

T  
576.192  
VIL



ESPOL

# ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de  
la Producción

"Determinación de la Cinética de Inactivación de la  
Escherichia Coli con Ozono"

## TESIS DE GRADO

Previo a la Obtención del Título de:  
INGENIERA DE ALIMENTOS

*Presentada por*  
**Mayra Gissella Villacís Aveiga**



ESPOL



ESPOL

Guayaquil - Ecuador

**Año 2006**

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

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

“Determinación de la Cinética de Inactivación de la Escherichia Coli  
con Ozono”

**TESIS DE GRADO**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERA DE ALIMENTOS**

Presentada por:

Mayra Gissella Villacís Aveiga

GUAYAQUIL – ECUADOR

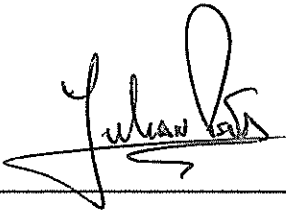
Año: 2006

## AGRADECIMIENTO

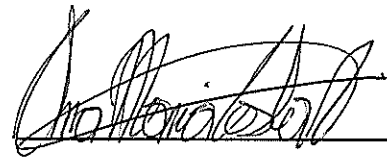


A Dios por ser la fuerza de mi vida y permitirme llegar hasta aquí. A mi directora de tesis, M.Ed. Ana Maria Costa por su valiosa colaboración. Al Ing. Luis Miranda por su influencia en mi vida universitaria. Al Ing. Juan Manuel Cevallos por su guía y apoyo.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Julian Peña E.  
(Delegado del Ing. Eduardo Rivadeneira P.)



M. Ed. Ana María Costa V.  
DIRECTORA DE TESIS



Ing. Luis Miranda S.  
VOCAL



Ing. Carmen Llerena R.  
VOCAL

## DEDICATORIA

A MIS PADRES BELLA Y HOMERO

A MIS HERMANOS HOMERO,  
ALEXIS Y MARLON

A MIS AMIGOS

## DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Mayra Villacís Aveiga', is written over a horizontal line.

Mayra Villacís Aveiga

TRIBUNAL DE GRADUACION



---

Ing. Eduardo Rivadeneira P.  
DECANO DE LA FIMCP  
PRESIDENTE



---

M. Ed. Ana Maria Costa V.  
DIRECTORA DE TESIS



---

Ing. Luis Miranda S.  
VOCAL



---

Ing. Carmen Llerena R.  
VOCAL

## RESUMEN

La industria de alimentos se encuentra actualmente en la necesidad de innovar las tecnologías de procesamiento con la finalidad de satisfacer la demanda del consumidor de productos frescos y microbiológicamente seguros. A nivel microbiológico el *Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas y frecuentemente empleadas como indicador de la calidad higiénica de un alimento. Por otro lado el ozono constituye un efectivo sanitizante caracterizado por su alto potencial de oxidación, que posee propiedades bactericidas y que además no conlleva la formación de residuos peligrosos en los alimentos debido a su espontánea descomposición a oxígeno, puede por tanto ser visto como una alternativa para un proceso alimenticio más ecológico. El producto elegido para la realización de los experimentos es el agua, ya que actualmente es la principal industria en nuestro país que utiliza la ozonización como un mecanismo de desinfección microbiana.

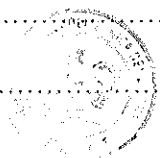


El presente trabajo de investigación determina la cinética de inactivación del *Escherichia Coli* en el agua a través de un tratamiento no térmico como es el caso del ozono. Para el efecto se utiliza un equipo generador de Ozono (Lotus), añadiendo controladamente ozono al agua inoculada previamente con una concentración conocida de cepas *E. coli*, posteriormente se hace el análisis microbiológico respectivo para cuantificar la presencia final de la bacteria.

En este estudio se determinan las concentraciones y tiempos necesarios para la inactivación del microorganismo (*E.Coli*). Con estos resultados experimentales y con la ayuda de herramientas estadísticas y matemáticas se determina el valor del tiempo de reducción decimal (D), y la ecuación de la cinética de inactivación de la *Escherichia Coli*.

Con la finalidad de aprovechar la aplicabilidad de los resultados obtenidos, se hace el ajuste de la ecuación encontrada para la cinética de inactivación del microorganismo en el agua, ahora aplicándola para el proceso de lavado y desinfección de frutas (uvas y manzanas).

## INDICE GENERAL

	Pag
RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
	
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA	
ID. ESPOL	
CAPITULO 1	
1. GENERALIDADES	
1.1. Ozono.....	2
1.2. Indicadores Microbiológicos.....	8
1.2.1. EscherichiaColi.....	8
1.3. Métodos de Inactivación de la E.Coli.....	14
CAPITULO 2	
2. FASE EXPERIMENTAL	
2.1. Diseño Experimental.....	19
2.2. Materiales y Métodos.....	20

2.3. Determinación del tiempo de Reducción Decimal.....	38
2.4. Determinación de la concentración de Ozono requerida para variar D.....	50

### CAPITULO 3

#### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de la ecuación de la cinética de inactivación de la E coli.....	64
3.2. Análisis de varianza de los resultados.....	68
3.3. Ajuste de la ecuación para procesos de desinfección de fruta.....	70

### CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	72
---	----

### APÉNDICES

### BIBLIOGRAFÍA

### ANEXOS

## ABREVIATURAS

O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>3</sub>	Ozono
D	Tiempo de Reducción Decimal
ppm	Partes por millón
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
GL	Grados de Libertad
H <sub>2</sub> O	agua
Mg Cl	Cloruro de Magnesio
TSB	Tryptone Soy Broth (Caldo Tripticasa Soya)
N <sub>o</sub>	concentración inicial de Microorganismos
N <sub>f</sub>	concentración final de Microorganismos

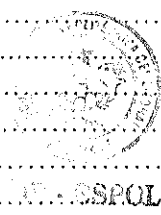
## INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Punto térmico Mortal para la E.Coli.....	16
TABLA 2	Composición del TSB.....	20
TABLA 3	Tratamiento Para Modelos De Un Factor.....	33
TABLA 4	Formulas para ANOVA de Medidas Repetitivas.....	34
TABLA 5	Tabla de análisis de varianza para el diseño RCBD .....	36
TABLA 6	Coefficientes de polinomios ortogonales para Análisis de Tendencias.....	37
TABLA 7	E-coli tratado con 1.2ppm de ozono.....	41
TABLA 8	E-coli tratado con 1.2ppm de ozono.....	42
TABLA 9	Datos para Medidas Repetitivas (Valor D a 1.2 ppm De ozono).....	43
TABLA 10	Anova para Medidas Repetitivas (Valor D a 1.2 ppm De ozono).....	43
TABLA 11	E-coli tratado con 0.52 ppm de ozono.....	44
TABLA 12	E-coli tratado con 0.52 ppm de ozono.....	45
TABLA 13	Datos para Medidas Repetitivas (Valor D 0.52 ppm de ozono).....	46
TABLA 14	Anova para Medidas Repetitivas (Valor D a 0.52 ppm de ozono).....	46
TABLA 15	Ecoli tratado con 0.2 ppm de ozono.....	47
TABLA 16	E-coli tratado con 0.2 ppm de ozono.....	48
TABLA 17	Datos para Medidas Repetitivas (Valor D 0.2 ppm de ozono).....	49
TABLA 18	Anova para Medidas Repetitivas (Valor D a 0.2 ppm de ozono) .....	49
TABLA 19	Valor D vs Concentración de ozono.....	52
TABLA 20	Valor D vs Concentración de ozono.....	53
TABLA 21	Datos para Análisis de Diseño de Bloques.....	54
TABLA 22	Anova para Bloques Completos Alegorizados.....	54
TABLA 23	Valores D para diferentes concentraciones de Ozono.....	55
TABLA 24	Valores D para diferentes concentraciones de Ozono.....	56

TABLA 25	Valores promedio.....	56
TABLA 26	Modelo Lineal.....	57
TABLA 27	Modelo Cuadrático.....	58
TABLA 28	Modelo lineal semi log.....	59
TABLA 29	Modelo cuadrático semi log.....	60
TABLA 30	Log de los valores experimentales.....	61
TABLA 31	ANOVA RCBD.....	61
TABLA 32	Modelo lineal log.....	62
TABLA 33	Modelo Cuadrático- Log.....	63
TABLA 34	Valores F Reales vs. Experimentales.....	68
TABLA 35	Anova para comparación de Medias.....	69
TABLA 36	Estadísticos.....	69
TABLA 37	Factor de Ajuste.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Formación de Ozono.....	2
Figura 1.2	Producción de Ozono.....	3
Figura 1.3	Acción del Ozono sobre la E.Coli.....	4
Figura 1.4	Tecnología de Barreras.....	16
Figura 2.1	Placas Petrifilm.....	21
Figura 2.2	Generador de Ozono. ....	22
Figura 2.3	Espectrofotómetro . ....	23
Figura 2.4	Ozonificador Comercial para las Frutas . ....	24
Figura 2.5	Presencia de E.Coli en Placa Petrifilm . ....	27
Figura 2.6	Siembra de E.Coli en placa Petrifilm . ....	27
Figura 2.7	Aplicador para el Petrifilm . ....	28
Figura 2.8	Contador de Colonias . ....	29
Figura 2.9	Diluciones Seriales.....	30
Figura 2.10	Valor D . ....	39
Figura 2.11	Valor D con 1.2 ppm de ozono . ....	41
Figura 2.12	Valor D con 1.2 ppm de ozono . ....	42
Figura 2.13	Valor D con 0.52 ppm de ozono . ....	44
Figura 2.14	Valor D con 0.52 ppm de ozono . ....	45
Figura 2.15	Valor D con 0.2 ppm de ozono . ....	47
Figura 2.16	Valor D con 0.2 ppm de ozono . ....	48
Figura 2.17	Valor Z . ....	50
Figura 2.18	Determinación Valor Z . ....	52
Figura 2.19	Determinación Valor Z.....	53
Figura 3.1	Relación Log -Log entre valor D y Concentración de Ozono.....	65



## INTRODUCCION

La aplicación del ozono al agua para lograr su desinfección viene siendo una practica generalizada que se ha ido incrementando a través de los años, siendo actualmente el principal mecanismo utilizado para la purificación del agua embotellada para consumo humano. Uno de los indicadores referenciales para el análisis microbiológico del agua es la Escherichia Coli.

La presente tesis de grado tiene por objetivo determinar la cinética de inactivación de la Escherichia Coli, al aplicar una concentración de ozono. Para lograr determinar esta cinética, se realizo el diseño del experimento, se realizaron los análisis microbiológicos necesarios, y luego se utilizaron métodos estadísticos como la herramienta principal para lograr determinar la cinética.

Al tratarse de experimentos biológicos, fue recomendable utilizar Análisis para Medidas repetitivas para determinar si existía diferencia entre los valores D a las diferentes concentraciones, y posteriormente se utilizo el método del Efecto Polinomial para lograr definir el modelo que mejor prediga la cinética de inactivación del microorganismo



# CAPITULO 1

## 1. GENERALIDADES



UN - GSPOL

### 1.1 Ozono

El ozono tiene un interesante uso industrial como precursor en la síntesis de algunos compuestos orgánicos, y sobre todo, como desinfectante mediante los generadores de ozono. Su principal propiedad es que es un fortísimo oxidante.

El ozono es una sustancia gaseosa. En 1781 Van Marum predijo su existencia cuando observó el olor del aire atravesado por descargas eléctricas, pero no fue descubierto hasta 1839 por Christian Schönbein que le dio el nombre de ozono (10). Aunque el ozono fue estudiado por Marignac, Becquerel y Fremi, no se determinó su estructura hasta 1863 cuando J. L. Soret demostró que se trataba de una forma alotrópica del oxígeno ( $O_3$ ).

Con temperaturas normales el OZONO se encuentra en estado gaseoso en disolución inestable en el aire descomponiéndose relativamente rápido y convirtiéndose nuevamente en oxígeno ( $O_2$ ).

### Producción de Ozono.

La formación de ozono es a partir de la reacción de una molécula de  $O_2$  con un átomo libre de oxígeno o llamado oxígeno atómico. Esto sucede cuando la molécula de  $O_2$  es sometida a una fuerte descarga de energía.

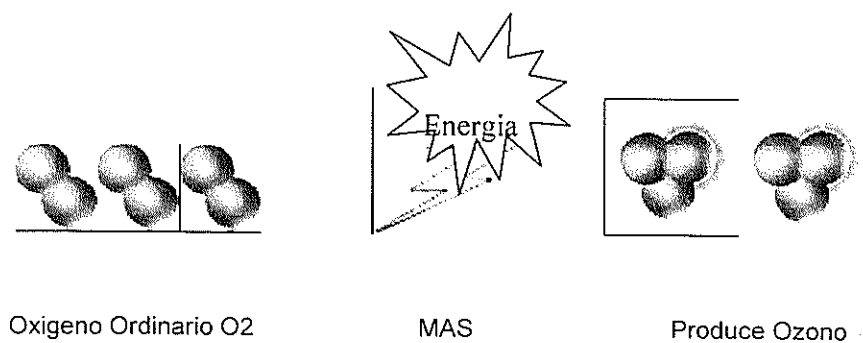


Figura 1.1 Formación de Ozono

Existen diversos métodos para la obtención industrial de ozono, pero el origen de la producción puede ser a partir de oxígeno, aire y los métodos industriales más usados son: electrólisis del agua, reacción fotoquímica del oxígeno, descomposición térmica del oxígeno, reacción radioquímica con el oxígeno líquido y por último

descarga eléctrica con el oxígeno. De los antedichos, el más utilizado a escala industrial es la descarga eléctrica con el oxígeno o aire.

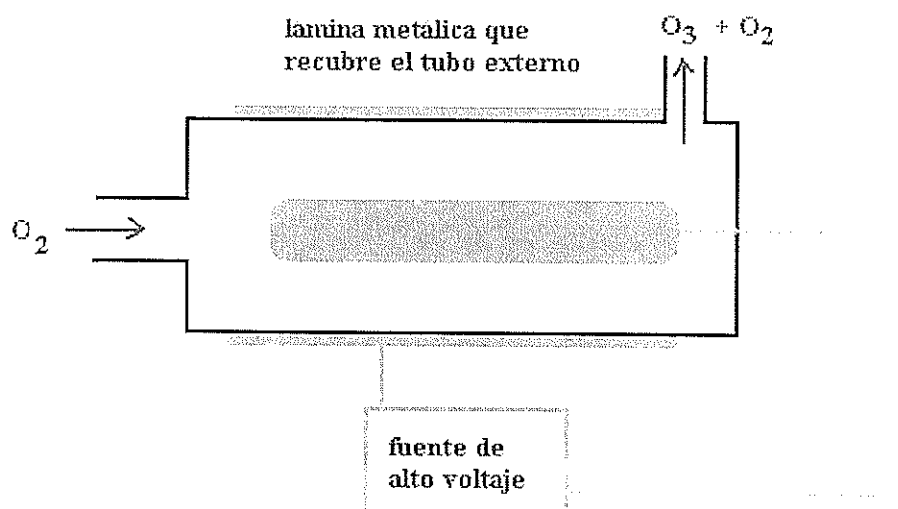


Figura 1.2 Producción de Ozono

La ozonización utiliza ozono como el agente oxidante. El ozono es más reactivo que el oxígeno y por lo tanto un poderoso agente oxidante.

El sistema de ozonización utilizado consiste en pasar aire a través de una forma especial de descarga eléctrica de alto voltaje. Luego esta mezcla de aire y ozono es pasada a través del agua a ser tratada.

Una de las ventajas más importantes del **OZONO**, con respecto a otros bactericidas es que este efecto se pone de manifiesto a bajas concentraciones (0,01 p.p.m. o menos) y durante periodos de exposición muy cortos. Incluso a concentraciones ínfimas de **OZONO** (del orden de 0.01 p.p.m.) es ya perfectamente observable un efecto bacteriostático (2).

El poder del ozono como sanitizante proviene de su estructura molecular inestable – el tercer átomo de oxígeno (O) tiende constantemente a separarse de las moléculas de ozono ( $O_3$ ) creando una poderosa fuerza sanitizante, de hecho el ozono es alrededor del 50% mas fuerte y actúa 3000 mas rápido que los detergentes y se revierte nuevamente a oxígeno una vez que la sanitización esta realizada (3).



Figura 1.3 Acción del Ozono sobre la E.Coli

Cuando se expone a la bacteria en el agua al ozono, la bacteria empieza a absorber la molécula de ozono inmediatamente.

Estas moléculas de ozono ( $O_3$ ) se rompen en cuestión de segundos, y cuando esto sucede, la bacteria literalmente explota, dejando solamente oxígeno y agua.

Durante años se han realizado trabajos para establecer el poder relativo del cloro y del ozono frente a virus y bacterias y por lo tanto se pueden aportar datos que demuestran que el ozono es como desinfectante, mucho más eficaz que el cloro.

Entre otros ejemplos podemos citar el realizado por Bringman, quien observo que 0.1mg/l de cloro requieren 4 horas para eliminar  $6 \times 10^4$  ufc/ml células de E.Coli en agua, mientras que 0.1mg/l de ozono requieren solo 5 segundos.

Con otros experimentos realizados se puede decir que el ozono actúa en la desinfección de 600 a 3000 veces más rápida que el cloro.

### **Efecto Bactericida**

Su efecto bactericida es bien conocido desde principios de siglo, donde se empezó a usar para el tratamiento de agua.



- En el caso de las bacterias, produce la lisis de la membrana celular y por lo tanto su muerte inmediata, mientras que el cloro y otros desinfectantes necesitan difundirse a través de la misma.
- Chevier (1992) indican que con el tiempo de exposición al ozono aparece el desbalance energético del microorganismo, acelerando su muerte.

Las ventajas del uso de ozono son innumerables:

- El ozono posee un altísimo aumento en la eficacia de la desinfección en relación con otras especies desinfectantes provocando la eliminación e inactivación de virus, bacterias, hongos, esporas, algas y protozoos.
- Elimina una gran cantidad de sustancias perjudiciales, las cuales oxida como el hierro o el manganeso descomponiendo detergentes, pesticidas, herbicidas, etc.
- Elimina todo tipo de olores en el agua.
- Provoca un aumento en la claridad del agua y el rendimiento de los filtros, ya que actúa como floculante.

### **Utilización del Ozono en la Industria de Alimentos**

La utilización del ozono en el procesamiento de alimentos como una técnica alternativa está siendo adoptada para el tratamiento del agua y sistemas sanitarios.

El ozono se ha estado utilizando en el tratamiento del agua por más de 100 años. Además, el ozono se usa en 98% del agua embotellada que se vende en los Estados Unidos (4).

Existen ciertos tipos de microorganismos que tienen capacidad de provocar enfermedades al ser humano. Otros muchos son capaces de ocasionar alteraciones en nuestros alimentos, haciéndolos inaceptables para su consumo. El ozono nos ofrece la posibilidad de eliminarlos mediante su acción oxidante que provoca un daño celular irreversible.

La fruta es uno de los tipos de alimento más delicado a la hora de la conservación y almacenaje. Es por ello que merece ser objeto de especial atención y mayores cuidados.

Hay variedades de frutas que entran en putrefacción en poco tiempo. Contienen un porcentaje de agua alrededor de un 90 %, lo que hace que el ambiente de las dependencias de almacenamiento tenga una elevada humedad relativa. Estas proporcionan el medio más

adecuado para el desarrollo de colonias de gérmenes, así como el favorecimiento de fermentaciones.

El lavado de la fruta con agua ozonizada puede ser visto como una nueva aplicación de la ozonificación, ya que se consigue la destrucción de los microorganismos responsables del deterioro prematuro, además de la destrucción de los microorganismos que puedan estar presentes en la misma.

## 1.2 Indicadores Microbiológicos

Algunos microorganismos pueden ser utilizados como indicadores en un ambiente específico que ha sido contaminado. Estos deben pertenecer a especies que representen fielmente las características del medio, deben ser confiables y fácilmente identificables.

Los indicadores microbiológicos ideales deben reflejar no solamente la presencia o ausencia de contaminación de un tipo específico, sino también los niveles de dicha contaminación y sus fluctuaciones periódicas.

### 1.2.1 Escherichia Coli

Las bacterias del género *E. coli* son Gram-negativas, tienen forma de bacilos y pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.





Esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el de los humanos, esta bacteria es la especie dominante encontrada en los restos fecales.

*E. coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole.

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados.

La bacteria se transmite por:

- a) Consumo de alimentos insuficientemente cocidos o crudos
- b) ingestión de agua contaminada
- c) contacto persona a persona
- d) contacto con materia fecal de animales

### **Enfermedades causadas y brotes a nivel mundial**

*E. coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización que se transmiten por vía fecal -oral de persona a persona o a través del agua y alimentos.

Puede ser leve o severa y se presenta a los 1 a 8 días del ingreso de la bacteria. Los niños menores de 5 años son los grupos más vulnerables.

La dosis requerida para enfermar parecer ser del orden de 10 a 100 ufc/ml. Se produce diarrea acuosa o usualmente con sangre, dolores abdominales severos, náuseas y vómitos, y a veces fiebre. La colitis hemorrágica puede derivar en una falla aguda del riñón o en Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en el 5 % de los infectados. Del 3 a 5 % de los que padecen SUH sufren la muerte.

Se estima que 73.000 casos de infecciones por E.coli se presentan en Estados Unidos anualmente (5).

Los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades reconocen que el E.coli es una enfermedad emergente llevada por el agua y alimentos.

### **Métodos de Detección**



11 - BSPOL

**Contaje de Placa:** Consiste en el plaqueo de una muestra de volumen conocido del alimento que se analiza.

El resultado es función de una serie de factores como son el método de muestreo, el tipo de microorganismo, el tipo de alimento y las características del medio de cultivo.

Cada bacteria viable formará una colonia, el plaqueo puede hacerse en una placa normal o por medio de un plaqueador en espiral que va depositando concentraciones progresivamente más diluídas de la muestra.

**Método del número más probable:** Basado en series de diluciones y cálculo estadístico del número de bacterias

presentes en las diluciones más altas. Se puede hacer con 3 ó 5 tubos.

**ELISA:** El método es similar al radioinmunoensayo: el antígeno se fija en un soporte sólido, se trata con el antisuero correspondiente y la interacción se detecta mediante una actividad marcadora (peroxidasa) unida al anticuerpo en cuestión o a un segundo anticuerpo de revelado

### **Examen de superficies.**

Métodos dirigidos a detectar y medir los números de microorganismos presentes en superficies contaminadas.

Algunas veces es necesario añadir agentes neutralizantes para eliminar el efecto de detergentes que han sido utilizados para limpiar la superficie.

El método más clásico de obtención de muestra es el uso de torundas de algodón. Las muestras se recogen en seco o en húmedo y se depositan sobre medios de cultivo líquido (generales o de enriquecimiento).

En algunos casos se usan otros métodos como el contacto con placa o la jeringa de agar.

**Petri film.-** Las Placas Petrifilm para Recuento de E. coli / Coliformes (EC) están diseñadas para identificar tanto E. coli como otros Coliformes. Con una fácil prueba se obtienen resultados confirmados en solo 24 a 48 horas.

Al eliminar la necesidad de confirmar las colonias presuntivas, se incrementa notablemente la eficiencia del laboratorio y reducirá los costos generales. Las Placas Petrifilm vienen listas para la muestra y ofrecen un método de mejor relación costo beneficio, más confiable y conveniente para pruebas de equipos, materias primas, etc.

Las Placas Petrifilm son un método consistente de análisis y fácil de realizar, por lo que se reducen las oportunidades de error cuando se compara contra otros métodos. La cuadrícula de fondo facilita el conteo de las colonias, entregando resultados rápidos precisos y consistentes.

Los métodos de las Placas Petrifilm han sido analizados colaborativamente y se encuentran incluidos dentro de los Métodos Oficiales de Análisis, publicados por la AOAC y además otros organismos internacionales.

### 1.3 Métodos de inactivación de E. Coli



SEPOA

#### Tratamientos térmicos

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento (y por lo tanto al tiempo de generación). Cada bacteria muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura.

El margen entre la temperatura mínima y la máxima se suele llamar margen de crecimiento, y en muchas bacterias suele comprender unos 40 grados centígrados.

Por encima de la temperatura mínima la tasa de crecimiento va aumentando proporcionalmente hasta alcanzar la temperatura óptima, debido a que las reacciones metabólicas catalizadas por enzimas se van aproximando a su óptimo. En dicha temperatura óptima las enzimas y reacciones se dan a su máxima tasa posible (6).

A partir de la temperatura óptima, si seguimos subiendo la temperatura se produce un descenso de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la temperatura máxima.

Dicha temperatura refleja:

- desnaturalización e inactivación de proteínas enzimáticas esenciales;
- colapsamiento de la membrana citoplásmica;
- lisis térmica de la bacteria.

La muerte por calor es una función exponencial de primer orden:

$$dN/dt = -K_T \cdot N$$

O sea, la acción del calor supone la muerte de una fracción constante ( $K_T$ ) de la población sobreviviente en cada momento.

La cinética de primer orden sugiere que no existen efectos acumulativos, sino que la muerte se debe a la destrucción o inactivación irreversible de una molécula o estructura esencial (como p. ej. el ADN cromosómico o por creación de un daño irreparable en la membrana). Hé aquí algunos parámetros que se utilizan:

**Tiempo térmico mortal:** es el tiempo mínimo requerido para que mueran todas las bacterias de una determinada suspensión a una determinada temperatura.



Tabla 1

## Punto térmico Mortal para la E.Coli

Punto térmico mortal	Especies
55°C	<i>Escherichia coli</i>

Elaborado por: Mayra Villacís

## Tecnología de barreras

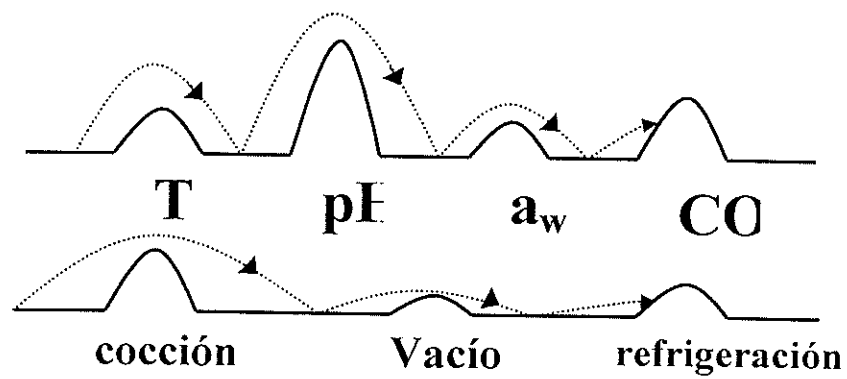


Figura 1.4 Tecnología de Barreras



La estabilidad y seguridad microbiana de la mayoría de los alimentos se basa en la combinación de varios factores que no deberían ser vencidos por los microorganismos.

Esto es ilustrado por el llamado "efecto barrera" (fig. 1.3), que es de fundamental importancia para la preservación de alimentos dado que las barreras en un producto estable controlan los procesos de deterioro, intoxicación y fermentación no deseados.

Además, el concepto de barrera ilustra el hecho de que las complejas interacciones entre temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, etc., son significativas para la estabilidad microbiana de los alimentos, mediante una combinación inteligente de obstáculos que aseguran la estabilidad y seguridad microbiana, así como propiedades nutritivas (7).

## **Tecnologías no convencionales**

### **Inactivación con Ozono**

La acción bactericida del ozono se basa principalmente en la oxidación de los enlaces disulfuro que mantienen el plegamiento de las proteínas. Esta oxidación comporta la destrucción de las proteínas estructurales de los microorganismos y la inactivación de los enzimas necesarios para su supervivencia (6).

De manera similar, el ozono tiene también la capacidad de inactivar virus. *La Escherichia Coli* (E.coli) es destruida en 5 segundos por el ozono, mientras que el cloro necesita 15.000 seg. para la misma concentración de oxidante.

# CAPITULO 2

## 2. FASE EXPERIMENTAL

### 2.1 Diseño Experimental

Los diseños clásicos de experimento, como el diseño factorial por ejemplo, ha demostrado ser poco preciso cuando debe ser aplicado en sistemas biológicos donde las observaciones son dependientes entre si mismas además de ser dependientes con respecto a la variable tiempo, es decir son doblemente dependientes. Esto hace poco útil el uso de los sistemas tradicionales de experimentos en los cuales existe simple o no dependencia. El único sistema que ha probado ser muy eficiente es una combinación de diseño factorial y diseño de experimento con factores anidados. Esta combinación es llamada "repeated measures". En este modelo el número de repeticiones debe ser igual al número de factores que se van a evaluar + 1. En este caso el único factor que se evalúa es la concentración de ozono (7).

## 2.2 Materiales y Métodos.

### Equipos y Materiales

**Cepa.**- E. Coli ATCC 43895 provisto por la Universidad de Florida fue utilizada para el experimento.

**TSB (Tryptone Soy Broth- Caldo Trypticasa Soya)** de Oxoid fue utilizado como el medio de mantenimiento del microorganismo.

**Datos Físicos:** Medio deshidratado de color beige

**Preparación:** Suspender 30 g en 1 l de agua destilada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

**Aplicaciones:** Medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos

**Tabla 2**

<b>Composición del TSB(g/l):</b>	
Peptona de Soja	3,0
D(+)-Glucosa	2,5
Peptona de Caseína	17,0
di-PotasioHidrógeno Fosfato	2,5
Sodio Cloruro	5,0
pH: 7,3±0,2	

Elaborado por: Mayra Villacis

**Buffer fosfato** (con MgCl, pH 7.2) fue utilizado como el medio de dilución. Se utilizo el buffer fosfato para evitar que el microorganismo inoculado se adhiera a las paredes del tubo de ensayo, lo cual podría afectar los resultados de los análisis.

**Placas de petrifilm** para E-coli provistas por 3M fueron utilizadas para determinar el número de E-coli presente en la muestra.

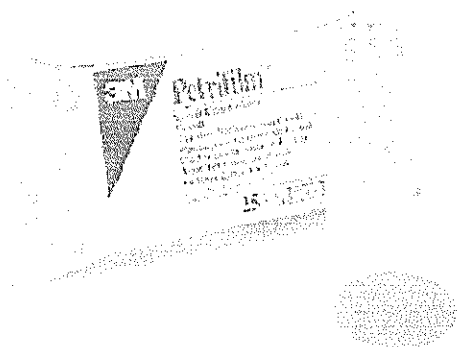


Figura 2.1 Placas Petrifilm

**Solución índigo stock** de Fischer fue utilizada para determinar la concentración del ozono siguiendo los procedimientos para cuantificar el ozono residual de Standard Methods (Standard Methods 2002).

**Generador de Ozono.**- El ozono fue producido por un generador de ozono (Lotus) adquirido de Tersano Inc (Fig 2.2). Este basa su principio de funcionamiento en descargas eléctricas que rompen el oxígeno molecular del aire, que previamente ha sido filtrado, y produce

oxígeno molecular del aire, que previamente ha sido filtrado, y produce ozono. El ozono circula a través de una pequeña tubería la cual es colocada en el recipiente (matraz) que contiene el agua a ser ozonificada.

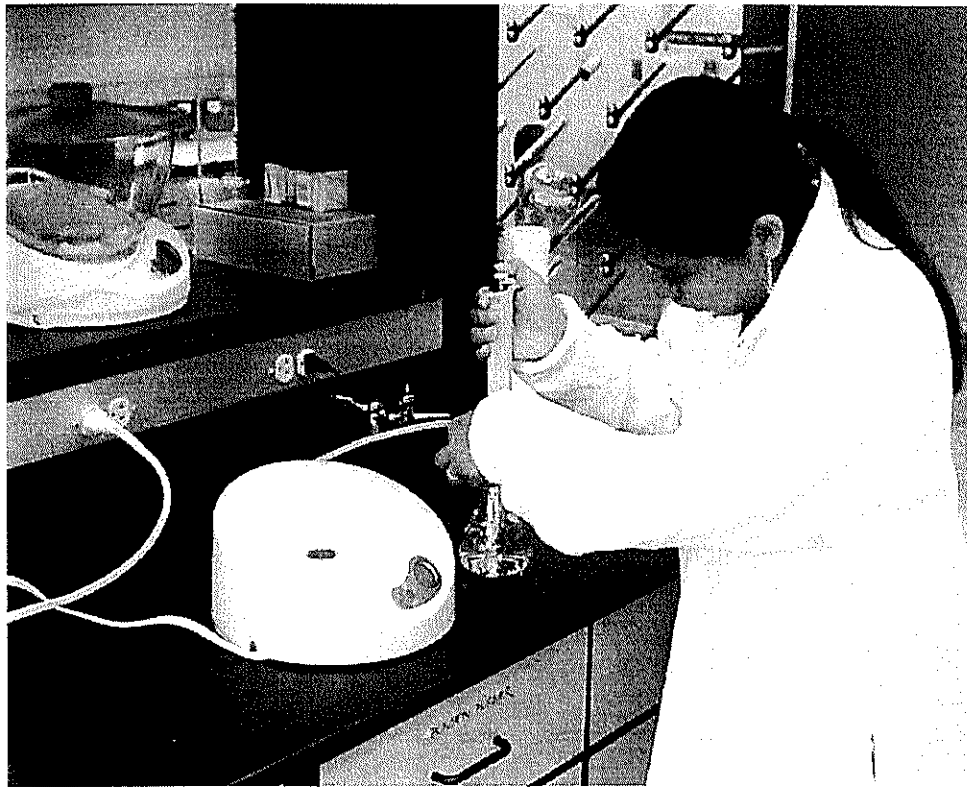


Figura 2.2 Generador de Ozono

**Concentración de Ozono.-** la concentración de ozono fue determinada con la ayuda de un espectrofotómetro Spectronic 601. Ver fig (2.3).

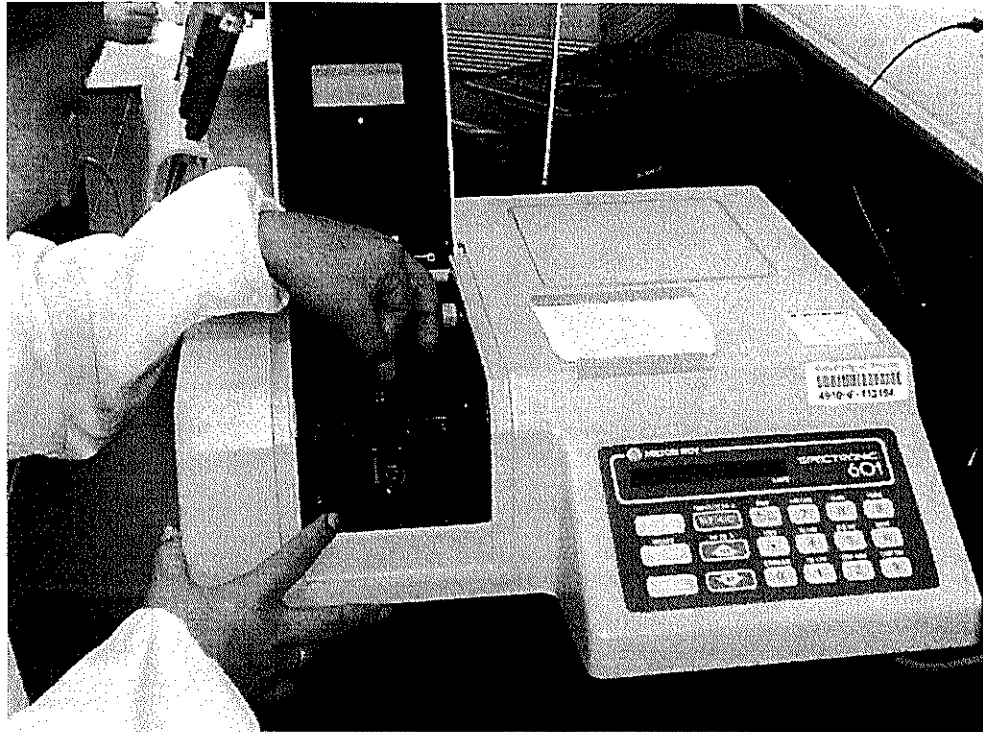


Figura 2.3 Espectrofotómetro



**Ozonificador Comercial para las Frutas.-** el Lotus Sanitizing System for Food es un generador de ozono de Tersano que está programado para generar y mantener una concentración de 0.1 ppm de Ozono en el agua.

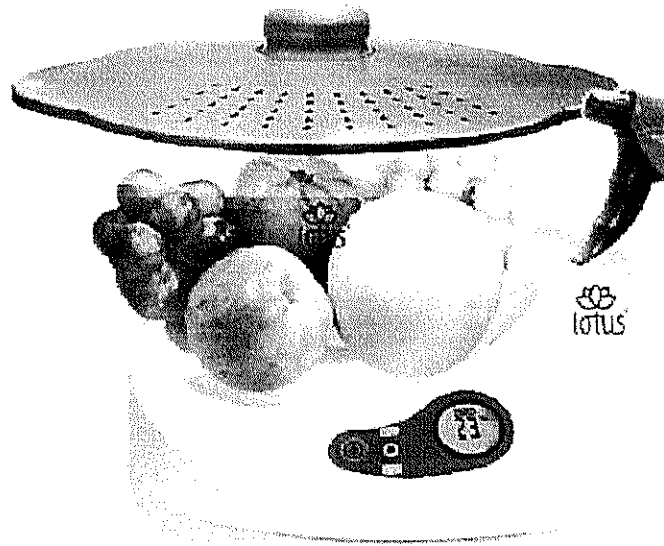


Figura 2.4 Ozonificador Comercial para las Frutas

### **Métodos**

#### **Determinación de Ozono (método colorimétrico del índigo)**

#### **Fundamento**

En solución ácida, el ozono rápidamente decolora el índigo, el decrecimiento en la absorbancia es lineal con el incremento en concentración.

La constante de proporcionalidad a 600 nm es  $0,42 \pm 0,01/\text{cm}/\text{mg}/\text{l}$ , ( $=20000/\text{M}\cdot\text{cm}$ ) comparado a la absorción en el ultravioleta de puro ozono de  $=2950.\text{M}\cdot\text{cm}$  a 258 nm.



## Procedimiento

### Medición espectrofotométrica

Agregar 10 ml de reactivo índigo I a 2 matraces volumétricos de 100 ml llene uno (blanco) a la marca con agua destilada, llene el otro a la marca con muestra. Agregar la muestra y agitar rápidamente sin que ocurra degasificación de ozono. Midan la absorbancia de ambas soluciones a  $600 \pm 5$  nm tan pronto como sea posible dentro de un tiempo máximo de 4 horas, usar celdas de preferencia de 10 cm. Calcule la concentración de ozono de la diferencia encontrada entre la absorbancia del blanco y la muestra. Una demora máxima de 4 horas antes de la medición puede ser tolerada solamente en aguas purificadas, para otras muestras existe una desviación muy fuerte.

### Cálculos

$$\text{mgO}_3/\text{l} = \frac{100 \times A}{f \times b \times v}$$

En donde:

A= Diferencia en absorbancia entre la muestra y el blanco.

b= Longitud de la celda

V= Volumen de la muestra ml (normalmente 90 ml)

f= 0,42

El factor  $f$  es basado sobre un factor de sensibilidad de 20000/cm para el cambio de absorbancia (600 nm) por mol de ozono añadido por litro lo cual fue calibrado por titulación yodométrica.

La absorbancia de uv del ozono en agua pura servirá como un estándar secundario. El factor  $f=0,42$  corresponde a un coeficiente de absorción para ozono acuoso de  $=2950M\text{-cm}$  a 258 nm.

### **Análisis Microbiológico.**



UN - ESPOL

### **Fundamento**

Las placas Petrifilm EC contienen los nutrientes del VRB, un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de la actividad glucuronidasa BCIG y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por los Coliformes y E.coli.

E. coli es capaz de crecer en medios conteniendo los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB). La mayoría de E. coli (aprox. el 97%) producen beta-glucuronidasa, que reacciona con un indicador (colorante) BCIG presente en la placa Petrifilm EC y que hace que la colonia sea de color azul a rojo-azul.

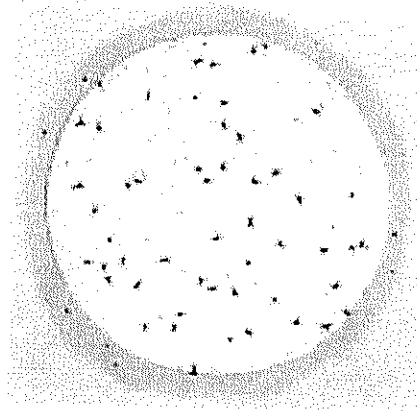


Figura 2.5 Presencia de E.Coli en Placa Petrifilm

### Determinación de la Presencia de E.Coli.

#### Inoculación

- Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.
- Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa Petrifilm, colocar 1 ml. de la muestra en el centro del film inferior.

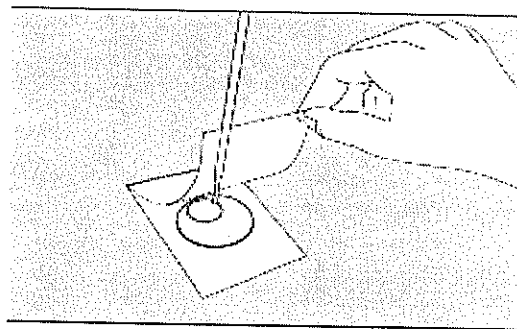


Figura 2.6 Siembra de E.Coli en placa Petrifilm

- Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.
- Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo.
- Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.

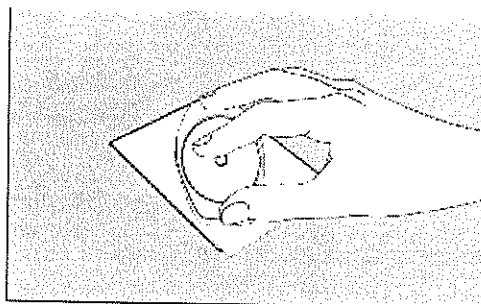


Figura 2.7 Aplicador para el Petrifilm

- Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que solidifique el gel.

### **Incubación**

Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas.

- Método Oficial AOAC 991.14 : para coliformes, incubar  $24\text{h} \pm 2\text{h}$  a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ; para E. Coli, incubar  $48\text{h} \pm 2\text{h}$  a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

### **Interpretación**

Las placas Petrifilm pueden leer con un contador de colonias Standard u otra lente de aumento (Ver fig. 2.8).

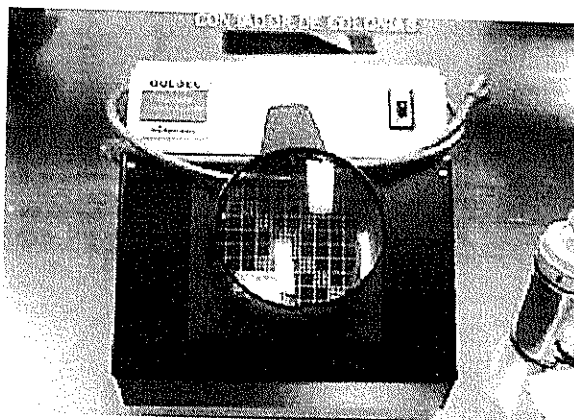


Figura 2.8 Contador de Colonias

## Ozonificación del Agua

### Procedimiento



1. El generador de ozono fue conectado a un matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 99 ml de agua destilada. El generador fue iniciado y la concentración de ozono monitoreada.
2. Una vez que la concentración deseada del ozono fuera alcanzada y fijada, 1 ml de TSA (Tryptic soy agar) conteniendo  $10^8$  ufc de E coli fue agregado al sistema y la concentración del ozono fue monitoreada.
3. Una vez que la concentración del ozono fuera estabilizada otra vez, muestras de 1ml fueron tomadas en intervalos de 10 segundos y colocadas inmediatamente en los tubos de prueba de la dilución que contenían el buffer fosfato para detener la acción del ozono.

4. Diluciones seriales fueron hechas y entonces las muestras fueron inoculadas para la cuantificación usando Petrifilm. La concentración de ozono fue mantenida y monitoreada constantemente durante el experimento.

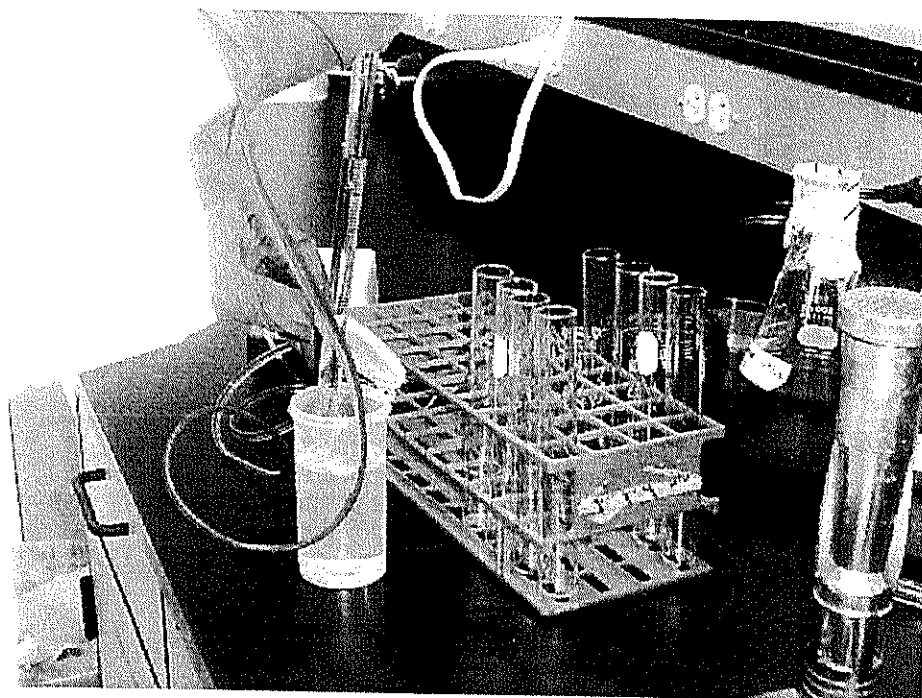


Figura 2.9 Diluciones Seriales

Todos los experimentos fueron corridos dos veces y por duplicado.

### Ozonificación de las frutas

Con la finalidad de validar la ecuación de la cinética de inactivación de la E. Coli en agua, esta vez para superficies de frutas (manzanas y uvas), encontrando además un factor de ajuste que será diferente para cada fruta, se utilizó el Lotus Sanitizing System for Food que es un generador de ozono de Tersano que está programado para generar y mantener una concentración de 0.84 ppm de Ozono en el agua.

Se realizó el siguiente procedimiento en la ozonificación de manzanas y uvas:

- Se sumergió la fruta en una solución en la que previamente se había inoculado E.Coli.
- Se retiró la fruta de la solución, se esperó hasta que se seque, y se tomó una muestra de su superficie para analizar la presencia de E.Coli en la fruta antes del tratamiento.
- Se colocó la fruta dentro del recipiente del Lotus y se llenó con agua. El sistema fue activado y el ozono fue generado.
- Luego de 3 minutos la concentración deseada fue alcanzada y mantenida durante 20 segundos.
- Luego se tomó muestra de la superficie de la fruta para realizar el análisis de presencia de E.coli, luego del tratamiento.



UNESPOL

## **Análisis Estadístico**

### **Análisis de Medidas Repetitivas**

#### **Definición**

Experimentos en los cuales las mismas unidades experimentales (usualmente elementos de una población humana o animal) son observadas bajo varias condiciones de tratamiento, o en diferente tiempo, son llamados experimentos con medidas repetitivas. Estos experimentos son utilizados en ciencias del comportamiento y en ciencias médicas y biológicas. El uso de la misma unidad experimental provoca que las observaciones sean dependientes en lugar de independientes.

La Anova de medidas repetitivas sirve para estudiar el efecto de uno o más factores cuando al menos uno de ellos es un factor intrasujetos.

Las ventajas de la Anova de medidas repetitivas son evidentes: requieren menos sujetos que un diseño completamente aleatorizado y permite eliminar la variación residual debido a los sujetos.

Para evitar sesgos por variaciones biológicas entre los diferentes especímenes, se realizó un ANOVA de mediciones repetitivas. Cuando se trabaja con medidas repetidas, como en este caso, las observaciones de puntos cercanos en el tiempo usualmente están



más correlacionadas entre sí que las observaciones que están más distanciadas en el tiempo.

### **Modelo de un Factor**

Los datos que permiten analizar este modelo son los procedentes de un diseño con un solo grupo de sujetos y un único factor cuyos niveles se aplican a todos los sujetos. Las distintas medidas, tantas como niveles tiene el factor, se toman sobre los mismos sujetos. De ahí el nombre de medidas repetidas que reciben estos modelos.

**TABLA 3**  
**TRATAMIENTO PARA MODELOS DE UN FACTOR**

SUJETO	1	2	.....	j
1	Y <sub>11</sub>	Y <sub>12</sub>	.....	Y <sub>1j</sub>
2	Y <sub>21</sub>	Y <sub>22</sub>	.....	Y <sub>2j</sub>
....	...	.....	.....	....
I	Y <sub>i1</sub>	Y <sub>i2</sub>	.....	Y <sub>ij</sub>

Elaborado por: Mayra Villacís

$X_1, X_2, X_3 \dots X_n$ : valores en cada tratamiento

$k$ : numero de tratamientos

$n_1, n_2, n_3$ : valores en cada tratamiento

$N$ : numero total de valores en todo el experimento

$T_k$  = sumatoria de cada grupo de tratamiento

$$- T_k = X_1 + X_2 \dots + X_n$$

$P$  = Sumatoria para cada sujeto

$G$ : suma de todos los valores en el experimento

$$- G = ST$$

$SS$ : suma cuadrada

$df$ : Grados de libertad

$F = MS_{\text{entre el tratamiento}} / MS_{\text{error}}$

**TABLA 4**

Formulas para ANOVA de Medidas Repetitivas:

	SS	df	MS
Total	$\sum X^2 - \frac{G^2}{N}$	$N - 1$	$\frac{SS}{df}$
Tratamiento	$\sum \frac{T^2}{n} - \frac{G^2}{N}$	$k - 1$	$\frac{SS}{df}$
Sujeto	$\sum \frac{P^2}{k} - \frac{G^2}{N}$	$n - 1$	$\frac{SS}{df}$
Error	$\left( \sum X^2 - \sum \frac{T^2}{n} \right) - \left( \sum \frac{P^2}{k} - \frac{G^2}{N} \right)$	$(N - k) - (n - 1)$	$\frac{SS}{df}$

Elaborado por: Mayra Villacís



IB - ESPOL

### **Efecto Polinomial**

Cada factor es contrastado a través de un polinomio lineal, cuadrático, cúbico, log, etc.

Se utilizo el tratamiento de efecto polinomial para determinar cual es la forma funcional que mejor describe el comportamiento de los datos.

### **Bloques Completos Aleatorizados**

De todos los diseños experimentales que se utilizan, al parecer éste es el que se ha utilizado más ampliamente.

Es un diseño en el que las unidades (llamadas unidades experimentales) a las que se aplican los tratamientos se subdividen en grupos homogéneos llamados bloques, de modo que el número de unidades experimentales en un bloque es igual al número (o algún múltiplo del mismo) de tratamientos en estudio. Los tratamientos se asignan posteriormente, al azar, a cada una de las unidades experimentales dentro de cada bloque.

Es importante tener en cuenta que cada tratamiento aparece en todos los bloques y cada bloque recibe todos los tratamientos.

El objetivo al utilizar el diseño de bloques completos aleatorizados es aislar y eliminar del término de error la variación atribuible a los

bloques, y asegurar que las medias del tratamiento estén libres de los efectos del bloque. Cuando el diseño se utiliza apropiadamente, el cuadrado medio del error en la tabla ANOVA se reduce, y mejora la probabilidad de rechazar la hipótesis nula.

TABLA 5

Tabla de análisis de varianza para el diseño de bloques  
completos aleatorizados

CUADRO DEL ANÁLISIS DE LA VARIANZA  
— MODELO TRATAMIENTO-BLOQUE —

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	scm	$\hat{F}$
Tratamiento	$scT = \sum_j (\bar{y}_{.j} - \bar{y}_{..})^2$	$i - 1$	$scmT = \frac{scT}{i - 1}$	$\frac{scmT}{scmR}$
Bloques	$scB = \sum_i (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{..})^2$	$j - 1$	$scmB = \frac{scB}{j - 1}$	$\frac{scmB}{scmR}$
Residuo	$scR = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_{i.} - \bar{y}_{.j} + \bar{y}_{..})^2$	$(i - 1)(j - 1)$	$scmR = \frac{scR}{(i - 1)(j - 1)}$	
Global	$scG = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2$	$ij - 1$	$scmG = \frac{scG}{ij - 1}$	

Elaborado por: Mayra Villacís

**CONTRASTE**

Se usa para contrastar las diferencias entre los niveles de un factor. Se puede especificar un contraste para cada factor en el modelo. Los contrastes representan las combinaciones lineales de los parámetros

**Contraste – Procedimiento**

**Definición de Contraste**

Sean,  $u_1, u_2, \dots, u_k$  las medias de K tratamientos. Sean  $a_1, a_2, \dots, a_k$  constantes definidas cuya suma sea igual a cero, es decir,  $\sum_{i=1}^k a_i = 0$ .

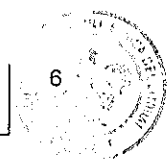
La siguiente combinación lineal,  $\Phi = \sum_{i=1}^k a_i u_i$ , se denomina un contraste en  $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_k$ .

Por ejemplo,  $\Phi_1 = u_1 - u_2 = u_1 - 2u_2 + u_3$  son un contraste en  $u_1, u_2$  y  $u_3$ .

**TABLA 6**

**Coefficientes de polinomios ortogonales para Análisis Tendencias**

	a	a <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>3</sub>	a <sub>4</sub>	a <sub>5</sub>	a <sub>6</sub>	a <sub>7</sub>	a <sub>8</sub>	a <sub>9</sub>	a <sub>10</sub>	Coef2
<b><u>Orden 1, Lineal</u></b>	3;1	-1	0	1								2
<b><u>Orden 2, Cuadrática</u></b>	3;2	1	-2	1								6



UNESPOL

Elaborado por: Mayra Villacís

Si graficamos los datos de reducción en la población microbiana en papel semilogarítmico, tendremos una línea recta como se ilustra en la figura a continuación.

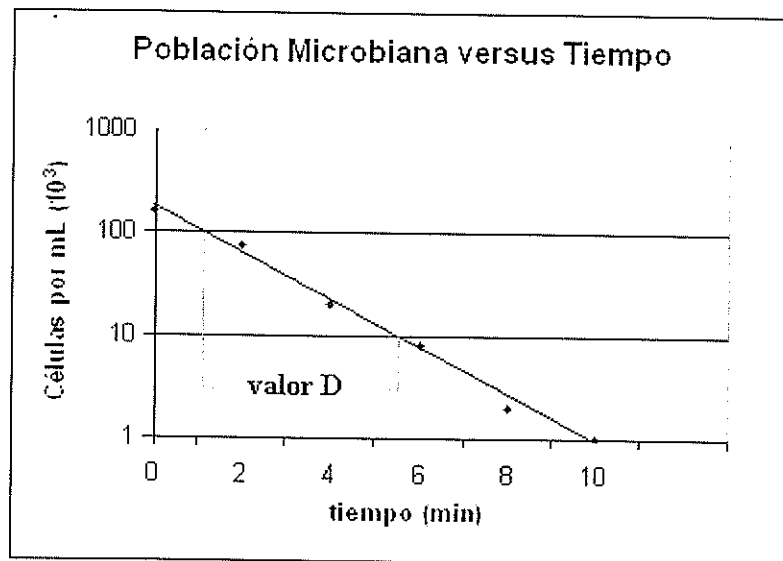


Figura 2.10 Valor D

El valor D estará dado por el tiempo que se requiere para que la línea recta traspase las dos líneas que identifican un cambio en el ciclo logarítmico. Como se ilustra (fig. 2.10), el valor D es el tiempo necesario para cruzar dicho ciclo, lo que representa una reducción del 90% de la población microbiana.

$$D = \frac{F}{\log \frac{N_0}{N_f}}$$

F= tiempo de tratamiento

No= Numero inicial de UFC

Nf= Numero final de UFC

Partiendo de esta definición, se calculo el tiempo de reducción decimal (valor D) pero utilizando como mecanismo de destrucción del microorganismo la concentración de Ozono, en vez de temperatura.

Se realizo los experimentos necesarios para la obtención del valor D.

Se utilizaron 3 concentraciones de Ozono y se cuantifico su capacidad para reducir la concentración de unidades formadoras de colonias de E.coli.

Se realizaron dos ensayos en cada prueba a fin de contrastar los resultados.

Las siguientes tablas muestran los resultados promedios para las concentraciones de 1.2ppm, 0.52ppm y 0.2ppm de ozono respectivamente.

## Experimentos Valor D

## PRIMER ENSAYO

TABLA 7

E-coli tratado con 1.2ppm de ozono

1.2 ppm

Tiempo (s)	UFC	Log (UFC)
0	4.20E+07	7.6232
12	9.00E+02	2.9542
22	3	0.4771

D = 3.06 sec

Elaborado por: Mayra Villacís

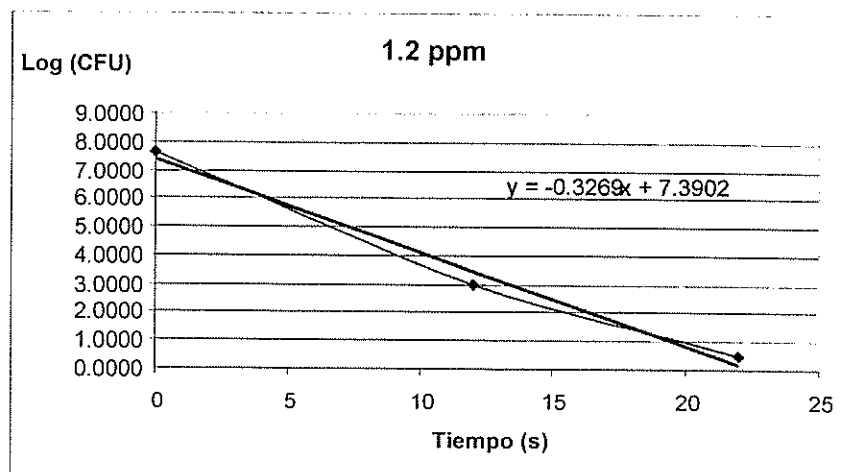


Figura 2.11 Valor D con 1.2 ppm de ozono



## SEGUNDO ENSAYO

TABLA 8

E-coli tratado con 1.2ppm de ozono

1.2 ppm

Tiempo (s)	UFC	Log (UFC)
0	4.50E+07	7.653212514
12	9.90E+02	2.995635195
22	1	0

D = 2.86 sec

Elaborado por: Mayra Villacís



UNPE - ESPOL

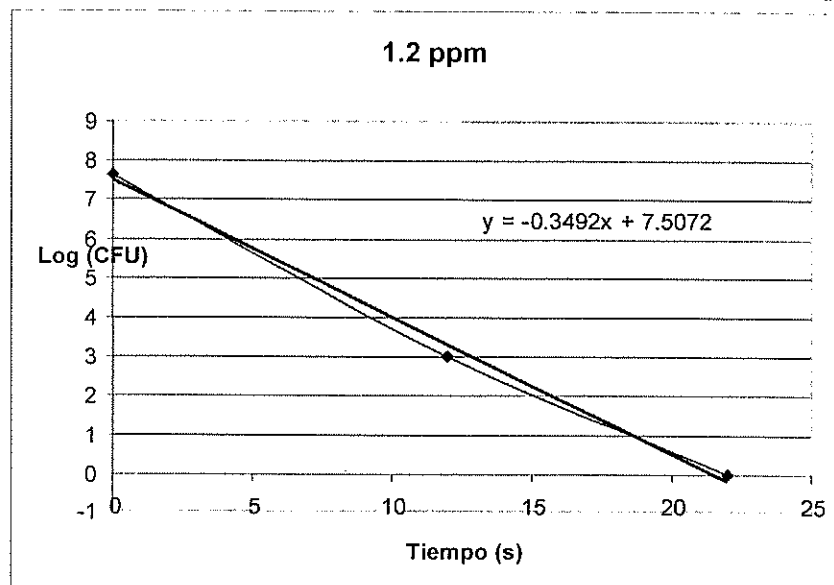


Figura 2.12 Valor D con 1.2 ppm de ozono

TABLA 9

Datos para Medidas Repetitivas (Valor D a 1.2 ppm de ozono)

Tiempo	Intento 1	Intento 2	Total
0	4.20E+07	4.50E+07	8.70E+07
12	9.00E+02	9.90E+02	1.89E+03
22	3	1	4.00E+00
Total	4.20E+07	4.50E+07	<b>8.70E+07</b>

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 10

Anova para Medidas Repetitivas (Valor D a 1.2 ppm de ozono)

ANOVA (Ozono = 1.2 ppm)					
Fuente	GL	SC	MC	F	Fcritic0 (0.05)
Tiempo	2	2.52E+15	1.26E+15	8.41E+02	19
Intento	1	1.50E+12	1.50E+12	1.00E+00	18.51
Error	2	3.00E+12	1.50E+12		
Total	5	2.53E+15			

Elaborado por: Mayra Villacís

Por lo tanto Si hay diferencia significativa entre los promedios del tiempo.

No hay diferencia significativa entre los intentos

## PRIMER ENSAYO

TABLA 11

E-coli tratado con 0.52 ppm de ozono

0.52 ppm

Tiempo (s)	UFC	Log (UFC)
0	4.20E+07	7.6232
10	1.94E+04	4.2878
20	50	1.6990

D = 3.38 sec

Elaborado por: Mayra Villacís

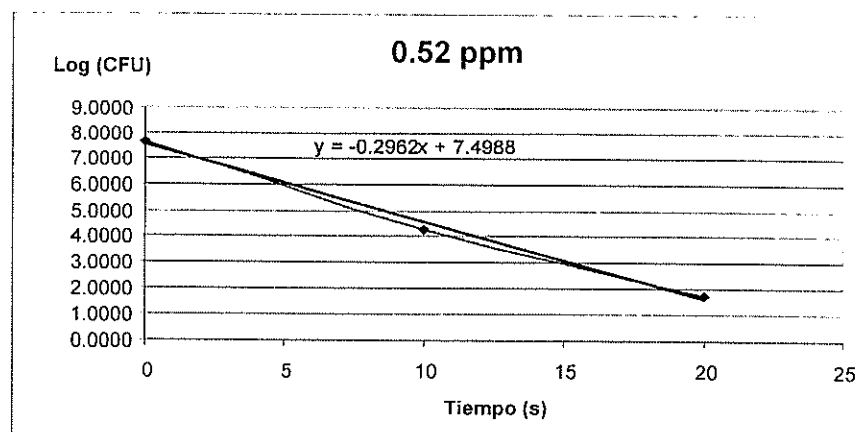


Figura 2.13 Valor D con 0.52 ppm de ozono

## SEGUNDO ENSAYO

TABLA 12

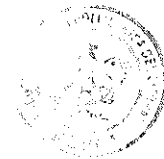
E-coli tratado con 0.52 ppm de ozono

0.52 ppm

Tiempo (s)	UFC	Log (UFC)
0	4.50E+07	7.653212514
10	2.00E+04	4.301029996
20	61	1.785329835

D = 3.41 sec

Elaborado por: Mayra Villacís



UNESPOL

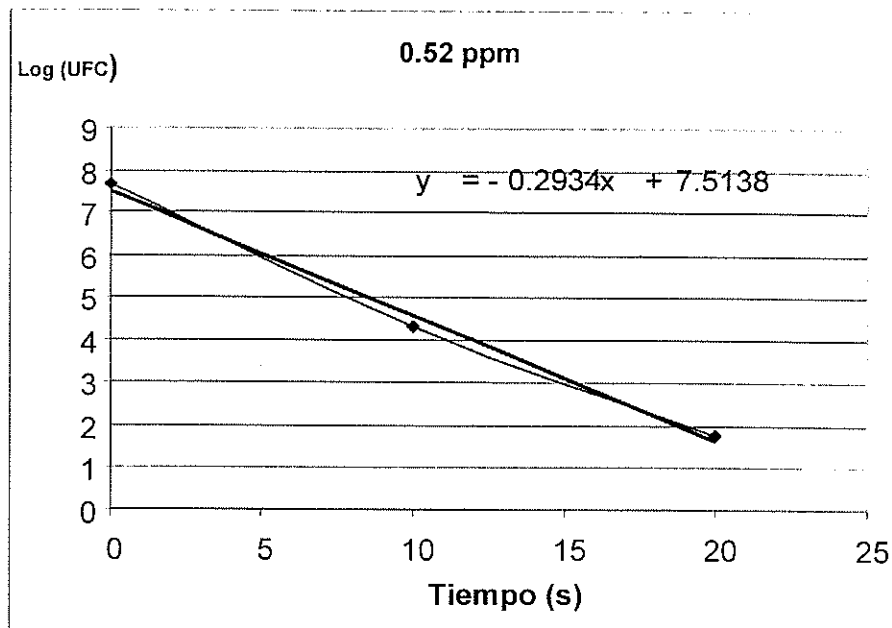


Figura 2.14 Valor D con 0.52 ppm de ozono

TABLA 13

Datos para Medidas Repetitivas (Valor D a 0.52 ppm de ozono)

Tiempo	Intento 1	Intento 2	Total
0	4.20E+07	4.50E+07	8.70E+07
10	1.94E+04	2.00E+04	3.94E+04
20	50	61	1.11E+02
Total	4.20E+07	4.50E+07	8.70E+07

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 14

Anova para Medidas Repetitivas (Valor D a 0.52 ppm de ozono)

ANOVA (Ozono = 1.2 ppm)					
Fuente	GL	SC	MC	F	Fcritico (0.05)
Tiempo	2	2.52E+15	1.26E+15	8.41E+02	19
Intento	1	1.50E+12	1.50E+12	1.00E+00	18.51
Error	2	3.00E+12	1.50E+12		
Total	5	2.53E+15			

Elaborado por: Mayra Villacís

Por lo tanto Si hay diferencia significativa entre los promedios del tiempo.

No hay diferencia significativa entre los intentos

## PRIMER ENSAYO

TABLA 15

E-coli tratado con 0.2 ppm de ozono

0.2 ppm

Tiempo (s)	UFC	Log (UFC)
0	4.20E+07	7.6232
15	8.60E+06	6.9345
50	66000	4.8195

D = 17.59 sec

Elaborado por: Mayra Villacís

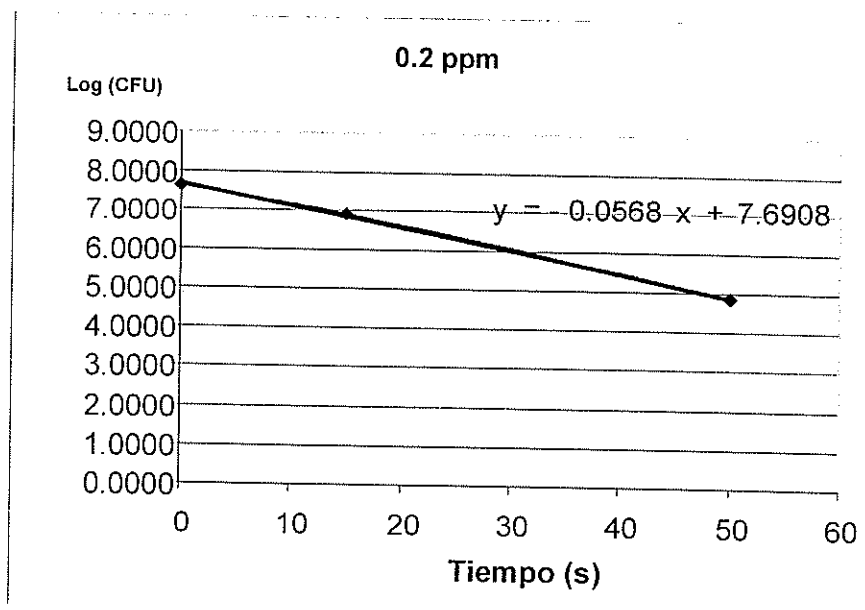


Figura 2.15 Valor D con 0.2 ppm de ozono

## SEGUNDO ENSAYO

TABLA 16

E-coli tratado con 0.2 ppm de ozono

0.2 ppm

Tiempo (s)	UFC	Log (UFC)
0	4.50E+07	7.653212514
15	8.00E+06	6.903089987
50	54000	4.73239376

D = 16.93 sec

Elaborado por: Mayra Villacís

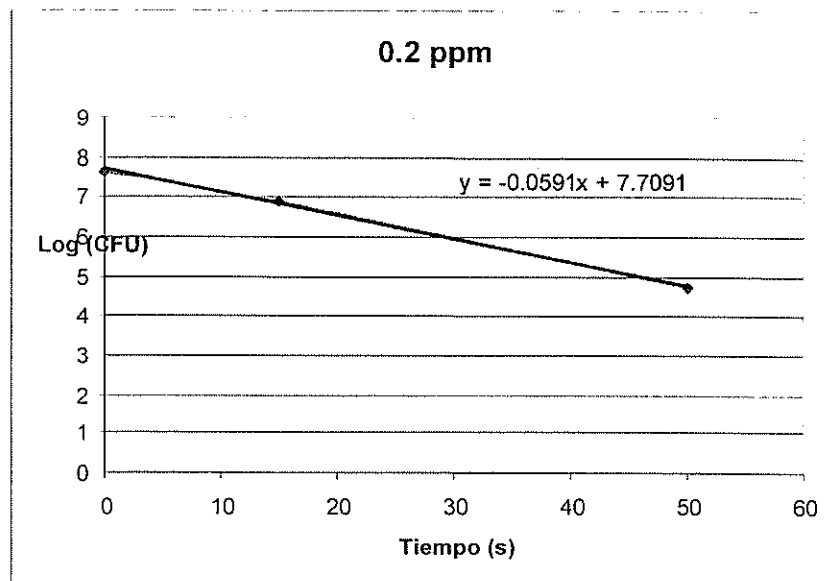


Figura 2.16 Valor D con 0.2 ppm de ozono

TABLA 17

Datos para Medidas Repetitivas (Valor D a 0.2 ppm de ozono)

Tiempo	Intento 1	Intento 2	Total
0	4.20E+07	4.50E+07	8.70E+07
15	8.60E+06	8.00E+06	1.66E+07
50	6.60E+04	5.40E+04	1.20E+05
Total	5.07E+07	5.31E+07	1.04E+08

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 18

Anova para Medidas Repetitivas (Valor D a 0.2 ppm de ozono)

ANOVA (Ozono = 1.2 ppm)					
Fuente	GL	SC	MC	F	Fcritico (0.05)
Tiempo	2	2.13E+15	1.06E+15	5.71E+02	19
Intento	1	9.50E+11	9.50E+11	5.10E-01	18.51
Error	2	3.73E+12	1.86E+12		
Total	5	2.13E+15			

Elaborado por: Mayra Villacís

Por lo tanto Si hay diferencia significativa entre los promedios del tiempo.

No hay diferencia significativa entre los intentos



INEC-ESPOL



## 2.4 Determinación de la concentración de Ozono requerida para variar el tiempo de Reducción Decimal

La constante de resistencia termal, mejor conocida como valor  $z$ , se define como la diferencia en temperaturas necesaria para causar una reducción de un 90% en el valor  $D$ . El valor  $z$  es un valor característico de cada microorganismo.

El valor  $z$  describe además la resistencia termal de las esporas de las bacterias. Para calcular el valor  $Z$ , grafican los valores  $D$  a diferentes temperaturas para un cultivo específico de un microorganismo. Como se ilustra en la figura a continuación (ver Fig 2.17), el valor  $z$  es la diferencia de las temperaturas que definen un cambio en el ciclo logarítmico.

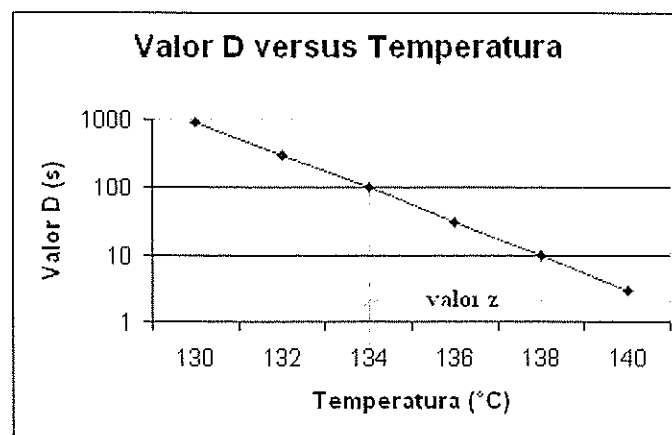


Figura 2.17 Valor Z

Entonces  $Z$  es el incremento en temperatura necesario para obtener el mismo efecto letal reduciendo el tiempo diez veces. El valor de  $z$  proporciona información sobre la resistencia relativa a la destrucción de un microorganismo a diferentes temperaturas. Los valores de  $z$  son específicos para cada alimento.

Partiendo de esta definición, se busco encontrar un valor análogo al valor  $Z$ , es decir el incremento necesario en la concentración de ozono para obtener el mismo efecto letal reduciendo un log al valor  $D$ .

## PRIMER ENSAYO

TABLA 19

Valor D vs Concentración de ozono

Ozono (ppm)	Valor D (s)	log D
1.2	3.06	0.485721426
0.52	3.38	0.5289167
0.2	17.59	1.245265839

Elaborado por: Mayra Villacís

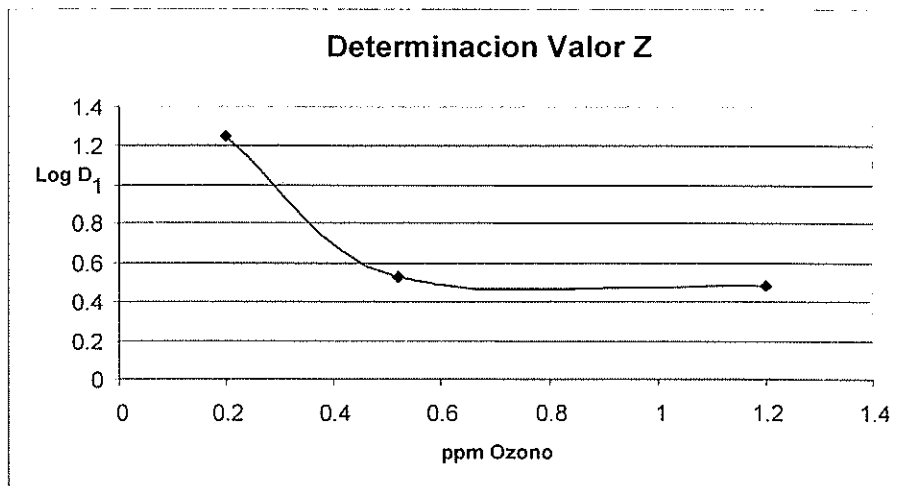


Figura 2.18 Determinación Valor Z

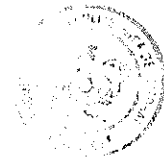
## SEGUNDO ENSAYO

TABLA 20

Valor D vs Concentración de ozono

Ozono (ppm)	Valor D (s)	log D
1.2	2.86	0.456366
0.52	3.41	0.532754379
0.2	16.93	1.2287

Elaborado por: Mayra Villacís



ESPOL

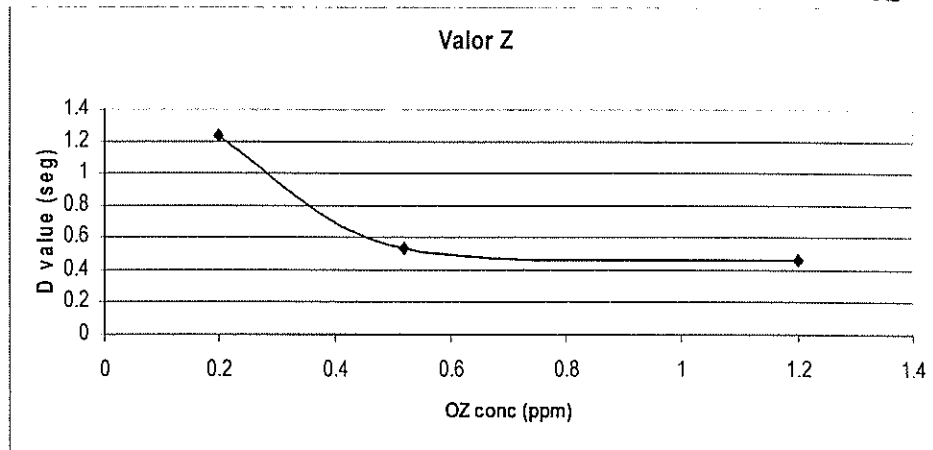


Figura 2.19 Determinación Valor Z

El análisis ANOVA para bloques aleatorizados fue utilizado para determinar si existe diferencia significativa entre el primer y segundo experimento.

**TABLA 21**

**Datos para Análisis de Diseño de Bloques**

Concentracin de ozono						
<b>Intento</b>		1.2	0.52	0.2	Total	
	1	3.06	3.38	17.59		24.03
	2	2.86	3.41	16.93		23.2
<b>Total</b>		5.92	6.79	34.52		<b>47.23</b>

Elaborado por: Mayra Villacís

**TABLA 22**

**Anova para Bloques Completos Aleatorizados**

ANOVA RCBD					
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>F critico 5%</b>
<b>Oz conc.</b>	2	264.6116	132.305817	2143.761545	19
<b>Intento</b>	1	0.114817	0.11481667	1.860383473	18.51
<b>Error</b>	2	0.123433	0.06171667		
<b>Total</b>	5	264.8499			264.6116333

Elaborado por: Mayra Villacís

Como el valor F de la concentración de ozono es mayor que el F crítico, el efecto de la concentración de ozono es significativo.

Como el valor F de los intentos es menor al F crítico entonces no hay diferencia significativa entre los dos experimentos realizados.

Al determinar que no existe diferencia significativa entre los experimentos podemos comprobar que la ausencia del valor OZ (concentración de ozono necesaria para disminuir D en un 90 %) no es resultado de fallas durante el desarrollo del experimento.

Entonces, se aplico métodos estadísticos para determinar la relación entre el valor D y la concentración de Ozono. Se utilizara el método polinomial para determinar la relación entre concentración de Ozono y el valor D.

## PRIMER EXPERIMENTO

TABLA 23

Valores D para diferentes concentraciones de Ozono

Ozono (ppm)	Valor D (s)	log D
1.2	3.06	0.485721
0.52	3.38	0.528917
0.2	17.59	1.245266

Elaborado por: Mayra Villacís

## SEGUNDO EXPERIMENTO

TABLA 24

Valores D para diferentes concentraciones de Ozono

Ozono (ppm)	Valor D (s)	log D
1.2	2.86	0.456366
0.52	3.41	0.532754
0.2	16.93	1.228657

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 25

Valores promedio

Ozono (ppm)	D (sec)	log oz	log D
1.2	2.96	0.079181	0.471292
0.52	3.395	-0.284	0.53084
0.2	17.26	-0.69897	1.237041

Elaborado por: Mayra Villacís

Se utilizo el procedimiento polinomial para determinar la relación entre concentración de Ozono y el valor D.

Se utilizo además el procedimiento de contraste

### Orden 1, Lineal

$a_1 = -1$        $a_2 = 0$        $a_3 = 1$       Coef=2

### Orden 2, Cuadrática

$a_1 = 1$        $a_2 = -2$        $a_3 = 1$       Coef=6

**TABLA 26**

### Modelo Lineal

Modelo lineal:	$D_3 - D_1 =$	14.3	$D_3 + 0 - D_1$
	MS lineal=	204.49	$2 * (D_3 + 0 - D_1) / \text{Coef}$
	MS error=	0.061717	MSe tabla anova
	F =	3313.368	MS lineal/MS error
	F critical (0.05, 1, 2)	38	

Elaborado por: Mayra Villacís

El efecto lineal es significativo



**TABLA 27**  
**Modelo Cuadrático**

Modelo cuadra:	$D1-2D2+D3=$	13.43	
	MS cuadrat. =	60.12163	$2*(D1-2D2+D3)/coef$
	MS error=	0.061717	MSe tabla anova
	F =	974.1555	MS lineal/MS error
	F critical =	38	

Elaborado por: Mayra Villacís

El efecto cuadrático es significativo



ID - ESPOL

**TABLA 28**  
**Modelo lineal semi log**

Modelo lineal semi log:	$\log D3 - \log D1 =$	0.765749	$D3 + 0 - D1$
	MS lineal =	0.586372	$2 * (D3 + 0 - D1) / \text{Coef}$
	MS error =	0.061717	MSe tabla anova
	F =	9.501026	MS lineal / MS error
	F critical (0.05, 1, 2)	38	

Elaborado por: Mayra Villacís

El efecto lineal semi log es insignificativo

**TABLA 29**  
**Modelo cuadrático semi log**

Modelo cuadra semi log:	$D1-2D2+D3=$	0.646653	
	MS cuadrat. =	0.139387	$2*(D3+ 0 -D1)/Coef$
	MS error=	0.061717	MSe tabla anova
	F =	2.258493	MS lineal/MS error
	F critical =	38	

Elaborado por: Mayra Villacís

El efecto cuadrático semi log es insignificativo

## ANALISIS DE MODELOS LOG-LOG

TABLA 30

Log de los valores experimentales

Concentracion de Ozono				
Intento	1.2	0.52	0.2	Total
1	0.485721426	0.5289	1.24527	2.2599
2	0.456366033	0.5328	1.22866	2.2178
Total	0.94208746	1.0617	2.47392	<b>4.4777</b>

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 31

ANOVA RCB					
Fuente	GL	SS	MS	F	F critico 5%
Oz conc.	2	0.7259	0.36294	2588.9	19
Intento	1	0.0003	0.0003	2.1098	18.51
Error	2	0.0003	0.00014		
Total	5	0.7265			

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 32  
Modelo lineal log

Modelo lineal log:	$\log D3 - \log D1 =$	0.765749	$D3 + 0 - D1$
	MS lineal=	0.586372	$2 * (D3 + 0 - D1) / \text{Coef}$
	MS error=	0.00014	MSe tabla anova
	F =	4182.604	MS lineal/MS error
	F critical (0.05, 1,2)	38	

Elaborado por: Mayra Villacís

El efecto lineal lineal log es significativo



UNL - ESPOL

**TABLA 33**  
**Modelo Cuadrático- Log**

Modelo cuadra log:	logD1- 2logD2+logD3=	0.646653	
	MS cuadrat. =	0.139387	$2*(D1-2D2+D3)/6$
	MS error=	0.00014	MSe tabla anova
	F =	994.2488	MSe tabla anova
	F critical =	38	MS lineal/MS error

Elaborado por: Mayra Villacís

El efecto cuadrático log es significativo

# CAPITULO 3

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Obtención de la Ecuación de la Cinética de Inactivación de la E.Coli

Al realizar el análisis del efecto polinomial determinamos los efectos de los modelos lineales, cuadráticos, lineal semi Log, cuadra semi Log de los cuales solo eran significativos al 95% los dos primeros.

También se analizaron los modelos Log –Log de los cuales se determinó que eran significativos el Lineal Log y el cuadrático Log.

Los modelos lineales, cuadrático, lineal LOG y cuadrático LOG son significativos, pero los modelos LOG predominan, y entre estos se escoge el de mayor exponente (o sea el cuadrático LOG). Encontramos que este modelo es el que mejor predice el comportamiento de la cinética de desactivación del microorganismo, por lo que:

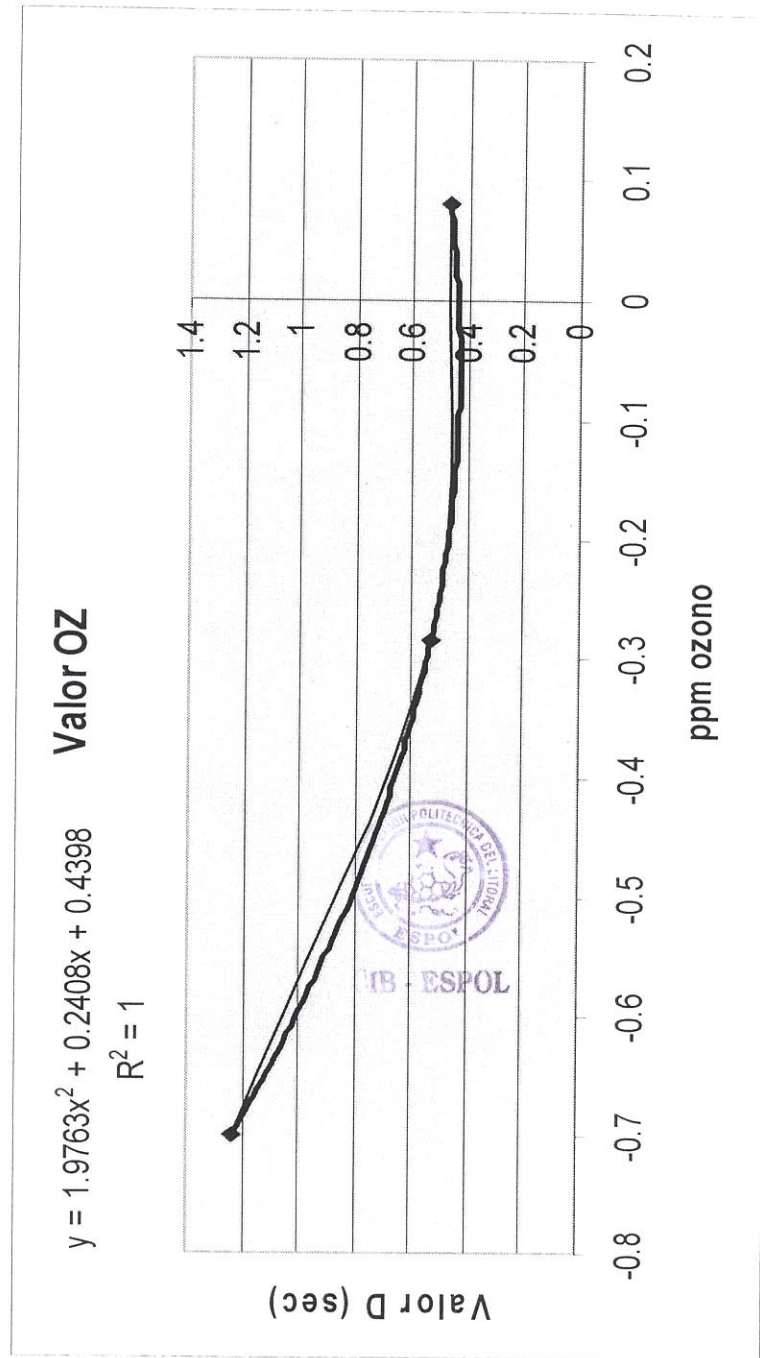


Figura 3.1 Relación Log -Log entre valor D y Concentración de Ozono



Luego tenemos que, la ecuación que relaciona al valor D con la concentración de ozono es:

$$\log D_C = 1.98(\log C)^2 + 0.24 \log C + 0.4398$$

(Ecuación 3.1)

Al despejar el valor D en la Ecuación 3.1, encontramos que:

$$D_C = 2.75(10^{1.98(\log C)^2})C^{0.24}$$

(Ecuación 3.2)

Entonces mezclando los resultados de los experimentos de los valores D con los de ozono tenemos:

$$D = \frac{F}{\log \frac{No}{Nf}}$$

Es decir:

$$2.75(10^{1.98(\log C)^2})C^{0.24} = \frac{F}{\log \frac{N_o}{N_f}}$$

(Ecuación 3.3)

de donde al despejar F, que es el tiempo de tratamiento, tendremos:

$$F = 2.75(10^{1.98(\log C)^2})C^{0.24} \left( \log \frac{N_o}{N_f} \right)$$

(Ecuación 3.4)

Esta ecuación (3.4) define la cinética de desactivación de la E.Coli al aplicar Ozono al agua, es decir el tiempo necesario (F), para reducir la cantidad del microorganismo de una concentración inicial ( $N_o$ ) a una concentración final ( $N_f$ ) al utilizar una concentración determinada de Ozono (C).

### 3.2 Análisis de varianza de los resultados

Se realizó validación a 0.7 ppm realizando una log reducción de 4 o superior

**TABLA 34**

#### Valores F Reales vs. Experimentales

Concentración de Ozono	Log Reducción	F Reales	F Ecuación
0.7	4.616	13.3	13
0.7	4.936	14.1	13.9
0.7	4.936	14.7	13.9
0.7	4.793	15	13.5
0.7	4.865	15	13.7
0.7	5.148	14.9	14.5

Elaborado por: Mayra Villacís

Luego, se realizó un análisis de varianza para comparar la diferencia entre las medias, y se obtuvo los siguientes resultados a un nivel de confianza del 95%.



UNESPOL

TABLA 35

## Anova para comparación de Medias

Tabla ANOVA					
Fuente	Suma	Grados de	Media		
	Cuadrados	Libertad	Cuadrada	F stat	Valor p
Tratamiento	1.6875	1	1.6875	4.773692	0.0538
Error	3.535	10	0.3535		
Total	5.2225	11			

Elaborado por: Mayra Villacís

TABLA 36

Estadísticos		
	F Reales	F Ecuacion
Media	14.5	13.75
STD Dev	0.678233	0.496990946
Min	13.3	13
Mediana	14.8	13.8
Max	15	14.5
Skewness	-1.41352	-0.021994715
Kurtosis	1.1979206	1.067219591
SS Dev	2.3	1.235
Observations	6	6

Elaborado por: Mayra Villacís

Con estos resultados podemos determinar que no existe diferencia significativa entre los valores experimentales y los valores predichos por la ecuación 3.4

### **3.3 Ajuste de la ecuación para procesos de desinfección de frutas**

Posteriormente para analizar si la ecuación encontrada para la cinética de inactivación del microorganismo en el agua, se puede aplicar también para el lavado de frutas, se realizaron pruebas experimentales, colocando las frutas dentro del recipiente con agua, y aplicando ozono al agua de lavado de uvas y manzanas.

Los parámetros de operación del equipo fueron: 0.1 ppm de concentración de ozono en el agua, que se mantuvo durante 3.12 minutos para la manzana y de 3.15 minutos para la uva.

#### **Reduccion UFC**

Manzana: de 110000 a 4000 UFC

Uva: de 70000 a 2000 UFC

Entonces al aplicar la ecuación 3.4 para estas frutas tenemos:



UN - DSPOL

$$F = 2.75(10^{1.98(\log 0.1)^2})0.1^{0.24} \left(\log \frac{110000}{4000}\right)$$

$$F = 217.35 \text{ segundos} = 3.6 \text{ min}$$

$$F = 2.75(10^{1.98(\log 0.1)^2})0.1^{0.24} \left(\log \frac{70000}{2000}\right)$$

$$F = 233 \text{ segundos} = 3.88 \text{ min}$$

Se realizó una comparación entre los resultados que da la ecuación y los experimentales para encontrar así un factor de ajuste para estos dos productos.

**TABLA 37**

**Factor de Ajuste**

	F min (Ecuación)	F Experimental	Factor de ajuste
Manzana	3,6	3,123	1,15
Uva	3,88	3,15	1,23

Elaborado por: Mayra Villacís

# CAPITULO 4



## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IS - ESPOL

- Se comprobó la eficacia de la utilización del ozono como un poderoso agente sanitizante para desinfección de agua.
- Se determinó y comprobó que la Escherichia Coli sigue una cinética de inactivación de primer orden con respecto al tiempo, pero no así con respecto a la concentración de ozono, para la cual es de segundo orden, más específicamente de la forma Log -cuadrática
- El rango más indicado de concentración de ozono para procesos de inactivación de la E. Coli está entre 0.52 y 1.2 ppm.

- La Ecuación encontrada para la cinética de inactivación de la E.COLI en agua, es también aplicable para el lavado de frutas (manzanas, uvas), pero se debe ajustar la ecuación con un factor de corrección que resulto ser de 1.15 para la manzana y de 1.23 para la uva.
- Cuando la bacteria con el TSB es añadida al agua ozonificada, la concentración de ozono cae a cero, debido a la reacción del agar con los componentes orgánicos del TSB, por esta razón es importante recordar que el tiempo de acción del ozono debe ser controlado una vez que se reestablece la concertación.
- Si se utiliza algún tipo de ozonificador comercial, se deberá comprobar periódicamente la correcta calibración de estos, ya que alguna falla o disminución el la concentración de ozono producida, nos llevará a resultados erróneos.
- Se recomienda además que se utilice el presente trabajo de investigación, como base para futuras investigaciones sobre la aplicación de esta ecuación para diferentes frutas, para lograr



establecer los factores de corrección para ellas, y además para otro tipo de productos para determinar su aplicabilidad.



IR - ESPOL

## BIBLIOGRAFIA

1. DOYLE MP, Food microbiology: fundamentals and frontiers, Beuchar LR, Montville TJ, editors, Washington, DC, 2001 ASM Press. 872 p
2. FLOWERS RUSSELL, DOYLE MICHAEL Bacteria Associated with Foodborne Diseases, AUGUST 2004, INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS
3. HUNT NK, MARIAS BJ, Kinetics of Escherichia coli with ozone. Water Research, 1997, 31(6):1355-62.
4. KHADRE MA, YOUSEF AE, KIM JG. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. Journal of Food Science, 2001, 66(9):1242-52.





B <sub>i</sub>		5% (máximo) y 1% (mínimo) los cuales para la construcción de F																												B <sub>i</sub>	
		el grado de los datos para el mayor y el menor																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		29
11	4.54	3.96	3.50	3.26	3.00	2.79	2.59	2.39	2.20	2.05	1.92	1.79	1.74	1.70	1.65	1.61	1.57	1.53	1.51	1.47	1.46	1.43	1.40	1.37	1.35	1.32	1.30	1.28	1.26	1.24	1.23
12	4.65	4.21	3.82	3.67	3.32	3.07	2.89	2.74	2.55	2.35	2.17	2.02	1.95	1.89	1.84	1.80	1.76	1.73	1.70	1.67	1.64	1.61	1.58	1.55	1.52	1.50	1.48	1.46	1.44	1.43	
13	4.75	4.30	3.95	3.78	3.41	3.13	2.94	2.76	2.56	2.35	2.17	2.01	1.93	1.87	1.82	1.78	1.74	1.71	1.68	1.65	1.62	1.59	1.56	1.53	1.50	1.48	1.46	1.44	1.43	1.41	
14	4.83	4.37	4.00	3.81	3.41	3.11	2.91	2.71	2.50	2.28	2.10	1.93	1.85	1.79	1.74	1.70	1.66	1.63	1.60	1.57	1.54	1.51	1.48	1.45	1.42	1.40	1.38	1.36	1.35	1.33	
15	4.87	4.39	4.00	3.79	3.38	3.06	2.85	2.64	2.42	2.20	2.01	1.83	1.75	1.69	1.64	1.60	1.56	1.53	1.50	1.47	1.44	1.41	1.38	1.35	1.32	1.30	1.28	1.26	1.25	1.23	
16	4.90	4.40	4.00	3.77	3.34	3.01	2.78	2.56	2.33	2.10	1.91	1.73	1.65	1.59	1.54	1.50	1.46	1.43	1.40	1.37	1.34	1.31	1.28	1.25	1.22	1.20	1.18	1.16	1.15	1.13	
17	4.92	4.41	4.00	3.75	3.31	2.97	2.73	2.50	2.26	2.03	1.83	1.65	1.57	1.51	1.46	1.42	1.38	1.35	1.32	1.29	1.26	1.23	1.20	1.17	1.14	1.12	1.10	1.08	1.07	1.05	
18	4.94	4.42	4.00	3.73	3.28	2.93	2.68	2.44	2.20	1.96	1.75	1.57	1.49	1.43	1.38	1.34	1.30	1.27	1.24	1.21	1.18	1.15	1.12	1.09	1.06	1.04	1.02	1.01	0.99	0.97	
19	4.95	4.43	4.00	3.71	3.25	2.89	2.64	2.39	2.14	1.90	1.68	1.50	1.42	1.36	1.31	1.27	1.23	1.20	1.17	1.14	1.11	1.08	1.05	1.02	0.99	0.96	0.94	0.93	0.91	0.89	
20	4.96	4.44	4.00	3.69	3.22	2.85	2.59	2.34	2.09	1.84	1.62	1.44	1.36	1.30	1.25	1.21	1.17	1.14	1.11	1.08	1.05	1.02	0.99	0.96	0.93	0.90	0.88	0.87	0.85	0.83	
21	4.97	4.45	4.00	3.67	3.19	2.81	2.54	2.29	2.03	1.78	1.56	1.38	1.30	1.24	1.19	1.15	1.11	1.08	1.05	1.02	0.99	0.96	0.93	0.90	0.87	0.84	0.82	0.81	0.79	0.77	
22	4.98	4.46	4.00	3.65	3.17	2.78	2.50	2.25	1.99	1.73	1.51	1.33	1.25	1.19	1.14	1.10	1.06	1.03	1.00	0.97	0.94	0.91	0.88	0.85	0.82	0.79	0.77	0.76	0.74	0.72	
23	4.99	4.47	4.00	3.63	3.14	2.75	2.47	2.22	1.95	1.69	1.47	1.29	1.21	1.15	1.10	1.06	1.02	0.99	0.96	0.93	0.90	0.87	0.84	0.81	0.78	0.75	0.73	0.72	0.70	0.68	
24	5.00	4.48	4.00	3.61	3.11	2.72	2.43	2.18	1.91	1.65	1.43	1.25	1.17	1.11	1.06	1.02	0.98	0.95	0.92	0.89	0.86	0.83	0.80	0.77	0.74	0.71	0.69	0.68	0.66	0.64	
25	5.01	4.49	4.00	3.59	3.08	2.69	2.40	2.14	1.87	1.61	1.39	1.21	1.13	1.07	1.02	0.98	0.94	0.91	0.88	0.85	0.82	0.79	0.76	0.73	0.70	0.67	0.65	0.64	0.62	0.60	
26	5.02	4.50	4.00	3.57	3.05	2.65	2.35	2.09	1.81	1.55	1.33	1.15	1.07	1.01	0.96	0.92	0.88	0.85	0.82	0.79	0.76	0.73	0.70	0.67	0.64	0.61	0.59	0.58	0.56	0.54	
27	5.03	4.51	4.00	3.55	3.02	2.61	2.30	2.04	1.76	1.50	1.28	1.10	1.02	0.96	0.91	0.87	0.83	0.80	0.77	0.74	0.71	0.68	0.65	0.62	0.59	0.56	0.54	0.53	0.51	0.49	
28	5.04	4.52	4.00	3.53	2.99	2.57	2.26	2.00	1.71	1.45	1.23	1.05	0.97	0.91	0.86	0.82	0.78	0.75	0.72	0.69	0.66	0.63	0.60	0.57	0.54	0.51	0.49	0.48	0.46	0.44	
29	5.05	4.53	4.00	3.51	2.96	2.54	2.23	1.97	1.68	1.42	1.20	1.02	0.94	0.88	0.83	0.79	0.75	0.72	0.69	0.66	0.63	0.60	0.57	0.54	0.51	0.48	0.46	0.45	0.43	0.41	
30	5.06	4.54	4.00	3.49	2.93	2.51	2.20	1.94	1.65	1.39	1.17	0.99	0.91	0.85	0.80	0.76	0.72	0.69	0.66	0.63	0.60	0.57	0.54	0.51	0.48	0.45	0.43	0.42	0.40	0.38	
31	5.07	4.55	4.00	3.47	2.90	2.48	2.17	1.91	1.62	1.36	1.14	0.96	0.88	0.82	0.77	0.73	0.69	0.66	0.63	0.60	0.57	0.54	0.51	0.48	0.45	0.42	0.40	0.39	0.37	0.35	
32	5.08	4.56	4.00	3.45	2.87	2.45	2.14	1.88	1.59	1.33	1.11	0.93	0.85	0.79	0.74	0.70	0.66	0.63	0.60	0.57	0.54	0.51	0.48	0.45	0.42	0.39	0.37	0.36	0.34	0.32	
33	5.09	4.57	4.00	3.43	2.84	2.42	2.11	1.85	1.56	1.30	1.08	0.90	0.82	0.76	0.71	0.67	0.63	0.60	0.57	0.54	0.51	0.48	0.45	0.42	0.39	0.36	0.34	0.33	0.31	0.29	
34	5.10	4.58	4.00	3.41	2.81	2.39	2.08	1.82	1.53	1.27	1.05	0.87	0.79	0.73	0.68	0.64	0.60	0.57	0.54	0.51	0.48	0.45	0.42	0.39	0.36	0.33	0.31	0.30	0.28	0.26	
35	5.11	4.59	4.00	3.39	2.78	2.36	2.05	1.79	1.50	1.24	1.02	0.84	0.76	0.70	0.65	0.61	0.57	0.54	0.51	0.48	0.45	0.42	0.39	0.36	0.33	0.30	0.28	0.27	0.25	0.23	
36	5.12	4.60	4.00	3.37	2.75	2.33	2.02	1.76	1.47	1.21	0.99	0.81	0.73	0.67	0.62	0.58	0.54	0.51	0.48	0.45	0.42	0.39	0.36	0.33	0.30	0.27	0.25	0.24	0.22	0.20	
37	5.13	4.61	4.00	3.35	2.72	2.30	1.99	1.73	1.44	1.18	0.96	0.78	0.70	0.64	0.59	0.55	0.51	0.48	0.45	0.42	0.39	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	0.22	0.21	0.19	0.17	
38	5.14	4.62	4.00	3.33	2.69	2.27	1.96	1.70	1.41	1.15	0.93	0.75	0.67	0.61	0.56	0.52	0.48	0.45	0.42	0.39	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	0.21	0.19	0.18	0.16	0.14	
39	5.15	4.63	4.00	3.31	2.66	2.24	1.93	1.67	1.38	1.12	0.90	0.72	0.64	0.58	0.53	0.49	0.45	0.42	0.39	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	0.21	0.18	0.16	0.15	0.13	0.11	
40	5.16	4.64	4.00	3.29	2.63	2.21	1.90	1.64	1.35	1.09	0.87	0.69	0.61	0.55	0.50	0.46	0.42	0.39	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.13	0.12	0.10	0.08	
41	5.17	4.65	4.00	3.27	2.60	2.18	1.87	1.61	1.32	1.06	0.84	0.66	0.58	0.52	0.47	0.43	0.39	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.10	0.09	0.07	0.05	
42	5.18	4.66	4.00	3.25	2.57	2.15	1.84	1.58	1.29	1.03	0.81	0.63	0.55	0.49	0.44	0.40	0.36	0.33	0.30	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.07	0.06	0.04	0.02	
43	5.19	4.67	4.00	3.23	2.54	2.12	1.81	1.55	1.26	1.00	0.78	0.60	0.52	0.46	0.41	0.37	0.33	0.30	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.04	0.03	0.01	0.00	
44	5.20	4.68	4.00	3.21	2.51	2.09	1.78	1.52	1.23	0.97	0.75	0.57	0.49	0.43	0.38	0.34	0.30	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	
45	5.21	4.69	4.00	3.19	2.48	2.06	1.75	1.49	1.20	0.94	0.72	0.54	0.46	0.40	0.35	0.31	0.27	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
46	5.22	4.70	4.00	3.17	2.45	2.03	1.72	1.46	1.17	0.91	0.69	0.51	0.43	0.37	0.32	0.28	0.24	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
47	5.23	4.71	4.00	3.15	2.42	2.00	1.69	1.43	1.14	0.88	0.66	0.48	0.40	0.34	0.29	0.25	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
48	5.24	4.72	4.00	3.13	2.39	1.97	1.66	1.40	1.11	0.85	0.63	0.45	0.37	0.31	0.26	0.22	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
49	5.25	4.73	4.00	3.11	2.36	1.94	1.63	1.37	1.08	0.82	0.60	0.42	0.34	0.28	0.23	0.19	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
50	5.26	4.74	4.00	3.09	2.33	1.91	1.60	1.34	1.05	0.79	0.57	0.39	0.31	0.25	0.20	0.16	0.12	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
51	5.27	4.75	4.00	3.07	2.30	1.88	1.57	1.31	1.02	0.76	0.54	0.36	0.28	0.22	0.17	0.13	0.09	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
52	5.28	4.76	4.00	3.05	2.27	1.85	1.54	1.28	0.99	0.73	0.51	0.33	0.25	0.19	0.14	0.10	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
53	5.29	4.77	4.00	3.03	2.24	1.82	1.51	1.25	0.96	0.70	0.48	0.30	0.22	0.16	0.11	0.07	0.03	0.00													

## APENDICE B

### COEFICIENTE DE POLINOMIOS ORTOGONALES

#### 3 TABLA B.20. Coeficientes de polinomios ortogonales para Análisis Tendencias

Para Diseño equilibrado y niveles de la variable independiente igualmente espaciados

Ejemplo de búsqueda

Parámetros

a	orden	a <sup>1</sup>	a <sup>2</sup>	a <sup>3</sup>	a <sup>4</sup>	a <sup>5</sup>	a <sup>6</sup>	a <sup>7</sup>	a <sup>8</sup>	a <sup>9</sup>	a <sup>10</sup>	Coef dif
5	1	-2	-1	0	1	2	0	0	0	0	0	5;1



CIB - ESPOL

#### Orden 1, Lineal

a	a <sup>1</sup>	a <sup>2</sup>	a <sup>3</sup>	a <sup>4</sup>	a <sup>5</sup>	a <sup>6</sup>	a <sup>7</sup>	a <sup>8</sup>	a <sup>9</sup>	a <sup>10</sup>	Coef
3; 1	-1	0	1								2
4; 1	-3	-1	1	3							20
5; 1	-2	-1	0	1	2						10
6; 1	-5	-3	-1	1	3	5					70
7; 1	-3	-2	-1	0	1	2	3				28
8; 1	-7	-5	-3	-1	1	3	5	7			168
9; 1	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4		60
10; 1	-9	-7	-5	-3	-1	1	3	5	7	9	330
-----											
3; 2	1	-2	1								6
4; 2	1	-1	-1	1							4
5; 2	2	-1	-2	-1	2						14

#### Orden 2, Cuadrática

6; 2	5	-1	-4	-4	-1	5					84
7; 2	5	0	-3	-4	-3	0	5				84
8; 2	7	1	-3	-5	-5	-3	1	7			168
9; 2	28	7	-8	-17	-20	-17	-8	7	28		2,77 2
10; 2	6	2	-1	-3	-4	-4	-3	-1	2	6	132
<hr/>											
4; 3	-1	3	-3	1							20
5; 3	-1	2	0	-2	1						10
6; 3	-5	7	4	-4	-7	5					180
7; 3	-1	1	1	0	-1	-1	1				6
8; 3	-7	5	7	3	-3	-7	-5	7			264
9; 3	-14	7	13	9	0	-9	-13	-7	14		990
10; 3	-42	14	35	31	12	-12	-31	-35	-14	42	8,58 0
<hr/>											
5; 4	1	-4	6	-4	1						70
6; 4	1	-3	2	2	-3	1					28
7; 4	3	-7	1	6	1	-7	3				154
8; 4	7	-13	-3	9	9	-3	-13	7			616
9; 4	14	-21	-11	9	18	9	-11	-21	14		2,00 2
10; 4	18	-22	-17	3	18	18	3	-17	-22	18	2,86 0
<hr/>											
6; 5	-1	5	-10	10	-5	1					252
7; 5	-1	4	-5	0	5	-4	1				84
8; 5	-7	23	-17	-15	15	17	-23	7			2,18 4
9; 5	-4	11	-4	-9	0	9	4	-11	4		468
10; 5	-6	14	-1	-11	-6	6	11	1	14	6	780

**Orden 3,  
Cúbica**

**Orden 4,  
Cuártica**

**Orden 5,  
Quíntica**