. Esta prueba dio los siguientes resultados para leche sin pasteurizar y pasteurizada a diferentes tiempos.

**Tabla I. Leche cruda**

Corrida	Tiempo (min.)	Calidad
01	16	Muy mala
02	13	Muy mala
03	15	Muy mala
04	13	Muy mala
05	15	Muy mala
06	13	Muy mala
07	15	Muy mala
08	14	Muy mala
09	17	Muy mala
10	14	Muy mala
11	16	Muy mala
12	15	Muy mala
13	14	Muy mala
14	18	Muy mala
15	15	Muy mala
16	18	Muy mala
17	16	Muy mala
18	19	Muy mala
19	18	Muy mala
20	15	Muy mala
21	17	Muy mala
22	14	Muy mala
23	15	Muy mala
24	18	Muy mala

La leche tratada por pulsos eléctricos con diferentes intervalos de tiempo de tratamiento dio los siguientes resultados.

**Tabla II. Tiempo de 10 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	33	Mala
02	30	Mala
03	32	Mala
04	32	Mala
05	33	Mala
06	31	Mala

**Tabla III. Tiempo de 15 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	46	Mala
02	44	Mala
03	45	Mala
04	47	Mala
05	48	Mala
06	47	Mala

**Tabla IV. Tiempo de 20 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	75	Mala
02	75	Mala
03	73	Mala
04	76	Mala
05	75	Mala
06	73	Mala

**Tabla V. Tiempo de 30 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	126	Mediocre
02	127	Mediocre
03	124	Mediocre
04	125	Mediocre
05	126	Mediocre
06	123	Mediocre

La leche tratada por medio de corriente directa a diferentes intervalos de tiempo de exposición dio los siguientes resultados.

**Tabla VI. Tiempo de 10 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	35	Mala
02	34	Mala
03	36	Mala
04	35	Mala
05	36	Mala
06	35	Mala

**Tabla VII. Tiempo de 15 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	56	Mala
02	58	Mala
03	59	Mala
04	57	Mala
05	59	Mala
06	56	Mala

**Tabla VIII. Tiempo de 20 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	75	Mala
02	74	Mala
03	78	Mala
04	76	Mala
05	76	Mala
06	78	Mala

**Tabla IX. Tiempo de 30 minutos**

Corrida	Tiempo (min)	Calidad
01	136	Mala
02	138	Mala
03	137	Mala
04	136	Mala
05	137	Mala
06	136	Mala

Las dos tablas siguientes contienen los tiempos promedios de cada tipo de tratamiento de pasteurización.

**Tabla X. Tiempos promedios para pulsos eléctricos**

	Tiempo de tratamiento			
	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
Tiempo de reacción	31.833	46.1667	74.5	125.17

**Tabla XI. Tiempos promedios para corriente directa**

	Tiempo de tratamiento			
	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
Tiempo de reacción	35.1667	57.5	76.167	136.667

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la evaluación del tratamiento de pasteurización por medio de electricidad fueron bastante similares al utilizar tanto pulsos eléctricos como corriente directa en la leche.

Los resultados son bastante similares debido a que la leche utilizada para este estudio procedía del mismo lugar y con la misma calidad. La leche se expuso a condiciones de contaminación tanto por manipulación como exposición al ambiente para lograr que su calidad no fuera óptima y así poder comprobar si el aparato diseñado para pasteurizar funcionaba o no.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, y para poder comprobar la hipótesis en la que se sustenta este estudio, el mejor método de análisis químico microbiológico para este caso es la prueba de azul de metileno o prueba de reductasa. Esta prueba consiste en observar cuanto tiempo tarda la leche en decolorar el azul de metileno y volver a su color inicial. Se escogió esta prueba ya que la calidad de la leche se basa en el tiempo que tarda en decolorar el azul de metileno. Los detalles de la prueba de azul de metileno están en el anexo B, donde se muestra la relación que existe entre el tiempo de decoloración y la calidad de la leche.

No se utilizaron otros métodos de análisis microbiológico a la leche tales como recuento en plato estándar o la prueba de fosfatasa. Esto se debió al hecho de que la prueba de fosfatasa solo indica si la leche está pasteurizada o no. En el caso del recuento en plato estándar la muestra inicial del nivel de contaminación iba a ser alto y lógicamente el siguiente debería haber sido más bajo, pero implicaba no poder tener resultados mas rápidos para determinar si el esterilizador estaba cumpliendo con su objetivo principal.

Como se observa en resultados tabla I, Leche cruda, la mayoría de los tiempos obtenidos fue de 15 minutos, lo cual con base en la clasificación del anexo B, revela que la leche tenía una calidad muy mala. Con los resultados de la tabla I, Leche cruda, se obtuvo una media estadística de 15.54 minutos, con lo que se confirma que la mayoría de los tiempos se encontraron en un rango de 15 a 16 minutos y que la leche que se utilizó en el experimento era una leche contaminada. Este resultado se puede visualizar mejor al observar la figura 13 del anexo A.

Los resultados de las tablas II, III, IV y V muestran la relación entre el tiempo de tratamiento de pasteurización por pulsos eléctricos y la calidad de la leche. Como se puede observar, el tiempo de tratamiento no fue suficiente para obtener una leche de calidad buena, pero también se tiene que en las tablas II, III y IV, aunque la calidad de leche reportada es mala, demuestra que el proceso sí funciona, ya que el tiempo de decoloración del azul de metileno fue aumentando con relación al tiempo de tratamiento.

Al observar el desarrollo del tratamiento se puede ver que la leche pasó de una calidad muy mala a una calidad mala y finalmente a una calidad mediocre. Estos resultados ayudan a confirmar la hipótesis que sustenta esta tesis, ya que la energía eléctrica funcionó como un agente germicida, mejorando la calidad de la leche tratada. Pero debido al diseño del aparato, que fue por lotes, y a la cantidad de leche tratada en el depósito de tratamiento no se obtuvo una leche de buena calidad.

En la tabla X se muestran los resultados promedios de la decoloración del azul de metileno con respecto al tiempo de tratamiento de pulsos eléctricos. Con base en esta información, se elaboró la figura 11 (ver anexo A), la cual muestra una tendencia lineal de los resultados, y esto se comprobó al realizar una regresión lineal de los datos. Se utilizó la regresión lineal porque fue la que tenía mejor coeficiente de regresión.



Con respecto a los resultados de las tablas VI, VII, VIII y IX, son similares a los de las tablas II, III, IV y V con respecto a la calidad obtenida, pero difieren en algunos minutos de tiempo de decoloración de azul de metileno, ya que el tratamiento de pasteurización por medio de corriente directa presentó un ligero aumento de tiempo de decoloración del azul de metileno.

Esto se pudo deber a varios factores tales como que la placa de pulsos y el condensador están creando una resistencia eléctrica que generaba pérdida de calor al ambiente y disminuía la eficiencia de los demás componentes del esterilizador, por lo que se continuó la fase experimental, pero esta vez solo con corriente directa.

Con respecto a los problemas que se presentaron con la placa de pulsos, como esta utilizaba una batería de 9 voltios para funcionar, después de dos días de uso se tenía que cambiar al empezar la segunda corrida de datos, por lo que la segunda corrida empezaba con una batería con carga completa.

Los resultados fueron satisfactorios, ya que el volumen utilizado en el proceso por lotes fue de 300 mililitros y una separación de 2 centímetros entre los electrodos de acero inoxidable. Un volumen menor y una menor separación entre electrodos daría mejores resultados. Sería interesante evaluar el proceso pero en forma continua, ya no por lotes.

Otro posible factor de variación de tiempo es la misma solución de azul de metileno, ya que para la primera fase se contaba con una solución de metileno preparada en el laboratorio hace varios años (1982). Para la segunda fase, se preparó una nueva solución la cual daba un color celeste un poco más oscuro que en la primera fase.

Aun con estas variaciones, la calidad de la leche estuvo dentro de los mismos rangos de calidad. Para el caso del tratamiento de la leche por medio de corriente directa, la tabla XI muestra la relación de los tiempos promedio de decoloración contra el tiempo de tratamiento. Con base en esta tabla, se elaboró la figura 12. Con esta información se realizó una regresión potencial ya que tenía el mejor coeficiente de regresión.

El tratamiento de leche por pasteurización por medio de corriente eléctrica no es un método nuevo, pero sí innovador ya que la mayor parte de los procesos de pasteurización se realizan por medio de la irradiación de calor al producto que se desea pasteurizar o esterilizar. Pero la mayor desventaja que tiene el uso de calor es que varios productos pierden sus propiedades organolépticas, las cuales son muy apreciadas. En el caso de la leche, el consumidor desea obtener una leche con un sabor agradable y no con sabor a leche cocida.

Es aquí donde el método de esterilización o pasteurización eléctrica entra en juego, ya que su principal ventaja es que aunque se produce un ligero aumento de la temperatura, este aumento no afecta las propiedades organolépticas de los productos. En este caso, la leche al inicio del tratamiento eléctrico tenía una temperatura de 19 °C, pero al cabo de 10 minutos la temperatura subió a 23 °C y al llegar a un tiempo de 20 minutos la temperatura era de 25 °C, la cual se mantuvo aunque el tiempo aumentó a 30 minutos de tratamiento.

El tratamiento se realizó con una corriente eléctrica de 10,000 Voltios, un amperaje de 4 amperios y, para la placa de pulso, una frecuencia de 60 Hz. Tanto el voltaje como el amperaje fueron iguales para corriente directa como para campo de pulsos eléctricos, pero los pulsos tuvieron una duración de  $5 \times 10^{-9}$  segundos. Las propiedades organolépticas no se afectaron, porque la leche conservó su sabor, color y olor característicos.

Otros factores muy importantes para el empleo del esterilizador eléctrico es que provoca cambios biológicos, tales como electropermeabilización y electrofusión. Estos dos procesos provocan cambios muy importantes en la biología de los microorganismos. La electropermeabilización es el primer paso para la electrofusión y este paso consiste en que la corriente eléctrica provoca la elevación del potencial transmembránico, lo cual conlleva la formación de poros en la superficie de la membrana. Si continúa la exposición a la corriente eléctrica, los poros serán mas grandes y el daño a la membrana será irreversible.

La electrofusión se produce cuando se crea una conexión o fusión de dos células separadas en una sola y sigue así hasta que se llega a formar cadenas de células unidas en lugar de células individuales. Lamentablemente esta parte de los efectos del campo eléctrico no se pudieron comprobar, ya que para poder observarlos se necesita de un microscopio electrónico de transmisión.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos por el esterilizador por campo de pulsos eléctricos y el de corriente directa comprueban la acción germicida de la corriente eléctrica, que confirma la hipótesis.
2. El esterilizador por pulsos eléctricos y el de corriente directa comprueban que la concentración de microorganismos contaminantes en la muestra sí afecta el tiempo de reacción de decoloración del azul de metileno.
3. Independientemente de la variación de tiempos entre las dos técnicas de pasteurización utilizadas, la calidad de leche reportada fue similar, lo que demuestra que el proceso con corriente eléctrica es efectivo por el momento solo como agente germicida y no como agente esterilizador.
4. Los resultados obtenidos en ambos métodos de pasteurización comprueban que entre más tiempo estuvo la leche en tratamiento la calidad mejoró gradualmente.

## **RECOMENDACIONES**

1. Evaluar un esterilizador de corriente eléctrica con flujo continuo en lugar del proceso por lotes.
2. Realizar un análisis económico de la factibilidad de realizar el proceso, ya sea por corriente directa o por pulsos.
3. Estudiar y desarrollar nuevas técnicas para procesos de esterilización y de pasteurización de productos con propiedades organolépticas, que se pierden al utilizar métodos que empleen calor.
4. Realizar análisis microbiológicos más exhaustivos a la leche tratada por medio de energía eléctrica, tales como recuento estándar en placa, prueba de reductasa y prueba de fosfatasa.
5. Utilizar leche en estado normal, o sea no contaminar la leche y comprobar si se puede obtener el grado de excelencia que se buscaba.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Austin, George. **Manual de procesos químicos en la industria**. 5ª. ed. México: UTEHA, 1992. 876 pp.
2. Barbosa, Gustavo et al. **Preservation of foods with pulsed electric field**. United State of America: Academic Press, 1999. 191 pp.
3. Fraizer, W. C. **Microbiología de los alimentos**. España: Edit. Acribia, 1962. 357 pp.
4. Hammer, Bernard et. al. **Dairy Bacteriology**. 3<sup>rd</sup>. edition. United State of America: Wiley editorial, 1948. 535 pp.
5. Henderson, James L. **The fluid milk industry**. 3<sup>rd</sup>. Edition. United State of America: The Avi publishing company, inc., 1971. 403 pp.
6. Kirk, Raymond et. al. **Enciclopedia de tecnología química**. ( tomo X) México: UTEHA, 1962. 1364 pp.
7. Kirk, Raymond et. al. **Enciclopedia de tecnología química**. ( tomo VII) México: UTEHA, 1962. 1232 pp.
8. McCulloch, Ernest. **Desinfection and sterilization**. United State of America: Editorial Lea & Febiger, 1936. 289 pp.
9. Pelczar, Michael et. al. **Microbiología**. 4ª. ed. México: McGraw Hill, 1982. 826 pp.
10. Sato, Masayuki et. al., “Sterilization of microorganisms by a high voltage, pulsed discharge under water”, **International Chemical Engineering**. (Estados Unidos de América) (30): 68. 1990.
11. Wong, Noble et. al. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3<sup>rd</sup>. edition. United State of America: Aspen publication, 1999. 617 pp.
12. Rico, Maria Antonia. Cuando se empieza a conservar los alimentos. [http://www.saludalia.com/Saludalia/web\\_saludalia/vivir\\_sano/doc/i\\_vivir\\_sano.htm](http://www.saludalia.com/Saludalia/web_saludalia/vivir_sano/doc/i_vivir_sano.htm) (4 octubre de 2001)

## ANEXO A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los siguientes datos fueron obtenidos durante el periodo del 27 de julio al 3 de agosto de 2004.

Los datos de la tabla XII son los siguientes: C #1 y C #2 son las muestras de leche cruda, P1.1, P1.2, P2.1 y P2.2 son las muestras tratadas en el pasteurizador por medio de pulsos eléctricos, donde 1.1 es la muestra 1 en el tratamiento 1 y 1.2 es la muestra 1 en el tratamiento 2.

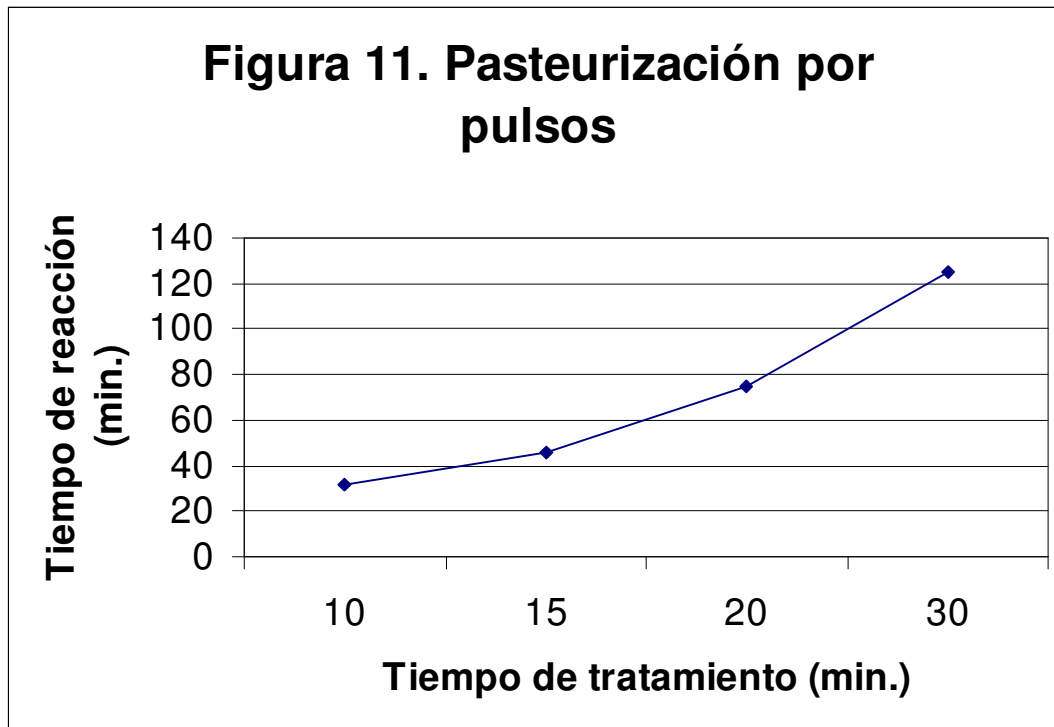
**Tabla XII. Datos obtenidos del proceso de pasteurización por pulsos eléctricos**

Fecha	C #1	C #2	P 1.1	P 1.2	P 2.1	P 2.2
27-Jul	16	13	46	126	44	127
28-Jul	15	13	45	124	47	125
29-Jul	15	13	48	126	47	123
30-Jul	15	14	33	75	30	75
2-Ago	17	14	32	73	32	76
3-Ago	16	15	33	75	31	73

**Tabla XIII. Datos ordenados por tiempo de tratamiento con su promedio**

PRUEBA	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
1	33	46	75	126
2	30	44	75	127
3	32	45	73	124
4	32	47	76	125
5	33	48	75	126
6	31	47	73	123
Promedio	31.833	46.1667	74.5	125.17

Con los tiempos promedios se realizó una gráfica, que se presenta a continuación (ver figura 11 siguiente página).



Los siguientes datos fueron obtenidos durante el periodo del 4 de agosto al 13 de agosto de 2004.

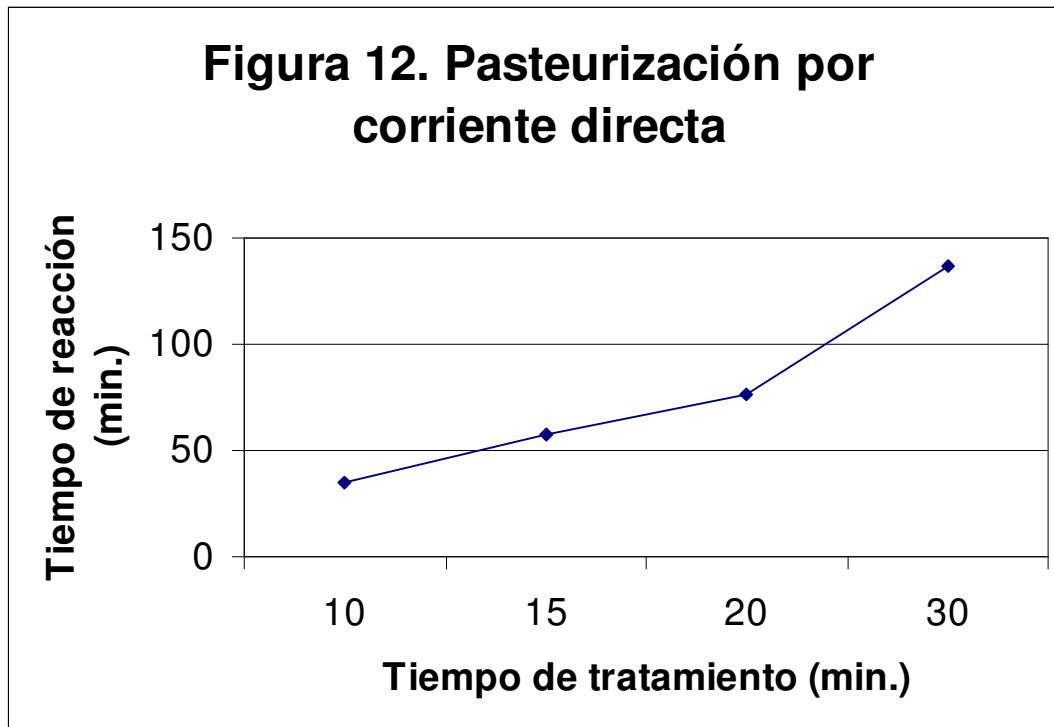
**Tabla XIV. Datos obtenidos del proceso de pasteurización por corriente directa**

Fecha	C #1	C #2	P 1.1	P 1.2	P 2.1	P 2.2
4-Ago	14	18	35	75	34	74
5-Ago	15	18	56	136	58	138
6-Ago	16	19	36	78	35	76
10-Ago	18	15	36	76	35	78
11-Ago	17	14	59	137	57	136
13-Ago	15	18	59	137	56	136

**Tabla XV. Datos ordenados por tiempo con su promedio en corriente directa**

PRUEBA	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
1	35	56	75	136
2	34	58	74	138
3	36	59	78	137
4	35	57	76	136
5	36	59	76	137
6	35	56	78	136
Promedio	35.1667	57.5	76.167	136.667





Los datos representados en la figura 12 son los tiempos promedios en el proceso de pasteurización por medio de corriente directa.

El análisis de la media aritmética de los tiempos obtenidos para las pruebas de azul de metileno de la leche cruda están en la tabla XVI y representados en la figura 13 de la siguiente página.

**Tabla XVI. Análisis estadístico para la leche cruda**

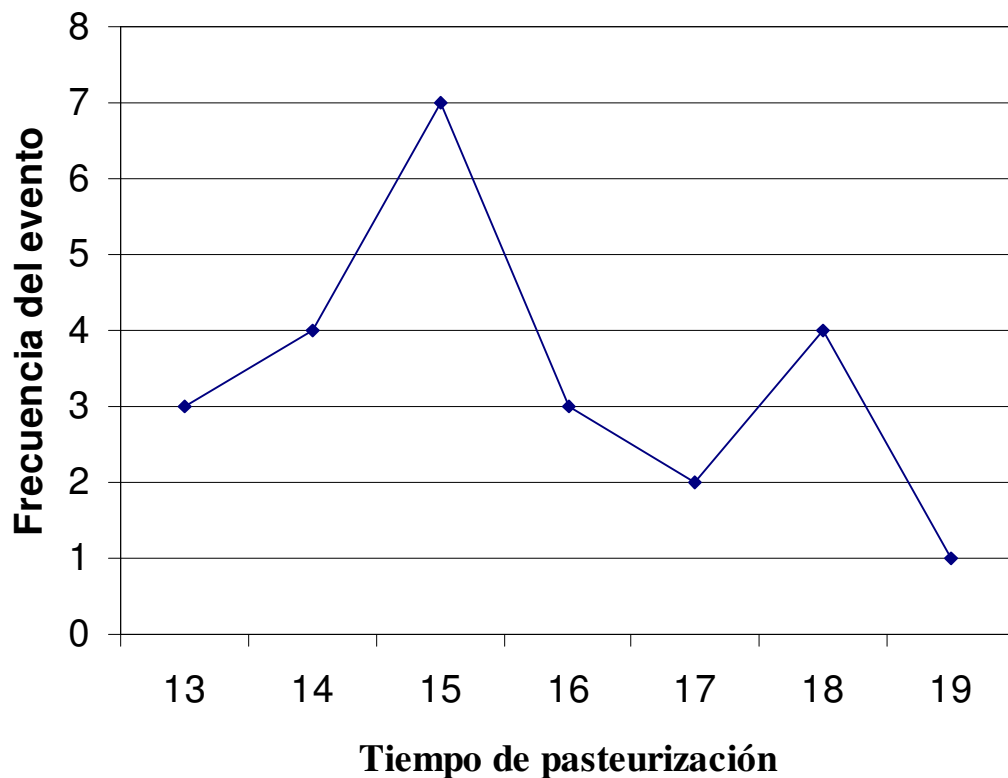
X	F	F*X
13	3	39
14	4	56
15	7	105
16	3	48
17	2	34
18	4	72
19	1	19

$$N = 24 \quad 373$$

$$\text{media} = \frac{\sum F \cdot X}{n} = 15.54$$

La media de los tiempos para la leche cruda es de 15.54; por lo tanto, la mayoría de los resultados obtenidos están entre 15 y 16 minutos, como se observa en la figura 13.

**Figura #13. Polígono de frecuencias para leche cruda**



El análisis estadístico realizado a los tiempos de decoloración del azul de metileno al utilizar el tratamiento de pulsos eléctricos fue la comprobación estadística de la hipótesis, que sirve para determinar que los datos no son iguales y que evidencian que el aumento del tiempo de tratamiento es la mejor forma para lograr la optimización de la calidad de la leche.

$$H_0: \mu_{10} = \mu_{15} = \mu_{20} = \mu_{30}$$

$$H_a: \mu_{10} \neq \mu_{15} \neq \mu_{20} \neq \mu_{30}$$

$$N = n_{x1} + n_{x2} + n_{x3} + n_{x4} = 6 + 6 + 6 + 6 = 24$$

	x1	x2	x3	x4
	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
	33	46	75	126
	30	44	75	127
	32	45	73	124
	32	47	76	125
	33	48	75	126
	31	47	73	123
$\sum x$	191	277	447	751

$$\sum XT = 1666$$

x1 <sup>2</sup>	X2 <sup>2</sup>	x3 <sup>2</sup>	x4 <sup>2</sup>	
1089	2116	5625	15876	
900	1936	5625	16129	
1024	2025	5329	15376	
1024	2209	5776	15625	
1089	2304	5625	15876	
961	2209	5329	15129	
6087	12799	33309	94011	146206 = $\sum X^2T$

gl = grados de libertad

$$\text{Inter.} = \# \text{ grupos} - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$\text{Intra} = N - \text{inter} = 24 - 3 = 21$$

$\sum c^2$  = valor correspondiente al intra o el inter.

$$Sc_{inter} = \sum (\sum X^2/n) - (\sum XT)^2/N$$

$$Sc_{inter} = (191^2/6 + 277^2/6 + 447^2/6 + 751^2/6) - 1666^2/24$$

$$Sc_{inter} = 30522$$

$$Sc_{intra} = S_{ct} - Sc_{inter}$$

Sc <sub>intra</sub> =	30557.8	-30522	35.8
-----------------------	---------	--------	------

			Cuadros
Fuente			Medio
Variación	gl	$\sum c^2$	$\sum c^2 / gl$
Inter....	3	30522	10174
Intra	21	35.8	1.705
Total	24	30558	

$F = (\sum c^2 / gl \text{ inter}) / (\sum c^2 / gl \text{ intra})$   
 $F = 10174 / 1.705 = 5968$

Utilizando una tabla de análisis de varianza de valores críticos de  $F$  a varios niveles de probabilidad se tiene que con un valor de 3.07 se rechaza la  $H_0$ , ya que para aceptarla se tendría que tener un valor por debajo de 3.07 en la variable  $F$ .

Prueba posterior, decisión de que si se rechaza  $H_0$

$F \text{ de tabla} = F_T = \text{dato tabla} * gl \text{ inter} = 3.07 * 3 = 9.21$

Media  $X_1 = 31.833$

Media  $X_2 = 46.1667$

Media  $X_3 = 74.5$

Media  $X_4 = 125.17$

$sw^2 = \sum \text{cuadromediointra} = 1.705$

$F_p = F_{ab} = (\text{media a} - \text{media b})^2 / (sw^2 * ((na+nb)/(na*nb)))$

A	B	C	D
10	15	20	30

pruebas a realizar

A-B      B-C

A-C      B-D

A-D      C-D

Na	6
Nb	6
nC	6
Nd	6

$$F_{AB} = ((\text{media } xA - \text{media } xB)^2 / (s_w^2((nA+nB)/(nA*nB))))$$

$$F_{AB} = ((31.833 - 46.1667)^2 / (1.705 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{AB} = 205.4949557 / 0.56833$$

$$F_{AB} = 361.57$$

$$F_{AC} = ((\text{media } xA - \text{media } xC)^2 / (s_w^2((nA+nC)/(nA*nC))))$$

$$F_{AC} = ((31.833 - 74.5)^2 / (1.705 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{AC} = 1820.47 / 0.56833$$

$$F_{AC} = 3203.19$$

$$F_{AD} = ((\text{media } xA - \text{media } xD)^2 / (s_w^2((nA+nD)/(nA*nD))))$$

$$F_{AD} = ((31.833 - 125.17)^2 / (1.705 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{AD} = 8711.79 / 0.56833$$

$$F_{AD} = 15328.76$$

$$F_{BC} = ((\text{media } xB - \text{media } xC)^2 / (s_w^2((nB+nC)/(nB*nC))))$$

$$F_{BC} = ((46.1667 - 74.5)^2 / (1.705 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{BC} = 802.77 / 0.56833$$

$$F_{BC} = 1412.51$$

$$F_{BD} = ((\text{media } xB - \text{media } xD)^2 / (s_w^2((nB+nD)/(nB*nD))))$$

$$F_{BD} = ((46.1667 - 125.17)^2 / (1.705 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{BD} = 6241.52 / 0.56833$$

$$F_{BD} = 10982.21$$

$$F_{CD} = ((\text{media } xC - \text{media } xD)^2 / (s_w^2((nC+nD)/(nD*nC))))$$

$$F_{CD} = ((74.5 - 125.17)^2 / (1.705 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{CD} = 2567.45 / 0.56833$$

$$F_{CD} = 4517.54$$

Conclusión: de acuerdo con los resultados obtenidos en las anteriores ecuaciones, se ha demostrado que no existe ninguna igualdad entre las columnas, lo que evidencia que entre más tiempo se pasteurice más efectivo será el tratamiento.

El análisis estadístico que se realizó a los datos promedio del tratamiento con corriente directa es igual que en el caso anterior y se obtuvo lo siguiente:

$$H_0: \mu_{10} = \mu_{15} = \mu_{20} = \mu_{30}$$

$$H_a: \mu_{10} \neq \mu_{15} \neq \mu_{20} \neq \mu_{30}$$

$$N = n_{x1} + n_{x2} + n_{x3} + n_{x4} = 6 + 6 + 6 + 6 = 24$$

$$S_{ct} = \sum X^2T - (\sum XT)^2/N$$

$$S_{ct} = 86284 - (1833^2/24)$$

$$S_{ct} = 34166$$

X1	X2	x3	x4
10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
35	56	75	136
34	58	74	138
36	59	78	137
35	57	76	136
36	59	76	137
35	56	78	136
211	345	457	820

$$\sum XT = 1833$$

x1 <sup>2</sup>	X2 <sup>2</sup>	X3 <sup>2</sup>	x4 <sup>2</sup>
1225	3136	5625	18496
1156	3364	5476	19044
1296	3481	6084	18769
1225	3249	5776	18496
1296	3481	5776	18769
1225	3136	6084	18496
7423	19847	34821	112070

$$Scinter = \sum(\sum X^2/n) - (\sum XT)^2/N$$

$$Scinter = (211^2/6 + 345^2/6 + 457^2/6 + 820^2/6) - 1833^2/24$$

$$Scinter = 34137$$

$$Scintra = Sct - Scinter$$

Scintra =	34166	-34137	28.5
-----------	-------	--------	------

gl = grados de libertad

$$Inter. = \# \text{ grupos} - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$Intra = N - inter = 24 - 3 = 21$$

$\sum c^2$  = valor correspondiente al intra o el Inter.

Fuente Variación	gl	$\sum c^2$	Cuadros Medio
			$\sum c^2/gl$
Inter.	3	34137	11379
Intra	21	28.5	1.357
Total	24	34166	

Utilizando una tabla de análisis de varianza de valores críticos de  $F$  a varios niveles de probabilidad se tiene que con un valor crítico de 3.07 se rechaza  $H_0$ , ya que para aceptarla se tendría que tener un valor por debajo de 3.07 en la variable  $F$

Prueba posterior, decisión de que si se rechaza  $H_0$

$$F \text{ de tabla} = FT = \text{dato tabla} * gl \text{ inter} = 3.07 * 3 = 9.21$$

$$\text{media } X_1 = 35.17$$

$$\text{media } X_2 = 57.5$$

$$\text{media } X_3 = 76.17$$

$$\text{media } X_4 = 136.7$$

$$sw^2 = \sum \text{cuadromediointra} = 1.357$$

$$F_p = F_{ab} = (\text{media } a - \text{media } b)^2 / (sw^2((na+nb)/(na*nb)))$$

A	B	C	D
10	15	20	30

pruebas a realizar

A-B	B-C	nA	6
A-C	B-D	nB	6
A-D	C-D	nC	6
		nD	6

$$F_{AB} = ((\text{media } xA - \text{media } xB)^2 / (sw^2((nA+nB)/(nA*nB))))$$

$$F_{AB} = ((35.1667 - 57.5)^2 / (1.357 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{AB} = 498.776 / 0.45233$$

$$F_{AB} = 1103$$

$$F_{AC} = ((\text{media } xA - \text{media } xC)^2 / (sw^2((nA+nC)/(nA*nC))))$$

$$F_{AC} = ((35.1667 - 76.167)^2 / (1.357 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{AC} = 1681.02 / 0.45233$$

$$F_{AC} = 3716.35$$

$$F_{AD} = ((\text{media } xA - \text{media } xD)^2 / (sw^2((nA+nD)/(nA*nD))))$$

$$F_{AD} = ((35.1667 - 136.667)^2 / (1.357 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{AD} = 10302.31 / 0.45233$$

$$F_{AD} = 22776.09$$

$$F_{BC} = ((\text{media } xB - \text{media } xC)^2 / (sw^2((nB+nC)/(nB*nC))))$$

$$F_{BC} = ((57.5 - 76.167)^2 / (1.357 * ((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{BC} = 348.46 / 0.45233$$

$$F_{BC} = 770.37$$



$$F_{BD} = ((\text{media } x_B - \text{media } x_D)^2 / (s_w^2((n_B+n_D)/(n_B*n_D))))$$

$$F_{BD} = ((57.5 - 136.667)^2 / (1.357*((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{BD} = 6267.41 / 0.45233$$

$$F_{BD} = 13855.84$$

$$F_{CD} = ((\text{media } x_C - \text{media } x_D)^2 / (s_w^2((n_C+n_D)/(n_D*n_C))))$$

$$F_{CD} = ((76.167 - 136.667)^2 / (1.357*((6+6)/(6*6))))$$

$$F_{CD} = 3660.25 / 0.45233$$

$$F_{CD} = 8091.99$$

Conclusión: con los resultados obtenidos en las anteriores ecuaciones, se ha demostrado que no existe ninguna igualdad entre las columnas; por lo tanto, es evidente que entre más tiempo se pasteurice más efectivo será el tratamiento.

## ANEXO B. PRUEBA DE AZUL DE METILENO

Se debe trabajar en condiciones de esterilidad y evitar la exposición a la luz solar de la muestra.

### Técnica

Colocar en un tubo de ensayo 10 ml de leche evitando mojar el costado de la pared interior del tubo. Agregar 1 ml de solución de azul de metileno sin que la punta de la pipeta entre en contacto con la leche. Tapar el tubo con un tapón de algodón y colocarlo en un baño de agua a 37-38 °C. El nivel de agua en el baño debe exceder al de la leche en el tubo. Medir el tiempo en que se produce decoloración total de la superficie.

La leche se clasificará según la siguiente tabla:

No.	Calidad	Tiempo
1.	Muy mala	Se decolora antes de los 20 min.
2.	Mala	Se decolora entre 20 min. y 2 h.
3.	Mediocre	Se decolora entre las 2 h y 5 h.
4.	Buena	Conserva el color por más de 5 h.

## ANEXO C. FOTOGRAFÍAS

Las siguientes son fotografías del esterilizador elaborado para verificar la hipótesis que sustenta esta tesis. La figura 4 muestra la vista lateral del pasteurizador. En esta figura se muestra la parte exterior del esterilizador.

Figura 4. Vista lateral del esterilizador.



La figura 5, vista del pasteurizador abierto. En esta figura se observa las conexiones de la tapera, un ventilador y el depósito de pasteurización.

Figura 5. Esterilizador abierto.



Figura 6, muestra las conexiones y compuestos internos del pasteurizador, en la figura 7 y 8 se observa el depósito de tratamiento.

Figura 6. Vista del interior del esterilizador.

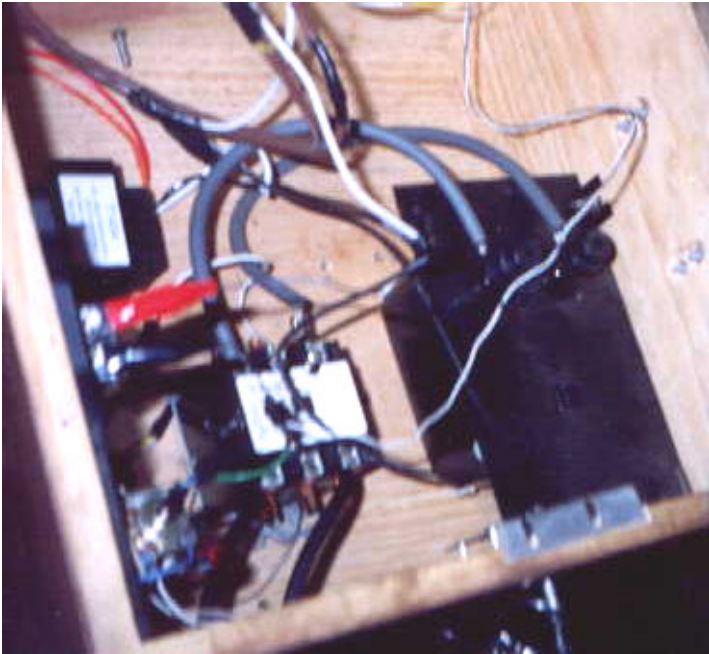


Figura 7  
Vista lateral del depósito



Figura 8  
Vista superior del depósito



En la figura 9 se puede observar los tubos de ensayo utilizados en las pruebas, en la figura 10 se trata de un baño María utilizado para la prueba de azul de metileno.

Figura 9. Tubos de ensayo con muestras de leche



Figura 10. Baño María

