



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL

**ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C EN UNA BEBIDA DE
GUANÁBANA (*Annona muricata*) Y KIWI (*Actinidia
deliciosa*) APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS
TÉRMICOS**

TRABAJO EXPERIMENTAL

Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención del título de
INGENIERO AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL

AUTOR
HERRERA CHILA LEONARDO GABRIEL

TUTOR
ING. ZUÑIGA MORENO LUIS EDUARDO, M. Sc.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2023



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUTRIAL

APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, **ZUÑIGA MORENO LUIS EDUARDO**, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: **ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C EN UNA BEBIDA DE GUANÁBANA (*Annona muricata*) Y KIWI (*Actinidia deliciosa*) APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS**, realizado por el estudiante HERRERA CHILA LEONARDO GABRIEL; con cédula de identidad 0956519375 de la carrera INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL, CAMPUS DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ-GUAYAQUIL, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Luis Eduardo Zúñiga Moreno, M. Sc.

Guayaquil, 07 de junio del 2023



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “**ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C EN UNA BEBIDA DE GUANÁBANA (*Annona muricata*) Y KIWI (*Actinidia deliciosa*) APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS**”, realizado por el estudiante HERRERA CHILA LEONARDO GABRIEL, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

Ing. Ana Campuzano Vera M.Sc.
PRESIDENTE

Ing. Julio Palmay Paredes, M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Yoansy García Ortega M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing, Luis Zúñiga Moreno M.Sc.
EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 11 de enero del 2023

Dedicatoria

Agradezco a Dios, por haberme proporcionado la fuerza y el carácter necesario para continuar con mis metas. Es necesario para mí mencionar en este agradecimiento a mi gran amigo Eco. Josué Castillo por su apoyo incondicional en todo el trascurso de mi vida estudiantil, agradezco especialmente a Sra. Martha Peña, quien cuidó de mí adoptándome en su familia y tratándome con un hijo más durante todos estos años.

Agradezco a los docentes por sus consejos y conocimientos, los cuales me sirvieron para cumplir con mi meta académica, también agradezco por su ayuda y amistad a mis compañeros de salón, quienes me ayudaron en múltiples ocasiones e hicieron de mí una mejor persona.

Dedico esta tesis a mi madre y a mi esposa, quienes siempre tuvieron una palabra de aliento para continuar y cumplir mis objetivos.

Autorización de Autoría Intelectual

Yo, Herrera Chila Leonardo Gabriel, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre **“ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C EN UNA BEBIDA DE GUANÁBANA (*Annona muricata*) Y KIWI (*Actinidia deliciosa*) APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS”** para optar el título de **INGENIERA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL**, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, 07 de junio del 2023

HERRERA CHILA LEONARDO GABRIEL
C.I. 0956519375

Índice general

PORTADA.....	1
APROBACIÓN DEL TUTOR	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	3
Dedicatoria.....	4
Autorización de Autoría Intelectual	5
Índice general	6
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	12
Resumen	14
Abstract.....	15
1. Introducción.....	16
1.1 Antecedentes del problema.....	16
1.2 Planteamiento y formulación del problema	17
1.2.1. Planteamiento del problema.	17
1.2.2. Formulación del problema.	18
1.3 Justificación de la investigación	18
1.4 Delimitación de la investigación	19
1.5 Objetivo general	19
1.6 Objetivos específicos.....	19
1.7 Hipótesis	20
2. Marco teórico.....	21
2.1 Estado del arte.....	21

2.2 Bases teóricas	23
2.2.1. Tratamientos térmicos en bebidas.	23
2.2.1.1. Pasteurización.....	23
2.2.1.2. Proceso de pasteurización.....	23
2.2.1.3. Aplicación.....	24
2.2.1.4. Tipo de pasteurización aplicada en la investigación.....	24
2.2.1.4.1. Pasteurización LTLT.	24
2.2.1.4.2. Pasterización LTLT por el método de baño María.	25
2.2.2. Vitamina C.....	26
2.2.2.1. Generalidades de la vitamina C.	26
2.2.2.2. Estructura química de la vitamina C.....	26
2.2.2.3. Importancia de la vitamina C.....	27
2.2.2.4. Antioxidantes.	27
2.2.2.5. Actividad antioxidante de la vitamina C.....	28
2.2.2.6. Cinética de degradación de la vitamina C.....	28
2.2.2.7. Energía de activación.	29
2.1.2.8. Estabilidad térmica de la vitamina C.	30
2.2.3. Métodos para determinar vitamina C.	30
2.2.3.1. Método yodométrico.....	30
2.2.3.2. Fundamentos del método yodométrico.	31
2.2.3.4. Reacción de la titulación.	31
2.2.3.5. Fundamento del indicador.	32
2.2.3. Kiwi (Actinidia deliciosa).....	32

2.2.3.1. Generalidades.	32
2.2.3.2. Producción de kiwi en Ecuador.	33
2.2.3.3. Zonas de producción del kiwi.	33
2.2.3.4. Taxonomía del kiwi.	34
2.2.3.5. Características nutricionales del kiwi.	34
2.2.4. Guanábana (<i>Annona muricata</i>).	34
2.2.4.1. Generalidades.	34
2.2.4.2. Producción de guanábana en Ecuador.	35
2.2.4.3. Zona de producción de la guanábana.	35
2.2.4.4. Morfología de la guanábana.	36
2.2.4.5. Características nutricionales de la guanábana.	36
2.3 Marco legal.	36
3. Materiales y métodos.	39
3.1 Enfoque de la investigación.	39
3.1.1. Tipo de investigación.	39
3.1.2. Diseño de investigación.	39
3.2.1. Variables.	40
3.2.1.1. Variable independiente.	40
3.2.1.2. Variable dependiente.	40
3.3.1. Tratamientos.	40
3.4.1. Diseño experimental.	41
3.4.2. Recolección de datos.	42
3.4.1.1. Recursos.	42

3.4.1.4. Descripción del diagrama de flujo.....	45
3.4.1.5. Análisis físico químico organoléptico y microbiológicos del producto terminado.	46
3.4.1.5.1. Coliformes NMP/cm ³ – Método de ensayo NTE INEN 1529-6.....	46
3.4.1.5.2. Coliformes fecales NMP/cm ³ - Método de ensayo NTE INEN 1529-8.	46
3.4.1.5.3. Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³ - Método de ensayo NTE INEN 1529-5.	47
3.4.1.5.4. Mohos y levaduras UP/ cm ³ - Método de ensayo NTE INEN 1529-10.	47
3.4.1.5.5. Contenido de vitamina C por método yodométrico.	48
3.4.1.5.6. Cálculo de ácido ascórbico en la muestra.....	49
3.4.1.5.7. Muestra de jugo de fruta.	49
3.4.1.5.8. Análisis sensorial.....	50
3.5.1. Análisis estadístico.....	50
4. Resultados.....	52
4.1 Desarrollo de una bebida de guanábana y kiwi, sometida a 3 distintas condiciones de pasteurización (tiempo y temperatura) y análisis sensorial de los 3 tratamientos.....	52
4.1.1. Color.....	52
4.1.2. Olor.....	54
4.1.3. Sabor.....	55

4.2 Identificación mediante el método de titulación yodométrico la muestra con mayor concentración de vitamina C en la bebida desarrollada.....	55
4.3 Determinación las características físico-químicas (pH, acidez titulable, grados °brix) de la muestra con mayor contenido de vitamina C.....	58
4.4 Realizar el análisis microbiológico establecido en la norma INEN 2 337:2008 a la muestra con mayor contenido de vitamina C.....	59
5. Discusiones	61
6. Conclusiones.....	63
7. Recomendaciones.....	65
9. Anexos	73
9.1 Anexo 1. Clasificación taxonómica	73
9.2 Anexo 2. Desglose global de titulación para determinar presencia de vitamina C	74
9.3 Anexo 3. Desarrollo de bebida de guanábana y kiwi	76
9.4 Anexo 4. Normas técnicas INEN 2 337: 2008	84
9.5 Anexo 5. NTE INEN 1 529 5 control de microorganismos aerobios mesófilos.....	92
9.6 Anexo 6. NTE INEN 1529 8 detección y recuento de E. coli	110
9.7 Anexo 7. Análisis organoléptico de las muestras	124
9.8 Anexo 8. Análisis de varianza	125
9.9 Anexo 9. Informe de resultados de los análisis físico-químicos	127
10.1 Anexo 10. Informe de resultados de concentración de vitamina.....	128

Índice de tablas

Tabla 1 Requisitos microbiológicos Norma INEN 2 337:2008.....	37
Tabla 2 Parámetros de pasteurización.....	41
Tabla 3. Formulación de jugo de kiwi y guanábana	41
Tabla 4. Diseño estadístico	50
Tabla 5. Análisis de varianza de la bebida de guanábana y kiwi (Color)	54
Tabla 6. Análisis de varianza de la bebida de guanábana y kiwi (Olor)	54
Tabla 7. Análisis de varianza de la bebida de guanábana y kiwi (Sabor)	55
Tabla 8. Resultados de análisis de vitamina C por método de yodometría AOAC 967.21	56
Tabla 9. Análisis de varianza a los resultados obtenidos de vitamina C a las muestras de jugo de guanábana y kiwi	57
Tabla 10. Resultados del análisis físico-químico a la muestra con mayor concentración de vitamina C	59
Tabla 11. Resultados de análisis microbiológicos.....	60
Tabla 12. Taxonomía del kiwi.....	73
Tabla 13. Taxonomía del guanábana.....	73

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la bebida de guanábana y kiwi	44
Figura 2. Estructura química de la vitamina C.....	74
Figura 3. Ecuación de Arrhenius	74
Figura 4. Fórmula para energía de activación.....	74
Figura 5. Ecuación de la recta.....	74
Figura 6. Reacción química determinación de vitamina C por el método yodométrico.....	75
Figura 7. Semi reacción del yodo.....	75
Figura 8. Oxidación de grupos hidroxilos	75
Figura 9. Reacción global de la titulación.....	75
Figura 10. Fórmula para calcular el porcentaje de vitamina C en una muestra de jugo	75
Figura 11. Recepción, limpieza y pelado de la materia prima.....	76
Figura 12. Despulpado de la materia prima	76
Figura 13. Adición de benzoato de sodio	77
Figura 14. Filtración de la materia prima.....	77
Figura 15. Toma de temperatura.....	78
Figura 16. Mezclado de la materia prima	78
Figura 17. Pasteurización por método baño María	79
Figura 18. Toma de datos de temperatura primer parámetro térmico (60 °C / 15, 20 y 30 min).....	79

Figura 19. Toma de datos de temperatura segundo parámetro térmico (60 C / 15, 20 y 30 min).....	80
Figura 20. Toma de datos de temperatura tercera parámetro térmico (65 C / 15, 20 y 30 min).....	80
Figura 21. Embazado de las muestras.....	81
Figura 22. Enfriamiento de la bebida de guanábana y kiwi	81
Figura 23. Evaluación sensorial	82
Figura 24. Recopilación de datos	82
Figura 25. Panelistas	83

Resumen

En la actualidad la industria de alimentos ha implementado técnicas y procesos que ayudan a conseguir productos inocuos que duren más tiempo sin deteriorarse, pero existe técnicas como la pasteurización que pueden alterar las características nutricionales, principalmente el contenido de ácido ascórbico. En la investigación se determinó la estabilidad de la vitamina C en un jugo de guanábana (*Anona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*) con la finalidad de seleccionar un tratamiento térmico que reduzca la pérdida de vitamina C en el proceso de pasteurización. La metodología aplicada en la investigación fue de tipo experimental, dónde se propusieron nueve tratamientos térmicos 60 °C (15, 20, 30 min), 63 °C (15, 20, 30 min) y 65 °C (15, 20, 30 min). Se determinó el contenido de vitamina C por el método cuantitativo yodometría AOAC 967.21, el T5 M2 (63 °C / 20 min) tuvo mayor concentración de vitamina C, con un resultado de 0.333 mg / ml, posteriormente, la muestra fue sometida a un análisis físico-químico (Acidez titulable, pH y grados °brix) y microbiológico establecidos en la norma INEN 2337:2008 donde se determinó que el tratamiento con mayor concentración de vitamina C se encuentra dentro del rango permisible para el consumo, en conclusión el T5 M2 fue el mejor con respecto al contenido de vitamina C, los resultados del análisis físico-químico y microbiológicos fueron favorables luego del tratamiento de pasteurización.

Palabras clave: Bebida, pasteurización, sensibilidad, tratamiento, vitamina C.

Abstract

Nowadays, the food industry has implemented techniques and processes that help to get safe products that last longer without deteriorating, but there are techniques such as pasteurization that can alter the nutritional characteristics, mainly the ascorbic acid content. In this study, the stability of vitamin C in soursop (*Anona muricata*) and kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) juice was determined in order to determine a heat treatment that would reduce the loss of vitamin C in the pasteurization process. The methodology applied in the research was experimental, where nine heat treatments were proposed: 60 °C (15, 20, 30 min), 63 °C (15, 20, 30 min) and 65 °C (15, 20, 30 min). The vitamin C content was determined by the quantitative method iodometry AOAC 967.21, the T5 M2 (63 °C / 20 min) had the highest concentration of vitamin C, with a result of 0.333 mg / ml. Afterwards, the sample was analyzed physico-chemically (titratable acidity, pH and degrees obrix) and microbiologically according to INEN 2337:2008, where it was determined that the treatment with the highest concentration of vitamin C was within the permissible range for consumption. In short, T5 M2 was the best in terms of vitamin C content; the results of the physico-chemical and microbiological analysis were favorable after pasteurization treatment.

Key words: Beverage, pasteurization, sensibility, treatment, vitamin C.

1. Introducción

1.1 Antecedentes del problema

La producción nacional de kiwi y guanábana en los últimos años se ha incrementado, cuenta con acogida en mercados extranjeros debido a las propiedades nutricionales y antioxidantes que presentan estas frutas, sin embargo, no se les ha añadido un valor agregado. Ambas frutas dentro de su composición cuentan con propiedades antioxidantes que pueden ayudar a ralentizar el envejecimiento celular producido por los radicales libres, el envejecimiento prematuro en las personas se puede dar por el estrés, falta de actividad física, mala alimentación, falta de descanso y exposición prolongada al sol, conllevan al deterioro de las células produciendo envejecimiento acelerado del organismo (Carvajal, 2019).

La oxidación celular es un proceso metabólico normal en los organismos vivos se desarrollan en condiciones aerobias. Los oxidantes naturales se dividen en dos, el 20 % del aire en la respiración es oxígeno que permite el correcto funcionamiento de las células en nuestro cuerpo, una parte del oxígeno que entra se transforma en una especie reactiva oxidativa y el otro oxidante natural son las especies reactivas del nitrógeno. El aumento de los radicales libres producidos por ambos oxidantes pueden provocar en organismos vivos un proceso de homeostasis o muerte celular y producir enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y diabetes tipo 2 entre otros (Sánchez y Méndez, 2017).

Para evitar el envejecimiento prematuro del organismo es necesario consumir alimentos que en su composición cuenten con antioxidantes como la

vitamina C (ácido ascórbico) en las personas cumple la función de agente antioxidante está presente en varias frutas cítricas, verduras y alimentos procesados fortificados. El ácido ascórbico, junto con el glutatión, conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo.

Las industrias dedicadas a la elaboración de bebidas frutales utilizan la pasteurización para bajar la carga microbiológica de organismos que puedan afectar la salud del consumidor y alargar el tiempo de vida útil inhibiendo la acción de enzimas y microorganismos que se encargan de descomponer los alimentos, por otro lado, la pasteurización afecta directamente el contenido nutricional de las bebidas frutales bajando su capacidad antioxidante por la pérdida de vitaminas debido a la termolabilidad que presentan, afectando la composición nutricional del producto terminado (Benítez, 2017).

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1. Planteamiento del problema.

Nieto, Chanin y Tamborrel (2017) mencionan que la demanda a nivel mundial de alimentos procesados va en aumento debido a la creciente población mundial. Las industrias de alimentos han tenido que aumentar su producción, adquiriendo un gran compromiso con la población, fabricando productos que no afecten la salud de los consumidores. Para lograrlo, se requiere la aplicación de diferentes técnicas y tratamientos en los alimentos durante los distintos procesos industriales. Los tratamientos térmicos son los más empleados en las industrias

porque que sirven para eliminar microorganismos e inactivar enzimas, alargando el tiempo de vida útil de los alimentos y cuidando la salud del consumidor.

El valor nutricional de los alimentos procesados y semi procesados que pasan por un tratamiento térmico sufren pérdidas en el contenido nutricional debido a la termolabilidad de los nutrientes (Contreras, 2019). La pasteurización en jugos puede eliminar gran cantidad de vitamina C perdiendo además la actividad antioxidante.

Según estudios realizados por Villareal y Mejía (2016), se demostró que la pérdida de la vitamina C por el método de pasteurización en una bebida frutal puede ser de hasta un 80 %.

1.2.2. Formulación del problema.

¿Cuál es la temperatura y tiempo de pasteurización que permita una mayor retención de vitamina C en una bebida de guanábana (*Annona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*)?

1.3 Justificación de la investigación

Este proyecto está diseñado con el objetivo de analizar diferentes parámetros de pasteurización para evaluar cual retiene mayor cantidad de vitamina C, sin alterar sus características sensoriales en una bebida de guanábana (*Annona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*). Es necesario encontrar un equilibrio en la aplicación de tratamientos térmicos para eliminar agentes microbiológicos y conservar las características nutricionales dentro de la bebida, reteniendo componentes nutricionales como la vitamina C (Tenisi, 2017).

La producción de frutas tropicales en el Ecuador, tales como la guanábana (*Annona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*) es principalmente para la exportación. En la composición nutricional de estas dos frutas, destaca el contenido de vitamina C. Por otro lado, la pérdida de la materia prima por falta de herramientas para la cosecha y transporte son elevadas. Se propone aprovechar las propiedades nutricionales del kiwi y guanábana para el consumo en mercado nacional, mediante el desarrollo de una bebida que sea alta en antioxidantes y mantenga la mayor cantidad de vitamina C posible luego de la aplicación de pasteurización.

1.4 Delimitación de la investigación

- **Espacio:** La presente investigación se realizó en la Provincia del Guayas, Cantón Guayaquil, Parroquia Ximena, en la Universidad Agraria del Ecuador.
- **Tiempo:** La investigación se realizó en un periodo de 12 meses.
- **Población:** Este proyecto se encontró dirigido a la población en general.

1.5 Objetivo general

Evaluar la estabilidad de la vitamina C en un jugo de guanábana (*Annona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*) aplicando diferentes tratamientos térmicos (Pasteurización LTLT).

1.6 Objetivos específicos

- Desarrollo de una bebida de guanábana con kiwi y someterla a 3 distintas condiciones de pasteurización (tiempo y temperatura) realizando el análisis sensorial de los 3 tratamientos.

- Identificar mediante el método de titulación yodométrico la muestra con mayor concentración de vitamina C en la bebida.
- Determinar las características físico-químicas (pH, acidez titulable, grados $^{\circ}$ brix) de la muestra con mayor contenido de vitamina C.
- Realizar el análisis microbiológico establecido en la norma INEN 2 337:2008 a la muestra con mayor contenido de vitamina C.

1.7 Hipótesis

Los parámetros térmicos planteados afectarán la concentración de vitamina C en el jugo de guanábana (*Annona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*).

2. Marco teórico

2.1 Estado del arte

Robles (2016) en su investigación, observó que el tratamiento de pasteurización por calor puede inferir la estabilidad de la vitamina C. Tiempo y temperatura a la que se expone el jugo de Oca (*Oxalis tuberosa*). La investigación dio como resultado una concentración de ácido ascórbico superior a 44.02 mg/ 100 mL a 85 °C durante 6 minutos. En cuanto a la capacidad antioxidante de las bebidas, no se encontraron diferencias significativas, con cambios en la temperatura de pasteurización resultando en 683.04 μ mol Trolox/ 100 mL a 75 °C durante 12 minutos.

Jijón (2017) determinó que la exposición del ácido ascórbico a altas temperaturas produce cambios debido a la resistencia al calor de la vitamina C. En su estudio, se analizó el contenido de vitamina C en bebidas de piña (*Anonas comus*) y soja (*Glycine max*) por el método HPLC, y los resultados de la investigación se compararon por métodos estadísticos, demostrando que la cantidad de sólidos solubles no permite alcanzar la temperatura de pasteurización establecida, el contenido de vitamina C no es inferior al IDR, a pesar de que, utilizando una temperatura de pasteurización de 89 °C, hubo poca variación se puede concluir que el factor principal es la cantidad de sólidos solubles.

Cabenilla (2020) mencionó que existe una estrecha relación entre el ácido ascórbico y el calor, el cual se considera un parámetro de calidad clave debido a la resistencia al calor del ácido ascórbico, para representar el modelo cinético de primer orden descrito en el cual se describe la relación entre el calor y la presencia

de vitamina C, en el estudio de la degradación cinética, la dependencia de la temperatura de la relación degradación es evidente.

Angulo (2021) analizó varios parámetros térmicos de pasteurización, para determinar cuál permite tener mayor estabilidad de ácido ascórbico en muestras de jugo de guayaba (*Psidium guajava*) y soja (*Glycine max*), los resultados fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA). El tratamiento con mejores resultados fue el T9 (60 % soya y 40 % guayaba; 90 °C / durante 2 min) con un contenido de 6.07 mg/ L, tuvo una mayor aceptación por parte del panel sensorial no entrenado. El análisis microbiológico en el T9 bajo la especificación de la norma INEN 3028 determinó la ausencia de colonias de microorganismos <10 UFC / g.

Borrás (2020) mencionó que la aplicación de la pasteurización no logro el propósito de la inactivación de los microorganismos en los zumos de naranja. El parámetro con mayor contenido de vitamina C fue el de 83 °C durante 53.8 seg obteniendo una concentración de vitamina C de 54.62 mg/ 100 mL., la variación que pudo afectar el resultado puede ser una posible contaminación cruzada en el momento de tomar las muestras o una mala aplicación de la técnica de pasteurización debido a posibles variaciones de temperatura.

2.2 Bases teóricas

2.2.1. Tratamientos térmicos en bebidas.

2.2.1.1. Pasteurización.

La pasteurización es un método térmico descubierto por el científico francés Louis Pasteur. En honor a su descubridor, el método térmico adoptó el nombre de pasteurización. Es un método muy utilizado en la industria alimentaria en la actualidad para alargar la vida útil de los alimentos. El objetivo principal de este método es reducir los agentes microbianos y enzimas, la investigación y el desarrollo de esta tecnología ha permitido mejorar la conservación del apartado organoléptico y nutricional de los alimentos procesados y semielaborados, aunque actualmente es un tema de discusión debido a la resistencia al calor de las vitaminas (Arena, 2017).

2.2.1.2. Proceso de pasteurización.

Pupiales (2021) indica que la pasteurización es un proceso donde se involucra el calor durante un tiempo predefinido y se dirige principalmente a los alimentos, con el objetivo de disminuir la población de agentes microbiológicos o inhibir enzimas que alteran las características organolépticas en los alimentos, las temperaturas empleadas son por debajo de temperatura de ebullición del agua, se aplica estas temperaturas para no alterar tanto las características nutricionales de los alimentos y ofrecer al consumidor un producto de calidad libre de agentes que puedan comprometer su salud y que un tiempo de vida útil extendido para el aprovechamiento del alimento.

2.2.1.3. Aplicación.

Según León (2018), la pasteurización se aplica ampliamente en las industrias alimentaria principalmente en la industria de bebidas y lácteos. Los beneficios que brinda este tratamiento térmico a estos sectores de producción son lo que les permite elaborar productos que no perezcan rápidamente y de esta forma poder llegar a otros mercados donde se requiere mucho tiempo de transportación. A diferencia de la esterilización la pasteurización elimina parcialmente la presencia de microorganismos, existen microorganismos termófilos que son capaces tolerar temperaturas elevadas de pasteurización por lo que las industrias obtén combinar la pasteurización y esterilización para asegurar que las esporas de microorganismos patógenos sean eliminadas por completo.

2.2.1.4. Tipo de pasteurización aplicada en la investigación.

2.2.1.4.1. Pasteurización LTLT.

El proceso industrial consiste en elevar la temperatura de grandes volúmenes de alimentos en recipientes o marmitas a 63 °C durante 30 minutos, para luego dejar enfriar lentamente hasta llegar a la temperatura requerida, pasteurización a altas temperaturas durante un breve período (Lurueña, 2020). Baja temperatura en un tiempo largo (LTLT: low temperatura-long time): para este caso, sería mantener el producto a 63° C durante 30 minutos, de manera que se consiga destruir microorganismos patógenos sin que la temperatura empleada afecte las características nutricionales. El sistema de pasteurización elegido, condicionará el equipamiento necesario para aplicarlo.

El sistema LTLT se puede plantear en procesos por cargas o discontinuos, para productos líquidos (que se calientan por convección) a granel (en marmitas) o envasados; y el sistema HTST solo tiene sentido para productos líquidos en procesos continuos, empleando equipos de intercambio térmico de suficiente eficiencia para que la homogeneidad del tratamiento sea la conveniente pese a que el tiempo es corto.

2.2.1.4.2. Pasterización LTLT por el método de baño María.

Hablamos de pasteurización artesanal cuando en el proceso se prioriza la mano de obra sobre la mecánica. Con limitados recursos se puede realizar la pasteurización tradicional, incluso prescindiendo de la electricidad y el empleo de embalajes. Solo requerimos de una olla y de un termómetro. El proceso se basa en calentar el fluido a fuego directo bajo movimiento constante o en baño María, cuidando que se eleve la temperatura del fluido a 65 °C y manteniendo esta temperatura por 30 minutos, a este procedimiento se le denomina también “pasteurización lenta”, y fue desarrollado para pasteurizar leche de cabra, sin afectar sus delicadas características (Ministerio de agricultura de Perú, 2009).

Se realizará el tratamiento de pasteurización de forma artesanal, en una olla pequeña de acero inoxidable se llenará con el zumo de guanábana y kiwi en otra olla de acero inoxidable más grande se llena un cuarto de la olla con agua, posteriormente se introduce la olla pequeña en la grande y se la pone en la estufa donde alcanzara la temperatura deseada, se controlará la temperatura con un termómetro y se regulara la temperatura adicionando más agua.

2.2.2. Vitamina C.

2.2.2.1. Generalidades de la vitamina C.

La vitamina C, conocida como ácido ascórbico, es un nutriente hidrosoluble que se encuentra en ciertos alimentos como frutas cítricas. En el cuerpo humano, su función es antioxidante, al ayudar a proteger las células contra los daños causados por los radicales libres. Los radicales libres son compuestos que se forman cuando el cuerpo convierte los alimentos que consumimos en energía. Las personas también están expuestas a los radicales libres presentes en el ambiente por el humo del cigarrillo, la contaminación del aire y la radiación solar ultravioleta.

Además, el cuerpo necesita ácido ascórbico para metabolizar colágeno, una proteína necesaria para la cicatrización de las heridas. La vitamina C también mejora la absorción del hierro presente en los alimentos de origen vegetal y contribuye al buen funcionamiento del sistema inmunológico para proteger al cuerpo contra las enfermedades (National Institutes of health, 2019).

2.2.2.2. Estructura química de la vitamina C.

El ácido ascórbico es una lactona de un azúcar ácido derivado del ácido gluónico que se metaboliza a partir de la glucosa (Ver Anexo 2, Figura 3). Desde el punto de vista bioquímico, la vitamina C o ácido L-ascórbico es un polvo cristalino, blanco e inodoro, muy soluble en agua y relativamente insoluble en disolventes orgánicos. En estado seco y protegido de la luz es estable durante períodos de tiempo muy prolongados. La mayor parte de los mamíferos y de las plantas sintetizan vitamina C de forma endógena a partir de la glucosa y de la galactosa. Sin embargo, los seres humanos carecen de esta capacidad. No disponemos, al igual que sucede

con algunos animales como los primates, la cobaya, los murciélagos frugívoros de la India, el caballo, determinadas especies de peces, algunos insectos y otros invertebrados, de una enzima denominada gulonolactona oxidasa implicada en la síntesis del ácido ascórbico, la estructura química del precursor mencionado es compleja (Valdés, 2016).

2.2.2.3. Importancia de la vitamina C.

Según Villagrán (2019), el consumo de esta vitamina está ligada a múltiples beneficios a la salud, la función principal del ácido ascórbico es inhibir los radicales libres que producen el envejecimiento. Se recomienda un consumo diario recomendada (IDR) de entre 90 mg/día a 75 mg/día, aunque puede variar la cantidad necesaria de ácido ascórbico dependiendo del sexo y la edad, las principales fuentes de vitamina C para el consumo humano son las frutas y vegetales, en general frutas cítricas representan un 44 % de su ingesta, las verduras constituyen un 33,8 %, el resto en productos derivados de lácteos 12,5 % para completar el índice diario recomendado.

2.2.2.4. Antioxidantes.

Los antioxidantes ayudan al cuerpo humano a disminuir la oxidación celular, los radicales libre que deterioran las células vivas son las causantes del envejecimiento y el aumento o disminución de radicales libres dependerá de las problemáticas a las que se enfrenta el organismo humano en su vida cotidiana (Coronado, 2015).

Los antioxidantes son compuestos químicos que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres, que son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células y producen la oxidación de sus diferentes partes,

alteraciones en el ADN y cambios diversos que aceleran el envejecimiento del cuerpo. Lo anterior se debe a que el oxígeno, aunque es imprescindible para la vida, es también un elemento químico muy reactivo. El propio cuerpo genera radicales libres para su propio uso (control de musculatura, eliminación de bacterias, regulación de la actividad de los órganos, etc.), pero al mismo tiempo genera antioxidantes para eliminar los radicales libres sobrantes, ya que estas sustancias son muy agresivas.

2.2.2.5. Actividad antioxidante de la vitamina C.

La vitamina C actúa como antioxidante y agente reductor. Interviene proporcionando electrones a compuestos tanto en el interior de la célula como en el exterior. Así, puede actuar fuera de la célula, conjuntamente con la vitamina E, en la prevención de la oxidación lipídica. Es de esta forma que actúa frente la oxidación de las LDL, punto donde se inicia la lesión aterosclerótica. También puede actuar en la prevención del daño oxidativo sobre el ADN, cuya oxidación estaría relacionada con ciertos tipos de cáncer y envejecimiento (Vilaplana, 2017).

2.2.2.6. Cinética de degradación de la vitamina C.

El ácido ascórbico es el más inestable de todas las vitaminas, pues se degrada por oxidación muy fácilmente. La pérdida de nutriente está ligada en función dependiente de la temperatura del tratamiento térmico, la degradación de la vitamina C, se ha detectado que mantiene una cinética de primer orden en los sistemas alimentarios. Por el contrario, con frecuencia se ha encontrado la degradación de ácido ascórbico en los sistemas modelo que sigue una cinética de pseudo-primer orden. Parece que la presencia de productos de degradación

modifica la cinética de degradación de ácido ascórbico y, por lo tanto, su concentración inicial va a influir en su velocidad de degradación la cual se puede identificar empleando una ecuación de Arrhenius (Órdoñez, 2013).

Yoshioka (2012) menciona que la cinética de degradación térmica de la vitamina C se calcula Donde, C es la concentración de vitamina C; k es la velocidad constante de primer orden (min^{-1}); t es el tiempo de escaldado (min); E_a es la energía de activación en kcal/mol; R es la constante de los gases ($1.987 \text{ cal/mol } ^\circ\text{K}$); T es la temperatura absoluta en $^\circ\text{K}$; A es la preexponencial constante (min^{-1}); Q10 es el cambio de la constante de velocidad de una reacción al aumentar la temperatura $10 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_{0.5}$ es el tiempo requerido para reducir el 50 % de la concentración original de vitamina C; D es la reducción decimal en min. Z es la constante de resistencia térmica en $^\circ\text{C}$, para hallar los parámetros cinéticos y la ecuación de Arrhenius (Ver Anexo 2, Figura 3).

2.2.2.7. Energía de activación.

Cortez (2015) define que la energía necesaria para que los reactivos formen el complejo activado se le llama energía de activación, E_a , y representa la barrera de energía que han de salvar las moléculas para que tenga lugar la reacción. En los choques moleculares, parte de la energía cinética puede convertirse en energía potencial. La energía de activación de la reacción directa es la cantidad de energía libre que debe añadirse para ir del nivel de energía de los reactivos al nivel de energía del estado de transición. Para el cálculo de energía de activación se utilizó la ecuación de Arrhenius, relacionando la ecuación de la recta con la expresión

lineal de dicha ecuación (Ver Anexo 2, Figura 4), los términos de la ecuación anterior relacionando con la ecuación de la recta (Ver Anexo 2, Figura 5).

2.1.2.8. Estabilidad térmica de la vitamina C.

La vitamina C en procesos industriales se utiliza como un indicador de la calidad nutricional, debido a que es sensible a la degradación durante el procesamiento y el posterior almacenamiento. Factores como la temperatura, el oxígeno, la luz, los cambios de pH y los iones metálicos pueden degradar este micronutriente durante el procesamiento de los alimentos, La disminución de la concentración de la vitamina C probablemente se debe a la capacidad de esta molécula de ser un eliminador eficaz de radicales que se producen durante el estrés oxidativo.

El uso de la vitamina C para mantener la estabilidad interna, desencadenando reacciones químicas que oxidan la molécula a la forma de hidroascórbico (DHAA), hidrólisis del DHAA al ácido 2,3-dicetogulónico y la generación por polimerización de productos inactivos nutricionalmente unido a la temperatura, el oxígeno es otro factor decisivo en la degradación de este compuesto bioactivo. Otro aspecto que pudo influir de la pérdida de vitamina C durante los tratamientos de cocción puede ser consecuencia de la baja concentración de otros antioxidantes como los carotenoides, compuestos fenólicos, y tocoferol, ya que estos compuestos pueden actuar directa o indirectamente en la oxidación de la vitamina C.

2.2.3. Métodos para determinar vitamina C.

2.2.3.1. Método yodométrico.

El método de yodométrico para identificar vitamina C se basa en la reacción que produce el yodo al tener contacto con el almidón y cómo la vitamina C interfiere en

la reacción (Ver Anexo 2, Figura 6). En ausencia de vitamina C el yodo reacciona con el almidón tornando un compuesto azul oscuro, lo que indica la ausencia de vitamina C, cuando si se encuentra la vitamina C el yodo es reducido a iones de yoduro y el ácido ascórbico a ácido dehidroascorbato (Campos, 2020).

2.2.3.2. Fundamentos del método yodométrico.

La yodometría es un tipo particular de volumetría redox. A su vez, la volumetría redox es una técnica que se basa en la reacción rápida y cuantitativa entre un agente oxidante y un agente reductor, pudiendo ser cualquiera de los dos el analito y cualquiera el titulante (Canterbury, 2020).

2.2.3.4. Reacción de la titulación.

Chemistry (2018) indica que la yodometría se basa en una reacción química rápida que transcurre de manera cuantitativa. Esto quiere decir que la reacción progresa hasta completarse, consumiendo completamente todo el reactivo limitante, lo que permite llevar a cabo cálculos estequiométricos exactos. En el caso del presente experimento, el agente oxidante es el yodo, el cual se encuentra en la disolución en forma de triyoduro, como se mencionó anteriormente, la semirreacción de reducción del yodo (Ver Anexo 2, Figura 8).

Por su parte, el analito es el ácido ascórbico, el cual se oxida a ácido dehidroascórbico por medio de la oxidación de dos de sus grupos hidroxilo y liberando dos electrones y dos protones, como se muestra a continuación (Ver Anexo 2, Figura 8), entonces, la reacción global de la titulación (Ver Anexo 2, Figura 9).

2.2.3.5. Fundamento del indicador.

Como en toda titulación, se debe tener alguna forma de detectar el punto final de la misma. Para esto, se suelen utilizar indicadores, los cuales son sustancias químicas que reaccionan con el exceso de titulante o que sufren algún otro cambio observable al alcanzar el punto de equivalencia. En el caso de las yodometría, el indicador consiste en una disolución de almidón. Este compuesto forma un complejo con los iones triyoduro que posee un color azul oscuro muy intenso, casi negro (Ikewuchi, 2019).

Durante la titulación, el triyoduro agregado desde la bureta reacciona con el analito transformándose en yoduro, evitando así la formación del complejo coloreado con el almidón. Sin embargo, al alcanzar el punto de equivalencia y consumir todo el ácido ascórbico presente, la siguiente gota de titulante tendrá un exceso de triyoduro que no se reducirá a yoduro, por lo que inmediatamente se formará el complejo negro dando un cambio de color dramático a la disolución.

2.2.3. Kiwi (*Actinidia deliciosa*).

2.2.3.1. Generalidades.

García (2018) indica que el kiwi es originario de China, dónde crece espontáneamente. Fueron los neozelandeses en 1906 quienes comenzaron a cultivarlo y comercializarlo. En 1910 se obtuvieron las primeras cosechas del kiwi originario de China, el nombre kiwi se adoptó en esta fruta debido a su similitud con el ave *Apteryx australis*. En 1970 el cultivo de esta fruta se extendió en zonas templadas que favorecieron el crecimiento. La demanda de esta fruta aumentó debido a su capacidad de conservación.

Según Álvarez, Bedolla y Uribe (2017), el kiwi tiene una forma ovalada de color marrón, cubierta de pelos finos, la pulpa tiene muchas semillas y tiene un color verde, regularmente pesa aproximadamente 74 g y proporciona a la dieta diaria 45 kcal, también se considera un fruto alergénico.

2.2.3.2. Producción de kiwi en Ecuador.

Rodríguez (2020) menciona que el Ecuador es uno de los países con mayor cantidad de frutas exóticas en el mundo, entre los cuales se encuentra el kiwi. En los últimos años el país ha seguido las tendencias globales de producción y comercialización entendiendo que una de las principales opciones de crecimiento son la productividad y competitividad de nuestra producción nacional, esto ayudará a introducir nuestros productos en mercados internacionales, por lo tanto, se ha optado en la producción y comercialización de productos no tradicionales como el kiwi lo que se traduce en un futuro aumento de la producción nacional de este fruto para la exportación y agroindustria, según datos del banco central del Ecuador el consumo de zumo de kiwi en Ecuador en el 2011 fue de 1.993 toneladas comparado con cifras del 2018 el consumo nacional creció un 33% 2.650 toneladas (Román, 2012).

2.2.3.3. Zonas de producción del kiwi.

Ibarra (2019) describe que la producción de kiwi se da principalmente en la región Sierra del Ecuador, específicamente al noroccidente en la provincia de Pichincha y también al norte de Esmeraldas desde estas zonas se distribuye para el consumo nacional. El kiwi crece con mejores atributos en zonas frías, por eso se destaca la producción en la región Sierra del país.

2.2.3.4. Taxonomía del kiwi.

Cárdenas (2020) indica que la *Actina deliciosa* es perteneciente al conjunto de la familia Actinidaceae y se clasifica (Ver Anexo 1, Tabla 2).

2.2.3.5. Características nutricionales del kiwi.

Según Mendoza (2017), el kiwi es reconocido a nivel nutricional, principalmente por su alto contenido de vitamina C, E y fibra. En su composición también cuenta con otros nutrientes esenciales en la dieta humana como el fósforo, magnesio y cobre.

López (2016) menciona que el kiwi no contiene mayor cantidad de calorías ya que 100 g proporcionan solo el 3 % de una dieta media de 2.000 kcal, sin embargo, es destacable el elevado contenido en vitamina C, ya que 100 g de la variedad verde permiten cubrir algo más del 150 % de las recomendaciones de vitamina C de un adulto de 20 a 40 años, y más del 260 % en el caso del kiwi amarillo (Ver Anexo 2, Figura 3).

2.2.4. Guanábana (*Annona muricata*).

2.2.4.1. Generalidades.

La guanábana (*Annona muricata*) es una planta que tiene un aproximado de 8 a 10 m de altura, con hojas tipo ovaladas de 3 a 5 cm de ancho, con yemas axilares, la raíz es pivotante con una ramificación fuerte, las flores son hermafroditas, se encuentran en el tallo y en las axilas. El fruto puede tener una longitud de hasta 30 cm o más, con un peso aproximado de 4 a 5 kg, tiene cascara de color verde oscuro, es jugosa y suave, cada fruto tiene alrededor de 200 semillas o más, su pulpa tiene

un 80 % de agua, 1 % de proteína, 14 % a 18 % hidratos de carbono, 24.05 % azúcares no reductores y vitamina B1, B2 Y C (Defaz, 2019).

2.2.4.2. Producción de guanábana en Ecuador.

Triviño (2018) menciona que en Ecuador la guanábana se considera un fruto exótico que cada vez tiene mayor presencia dentro del mercado interno. En Sudamérica, Ecuador ocupa el tercer puesto de producción de guanábana de la región, esta fruta con mayor presencia en las costas ecuatorianas se vuelve atractiva ante los mercados extranjero debido a su precio, además de calidad nutricional, se estima que en el 2016 existían cerca 250 ha de guanábana sembradas, entre cultivos tecnificados y aislados (Tiscama, 2021).

2.2.4.3. Zona de producción de la guanábana.

Villagrán (2016) indica que los puntos de producción de guanábana en el país se ubican en la provincia de Santa Elena, Esmeraldas, Imbabura, Pastaza y Guayas donde se encuentran producciones totalmente tecnificadas. También existen más zonas de producción como el sur de Manabí y zonas rurales de Santo Domingo, donde los campesinos del lugar se dedican al cultivo y cosecha de esta fruta de forma orgánica, dichas zonas de producción son óptimas por su clima lo cual cumple las condiciones para el crecimiento de la guanábana, se considera que la guanábana es una materia prima con mucho potencial de exportación, se encuentra como fruta exótica y su precio es atractivo en mercados extranjeros.

2.2.4.4. Morfología de la guanábana.

La guanábana pertenece a la familia de las Anonáceas, y se caracterizan por ser plantas leñosas de hojas enteras, sin estípulas, de flores hermafroditas y frutos por lo general en baya, frecuentemente reunidas formando frutos colectivos de los que forma parte el eje floral carnoso (Sephu, 2010). El árbol de guanábana es tropical siempre verde, pertenece a la familia de las Annonaceae y desarrolla frutos entre 0.9 y 10 kg. Estos tienen una epidermis con protuberancia de los carpelos y pulpa fibrosa, por lo general con más de 100 semillas de 1 a 2 cm de longitud, (Ver Anexo 1, Tabla 3).

2.2.4.5. Características nutricionales de la guanábana.

La guanábana tiene grandes cantidades de carbohidratos y ácido ascórbico, constituye un 70 % de pulpa por lo que el rendimiento de pulpa es alto, en su composición está la presencia de alcaloides (muricina, muricinina, N-metilcoridina, N-metilcorituberina) flavonoides y acetogeninas, se considera de fermentación rápida aproximadamente entre 6 a 8 días después de su cosecha (Armijo, 2020). Ramos (2020) indica que la guanábana tiene una cantidad elevada de vitamina C y ácido málico lo que otorga un sabor ácido, también tiene una alta cantidad de sólidos solubles, alrededor de 17 °Brix, lo que balancea el sabor ácido y dulce.

2.3 Marco legal

El presente proyecto investigativo se basará bajo la norma ecuatoriana INEN 2 337:2008.

Tabla 1. Requisitos microbiológicos Norma INEN 2 337:2008

	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-5
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	3	< 10	1	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/cm ³	3	< 10	1	1	NTE INEN 1529-10

Requisitos que debe cumplir los parámetros microbiológicos.
INEN, 2008

Requisitos específicos para los jugos y pulpas concentradas

- El jugo concentrado puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- La pulpa concentrada debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- El jugo y pulpa concentrado, con azúcar o no, debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.
- El contenido de sólidos solubles (°Brix a 20 °C con exclusión de azúcar) en el jugo concentrado será por lo menos, un 50 % más que el contenido de sólidos solubles en el jugo original.

Requisitos específicos para las bebidas de frutas

- En las bebidas el aporte de fruta no podrá ser inferior al 10 % m/m, con excepción del aporte de las frutas de alta acidez (acidez superior al 1.00 mg/100 cm³ expresado como ácido cítrico anhidro) que tendrán un aporte mínimo del 5 % m/m.
- El pH será inferior a 4.5 (determinado según NTE INEN 389).

- Los °Brix de la bebida serán proporcional al aporte de fruta, con exclusión de la azúcar añadida.

Requisitos microbiológicos

- El producto debe estar exento de bacterias patógenas, toxinas y de cualquier otro microorganismo causante de la descomposición del producto.
- El producto debe estar exento de toda sustancia originada por microorganismos y que representen un riesgo para la salud.
- El producto debe cumplir con los requisitos microbiológicos (Ver Tabla 1).

3. Materiales y métodos

3.1 Enfoque de la investigación

La presente investigación se realizó a través de información de tipo bibliográfico y experimental, de tipo bibliográfico debido a que se tomó información de fuentes confiables como libros, documentos virtuales, artículos científicos, entre otros, la investigación fue de tipo experimental porque se llevó a cabo análisis de laboratorio como yodometría para determinar contenido de vitamina C, análisis organoléptico y microbiológicos (aerobios mesófilos, coliformes fecales, recuento estándar en placa REP, esporas de *Clostridium spp*, mohos y levaduras).

3.1.1. Tipo de investigación.

La investigación fue de tipo documental donde se obtuvieron datos que posteriormente determinaron el parámetro térmico con mayor concentración de vitamina C, el nivel de estudio de la investigación es además de tipo experimental, se manipularon las variables de tiempo y temperatura de pasteurización donde se evaluó el efecto de estos parámetros sobre la vitamina C de bebida en estudio, también se realizó una investigación comparativa a través de análisis físico químico de la bebida desarrollada y los datos obtenidos en bibliografía.

3.1.2. Diseño de investigación.

El estudio de la investigación propuesta se realizó enviando las muestras a estudio en un laboratorio acreditado, se analizó nueve tratamientos térmicos aplicados a una bebida de guanábana y kiwi, obteniendo las muestras para el estudio experimental, también se realizó un análisis cuantitativo (yodométrico) para determinar la muestra con mayor concentración de vitamina C, la muestra elegida

fue catada por un panel sensorial no entrenado los cuales determinaron las características organolépticas de la bebida, posteriormente la muestra con mayor concentración fue evaluada a través de un análisis microbiológico (Ver Anexo 5).

3.2.1. Variables.

3.2.1.1. Variable independiente.

- Tiempo de pasteurización.
- Temperatura de pasteurización.

3.2.1.2. Variable dependiente.

- Contenido de vitamina C.
- Parámetros sensoriales.
- Parámetros físico-químico (pH, grados °Brix, acidez).
- Microbiológicos (aerobios mesófilos, coliformes fecales, recuento estándar en placa REP, esporas de *Clostridium* spp, mohos y levaduras).

3.3.1. Tratamientos.

La investigación propuso una formulación de bebida de kiwi y guanábana la cual prioricé el contenido de vitamina C, la cual fue sometida a parámetros de pasteurización especificados en la siguiente tabla.

Tabla 2. Parámetros de pasteurización

	Temperatura		
Tiempo	60 °C	63 °C	65 °C
30 min	T1	T2	T3
20 min	T4	T5	T6
15 min	T7	T8	T9

Descripción de los parámetros térmicos propuestos para medir el contenido de vitamina C de la muestra en estudio.
Herrera, 2022

Tabla 3. Formulación de jugo de kiwi y guanábana

Ingredientes	Cantidad	%	Unidades
Kiwi	30	30	g
Guanábana	20	20	g
Benzoato de sodio	0.3	0.3	g
Azúcar	10	10	g
Agua	39.70	39.70	mL

Descripción de la formulación en porcentaje de la bebida de guanábana y kiwi.
Herrera, 2022

3.4.1. Diseño experimental.

Se desarrolló un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial AXB (3X3), para indicar el parámetro con mayor concentración de vitamina C. El muestreo fue por triplicado a los tratamientos establecidos de acuerdo con los objetivos planteados, las muestras se evaluaron mediante un análisis sensorial para determinar el efecto de la pasteurización sobre las características organolépticas del jugo. La muestra con mayor contenido de vitamina C fue examinada para conocer sus características físico-químicas (pH, acidez titulable, grados °brix) y

microbiológicas (INEN 2 337:2008) luego de la pasteurización para indicar si la muestra elegida cumple los estándares físico-químicos y microbiológicos establecidos por la norma técnica.

3.4.2. Recolección de datos.

- Recursos bibliográficos
- Revistas científicas
- Libros
- Artículos científicos
- Sitios web
- Informes técnicos
- Tesis de grado

3.4.1.1. Recursos.

- Materiales
- Colador
- Frascos de vidrio esterilizado
- Placas Petri
- Agar PCA
- Vaso precipitado 250 mL
- Bureta 25 mL
- Piseta con agua destilada
- Probeta de 100 mL
- Pinzas
- Matraz Erlenmeyer (250 mL)

- Tubo de ensayo (50 mm)
- Pipeta (25 mL)
- Soporte universal
- Gradilla de tubos
- Equipo de laboratorio
- Balanza analítica - 321 LS 6200C Precision Balance with SmartBox
- Microscopio - Akropol | 1111.2441
- Mechero
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave - MLS-3020U-PE
- Incubadora - Cytomat™ Serie 10 C
- Reactivos
- Yodo
- **Insumos**
- Kiwi
- Guanábana
- Equipo de protección personal
- Cofia
- Guantes

3.4.1.3. Métodos y técnicas.

3.4.1.3.1. Diagrama de flujo del proceso.

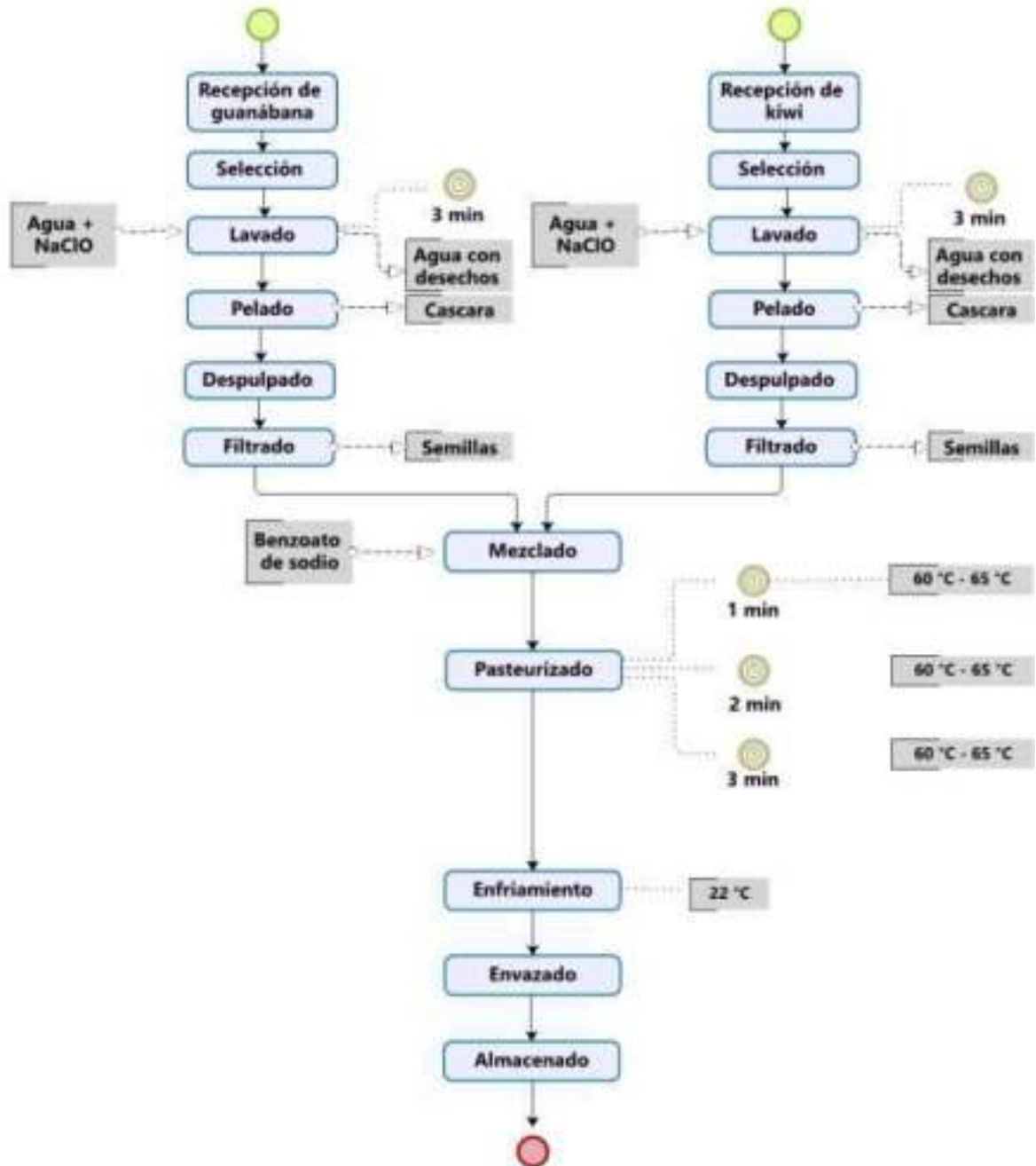


Figura 1. Diagrama de flujo de la bebida de guanábana y kiwi Herrera, 2023

3.4.1.4. Descripción del diagrama de flujo.

Recepción: Se receptaron las materias primas e insumos para elaborar la bebida de guanábana y kiwi, en este paso se tomó en consideración la madurez requerida de las frutas para entrar al proceso.

Selección: Se tipificaron las frutas para poder separarlas y elegir la que estaban aptas para el proceso, como parámetro de selección se observó el grado de madurez y se examinó si no presentaba golpes o magulladuras.

Lavado: Las frutas fueron inmersas en una solución de hipoclorito de sodio y agua potable para extraer agentes patógenos y sólidos extraños adheridos a la superficie de la materia prima.

Pelado: Se retiró la cascara que recubre la materia prima.

Despulpado: Las materias primas ingresaron a una procesadora donde se extrajo el zumo de guanábana y kiwi.

Filtrado: Los zumos de las materias primas fueron filtrados por medio de un colador de acero inoxidable se desecha las semillas y el bagazo de las frutas.

Mezclado: Se integraron los zumos de guanábana y kiwi, luego se homogeniza, añadiendo benzoato de sodio para la estabilidad de la bebida.

Pasteurizado: Se realizó el pasteurizado por método baño María, controlar temperatura con termómetro.

Enfriado: Se enfriaron las bebidas, hasta los 25 °C.

Envasado: En este paso se buscó realizar un sellado hermético para evitar el paso de microorganismos que puedan afectar la vida útil de la bebida.

Almacenado: Luego de realizar el sellado se almacenó la bebida a una temperatura de 22 °C.

3.4.1.5. Análisis físico químico organoléptico y microbiológicos del producto terminado.

3.4.1.5.1. Coliformes NMP/cm³ – Método de ensayo NTE INEN 1529-6.

Se realizó una dilución con pipeta para transferir 1 mL de la dilución 10⁻¹ a 3 tubos de ensayo con 10 mL de caldo BGBL, luego con una pipeta estéril transferir 1 mL de la dilución 10⁻² a 3 tubos de ensayo que contengan 10 mL del medio de cultivo. Incubar los tubos a 30 °C para productos congelados y 35 °C para productos a temperatura ambiente por 48 horas, luego todo los tubos con presuntos positivos serán separados y con una asa extraer la muestra, sembrar en placas con Agar EMB, invertir las placas e inocular a una temperatura de 30 °C para productos refrigerados y 35 °C para productos a temperatura ambiente por 24 horas, para confirmar la presencia de coliformes se debe identificar colonias lactosa positivas con centro oscuro o colonias mucoides de color rosa naranja (INEN 1 529-6).

3.4.1.5.2. Coliformes fecales NMP/cm³ - Método de ensayo NTE INEN 1529-8.

Se agregó 1 mL de suspensión inicial a 9 mL de caldo lauril sulfato de concentración simple o 10 mL de caldo lauril sulfato de concentración doble, incubar los tubos a 37 °C ± por 24 h, si no se observa opacidad ni producción de gas incubar hasta 48 h ± 2 h. Los tubos que presentaron opacidad o presencia de gas se deben subcultivo, inoculando con un asa de muestreo a un tubo que contiene Caldo EC (medio líquido selectivo) e incubarlos en el baño de agua o en la incubadora a 44

°C por 24 h \pm 2 h, si no se observa la presencia de gas extender la incubación hasta 48 h \pm 2 h (NTE INEN 1529-8).

3.4.1.5.3. Recuento estándar en placa REP UFC/cm³ - Método de ensayo NTE INEN 1529-5.

Todas las diluciones fueron por duplicado, en las cajas Petri se depositará 1 mL de cada dilución, verter en las placas inoculadas 20 mL de agar PCA, fundido y templado a 45 °C. Para la prueba de esterilidad verter Agar PCA en una caja Petri sin inocular, invertir las placas e inocularlas a 30 °C por 48 a 75 horas, luego contar las colonias formadas en las cajas Petri (NTE INEN 1 529-5).

3.4.1.5.4. Mohos y levaduras UP/ cm³ - Método de ensayo NTE INEN 1529-10.

La inoculación e incubación fue sobre una placa de agar previamente fundido, utilizando una pipeta estéril, transferir 0.1 mL de la muestra si es líquido, o 0.1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos. Sobre una segunda placa de agar, utilizando una pipeta estéril fresco, transferir 0.1 ml de la dilución decimal primera (10^{-1}) dilución (producto líquido), o 0.1 ml de la dilución 10^{-2} (otros productos). Para facilitar el recuento de bajas poblaciones de levaduras y mohos, los volúmenes pueden llegar hasta 0.3 ml de una dilución 10^{-1} de muestra, o de la muestra de prueba, si es líquido, puede ser extendido en tres placas. Repetir estas operaciones con diluciones posteriores, utilizando una pipeta estéril nueva para cada dilución decimal. Si se sospecha un rápido crecimiento de mohos se sospecha, extender el líquido sobre la superficie de la placa de agar con un esparcidor estéril hasta que el líquido se encuentre completamente absorbido en el medio.

Se incubaron las placas preparadas aeróbicamente, con las tapas superiores en posición vertical en la incubadora a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Si es necesario, deje las placas de agar de pie con luz natural difusa durante 1 día a 2 días. Se recomienda incubar las placas en una bolsa de plástico abierta con el fin de no contaminar la incubadora en el caso de la difusión de los mohos de los platos.

Recuento y selección de colonias para la confirmación. Se Leyó las placas entre 2 días y 5 días de incubación. Se selecciono los platos que contienen menos de 150 colonias y contarlas. Si estos mohos son de rápido crecimiento puede ser un problema, al momento del conteo, por ello se recomienda realizar un recuento a los 2 días y otra vez después de 5 días de incubación.

Se conto las colonias de levaduras y las colonias de mohos por separado, si es necesario. Para la identificación de levaduras y mohos, seleccionar áreas de crecimiento de hongos y examinar con el microscopio o inocular en el medio adecuado para su aislamiento (NTE INEN 1529-10:2013).

3.4.1.5.5. Contenido de vitamina C por método yodométrico.

Se utilizo esta técnica como método cuantitativo se realizó una titulación de la mezcla de almidón y vitamina C con Lugol. Sabiendo el volumen gastado de Lugol, se puede calcular la concentración de vitamina C de la muestra (Campos, Métodos analíticos para la determinación de vitamina C, 2020).

1. Se transfirió una alícuota de 10 ml de la muestra respectiva (preparada según los pasos anteriores) a una fiola de 250 mL utilizando una pipeta volumétrica.
2. Se agrego 100 ml de agua desionizada y 1 ml del indicador de almidón.

3. Se Titulo la alícuota con la disolución de triyoduro empleando una bureta hasta que la disolución en la fiola cambie de color a un color azul oscuro, casi negro.

4. Se tomó nota del volumen de titulante gastado y repita el procedimiento 2 veces más para obtener así un volumen promedio de titulante (Canterbury, 2017).

3.4.1.5.6. Cálculo de ácido ascórbico en la muestra.

Dado que la relación estequiométrica entre el titulante y el analito es de 1:1, en el punto de equivalencia podemos decir que los moles de ambos son iguales, es decir:

$$C_{\text{jugo}} = V_{\text{titulante}} \times \left(\frac{0,01 \text{ M}}{20 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{176,12 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ L}}{1,000 \text{ mL}} \right) \times 100\%$$

C jugo: Concentración de jugo

V titulante: Volumen del titulante

0.01 M/20 mL: Agente titulante

176.6 g/1 mol: Masa molar del ácido ascórbico

En la fórmula anterior se colocó el volumen del titulante en mL. Esta concentración puede transformarse a un porcentaje o a un contenido por unidad según el tipo de muestra que se trate.

3.4.1.5.7. Muestra de jugo de fruta.

En este caso, la concentración molar de la vitamina C en el jugo es directamente la obtenida para la alícuota, así que la masa por cada 100 mL de jugo se puede obtener, (Ver Anexo 2, Figura 11) esta fórmula da como resultado los gramos de vitamina C por cada 100 mL de jugo o extracto.

3.4.1.5.8. Análisis sensorial.

Se realizó un panel sensorial compuesto de 30 panelistas no entrenados de la Universidad Agraria del Ecuador, quienes evaluarán el jugo de guanábana (*Annona muricata*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*), mediante una escala hedónica de 5 puntos para determinar si la pasteurización afectó las características organolépticas de la bebida.

3.5.1. Análisis estadístico.

Los datos que se obtuvieron en la investigación fueron analizados en el programa estadístico Infostat mediante un análisis de varianza a los resultados de las muestras, se aplicó un método estadístico ANOVA, con un test de Tukey al 5 % de significancia a las muestras sometidas a los parámetros establecidos en la investigación para determinar si existe una diferencia significativa en las muestra, comparando los resultados de las muestras, para determinar por método estadístico el parámetro con mayor contenido de vitamina C.

Tabla 4. Diseño estadístico

Fuente de Variación	Fórmula	Desarrollo	Grados de libertad
Factor A (Temperatura)	A-1	3-1	2
Factor B (tiempo)	B-1	3-1	2
Interacción	(A-1) (B-1)	(3-1) *(3-1)	4
Error		(N-1) -(A-1) -(B-1)	(27-1) -(3-1) -(3-1)- 18
	(A-1) (B-1)	(3-1) (3-1)	
Total	N-1	(27-1)	26

Diseño estadístico para determinar la muestra con mayor contenido de vitamina C. Herrera, 2021

Hipótesis

Ho: Ninguna muestra tiene variación de vitamina C

H1: Al menos una muestra mantendrá un alto contenido de vitamina C.

4. Resultados

4.1 Desarrollo de una bebida de guanábana y kiwi, sometida a 3 distintas condiciones de pasteurización (tiempo y temperatura) y análisis sensorial de los 3 tratamientos

Se desarrolló la bebida con zumos de guanábana y kiwi, las materias primas pasaron por un proceso de selección donde se descartaron las frutas con magulladuras o defectos que puedan alterar el producto final, posteriormente, se mezclaron los zumos con benzoato de sodio para procurar el tiempo de vida útil de la bebida, luego se sometió a 9 tratamientos térmicos (60 °C/ 15, 20, 30 min - 63 °C/ 15, 20, 30 min - 65 °C/ 15, 20, 30 min), aplicados a través del método Baño María, donde se controló las temperaturas propuestas con un termómetro de grado alimentario, se enfrió las bebidas hasta llegar a 22 °C para su envasado y rotulado.

Los análisis sensoriales fueron realizados por un panel de 30 estudiantes de la Universidad Agraria del Ecuador, unidad académica Campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz - Guayaquil, donde cataron los diferentes tratamientos a través de una escala hedónica puntuando del 1 al 5 (1. Muy malo, 2. Malo, 3. Regular, 4. Bueno, 5. Muy bueno), los datos obtenidos se ingresaron al programa estadístico Infostat para obtener los resultados de la varianza y determinar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos, el análisis estadístico usado fue Friedman con un nivel de significancia del 0.05.

4.1.1. Color.

Según los resultados obtenidos se interpreta que los tratamientos T1 (60 °C / 30 min) Y T7 (60 °C / 15 min) no presentan diferencias significativas, el color se

mantiene, los panelistas determinan que el color no les parece tan agradable, evaluando los tratamientos como regular, con respecto al tratamiento T4 (60 °C / 20 min), T5 (63 °C / 20 min), T6 (65 °C / 20 min) y T9 (65 °C / 15 min) se los ubica entre regular y bueno, esta ligera aceptación puede deberse al pardeamiento enzimática que ocurre en la bebida tornando un color más agradable para el criterio de los panelistas, los tratamientos considerados como bueno fueron el T2 (63 °C / 30 min), T3 (65 °C / 30 min) Y T8 (63 °C / 15 min), estos tratamientos estuvieron más tiempos a temperaturas elevadas por lo que había una diferencia en el color que resulto agradable para los panelistas determinando los tratamientos como bueno.

Los tratamientos determinados como regular estuvieron expuestos a una temperatura de 60 °C / 15 min – 30 min, los tratamientos evaluados como regular y bueno tuviera una exposición de 60 °C – 65 °C / 20 min y los tratamientos considerados bueno tuvieron expuesto aún rango mayor de temperatura 63 °C-65 °C / 20 min, es decir las temperaturas más elevadas obtuvieron mejor calificación, el tratamiento con mayor aceptación fue el T3 con una media de 4.15 y el que tuvo menos aceptación fue el T7 (60 °C / 15 min) con una media de 3.41 ubicándose entre bueno y regular.

Tabla 5. Análisis de varianza de la bebida de guanábana y kiwi (Color)

Color	N	Medias
T1	27	3.44 (A)
T2	27	4.11 (C)
T3	27	4.15 (C)
T4	27	3.74 (A-B)
T5	27	3.52 (A-B)
T6	27	3.67 (A-B)
T7	27	3.41 (A)
T8	27	4.00 (C)
T9	27	3.96 (A-B)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Herrera, 2022

4.1.2. Olor.

Según la evolución sensorial del parámetro de olor en la bebida, el tratamiento T4 (60 °C / 20 min) tuvo mayor aceptación por parte del panel sensorial, considerado como bueno, obtuvo como resultado una media de 4.07 consideradas de las más alta con respecto a los demás tratamientos, el olor de la bebida es más agradable a 60 C / 20 min debido a la concentración de la bebida, el olor de la guanábana resalta sobre el kiwi produciendo más agrado en los panelistas, los demás tratamientos se consideraron entre bueno y regular. El tratamiento con menos aceptación fue T2 (63 °C / 30 min) eso quiere decir que a temperaturas más elevadas por tiempos más prolongados el olor se vuelva menos agradable.

Tabla 6. Análisis de varianza de la bebida de guanábana y kiwi (Olor)

Olor	N	Medias
T1	27	3.66 (A-B)
T2	27	3.59 (A-B)
T3	27	3.74 (A-B)
T4	27	4.07 (C)
T5	27	3.85 (A-B)
T6	27	3.74 (A-B)
T7	27	3.88 (A-B)
T8	27	3.66 (A-B)
T9	27	3.93 (A-B)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Herrera, 2022

4.1.3. Sabor.

Se analizó el parámetro sensorial de sabor, obteniendo como resultado el tratamiento T3 (65 °C / 30 min) como el mejor con una media de 4.00, obteniendo la media más alta en comparación a los tratamientos que se ubicaron entre regular y bueno, según los resultados estadísticos el sabor de la bebida mejora a mayor temperatura y tiempo de exposición esto se puede dar a la concentración de sólidos solubles de la bebida lo que intensifica el sabor de la bebida. El tratamiento con menos aceptación fue el T1 (60 °C / 30 min), obteniendo la media más baja de 3.66, es decir que a mayor temperatura se consigue mejor sabor en la bebida.

Tabla 7. Análisis de varianza de la bebida de guanábana y kiwi (Sabor)

Sabor	N	Medias
T1	27	3.66 (A-B)
T2	27	3.85 (A-B)
T3	27	4.00 (C)
T4	27	3.70 (A-B)
T5	27	3.96 (A-B)
T6	27	3.77 (A-B)
T7	27	3.77 (A-B)
T8	27	3.81 (A-B)
T9	27	3.92 (A-B)

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
Herrera, 2022

4.2 Identificación mediante el método de titulación yodométrico la muestra con mayor concentración de vitamina C en la bebida desarrollada

Se evaluó el contenido de vitamina C en un jugo de guanábana y kiwi, donde se analizaron nueve parámetros térmicos propuestos en la investigación, las muestras fueron rotuladas utilizando las siguiente siglas (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9) el muestreo se realizó por triplicado para tener un resultado más preciso, en la obtención de la concentración de vitamina C se utilizó el método cuantitativo AOAC

967.21 (Yodometria) avalado por la INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización) mediante el cual se obtuvieron las siguientes concentraciones de vitamina C especificados en la siguiente tabla.

Tabla 8. Resultados de análisis de vitamina C por método de yodometría AOAC 967.21

Muestras	Tratamientos	Parámetros térmicos	Resultado g/ml
M1		30 min / 60 ° C	0.300
M2	Tratamiento 1	30 min / 60 ° C	0.120
M3		30 min / 60 ° C	0.180
M1		30 min / 63 ° C	0.300
M2	Tratamiento 2	30 min / 63 ° C	0.300
M3		30 min / 63 ° C	0.182
M1		30 min / 65 ° C	0.210
M2	Tratamiento 3	30 min / 65 ° C	0.290
M3		30 min / 65 ° C	0.305
M1		20 min / 60 ° C	0.276
M2	Tratamiento 4	20 min / 60 ° C	0.260
M3		20 min / 60 ° C	0.301
M1		20 min / 63 ° C	0.298
M2	Tratamiento 5	20 min / 63 ° C	0.333
M3		20 min / 63 ° C	0.320
M1		20 min / 65 ° C	0.278
M2	Tratamiento 6	20 min / 65 ° C	0.318
M3		20 min / 65 ° C	0.320
M1		15 min / 60 ° C	0.289
M2	Tratamiento 7	15 min / 60 ° C	0.320
M3		15 min / 60 ° C	0.332
M1		15 min / 63 ° C	0.301
M2	Tratamiento 8	15 min / 63 ° C	0.300
M3		15 min / 63 ° C	0.322
M1		15 min / 65 ° C	0.290
M2	Tratamiento 9	15 min / 65 ° C	0.320
M3		15 min / 65 ° C	0.318

Resultado de los análisis de concentración de vitamina C realizado a 9 tratamientos con 3 repeticiones.

Herrera, 2022

En los resultados obtenidos por medio del método de titulación yodometría AOAC 967.21 a la bebida de guanábana y kiwi, se interpreta que la muestra con mayor concentración de vitamina es el tratamiento 5 M2 (20 min / 63 °C) con una cantidad de 0.333 mg/ml esto quiere decir que la bebida mantiene una concentración alta de vitamina C a pesar del tiempo al que se expuso, para comprobar el resultado se utilizó el programa estadístico Infostat, determinando la media con un test de Tukey al 5% de significancia, donde el T5 tuvo la media más alta con 0.32, evidenciando que T5 tuvo mayor concentración de vitamina C, los resultados del análisis de varianza evidenciados en la siguiente tabla.

Tabla 9. Análisis de varianza a los resultados obtenidos de vitamina C a las muestras de jugo de guanábana y kiwi

Tratamientos	Medias g/ml	n	E.E.	
T1	0.20	3	0.03	A
T2	0.26	3	0.03	A
T3	0.27	3	0.03	A
T4	0.28	3	0.03	A
T6	0.31	3	0.03	A
T8	0.31	3	0.03	A
T9	0.31	3	0.03	A
T7	0.31	3	0.03	A
T5	0.32	3	0.03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
Herrera, 2022

Se calculó la media de los tratamientos, los resultados que se interpretan (Ver tabla 11), no existe diferencia significativa entre los tratamientos, el error

experimental es de 0.03 en todos los tratamientos, el T5 se representa con la letra (A), es el que presenta mayor contenido de vitamina C, los demás tratamiento presentan valores similares, comparando con el IDR que una persona promedio debería consumir de vitamina C, tendría que tomar tres jugos de 275 ml de guanábana y kiwi para satisfacer su requerimiento de vitamina C.

En los resultados obtenido se puede determinar que el T5 M2 que fue sometido a 63 °C durante 20 minutos presentó un porcentaje mayor de vitamina C en comparación a los demás tratamientos propuestos en la investigación. En el análisis estadístico realizado en el programa Infostat para comprobar la hipótesis, se utilizó un test de Tukey al 5% de significancia con un arreglo factorial A*B, la hipótesis nula y alternativa:

Ho: Ninguna muestra presentaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C.

H1: Al menos una muestra tubo diferencia significativa en el contenido de vitamina C.

4.3 Determinación las características físico-químicas (pH, acidez titulable, grados °brix) de la muestra con mayor contenido de vitamina C

Posteriormente al análisis de contenido de vitamina C, se realizó un análisis físico químico a la muestra con mayor contenido de ácido ascórbico (T5), los resultados obtenidos de las características físico-químicas sirvieron para identificar si la muestra cumple con la normativa técnica, obteniendo los resultados en la siguiente tabla.

Tabla 10. Resultados del análisis físico-químicos a la muestra con mayor concentración de vitamina C

Muestra	Parámetros	Método	Resultados	Unidad	Requisitos
T 5 M2	Acidez	INEN 381	0.75%	m/m	< 10 m/m
	pH	Potenciómetro NTE INEN-ISO 1842:2013 2013-09	4.05	-	< 4.5
	°Brix (sólidos solubles)	INEN 273	10.20	%	> 8.0 kiwi > 11.0 guanábana

Presentación de resultados físicos químicos de la muestra con mayor concentración de vitamina C.
Herrera, 2022

Se analizó el T5, los resultados obtenidos en los parámetros de acidez fueron de 0.75% m/m analizados por el método INEN 381 indicando que la acidez de la bebida de guanábana y kiwi se encuentra dentro de los parámetros de aceptación. El pH según la tabla es de 4.05 obtenido con la ayuda de un potenciómetro, indicando que el pH se encuentra dentro del rango permitido, por último, se analizó la cantidad de sólidos solubles donde presentó un 10.20% encontrándose dentro de los rangos permitidos según la norma INEN 273.

4.4 Realizar el análisis microbiológico establecido en la norma INEN 2337:2008 a la muestra con mayor contenido de vitamina C

Se determinó el apartado microbiológico del T5 M2, según lo estipulado en la norma INEN 337:2008, comprobando que los resultados microbiológicos se encuentran de los rangos de aceptación, especificados en la siguiente tabla.

Tabla 11. Resultados de análisis microbiológicos

Muestra	Parámetro	Método	Resultado	Unidad	Requisitos INEN 337:2008
	Mohos y levaduras	BAM-FDA CAP. #5 2007 NTE INEN 1529- 10	<9	UP/cm ³	<10
T 5 M2	Aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	<8	UFC/cm ³	<10
	Coliformes totales	NTE INEN 1529-6	<2	NMP/cm ³	<3
	Coliformes fecales	NTE INEN 1529-8	<1	NMP/cm ³	<3

Presentación de resultados microbiológicos realizados a la muestra con mayor concentración de vitamina C.

Herrera, 2022

5. Discusiones

En la presente investigación se elaboró una bebida de guanábana y kiwi con la finalidad de someter la bebida a diferentes parámetros térmicos (60 °C/ 15, 20, 30 min, 63 °C/ 15, 20, 30 min y 65 °C/ 15, 20, 30 min) de pasteurización para identificar si los tratamientos térmicos a los rangos propuestos pueden alterar el contenido de vitamina C con respecto a otros tratamientos con temperaturas más elevadas. Se obtuvo el siguiente resultado donde el T5 (63 °C / 20 minutos), obtuvo una concentración de 0.32 g/ ml de vitamina C en la bebida, en cambio en la investigación Robles (2016), en un jugo de Oca (*Oxalis tuberosa*) propone un parámetro térmico donde usa una temperatura de 85 °C durante 6 minutos, obteniendo una concentración de 44.02 mg/ 100 mL, según los datos obtenidos se puede comprobar que no existe una diferencia significativa en los resultados, en la investigación de Robles, tuvo que usar mayor cantidad de recursos para tener resultados similares, esto quiere decir que utilizar temperaturas más bajas a mayor tiempo tiene resultados positivos en la concentración de vitamina C en la bebida en discusión.

El método para alcanzar la temperatura de pasteurización en la bebida fue baño maría, donde se usó un termómetro de grado alimentario para monitorear constantemente la temperatura, al usar temperaturas entre un rango de 60 °C y 65 °C es más fácil controlar la temperatura, Jijón (2019) en su investigación expone una bebida de piña (*Anonas comus*) y soja (*Glycine max*) a una temperatura de 89 °C utilizando baño maría, también argumenta que debido a los sólidos solubles de su bebida tuvo problemas para determinar la concentración de vitamina C, en comparación a la

investigación de Jijón (2019), al manipular temperaturas más bajas, como las empleadas en la presente investigación es recomendable utilizar el método de baño maría pero a la temperatura experimental que propone Jijón es necesario emplear un equipo específico para pasteurizar debido a que a dicha temperatura se pierde el control provocando errores experimentales como la pérdida de vitamina C en la bebida de Jijón.

En la investigación luego de obtener la muestra con mayor concentración de vitamina C se procedió a realizar análisis físico-químico y microbiológico establecidos en la norma INEN 2 337:2008 a la muestra T5 (63 °C / 20 minutos), obteniendo mayor concentración de vitamina C, luego de analizar todos los parámetros térmicos en investigación. Angulo (2021) analizo la concentración de vitamina C en una bebida de guayaba (*Psidium guajava*) y soja (*Glycine max*), los resultados fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) el cual arrojó como resultados el T9 (60 % soya y 40 % guayaba; 90 °C / durante 2 min) con un contenido de 6.07 mg/ L. El análisis microbiológico en el T9 bajo la especificación de la norma INEN 3028 determinó la ausencia de colonias de microorganismos <10 UFC / g, en comparación a mi investigación en el apartado microbiológico la muestra analizada también se determinó la ausencia de aerobios mesófilos <10 UFC / cm³, coliformes totales <3 NMP/ cm³, coliformes fecales <3 NMP/ cm³, mohos y levaduras <10 UP/ cm³ adicional análisis físico químico acidez 0.75% m/m, pH 4.05 y °brix 10.20% por lo que en comparación con los resultados de Angulo (2021) los resultados de la presente investigación tuvo mayor concentración de vitamina C y aprobación por la norma INEN para su consumo.

6. Conclusiones

Con base en los resultados se concluye que la bebida de guanábana y kiwi sometidos a tres distintas condiciones de pasteurización tuvo los siguientes resultados, el T5 (63 C° / 15 min) logró mantener una concentración de 0.32 g/mL, no obstante, el análisis sensorial arrojó como resultado que la muestra con mayor aprobación fue olor (T4) con una media de 5.80, sabor (T3) con una media de 5.53 y color (T3) con una media de 6.00, concluyendo que la bebida de guanábana y kiwi tuvo una excelente acogida por parte de los panelistas, indicando reiteradas veces que la combinación de estas materia primas permite obtener una bebida con potencial de comercialización.

Se utilizó el método de titulación yodométrico como indicador de la concentración de vitamina C de las muestras en estudio, el total de muestras analizadas fueron 27 debido a que los nueve parámetros térmicos se analizaron por triplicado, se concluye que teniendo en cuenta la cantidad de muestras analizadas este tipo de análisis resulta de beneficio para estudiantes que no cuentan con los recursos para analizar contenido de vitamina C por métodos más específicos con el HPLC.

Las características físico-químicas y microbiológicas de la bebida fueron evaluadas en base a la norma INEN 337:2008 para jugos y zumos de frutas, todos los resultados estuvieron dentro del rango de aprobación por la norma con los siguientes resultados físico-químico (Acidez 0.75 % ácido cítrico m/m, pH 4.05 y sólidos solubles 10.20%) y microbiológicos (Aerobios mesófilos <9 UFC / cm³, coliformes totales <1 NMP/ cm³, coliformes fecales <2 NMP/ cm³, mohos y

levaduras $<8 \text{ UP/ cm}^3$) concluyendo que el parámetro térmico empleado fue efectivo para asegurar la calidad físico-química y microbiológica de la bebida.

7. Recomendaciones

Posteriormente a los resultados obtenidos se puede sugerir las siguientes recomendaciones:

Utilizar tratamientos térmicos con una brecha más amplia en temperaturas y tiempos, esto con la finalidad de encontrar una diferencia significativa en los resultados, esto permitirá al investigador hallar datos relevantes de contenido de vitamina C. Se propone utilizar métodos más exactos como el método HPLC para evaluar la cantidad de vitamina C en las muestras de jugo.

Se sugiere evaluar todo el perfil nutricional de la muestra con mayor contenido de vitamina C, con la finalidad de indagar que sucede con las demás vitaminas relacionadas con la bebida de guanábana y kiwi, el enfoque que se puede sugerir en una nueva investigación es vincular los tratamientos térmicos con el perfil nutricional en la combinación de materia prima propuesta o de otras que el investigador desee proponer.

Se propone evaluar la carga microbiológica usando temperaturas más bajas a la propuesta para identificar cuál es el rango mínimo de temperatura para pasteurizar bebidas.

8. Bibliografía

- Álvarez L, Bedolla C, y Uribe A. (2017). Prevalencia de sensibilización y alergia al kiwi(*Actinidia deliciosa*) en adultos con enfermedades alérgicas. *Alergia México*. Revista alergia México 34-36. <https://revistaalergia.mx/ojs/index>
- Angulo, C. (2021). *Valoración del ácido ascórbico en una bebida de soja (glyáne max) y guayaba (Psidium guajava) aplicando tres temperatura de pasteurización*. (Tesis de pregrado). Universidad Agraria Del Ecuador. Milagro, Ecuador.
- Armijo, G. (2020). *Determinación de la vida útil de la pulpa de guanábana (Annona muricata) conservada con jengibre (Zingiber officinale) como agente antimicrobiano*. (Tesis de pregrado). Universidad Estatal Amazónica. Puyo, Ecuador.
- Barrera, L. (2019). *Elaboración y procesamiento de kiwi enlatado*. (tesis de pregrado). Universidad de guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Borrás, J. (2020). *Optimización de la pasteurización de zumo de naranja mediante tratamientos térmicos*. (Tesis de pregrado). Universidad Politecnica De Valencia. Valencia, España .
- Cabenilla, E. (2020). *Estudio de la cinética de degradación de vitamina C y el color de pulpa de pitahaya (Hyloariaus monocanthus) pasteurizado*.(Tesis de pregrado). Universidad Señor De Sipán. Pimentel, Perú.
- Cagua, P. (2021). *Determinacion de capacidad antioxidante, nutricional y sensorial de una bebida a base de Ilex guayusa y avena santiva tipo chai tea*. (Tesis de pregrado). Universidad Agraria Del Ecuador. Milagro, Ecuador.

- Campos, C. (2020). *Facultad de Farmacia Universidad La Laguna*. Obtenido de Método anlíticos para determinación de vitamina C.
- Campos, C. (2020). *Métodos analíticos para la determinación de vitamina C*.
- Cano, R., Soriano, J., & Marino, J. (2017). Causas y tratamiento de la obesidad. *Nutricion clinica y dietetica hospitalaria*. Obtenido de <https://revista.nutricion.org/PDF/RCANO.pdf>
- Canterbury, U. o. (2017). *Redox Titration Using Iodine Solution*. Obtenido de https://www.canterbury.ac.nz/media/documents/science-outreach/vitaminc_iodine.pdf
- Castillo, E. (2019). Revista de la facultad de medicina humana. *Vitamina C en la salud y en la enfermedad*. Lima . Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-05312019000400014
- Contreras, N. (2019). *Determinación De Vida Útil En Yema Líquida Pasteurizada*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Federico Santa María. Santa María, Brazil.
- Defaz, O. (2019). *Efecto antimicrobiano del extracto de cáscara de guanánaba en comparación con la clorhexidina al 12% sobre Streptococcus mutans. estudio comparativo in vitro*. (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Domínguez, A. (2017). *Formulación Y Métodos De Conservación De Una Bebida Apartir De La Hoja De Teberinto*. (Tesis de pregrado).. Universidad De El Salvador. San Salvador, El salvador.

- García, A., y Creus, E. (07 de 04 de 2016). Revista cubana de medicina general integral. *La obesidad como factor de riesgo, sus determinantes y tratamiento*. Escuela Nacional de Salud Pública. La Habana, Cuba.
- García, M. (2016). *Efecto de los cultivos asociados en la producción de guanabana (Annona muricata) en la estación* (Tesis de pregrado). Universidad Agraria Del Ecuador. Guayaquil, Ecuador.
- García, M. (2018). *Influencia del tiempo de almacenamiento y del sistema de cultivo sobre las características físico-químicas y sensoriales del kiwi en fresco y almibar*. (Tesis de pregrado). Universidad de Santiago de Compostela. Coruña, España.
- INEN 1 529-6. (s.f.). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable*. Obtenido de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-6.pdf>
- INEN. (2008). *Jugos, pulpas, concentrados, nectares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos*. Quito. Obtenido de https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2337.pdf
- INEN. (2011). *Rotulo de roductos alimenticios para consumo humano* . Obtenido de <https://www.controlsanitario.gob.ec/wp>
- Jijón, M. (2017). *Sustitución parcial de azúcar por stevia y estudio del efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de vitamina C e una bebida de piña (Anonas comous) y soja (Glycine max)*. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco De Quito. Quito, Ecuador .

- Jiménez, y Rosendo. (2017). Topicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007>
- Juliarena, P. (2017). Conservación de los alimentos. En *Tecnología, ambiente y sociedad*.
- Leiva, S. (2018). *Annona muricata L. "guanábana" (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v25n1/a08v25n1.pdf/>
- Leon, I. (2018). *efectos de la pasteurización en el contenido de antocininas y felones totales en el jugo de uva*. (Tesis de pregrado). Universidad señor de sipán , Pimentel. Chiclayo, México.
- López, A. (2016). *SciELO*. Obtenido de Beneficios nutricionales y sanitarios asociados al consumo de kiwi.
- Valdez, A. (2019). *Revista chilena de nutrición* . Obtenido de Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad.
- Mendoza, K. (2017). *Muffins de chocolate con relleno de mermelada de kiwi enriquecida con spirulina*. (Tesis de pregrado). Universidad nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú.
- National Institutes of health. (2019). Datos sobre la vitamina C. Obtenido de <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminC-DatosEnEspanol.pdf>
- Nieto, C., Alik, C., y Tamborrel, N. (2017). *Sciencedirect*. Obtenido de Percepción sobre el consumo Delaware alimentos procesados y

productosultraprocesados en estudiantes Delaware posgrado Delaware la Ciudad Delaware Méxic.

NTE INEN 1 529-5. (s.f.). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. REP.* Obtenido de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>

INEN 1529-10:2013. (s.f.). *Mohos y levaduras. Recuento en placa* . Obtenido de https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf

INEN 1529-8. (s.f.). *Control microbiológico de los alimentos. Detección y recuento de Escherichia coli presuntiva por la técnica del número más probable.*

Núñez, A. (2020). *Desarrollo de un puré deshidratado instantáneo a base de higo (Ficus carica) y kiwi (Actinidia deliciosa) como alternativa de consumo.* (Tesis de pregrado). Universidad Agraria del Ecuador. Milagro, Ecuador.

NUTRI-FACTS. (2019). VITAMINA C. 1. Obtenido de https://www.nutrifacts.org/content/dam/nutrifacts/pdf/nutrients-pdf-es/Vitamina_C.pdf

Pupiales, E. (2021). *incidencia de la pasteurización lenta en la capacidad antioxidante hidrosoluble del jugo de limon.* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica del norte. Ibarra, Ecuador.

Rodriguez, M. (2020). *Determinacion de la presencia de antioxidantes en una bebida elaborada con soja (Glycine max) y kiwi (Actinidia deliciosa), saborizada con maracuyá.* (Tesis de pregrado). Universidad Agraria Del Ecuador. Milagro, Ecuador.

- Ramos, A. (2020). *EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE GUANÁBANA (Annona muricata)*. (Tesis de pregrado). Universidad de Córdoba, Montería. Cordova, España.
- Robles, N. (2016). *Efecto del tiempo y temperatura de pasteurización en el contenido de vitamina C y capacidad antioxidante en zumo de oca (Oxalis tuberosa)*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Del Altiplano. Puna, Perú.
- Rojas, A. (2020). *Efecto del ácido indol butírico y naftalen acético sobre la producción y morfología radicular in vitro de kiwiw verde y la supervivencia de la planta ex vitro*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Román, M. (2012). *Escuela Politécnica del ejército*. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6717/1/T-ESPE-010107.pdf>
- Saucedo, T., y Torpoco, L. (2018). *Contenido de acido ascorbico en zumo de naranja embotellado y expedido de forma ambulatoria . tesis de pregrado*. Universidad Norbert Wiener. Lima, Perú.
- SciELO. (2015). *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud* . Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
- Sephu. (11 de mayo de 2010). *Sociedad española de productos humicos s.a.* Obtenido de Cultivo de guanabana recomendaciones para solucionar problemas de floración, cuajado y aborto de flores: https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/81972/046---11.05.10---Cultivo-de-la-Guana--769-bana.pdf

- Serrano, M., y Castillo, N. (2017). *SciELO*. Obtenido de La obesidad en el mundo:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832017000200011&script=sci_arttext
- Tenisi, M. S. (2017). *Revisión sistemática de los cambios químicos producidos por la pasteurización*. (Tesis de pregrado) . Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Tiscama, K. (2021). *Plan de negocios para la implementación de una planta procesadora de néctar de guanábana en la provincia de Los Ríos*.
- Triviño, D. (2018). *Importancia de la producción y exportación de guanábana en el Ecuador y sus perspectivas*. (Tesis de pregrado). Universidad Guayaquil. Guayaquil.
- Valdés, F. (2016). *Academia Española de dermatología y venereología* . Obtenido de Vitamina C: <https://www.actasdermo.org/es-vitamina-c-articulo-13095269>
- Vilaplana, M. (2017). *Antioxidantes presentes en los alimentos* . Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13112893>
- Villareal, D., y Mejía, D. Y. (2016). *Bioteología en sector agropecuario y agroindustrial* . Obtenido de Efectos de pasteurización sobre características sensoriales y contenido de vitamina C en jugos de frutas
- Zhongwei, F. (2017). *Facultad de Farmacia Universidad Complutense* . Obtenido de Métodos analíticos para la determinación de vitamina C en alimentos.

9. Anexos

9.1 Anexo 1. Clasificación taxonómica

Tabla 12. Taxonomía del kiwi

Reino:	Plantea
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliophyta
Orden:	Ericales
Familia:	<i>Actinidiaceae</i>
Género:	<i>Actinidia</i>
Especie:	<i>A. deliciosa</i>

Clasificación taxonómica del kiwi.
Cárdenas, 2020

Tabla 13. Taxonomía de la guanábana

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Magnoliales
Familia:	<i>Annonaceae</i>
Género:	<i>Annona</i>
Especie:	<i>A. muricata</i>

Clasificación taxonómica de la guanábana.
Leiva, 2018

9.2 Anexo 2. Desglose global de titulación para determinar presencia de vitamina C

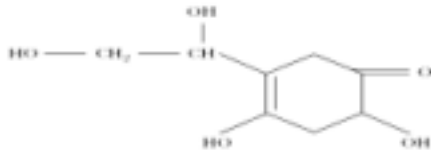


Figura 2. Estructura química de la vitamina C
Serra, 2014

$$\frac{Ct}{Co} = \exp(-k \times t)$$

$$k = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right)$$

$$Q_{10} = \left[\frac{k_2}{k_1}\right]^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1}\right)}$$

$$t_{0.5} = -\ln(0.5)/k$$

$$D = \frac{\ln 10}{k}$$

$$Z = 10 \frac{\ln(10)}{\ln Q_{10}}$$

Figura 3. Ecuación de Arrhenius
Ordoñez, 2016

$$\ln [\text{Ácido ascórbico}]_f = \ln [\text{Ácido ascórbico}]_o - \frac{Ea}{R} * \frac{1}{T}$$

Figura 4. Fórmula para energía de activación
Cortez, 2015

$$Y = \ln [\text{Ácido ascórbico}]_f$$

$$b = \ln [\text{Ácido ascórbico}]_o$$

$$m = -\frac{Ea}{R}$$

$$x = \frac{1}{T}$$

Figura 5. Ecuación de la recta
Chemistry, 2018

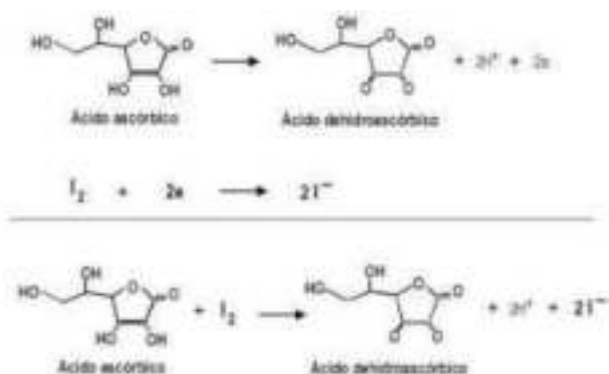


Figura 6. Reacción química determinación de Vitamina C por el método yodométrico
Ikwuchi, 2019

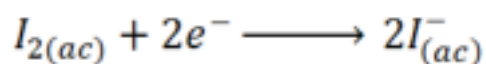


Figura 7. Semi reacción del yodo
Ikwuchi, 2019

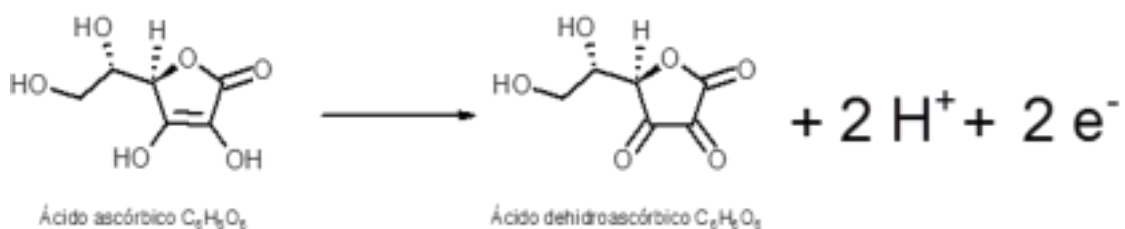


Figura 8. Oxidación de grupos hidroxilos
Campos, 2020

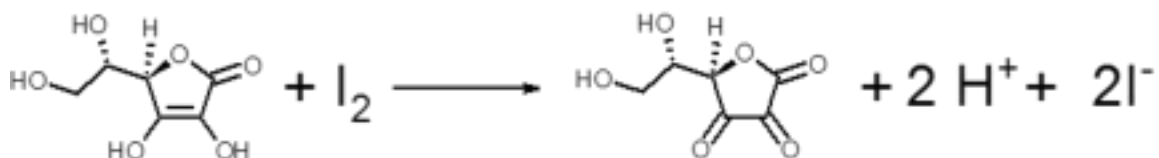


Figura 9. Reacción global de la titulación
Campos, 2020

9.3 Anexo 3. Desarrollo de bebida de guanábana y kiwi



Figura 10. Recepción, limpieza y pelado de la materia prima
Herrera, 2022



Figura 11. Despulpado de la materia prima
Herrera, 2022



Figura 12. Adición de benzoato de sodio
Herrera, 2022



Figura 13. Filtración de la materia prima
Herrera, 2022



Figura 14. Toma de temperatura
Herrera, 2022



Figura 15. Mezclado de la materia prima
Herrera, 2022



Figura 16. Pasteurización por método baño María
Herrera, 2022



Figura 17. Toma de datos de temperatura primer parámetro térmico (60 °C / 15, 20 y 30 min)
Herrera, 2022



Figura 19. Toma de datos de temperatura segundo parámetro térmico (60 C / 15, 20 y 30 min)
Herrera, 2022



Figura 18. Toma de datos de temperatura tercera parámetro térmico (65 C / 15, 20 y 30 min)
Herrera, 2022



Figura 20. Embazado de las muestras
Herrera, 2022



Figura 21. Enfriamiento de la bebida de guanábana y kiwi
Herrera, 2022



Figura 23. Evaluación sensorial
Herrera, 2022

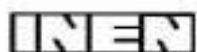


Figura 22. Recopilación de datos
Herrera, 2022



Figura 24. Panelistas
Herrera, 2022

9.4 Anexo 4. Normas técnicas INEN 2 337: 2008



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2 337:2008

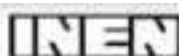
JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS

Primera Edición

FRUIT JUICE, PUREES, CONCENTRATES, NECTAR AND BEVERAGE. SPECIFICATIONS.

First Edition

CDU: 663.8
ICS: 67.080.20



CIRJ-3113
AL 02.03-405

**Norma Técnica
Ecuatoriana
Voluntaria**

**JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS,
NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES.
REQUISITOS.**

**NTE INEN
2 337:2008
2008-12**

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir los jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales.

2. ALCANCE

2.1 Esta norma se aplica a los productos procesados que se expenden para consumo directo; no se aplica a los concentrados que son utilizados como materia prima en las industrias.

3. DEFINICIONES

3.1 Jugo (zumo) de fruta.- Es el producto líquido sin fermentar pero susceptible de fermentación, obtenido por procedimientos tecnológicos adecuados, conforme a prácticas correctas de fabricación, procedente de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o, a partir de frutas conservadas por medios físicos.

3.2 Pulpa (puré) de fruta.- Es el producto caroso y comestible de la fruta sin fermentar pero susceptible de fermentación, obtenido por procesos tecnológicos adecuados por ejemplo, entre otros: tamizando, triturando o desmenuzando, conforme a buenas prácticas de manufactura; a partir de la parte comestible y sin eliminar el jugo, de frutas enteras o peladas en buen estado, debidamente maduras o, a partir de frutas conservadas por medios físicos.

3.3 Jugo (zumo) concentrado de fruta.- Es el producto obtenido a partir de jugo de fruta (definido en 3.1), al que se le ha eliminado físicamente una parte del agua en una cantidad suficiente para elevar los sólidos solubles (° Brix) en, al menos, un 50% más que el valor Brix establecido para el jugo de la fruta.

3.4 Pulpa (puré) concentrada de fruta.- Es el producto (definido en 3.2) obtenido mediante la eliminación física de parte del agua contenida en la pulpa.

3.5 Jugo y pulpa concentrado edulcorado.- Es el producto definido en 3.3 y 3.4 al que se le ha adicionado edulcorantes para ser reconstituido a un néctar o bebida, el grado de concentración dependerá de los volúmenes de agua a ser adicionados para su reconstitución y que cumpla con los requisitos de la tabla 1, ó el numeral 5.4.1

3.6 Néctar de fruta.- Es el producto pulposo o no pulposo sin fermentar, pero susceptible de fermentación, obtenido de la mezcla del jugo de fruta o pulpa, concentrados o sin concentrar o la mezcla de éstos, provenientes de una o más frutas con agua e ingredientes endulzantes o no.

3.7 Bebida de fruta.- Es el producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido de la dilución del jugo o pulpa de fruta, concentrados o sin concentrar o la mezcla de éstos, provenientes de una o más frutas con agua, ingredientes endulzantes y otros aditivos permitidos.

4. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

4.1 El jugo y la pulpa debe ser extraído bajo condiciones sanitarias apropiadas, de frutas maduras, sanas, lavadas y sanitizadas, aplicando los Principios de Buenas Prácticas de Manufactura.

4.2 La concentración de plaguicidas no deben superar los límites máximos establecidos en el Codex Alimentario (Volumen 2) y el FDA (Part. 193).

(Continúa)

4.3 Los principios de buenas prácticas de manufactura deben propender reducir al mínimo la presencia de fragmentos de cáscara, de semillas, de partículas gruesas o duras propias de la fruta.

4.4 Los productos deben estar libres de insectos o sus restos, larvas o huevos de los mismos.

4.5 Los productos pueden llevar en suspensión parte de la pulpa del fruto finamente dividida.

4.6 No se permite la adición de colorantes artificiales y aromatizantes (con excepción de lo indicado en 4.7 y 4.9), ni de otras sustancias que disminuyan la calidad del producto, modifiquen su naturaleza o den mayor valor que el real.

4.7 Únicamente a las bebidas de fruta se pueden adicionar colorantes, aromatizantes, saborizantes y otros aditivos tecnológicamente necesarios para su elaboración establecidos en la NTE INEN 2 074.

4.8 Como acidificante podrá adicionarse jugo de limón o de lima o ambos hasta un equivalente de 3 g/l como ácido cítrico anhidro.

4.9 Se permite la restitución de los componentes volátiles naturales, perdidos durante los procesos de extracción, concentración y tratamientos térmicos de conservación, con aromas naturales.

4.10 Se permite utilizar ácido ascórbico como antioxidante en límites máximos de 400 mg/kg.

4.11 Se puede adicionar enzimas y otros aditivos tecnológicamente necesarios para el procesamiento de los productos, aprobados en la NTE INEN 2 074, Codex Alimentario, o FDA o en otras disposiciones legales vigentes.

4.12 Se permite la adición de los edulcorantes aprobados por la NTE INEN 2 074, Codex Alimentario, y FDA o en otras disposiciones legales vigentes.

4.13 Sólo a los néctares de fruta pueden añadirse miel de abeja y/o azúcares derivados de frutas.

4.14 Se pueden adicionar vitaminas y minerales de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 1 334-2 y en las otras disposiciones legales vigentes.

4.15 La conservación del producto por medios físicos puede realizarse por procesos térmicos: pasteurización, esterilización, refrigeración, congelación y otros métodos adecuados para ese fin; se excluye la radiación ionizante.

4.16 La conservación de los productos por medios químicos puede realizarse mediante la adición de las sustancias indicadas en la tabla 15 de la NTE INEN 2 074.

4.17 Los productos conservados por medios químicos deben ser sometidos a procesos térmicos.

4.18 Se permite la mezcla de una o más variedades de frutas, para elaborar estos productos y el contenido de sólidos solubles ("Brix"), será ponderado al aporte de cada fruta presente.

4.19 Puede añadirse jugo obtenido de la mandarina *Citrus reticulata* y/o híbridos al jugo de naranja en una cantidad que no exceda del 10% de sólidos solubles respecto del total de sólidos solubles del jugo de naranja.

4.20 Puede añadirse jugo de limón (*Citrus limon* (L.) Burm. f. *Citrus limonum* Rissa) o jugo de lima (*Citrus aurantifolia* (Christm.), o ambos, al jugo de fruta hasta 3 g/l de equivalente de ácido cítrico anhidro para fines de acidificación a jugos no endulzados.

4.21 Puede añadirse jugo de limón o jugo de lima, o ambos, hasta 5 g/l de equivalente de ácido cítrico anhidro a néctares de frutas.

4.22 Puede añadirse al jugo de tomate (*Lycopersicon esculentum* L) sal y especias así como hierbas aromáticas (y sus extractos naturales).

(Continúa)

4.23 Se permite la adición de dióxido de carbono, mayor a 2 g/kg, para que al producto se lo considere como gasificado.

4.24 A las bebidas de frutas cuando se les adicione gas carbónico se las considerará bebidas gaseosas y deberán cumplir los requisitos de la NTE INEN 1 101.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos para los jugos y pulpas de frutas

5.1.1 El jugo puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.

5.1.2 La pulpa debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.

5.1.3 El jugo y la pulpa debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.

5.1.4 Requisitos físico-químico

5.1.4.1 Los jugos y las pulpas ensayados de acuerdo a las normas técnicas ecuatorianas correspondientes, deben cumplir con las especificaciones establecidas en la tabla 1.

5.2 Requisitos específicos para los néctares de frutas

5.2.1 El néctar puede ser turbio o claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta o frutas de las que procede.

5.2.2 El néctar debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.

5.2.3 Requisitos físico-químicos

5.2.3.1 El néctar de fruta debe tener un pH menor a 4,5 (determinado según NTE INEN 389).

5.2.3.2 El contenido mínimo de sólidos solubles ("Brix) presentes en el néctar debe corresponder al mínimo de aporte de jugo o pulpa, referido en la tabla 2 de la presente norma.

(Continua)

TABLA 1. Especificaciones para los jugos o pulpas de fruta

FRUTA	Nombre Botánico	Sólidos Solubles ⁴⁾ Mínimo NTE INEN 380
Acerola	<i>Melphigia</i> sp	6,0
Albaricoque (Damasco)	<i>Prunus armeniaca</i> L.	11,5
Arándano (mirtilo)	<i>Vaccinium myrtillus</i> L. <i>Vaccinium corymbosum</i> L. <i>Vaccinium angustifolium</i>	10,0
Arazá	<i>Eugenia stipitata</i>	4,8
Babaco	<i>Carica pentagona</i> Heilb	5,0
Banano	<i>Musa</i> spp	21,0
Borojo	<i>Borojoa</i> spp	7,0
Carambola (Grosella china)	<i>Averrhoa carambola</i>	5,0
Claudia ciruela	<i>Prunus domestica</i> L.	12,0
Coco (1)	<i>Cocos nucifera</i> L.	5,0
Coco (2)	<i>Cocos nucifera</i> L.	4,0
Durazno (Melocotón)	<i>Prunus pérsica</i> L.	9,0
Frutilla	<i>Fragaria</i> spp	6,0
Frambuesa roja	<i>Rubus idaeus</i> L.	7,0
Frambuesa negra	<i>Rubus occidentalis</i> L.	11,0
Guanábana	<i>Annona muricata</i> L.	11,0
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	5,0
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	8,0
Litchi	<i>Litchi chinensis</i>	11,0
Lima	<i>Citrus aurantifolia</i>	4,5
Limón	<i>Citrus limon</i> L.	4,5
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	10,0
Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	11,0
Manzana	<i>Malus domestica</i> Borkh	6,0
Maracuyá (Parchita)	<i>Passiflora edulis</i> Sims	12,0
Marañón	<i>Anacardium occidentale</i> L.	11,5
Melón	<i>Cucumis melo</i> L.	5,0
Mora	<i>Rubus</i> spp.	6,0
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	9,0
Naranjilla (Lulo)	<i>Solanum quitoense</i>	6,0
Papaya (Lechosa)	<i>Carica papaya</i>	8,0
Pera	<i>Pyrus communis</i> L.	10,0
Piña	<i>Ananas comosus</i> L.	10,0
Sandia	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb	6,0
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i> L.	18,0*
Tomate de árbol	<i>Cyphomandra betacea</i>	8,0
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	4,5
Toronia (Pomelo)	<i>Citrus paradisi</i>	8,0
Uva	<i>Vitis</i> spp	11,0

⁴⁾ En grados Brix a 20 °C (con exclusión de azúcar)

(1) Este producto se conoce como "agua de coco" el cual se extrae directamente del fruto sin exprimir la pulpa.

(2) Es la emulsión extraída del endosperma (almendra) maduro del coco, con o sin adición de agua de coco

* Para extraer el jugo del tamarindo debe hacerse en extracción acuosa, lo cual baja el contenido de sólidos solubles desde 60 °Brix, que es su Brix natural, hasta los 18 °Brix en el extracto.

NOTA 1. Para las frutas que no se encuentran en la tabla el mínimo de grados Brix será el Brix del jugo o pulpa obtenido directamente de la fruta

5.3 Requisitos específicos para los jugos y pulpas concentradas.

5.3.1 El jugo concentrado puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.

5.3.2 La pulpa concentrada debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.

5.3.3 El jugo y pulpa concentrado, con azúcar o no, debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.

5.3.4 El contenido de sólidos solubles ("Brix a 20 °C con exclusión de azúcar) en el jugo concentrado será por lo menos, un 50% más que el contenido de sólidos solubles en el jugo original (Ver tabla 1 de esta norma).

5.4 Requisitos específicos para las bebidas de frutas

5.4.1 En las bebidas el aporte de fruta no podrá ser inferior al 10 % m/m, con excepción del aporte de las frutas de alta acidez (acidez superior al 1,00 mg/100 cm³ expresado como ácido cítrico anhidro) que tendrán un aporte mínimo del 5% m/m

5.4.2 El pH será inferior a 4,5 (determinado según NTE INEN 389)

5.4.3 Los grados brix de la bebida serán proporcionales al aporte de fruta, con exclusión del azúcar añadida.

5.5 Requisitos microbiológicos

5.5.1 El producto debe estar exento de bacterias patógenas, toxinas y de cualquier otro microorganismo causante de la descomposición del producto.

5.5.2 El producto debe estar exento de toda sustancia originada por microorganismos y que representen un riesgo para la salud.

5.5.3 El producto debe cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 3, tabla 4, o con el numeral 5.5.4

TABLA 3. Requisitos microbiológicos para productos congelados

	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-8
Recuento de esporas clostridium sulfito reductoras UFC/cm ³ ¹⁾	3	< 10	--	0	NTE INEN 1529-18
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ²	3	1,0x10 ²	1,0x10 ³	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/ cm ²	3	1,0x10 ²	1,0x10 ³	1	NTE INEN 1529-10

¹⁾ Para productos enlatados.

(Continúa)

TABLA 4. Requisitos microbiológicos para los productos pasteurizados

	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-8
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/cm ³	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-10

En donde:

- NMP = número más probable
- UFC = unidades formadoras de colonias
- UP = unidades propagadoras
- n = número de unidades
- m = nivel de aceptación
- M = nivel de rechazo
- c = número de unidades permitidas entre m y M

5.5.4 Los productos envasados asépticamente deben cumplir con esterilidad comercial de acuerdo a la NTE INEN 2 335

5.6 Contaminantes

5.6.1 Los límites máximos de contaminantes no deben superar lo establecido en la tabla 5

TABLA 5. Límites máximos de contaminantes

	Límite máximo	Método de ensayo
Arsénico, As mg/kg	0,2	NTE INEN 269
Cobre, Cu mg/kg	5,0	NTE INEN 270
Estaño, Sn mg/kg *	200	NTE INEN 385
Zinc, Zn mg/kg	5,0	NTE INEN 399
Hierro, Fe mg/kg	15,0	NTE INEN 400
Plomo, Pb mg/kg	0,05	NTE INEN 271
Patulina (en jugo de manzana)**, mg/kg	50	AOAC 49.7.01
Suma de Cu, Zn, Fe mg/kg	20	
* En el producto envasado en recipientes estañados		
** La patulina es una micotoxina formada por una lactona hemiacetálica, producida por especies del género <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Byssoclamys</i> .		

5.7 Requisitos Complementarios

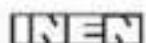
5.7.1 El espacio libre tendrá como valor máximo el 10 % del volumen total del envase (ver NTE INEN 394).

5.7.2 El vacío referido a la presión atmosférica normal, medido a 20 °C, no debe ser menor de 320 hPa (250 mm Hg) en los envases de vidrio; ni menor de 160 hPa (125 mm Hg) en los envases metálicos. (ver NTE INEN 392).

NTE INEN 2 337	2008-12
6. INSPECCIÓN	
6.1 Muestreo. El muestreo debe realizarse de acuerdo a la NTE INEN 378.	
6.2 Aceptación o Rechazo. Se aceptan los productos si cumplen con los requisitos establecidos en esta norma, caso contrario se rechaza.	
7. ENVASADO Y EMBALADO	
7.1 El material de envase debe ser resistente a la acción del producto y no debe alterar las características del mismo.	
7.2 Los productos se deben envasar en recipientes que aseguren su integridad e higiene durante el almacenamiento, transporte y expendio.	
7.3 Los envases metálicos deben cumplir con la NTE INEN 190, Codex Alimentario y FDA.	
8. ROTULADO	
8.1 El rotulado debe cumplir con los requisitos establecidos en la NTE INEN 1 334-1 y 1 334-2, y en otras disposiciones legales vigentes.	
8.2 En el rotulado debe estar claramente indicada la forma de reconstituir el producto.	
8.3 No debe tener leyendas de significado ambiguo, ni descripción de características del producto que no puedan ser comprobadas.	
(Continúa)	

Figura 25. Presentación ...
INEN,

9.5 Anexo 5. NTE INEN 1 529 5 control de microorganismos aerobios mesófilos



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 529-5:2006

Primera revisión

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.**

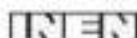
Primera Edición

WORD BIOLOGICAL CONTROL IN FOODS - DETERMINATION OF THE QUANTITY OF AEROBIC MESOPHILIC MICROORGANISMS PCA.

First Edition

DESCRIPCIÓN: Microbiología de los alimentos, ensayo. REP.
AL: 01 05-200
CEN: 679-67
CIN: 4100
ICE: 07 100.30 67 200

CSU 379 ET
 ESE-07 100.30 N7 083



CSU 9320
 AL 01 05-303

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS, REP.	NTE INEN 1 529-S:2006 Primera revisión 2006-01
--	--	---

1. OBJETIVO

1.1 Esta norma establece el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.

2. ALCANCE

2.1 Este método de ensayo solo permitirá cuantificar la presencia de grupos de microorganismos aerobios mesófilos.

3. DEFINICIONES

3.1 Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C.

3.2 REP es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos por gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento.

4. RESUMEN

4.1 Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual viable. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inoculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento.

4.2 Limitaciones del método. Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos vitales (viables) en la muestra debido a las siguientes condiciones:

4.2.1 Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.

4.2.2 Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse.

4.2.3 Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura, la presencia de inhibidores y el uso incorrecto.

5. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 Todo el material a utilizarse en la determinación debe estar perfectamente limpio y estéril.

5.2 El área de trabajo debe estar constituida por una mesa nivelada, de superficie amplia, limpia, desinfectada, bien iluminada, situada en una sala de aire limpio, libre de polvo y corrientes de aire.

(Continúa)

DESCRPTORES: Montaje de alimentos, ensayo REP

5.3 La carga microbiana del aire debe ser controlada durante el ensayo y, para una exposición del medio de cultivo a él por 15 min, no debe exceder de 15 ufo/placa, de superarse este valor los ensayos deben ser anulados.

5.4 Todas las demás áreas del laboratorio deben estar libres de polvo, de insectos y guardar protegidos el material y suministros.

6. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Materiales

6.1.1 Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 cm³ y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

6.1.2 Cajas Petri de 90 mm x 15 mm.

6.1.3 Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

6.1.4 Tubos de 150 mm x 16 mm.

6.1.5 Gradillas.

6.1.6 Contador de colonias.

6.1.7 Balanza de capacidad no superior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad.

6.1.8 Baño de agua regulado a 45°C ± 1°C.

6.1.9 Incubador regulable (25°C - 50°C).

6.1.10 Autoclave.

6.1.11 Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo.

6.1.12 Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15°C a -20°C.

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Agar para recuento en placa (Plate Count Agar). Preparación (ver Agares en la NTE INEN 1529-1).

6.2.2 Agua peptonada al 0,1 % (diluyente). Preparación (ver diluyentes en la NTE INEN 1 529-1).

7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 Preparar la muestra según uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Para cada dilución el ensayo se hará por duplicado. En cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositará 1 cm³ de cada dilución. Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.

8.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar para recuento en placa-PCA, fundido y templado a 45°C ± 2°C. La adición del medio no debe pasar de más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución.

(Continúa)

8.3 Cuidadosamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.

8.4 Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.

8.5 Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar.

8.6 Invertir las cajas e incubarlas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas.

8.7 No apilar más de 6 placas. Las pilas de placas deben estar separadas entre sí, de las paredes y del techo de la incubadora.

8.8 Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias y utilizando un contador de colonias, contar todas las colonias que hayan crecido en el medio, incluso las pequeñas, pero, se debe tener cuidado para no confundirlas con partículas de alimentos o precipitados, para esto, utilizar lupas de mayor aumento.

8.9 Las colonias de crecimiento difuso deben considerarse como una sola colonia si el crecimiento de este tipo de colonias cubre menos de un cuarto de la placa; si cubre más la caja no será tomada en cuenta en el ensayo.

8.10 Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.

9. CALCULOS

9.1 Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias)

9.1.1 Calcular el número N de microorganismo por gramo o cm^3 de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

En donde:

- $\sum c$ = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas.
- V = Volumen inoculado en cada caja Petri.
- n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada.
- n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada.
- d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada ($d = 1$ cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

9.1.2 Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la correspondiente potencia de 10.

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados (dos placas por dilución):
primera dilución seleccionada (10-2): 225 y 178 colonias,
segunda dilución seleccionada (10-3): 25 y 15 colonias.

(Continúa)

$$N = \frac{225 + 178 + 25 + 15}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$$

$$N = \frac{443}{0,022}$$

$$N = 20136$$

Redondeando:

$$20\ 000 = 2,0 \times 10^5$$

9.2 Recuentos estimados

9.2.1 Si dos placas inoculadas con muestra no diluida (productos líquidos), o con la suspensión inicial (otros productos) o con la primera dilución inoculada o retenida contienen menos de 15 colonias, calcular el número estimado N_e de microorganismos presentes por gramo o cm^3 de producto como una media aritmética m de las colonias contadas en las dos placas utilizando la siguiente ecuación:

$$N_e = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

- $\sum C$ = suma de las colonias contadas en las dos placas;
 V = volumen inoculado en cada placa;
 n = número de placas seleccionadas (en este caso, $n = 2$);
 d = factor de dilución de la suspensión inicial o de la primera dilución inoculada o seleccionada ($d = 1$ cuando se inocula un producto líquido sin diluir).

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados:

Primera dilución retenida (10⁻²): 12 y 13 colonias.

$$N_e = \frac{12 + 13}{1 \times 2 \times 10^{-2}}$$

$$N_e = \frac{25}{0,02}$$

$$N_e = 1250$$

Redondeando:

$$N_e = 1300$$

$$N_e = 1,3 \times 10^3$$

(Continúa)

En los productos líquidos, $N_L = m$

9.2.2 Si las dos placas inoculadas con la muestra sin diluir (productos líquidos), o con la primera dilución o con la suspensión inicial (otros productos) no presentan colonias, expresar los resultados de la siguiente manera:

$$N_L \leq 1/d$$

En donde:

- N_L = cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico.
- d = factor de dilución (ver numeral 9.2.1)

10. INFORME DE RESULTADOS

10.1 Informar como número N de microorganismos por gramo o cm^3 de muestra utilizando solo dos cifras significativas, según lo indicado en el numeral 9.1.

10.1.1 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.1.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N de microorganismos/g o $cm^3 = 2,0 \times 10^7$

10.1.2 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.1, se expresaría de la siguiente manera:

- N_L de microorganismos/g ó $cm^3 = 1,3 \times 10^7$

10.1.3 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N_L de microorganismos/g ó $cm^3 \leq 1,0/d$

(Continúa)

APENDICE Z**Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR**

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:1999	Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:1999	Control microbiológico de los alimentos. Preparación de muestras.

Z.2 BASES DE ESTUDIO

International Standard ISO 7218:1996 and Amendment 1:2001 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations*. International Organization for Standardization, Geneva, 1996.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1 529-5 Primera revisión	TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.	Código: AL 01.05-303
--	--	--------------------------------

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo Oficialización con el Carácter de por Acuerdo No. de publicado en el Registro Oficial No. de Fecha de iniciación del estudio:
--	--

Fechas de consulta pública de a

Comité Interno del INEN
 Fecha de iniciación: 2005-01-12 Fecha de aprobación: 2005-01-12
 Integrantes del Comité Interno:

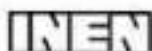
NOMBRES:	INSTITUCIÓN REPRESENTADA:
Dr. Ramiro Gallagos (Presidente) Dra. Hipatia Navas Dr. Hugo Ayala Ing. Gonzalo Artaza (Secretario Técnico)	DIRECTOR DEL ÁREA TÉCNICA DE SERVICIOS TECNOLÓGICOS AREA TÉCNICA DE SERVICIOS TECNOLÓGICOS AREA TÉCNICA DE CERTIFICACIÓN AREA TÉCNICA DE NORMALIZACIÓN

Otros trámites:

El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 2005-10-26

Oficializado como Voluntaria Por Acuerdo Ministerial No. 06-004 de 2006-01-02
 Registro Oficial No. 188 de 2006-01-16

CDU: 663.1



AL 01.05-304

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE	INEN 1 529-6 1990-02
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de microorganismos coliformes.</p> <p style="text-align: center;">2. TERMINOLOGIA</p> <p>2.1 Coliformes (coliformes aerógenos). Bacterias de forma bacilar, Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas móviles e inmóviles, no esporuladas que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ los productos refrigerados y a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ los productos que se mantienen a temperatura ambiente y se utiliza el medio y método descrito. Este grupo es utilizado como indicador del grado de higiene.</p> <p>2.2 Recuento de coliformes. Es la determinación del número de coliformes viables por gramo o cm^3 de muestra de alimento.</p> <p style="text-align: center;">3. RESUMEN</p> <p>3.1 El método se basa en la determinación del número más probable (NMP) por la técnica de dilución en tubos, utilizando el medio líquido selectivo caldo verde brillante bils lactosa o similar para el ensayo presuntivo y los tubos que presentan gas son confirmados en agar Eosina azul de metileno (E M B). La temperatura de incubación para el ensayo presuntivo y confirmativo es $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para productos refrigerados y $35 \pm 1^\circ\text{C}$ para productos que se mantienen a temperatura ambiente.</p> <p style="text-align: center;">4. EQUIPO Y MATERIAL DE VIDRIO</p> <p>4.1 Equipo usual en un laboratorio microbiológico. En particular</p> <p>4.1.1 Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 y 10 cm^3 graduadas en 1/10 de unidad.</p> <p>4.1.2 Cajas petri</p> <p>4.1.3 Tubos de 150 x 16 mm y de 125 x 12 mm</p> <p>4.1.4 Tubos Durham de 50 x 6 mm</p> <p>4.1.5 Erlenmeyer de 500 y $1\ 000\text{ cm}^3$</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p>		

4.1.6 Frascos de boca ancha de 250, 500 y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

4.1.7 Asa de inoculación

4.1.8 Gradillas

4.1.9 Balanza de capacidad no inferior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad

4.1.10 Incubador regulable, rango de temperatura de 25 - 70 ± 1 °C

4.1.11 Autoclave

4.1.12 pH-metro

5. MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTE

5.1 Caldo verde brillante bilito-lactosa (BGBL); ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1529-1

5.2 Agar eosina azul de metileno (EMB), ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.3 Solución de Peptona al 0,1% ver preparación diluyentes en la Norma INEN 1 529-1 .

6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 Preparar la muestra según uno de los procedimientos indicados en la Norma INEN 1 529-2.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Inmediatamente después de realizadas las diluciones con una pipeta estéril, transferir 1 cm³ de la dilución 10⁻¹ a cada uno de los tres tubos que contengan 10 cm³ de caldo BGBL o similar (5.1) (ver esquema 1).

7.2 Con otra nueva pipeta estéril, transferir 1 cm³ de la dilución 10⁻² en cada uno de los tres tubos que contengan 10 cm³ del medio. Proceder de igual manera con otras diluciones.

7.3 Incubar los tubos a 30 ± 1 °C para productos refrigerados y 35 ± 1 °C para productos que se mantiene a temperatura ambiente por 48 horas.

7.4 Transcurridas las 48 horas anotar en cada dilución como presuntos positivos todos los tubos que presenten crecimiento con producción suficiente de gas como para llenar el fondo cóncavo del tubo Durham

(Continúa)

es decir, el menisco llegaría hasta donde las paredes del tubo se hacen paralelas. También se considera como presunto positivo si el tubo Durham contiene menos gas del indicado, pero al golpear delicadamente al tubo de cultivo hay desprendimiento de burbujas. Solo la turbidez no es indicativo de una prueba positiva.

7.5 Agitar cada uno de los tubos presuntamente positivos y con un asa de inoculación a partir de cada uno de ellos sembrar por estria en la superficie de placas individuales secas de Agar EMB (5.2), identificar las placas.

7.6 Invertir las placas e incubarlas a 30 ± 1 °C para productos refrigerados y 35 ± 1 °C para productos que se mantienen a temperatura ambiente por 24 ± 2 horas.

7.7 Si al término del periodo de incubación hay desarrollo de colonias lactosa positivas las cuales son negras o poseen centro oscuro con periferias transparentes incoloras o bien colonias mucoides de color rosa naranja, confirman la presencia de coliformes.

7.8 De cada dilución anotar el número de tubos positivos confirmados de coliformes.

8. SELECCION DE DILUCIONES

8.1 Elegir la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en tres tubos y las dos diluciones superiores más próximas. Por ejemplo, si las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} presentan resultados positivos confirmados en los tres tubos, la 10^{-3} presenta un tubo y 1 a 10^{-4} ninguno, anotar los resultados de la siguiente manera:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
3/3	1/3	3/3	0/3

Las diluciones elegidas serán la 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} cuya relación de tubos positivos es 3-1-0 que según la Tabla 1 le corresponde un NMP de 43.

8.2 Si ninguna de las diluciones presenta tres tubos positivos confirmados seleccionar las tres diluciones más altas con algún tubo positivo. Por ejemplo, se tiene los siguientes datos:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
2/3	2/3	1/3	1/3

Las diluciones que deben ser seleccionadas son las 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , dando una combinación de tubos positivos de 2-1-1 que según la Tabla 1 le corresponde un NMP de 20.

(Continúa)

9. CALCULOS

9.1 Cuando las tres diluciones decimales sucesivas son las 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se ha inoculado 3 alícuotas de 1 cm^3 de cada una de éstas, anotar la relación de tubos positivos confirmados y ver en la Tabla 1 el respectivo NMP/g ó cm^3 .

9.2 Para calcular el NMP/g ó cm^3 cuando se inocula tres alícuotas de 1 cm^3 de más de tres diluciones decimales sucesivas, multiplicar el NMP por el factor adecuado: 10, 100, 1 000, etc. Por ejemplo, si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , multiplicar por 100, multiplicar por 1 000 si las diluciones seleccionadas son 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y así sucesivamente.

Completando los ejemplos de los literales 8.1 y 8.2 tenemos respectivamente: NMP de 430 coliformes/g ó cm^3 (43×10); NMP de 200 coliformes/g ó cm^3 (20×10).

9.3 Para el caso de productos con baja carga microbiana se puede utilizar soluciones más concentradas. En este caso, dividir el NMP para el factor adecuado. Por ejemplo, si al inocular 3 alícuotas de 10 cm^3 de la dilución 10^{-1} , 3 alícuotas de 1 cm^3 de la 10^{-2} y 3 alícuotas de 1 cm^3 de la 10^{-3} se obtiene una relación de tubos positivos confirmados de 3-2-1, a esta relación le corresponde un NMP de 150 que dividido para 10 se obtiene un NMP de 15 coliformes/g ó cm^3 de muestra.

9.4 Mayores detalles ver en la Norma INEN 1 529-4.

10. ERRORES DE METODO

10.1 El NMP es realmente una estimación del número de bacterias existentes en cualquier muestra, y esta estimación está sujeta a errores inherentes al método, aunque esto no invalida la idoneidad de la prueba para detectar la contaminación.

10.2 Las combinaciones de tubos positivos de las categorías 3-4 y las que no figuran en la Tabla 1, son muy poco probables y no pueden servir de base para decidir, devolver y/o reprocesar el producto.

10.3 Cuando frecuentemente se obtengan combinaciones improbables, revisar cuidadosamente el método y eliminar todas las probables causas de error (mezcla deficiente de la muestra y/o diluciones, presencia de inhibidores en los alimentos, etc.).

11. INFORME DE RESULTADOS

11.1 Reportar: NMP de coliformes/g ó cm^3 de muestra.

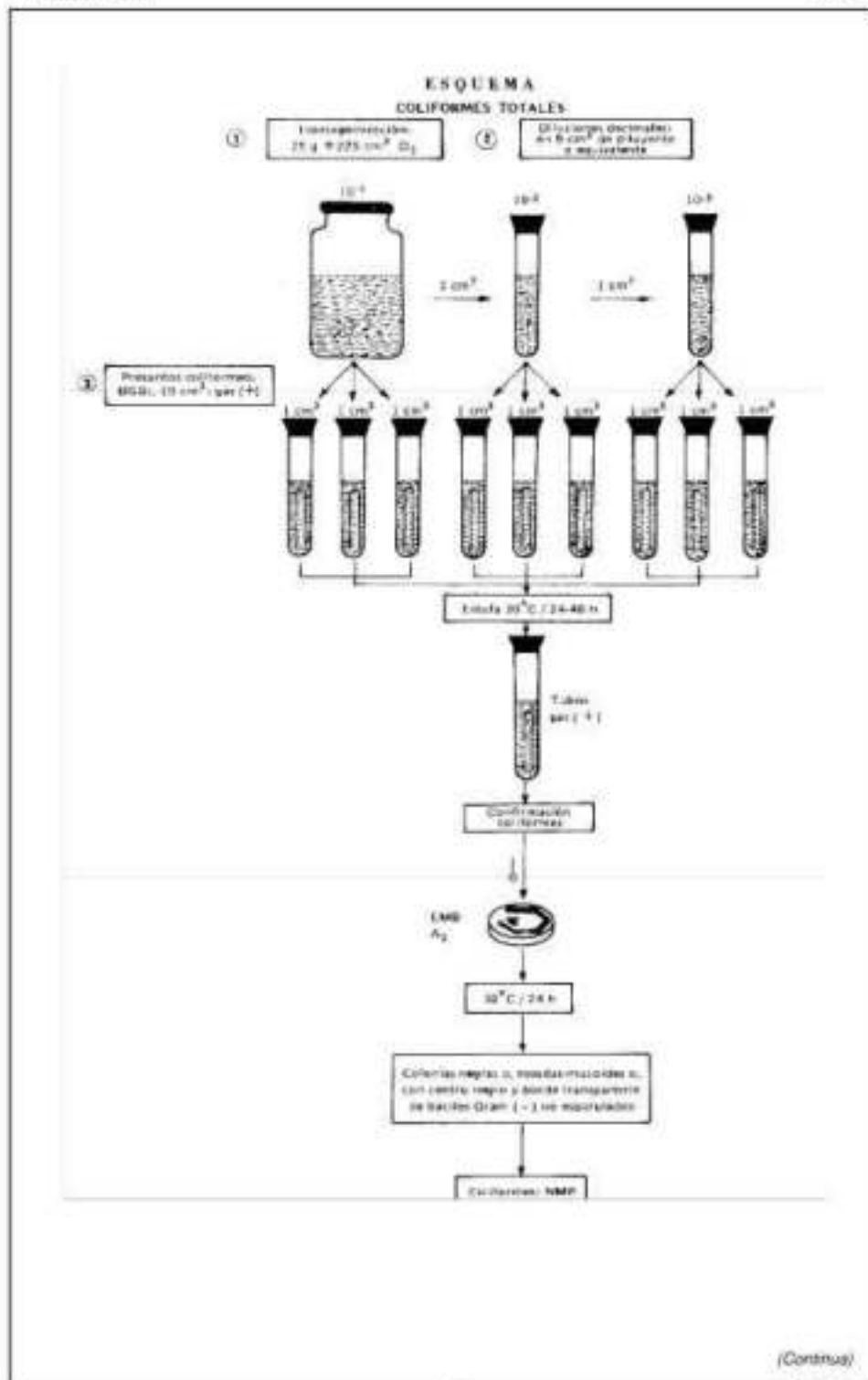
11.2 Indicar el método de ensayo. Mencionar cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado. Incluir todos los detalles de identificación de la muestra.

(Continúa)

TABLA 1. Índice del NMP de bacterias cuando se utiliza tres alicuotas de 1 cm³ por dilución.

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCION			NMP POR GRAMO O cm ³	LIMITES DE CONFIANZA DEL 95%		CATEGORIA
DILUCION 10 ¹	DILUCION 10 ²	DILUCION 10 ³		INFERIOR	SUPERIOR	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	2
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	390	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	390	3
3	2	0	90	15	390	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	35	1 300	1
3	3	1	460	71	2 400	1
3	3	2	1 100	150	4 800	1

(Continua)



APENDICE Z**Z.1 NORMAS A CONSULTAR**

INEN 52	<i>Reglas para redondear números</i>
INEN 1 529-1	<i>Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.</i>
INEN 1529-2	<i>Control microbiológico de los alimentos. Preparación de muestras.</i>
INEN 1 529-4	<i>Control microbiológico de los alimentos. Recuento microbiológico.</i>

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Internacional ISO 4831 *Microbiology. General Guidance for the enumeration of Coliforms. Most probable number Technique at 30°C.* Primera edición. Ginebra, 1978.

I.C.M.S.F. *Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas del análisis microbiológico.* Editorial Acribia, Zaragoza, España.

FAO - FOOD AND NUTRITION PAPER 14/4 *Manual of food quality control 4. Microbiological analysis.* Roma, 1979.

Food and Drug Administration Bureau of foods División of Microbiology. *Bacteriological Analytical Manual* 5a Ed. 1978.

Centro Nacional de Alimentación y nutrición. *Método de examen microbiológico para alimentos y bebidas Normas recomendadas. Manual Práctico.* Madrid, 1976.

International Dairy Federation, FIL-IDF-73 *Milk and Milk Products count of Coliform Bacteria.* International Dairy Federation, Bruselas, 1974.

Mossel, D.A., Moreno Garcia, B. *Microbiología de los alimentos.* Edt. Acribia, Zaragoza, España 1982.

Harrigan W. F., McLance, M.E. *Métodos de laboratorio en microbiología de los alimentos y productos lácteos.* León, España, 1979.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1529-6	TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO	Código: AL 01.05-304
ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio: 1988-03-28	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo Oficialización con el Carácter de por Acuerdo No. de publicado en el Registro Oficial No. de Fecha de iniciación del estudio:	
Fecha de consulta pública: de _____ a _____		

Subcomité Técnico: **AL 01.05 Microbiología de los Alimentos**

Fecha de iniciación:

Fecha de aprobación: 1988-07-14

Integrantes del Subcomité Técnico:

NOMBRES:

Dra. Nelly Carba (Presidenta)
Sr. Fernando Peñafiel
Dra. Luz Guerrero
Ing. Hayde Llerena
Ing. Edwin Santamaría
Dr. Víctor Villarreal
Ing. Mario Paredes
Dra. Magdalena Basas
Dra. Rosa de León
Dra. Teresa Avila
Ing. Luz Viteri

Dra. Irma Paredes
Dra. Hipatia Navas
Ing. Marcelo Procel (Secretario Técnico)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

INSTITUTO NACIONAL DE PESCA-ESPOL
BALANCEADOS VIGOR
PASTEURIZADORA QUITO
PASTEURIZADORA QUITO
GELEC S.A.
INEDECA NESTLE S.A.
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE-QUITO
DIRECCIÓN MUNICIPAL DE HIGIENE-QUITO
DIRECCIÓN MUNICIPAL DE HIGIENE-
AMBATO
ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
INEN
INEN

Otros trámites: * Esta norma sin ningún cambio en su contenido fue **DESREGULARIZADA**, pasando de **OBLIGATORIA a VOLUNTARIA**, según Resolución de Consejo Directivo de 1998-01-08 y oficializada mediante Acuerdo Ministerial No. 235 de 1998-05-04 publicado en el Registro Oficial No. 321 del 1998-05-20. El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 1990-02-08

Oficializada como: OBLIGATORIA
Registro Oficial No. 431 de 1990-05-07

Por Acuerdo Ministerial No. 159 de 1990-04-25

9.6 Anexo 6. NTE INEN 1529 8 detección y recuento de E. coli



NORMA
TÉCNICA
ECUATORIANA

NTE INEN 1529-8
Primera revisión
2016-09

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETECCIÓN Y
RECUENTO DE *ESCHERICHIA COLI* PRESUNTIVA POR LA
TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE**

MICROBIOLOGY CONTROL OF FOOD. DETECTION AND ENUMERATION OF PRESUMPTIVE
ESCHERICHIA COLI BY MOST PROBABLE NUMBER TECHNIQUE

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS
DETECCIÓN Y RECUENTO DE *ESCHERICHIA COLI*
PRESUNTIVA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE**

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma proporciona un método para la detección, recuento y confirmación de *Escherichia coli* presuntiva por las pruebas bioquímicas IMViC y la técnica del número más probable.

El método descrito en esta norma sirve para determinar *Escherichia coli* presuntiva por la técnica del número más probable y las pruebas bioquímicas confirmatorias en:

- productos destinados al consumo humano y la alimentación de los animales,
- muestras ambientales en el ámbito de la producción alimentaria y manipulación de alimentos.

2. REFERENCIAS NORMATIVAS

Los siguientes documentos en su totalidad o en parte, son indispensables para la aplicación de este documento. Para referencias fechadas, solamente aplica la edición citada. Para referencias sin fecha, aplica la última edición (incluyendo cualquier enmienda).

ISO/TS 11133, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*

NTE INEN-ISO 4831, *Control microbiológico de los alimentos - Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable*

NTE INEN-ISO 6887-1, *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal - Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico - Parte 1: reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales (ISO 6887-1:1999, IDT)*

NTE INEN-ISO 6887-2, *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal - Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico - Parte 2: reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos (ISO 6887-2:2003, IDT)*

NTE INEN-ISO 6887-3, *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal - Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico - Parte 3: reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca (ISO 6887-3:2003, IDT)*

NTE INEN-ISO 6887-4, *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico - Parte 4: reglas específicas para la preparación de productos distintos a leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos y, pescados y productos de la pesca (ISO 6887-4:2003, IDT)*

NTE INEN-ISO 6887-5, *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal - Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico - Parte 5: reglas específicas para la preparación de leche y productos lácteos (ISO 6887-5:2008, IDT)*

NTE INEN 1529-1, *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos*

NTE INEN 1529-B, Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E. coli*

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Para la aplicación de esta norma se aplican los siguientes términos y definiciones:

3.1

Escherichia coli

Bacteria perteneciente al grupo de los coliformes fecales capaz de fermentar lactosa a 44 °C con producción de gas, es capaz de producir indol a partir de triptófano, reacciona positivamente a la prueba de rojo de metilo y negativo a la prueba de Voges Proskauer y no usa el citrato como única fuente de carbono.

3.2

recuento de *Escherichia coli* presuntiva

Número más probable de *Escherichia coli* por mililitro o por gramo de la muestra analizada.

3.3

IMVIC

Grupo de pruebas utilizadas para la identificación bacteriana. Se compone de cuatro pruebas: Indol (I) Rojo de metilo (M), Voges-Proskauer (V) y Citrato (C). El resultado de este test se expresa mediante símbolos de positivo o negativo (+ o -) según el resultado de cada prueba.

3.4

método del número más probable (NMP)

Estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible.

4. MÉTODO PARA DETECCIÓN Y RECUENTO DE *Escherichia coli* PRESUNTIVA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

4.1 Principio

4.1.1 Método de detección de coliformes

Los tubos que presentan opacidad o producción de gas en el medio líquido de enriquecimiento selectivo y cuyos subcultivos han producido gas en Caldo EC e indol en agua de peptona a 44 °C, se considera que contienen *Escherichia coli* presuntiva.

4.1.2 Método de recuento

El número más probable de *Escherichia coli* presuntiva, es determinado por medio de la tabla NMP (ver Anexo A), acorde con el número de tubos con medos de concentración simple o doble, cuyos subcultivos han producido gas en el caldo EC e indol en agua de peptona a 44 °C.

4.1.3 Pruebas IMVIC para determinación de *Escherichia coli*

La determinación de *Escherichia coli* se realiza mediante la aplicación de las pruebas bioquímicas IMVIC.

4.1.3.1 Prueba de indol. Determina si la bacteria posee una enzima (triptofanasa). La triptofanasa hidroliza el triptófano en indol y alanina. El indol se detecta empleando un reactivo específico (Reactivo de Kovacs). El triptófano forma parte de las peptonas del medio. *Escherichia coli* es positiva a la prueba de indol.

4.1.3.2 Prueba de rojo de metilo. Detecta la fermentación ácido-mixta. Se acumulan ácidos (acético, fórmico, etc.), relativamente fuertes, reduciendo el pH del medio entre 5 y 4. Dicho

cambio de pH se detecta añadiendo un indicador (rojo de metilo) al cultivo. *Escherichia coli* es positiva a la prueba de rojo de metilo.

4.1.3.3 Prueba de Voges Proskauer. Detecta la fermentación butanodiótica. En esta fermentación se producen menor cantidad de ácidos que en la fermentación ácido-mixta, y una gran cantidad de butanodiol. Mediante los reactivos, alfa-naftol e hidróxido de potasio (KOH) al 40 %, se detecta la presencia de un precursor del butanodiol (acetilmetilcarbinol o acetoina). La acetoina en presencia de oxígeno se oxida a diacetilo. El diacetilo origina una coloración roja al reaccionar con los restos guanidínicos de algunos aminoácidos de la peptona del medio (E. Arginina). *Escherichia coli* es negativa a la prueba de Voges Proskauer.

4.1.3.4 Prueba de citrato. Determina la utilización del citrato como única fuente de carbono y energía. Se utiliza el medio de Simmons que consiste en un medio sólido con citrato sódico y un indicador ácidobase (azul de bromotimol). En este caso se detecta la alcalinización del medio por el consumo del citrato. *Escherichia coli* es negativa a la prueba de citrato.

4.2 Reactivos y materiales

4.2.1 Medio de enriquecimiento selectivo (Caldo de lauril sulfato)

TABLA 1. Composición del medio de enriquecimiento selectivo

Componente	a) Medio de concentración doble	b) Medio de concentración simple
Triptosa	40,0 g	20,0 g
Lactosa	10,0 g	5,0 g
Fosfato monoácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	5,5 g	2,75 g
Fosfato diácido de potasio (KH ₂ PO ₄)	5,5 g	2,75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10,0 g	5,0 g
Lauril sulfato de sodio [C ₁₂ (CH ₃) ₁₁ OSO ₃ Na]	0,2 g	0,1 g
Agua destilada	1 000 mL	1 000 mL

4.2.1.1 Preparación

Disolver los componentes del medio completo deshidratado en agua, por calentamiento si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, de modo que después de la esterilización sea 6,8 °C ± 0,2 °C a 25 °C. Los reactivos añadidos para ajustar el pH se pueden utilizar según la especificación del fabricante, se recomienda usar hidróxido de sodio (NaOH) (4.2.23) o ácido clorhídrico (HCl) (4.2.24) de concentración 0,1 mol/L, según sea el caso.

En el caso del medio de concentración simple, dispensar el medio en cantidades de 9 mL dentro de tubos de 18 mm x 160 mm que contengan tubos Durham. En el caso del medio de concentración doble dispensar el medio en cantidades de 10 mL dentro de tubos de 18 mm x 180 mm que contengan tubos Durham.

Esterilizar por 15 min en un autoclave (4.3.1) a 121 °C, con una presión de 103 421,3 Pa (15 PSI).

Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

4.2.2 Caldo EC

TABLA 2. Composición del Caldo EC

Componente	Cantidad
Triptina	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Sales biliares nro.3	1,5 g
Fosfato monopotásico (K_2HPO_4)	4,0 g
Fosfato dipotásico (KH_2PO_4)	1,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agua destilada	1 000 mL

4.2.2.1 Preparación

Disolver los componentes del medio completo deshidratado en agua, por calentamiento si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, de modo que después de la esterilización sea $6,8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los reactivos añadidos para ajustar el pH se pueden utilizar según la especificación del fabricante, se recomienda usar hidróxido de sodio (NaOH) (4.2.23) o ácido clorhídrico (HCl) (4.2.24) de concentración 0,1 mol/L, según sea el caso.

Dispensar el medio en cantidades de 10 mL dentro de tubos de 16 mm x 160 mm que contengan tubos Durham.

Esterilizar por 15 min en una autoclave (4.3.1) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, con una presión de 103 421,3 Pa (15 PSI).

Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

4.2.3 Agua de peptona libre de indol

TABLA 3. Composición del agua de peptona libre de indol

Componente	Cantidad
Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agua destilada	1 000 mL

4.2.3.1 Preparación

Disolver los componentes del medio completo deshidratado en agua, por calentamiento si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, de modo que después de la esterilización sea $7,3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los reactivos añadidos para ajustar el pH se pueden utilizar según la especificación del fabricante, se recomienda usar hidróxido de sodio (NaOH) (4.2.23) o ácido clorhídrico (HCl) (4.2.24) de concentración 0,1 mol/L, según sea el caso.

Dispensar el medio en cantidades de 5 mL a 10 mL dentro de tubos de 16 mm x 160 mm.

Esterilizar por 15 min en una autoclave (5.3.1) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, con una presión de 103 421,3 Pa (15 PSI).

4.2.4 Caldo para las pruebas de Rojo de Metilo y Voges-Proskauer (MR-VP), ver NTE INEN 1529-1.

4.2.5 Solución de rojo de metilo, ver NTE INEN 1529-1.

4.2.6 Solución de creatina al 0,5%, ver NTE INEN 1529-1.

- 4.2.7 Solución de α -naftol, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.8 Solución de hidróxido de potasio (KOH) al 40%, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.9 Agar citrato de Simmons, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.10 Solución de alcohol cetona, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.11 Solución de cristal de violeta al 1 %, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.12 Solución de fucsina básica al 1 %, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.13 Solución de lugol, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.14 Reactivo de Kovacs, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.15 Agar nutritivo, ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.16 Agar de contaje en placa (PCA), ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.17 Agar de eosina azul de metilo (EMB), ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.18 Agar cristal violeta-rojo neutro bills (VRB), ver NTE INEN 1529-1.
- 4.2.19 Tubos de ensayo, de dimensiones de aproximadamente de 16 mm x 160 mm y 18 mm x 180 mm o 20 mm x 200 mm.
- 4.2.20 Tubos Durham, de tamaño adecuado para que pueda colocarse dentro de los tubos de ensayo.
- 4.2.21 Pipetas para entregar (TD) o pipetas automáticas, que tengan una capacidad nominal de 0,1 mL a 1 mL y de 1 mL a 10 mL.
- 4.2.22 Asas de muestreo, hechas de platino/iridio o níquel/cromo, aproximadamente de 3 mm de diámetro o de 10 μ L, si son asa estériles desechables.
- 4.2.23 Hidróxido de sodio (NaOH), de concentración 0,1 (mol/L).
- 4.2.24 Ácido clorhídrico (HCl), de concentración 0,1 (mol/L).

4.3 Equipos

Se requieren los equipos usados comúnmente en el laboratorio de microbiología y, en particular, los siguientes:

- 4.3.1 Aparato de esterilización seca (estufa) o esterilización húmeda (autoclave).
- 4.3.2 Incubadora, capaz de operar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.3.3 Baño de agua, capaz de mantenerse a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.3.4 Potenciómetro, que tenga una resolución de 0,01 unidades de pH y una exactitud de $\pm 0,1$ unidades de pH a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.3.5 Mechero de Bunsen o cabina de flujo laminar, clase I

4.4 Prueba de calidad del medio

Para probar el rendimiento y aseguramiento de la calidad del medio de cultivo se puede usar la ISO/TS 11133.

4.5 Preparación de las muestras y de las diluciones

Se prepara y diluye la muestra de acuerdo al producto a analizar para alimentos de consumo humano y animal, según NTE INEN-ISO 6887-1, para carne y productos cárnicos según NTE INEN-ISO 6887-2, para pescados y productos de pesca según NTE INEN-ISO 6887-3, para leche y productos lácteos según NTE INEN-ISO 6887-5, y para otros productos diferentes a los anteriormente citados según NTE INEN-ISO 6887-4.

4.6 Procedimiento

4.6.1 Método de detección

Agregar 1 mL de suspensión inicial a 9 mL de caldo lauril sulfato (medio de enriquecimiento selectivo) de concentración simple (4.2.1) o 10 mL de suspensión inicial a 10 mL de caldo lauril sulfato de concentración doble (4.2.1).

Incubar los tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ h}$ por 24 h, si no se observa opacidad ni producción de gas incubar hasta $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

NOTA 1. Para mariscos vivos, el tiempo de incubación aconsejable es 48 h \pm 2 h.

NOTA 2. Para algunos productos lácteos como la caseína, el Tubo Durham puede pegarse a la parte inferior de los tubos con medio de enriquecimiento selectivo, si después del periodo de incubación se observa opacidad pero no producción de gas, inocular el caldo EC con este caldo y proceder como se detalla en el paso siguiente.

Los tubos que presentaron opacidad o presencia de gas se deben subcultivar, inoculando con un asa de muestreo (4.2.22) a un tubo que contiene Caldo EC (medio líquido selectivo) (4.2.2) e incubarlos en el baño de agua (4.3.3) o en la incubadora (4.3.2) a $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h \pm 2 h. Si no se observa la presencia de gas extender la incubación hasta 48 h \pm 2 h.

NOTA 1. Para mariscos vivos, el tiempo de incubación aconsejable es 24 h \pm 2 h.

4.6.2 Pruebas IMVIC para determinación de *Escherichia coli*

A las muestras mismas que se ha aplicado al procedimiento citado en 4.6.1 y han mostrado presencia de opacidad y gas, sembrar por estración con un asa en una placa individual de agar eosina azul de metilo (EMB), o agar cristal violetarjo neutro bilis (VRB) previamente seca e identificada.

Incubar las placas invertidas de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h \pm 2 h.

Para confirmar la presencia de *Escherichia coli* de cada placa escoger 2 a 3 colonias bien aisladas y típicas (negra o nucleada con brillo verde metálico de 2 a 3 mm de diámetro), y sembrar por estración con asa en tubos de agar de cortaje en placa (PCA) o agar nutritivo inclinado e incubar los cultivos de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h \pm 2 h.

Tomar colonias que han crecido en los medios citados anteriormente y aplicar tinción Gram, a las colonias que sean bacilos gram negativos no esporulados, utilizarlos para las pruebas IMVIC.

El procedimiento para las pruebas confirmatorias IMVIC es el siguiente:

4.6.2.1 Prueba para determinar la producción de indol

Subcultivar inoculando con un asa de muestreo (4.2.22) a un tubo con agua de peptona (4.2.3) precalentada a $44\text{ }^{\circ}\text{C}$. Incubar por 48 h \pm 2 h a $44\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Agregar 0,5 mL del reactivo de Kovacs (4.2.14) Mezclar bien y examinar después de 1 min. La presencia de un color rojo en la fase alcohólica indica la producción de indol.

4.6.2.2 Prueba de rojo de metilo

En un tubo con caldo MR-VP (4.2.4) inocular el cultivo puro utilizando un asa (obtenido del tubo de agar de contaje en placa (PCA) o agar nutritivo inclinado), incubar de 35 °C a 37 °C por 24 h \pm 2 h.

Agregar 3 gotas de solución de rojo de metilo (4.2.5) mezclar bien. Si el cultivo se torna rojo la prueba es positiva si hay viraje de color a amarillo la prueba es negativa.

4.6.2.3 Prueba de Voges Proskauer

En un tubo con caldo MR-VP (4.2.4) inocular el cultivo puro utilizando un asa (obtenido del tubo de agar de contaje en placa (PCA) o agar nutritivo inclinado) incubar de 35 °C a 37 °C por 24 h \pm 2 h.

Luego del periodo de incubación agregar 2 gotas de solución de creatina al 0.5 % (4.2.6), 3 gotas de solución de *o*-naftol (4.2.7) y 2 gotas de hidróxido de potasio (KOH) al 40 % (4.2.8).

Observar después de 15 min la formación de un color rosado o rojo brillante, indica un resultado positivo, caso contrario es negativa.

NOTA. Generalmente después de 5 min ya se observa un resultado positivo.

4.6.2.4 Prueba para la utilización de citrato

Sembrar en un tubo con agar citrato de Simmons (4.2.9) inclinado un asa con cultivo puro (obtenido del tubo de agar de contaje en placa (PCA) o agar nutritivo inclinado), incubar de 35 °C a 37 °C por 24 h \pm 2 h.

La prueba es positiva cuando se observa un viraje de color del medio de verde a azul, caso contrario es negativa.

Considerar como *Escherichia coli* a los microorganismos que presentan las siguientes características: bacilos Gram negativos, no esporulados que producen gas a partir de la fermentación de la lactosa y cumplen los resultados a las pruebas IMVIC según la tabla 4.

4.6.3 Método de recuento

Está previsto, una serie de tres tubos de cada dilución, si es necesario, se incuba una serie de cinco tubos (ver Anexo A) para mariscos vivos u otros productos especiales, o cuando se requiera para tener una mayor exactitud de resultados.

Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento selectivo (caldo lauril sulfato) de doble concentración. Utilice una pipeta estéril o punta estéril para pipeta automática, transfiera a cada uno de estos tubos 10 mL de suspensión inicial. Estas porciones de ensayo corresponden a 1 g de muestra por tubo.

Luego, tomar tres tubos de medio de enriquecimiento selectivo (caldo lauril sulfato) de simple concentración. Utilice una pipeta estéril nueva, transfiera a cada uno de los tubos 1 mL de suspensión inicial. Estas porciones de ensayo corresponden a 0,1 g de muestra por tubo.

Cada una de las diluciones futuras (igual a 0,01 g; 0,001 g; etc., de muestra por tubo) proceder como en el paso anterior. Usar una nueva pipeta para cada dilución o punta estéril para pipeta automática. Cuidadosamente mezclar el inóculo con el medio.

Incubar los medios inoculados de simple y doble concentración en la incubadora (4.3.2) a 37 °C por 24 h \pm 2 h. Si no existe presencia de gas inocular hasta 48 h \pm 2 h.

NOTA 1. Para mariscos vivos el tiempo de incubación adecuada debe ser 48 h \pm 2 h.

NOTA 2. Para algunos productos lácteos como la caseína, el Tubo Durham puede pegarse a la parte inferior de los tubos con medio de enriquecimiento selectivo (Caldo lauril sulfato); si después del período de incubación se observa opacidad pero no producción de gas, inocular el caldo EC con este caldo y proceder como se detalla en el siguiente paso.

Los tubos de concentración simple o doble que presentan opacidad o presencia de gas visible deben subcultivarse en un tubo que contenga Caldo EC inoculando un asa de muestra.

Incubar estos tubos inoculados en baño de agua (4.3.3) o en incubadora (4.3.2) a 44 °C por 24 h ± 2 h, si no se observa presencia de gas incubar hasta 48 h ± 2 h.

Para mariscos vivos, el total de tiempo de incubación debe ser de 24 h ± 2 h.

4.7 Informe de resultados

El informe del análisis debe detallar:

- toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra;
- el método de toma de muestras utilizado, si se conoce;
- el método empleado, haciendo referencia a esta norma nacional, es decir NTE INEN 1529-8;
- todos los detalles experimentales no descritos en esta norma nacional, o considerados opcionales, junto con los detalles de todo tipo de incidencias que pudieran haber influido sobre el(los) resultado(s);
- los resultados obtenidos en la prueba expresados de la siguiente manera según el método.

4.7.1 Método de detección de *Escherichia coli*

Considerar como positivas a las muestras tratadas acorde a 4.6.1 que han presentado presencia de gas en el caldo EC y que cumplan con los resultados de *Escherichia coli* a las pruebas IMVIC. Reportar la presencia o ausencia de *Escherichia coli* presuntiva en la porción de ensayo, especificando la masa en gramos o el volumen en mililitros de la muestra de ensayo.

4.7.2 Método de determinación de *Escherichia coli*

El resultado de esta prueba se expresa mediante símbolos de positivo o negativo (+ o -) según el resultado de cada prueba, ver tabla 4.

TABLA 4. Resultados de *Escherichia coli* a las pruebas IMVIC

Nombre de la prueba	Resultado
Producción de indol	+
Prueba de rojo de metilo	+
Prueba de Voges-Proskauer	-
Utilización de citrato	-

4.7.3 Método de recuento con la tabla del número más probable

Utilizar la tabla del Anexo A.

EJEMPLO. Usando una muestra sólida y tres tubos, en el 95 % de los casos, los límites de confianza varían de 13 a 200 *Escherichia coli* presuntiva por gramo por un NMP de 7,4 x10, *Escherichia coli* presuntiva por gramo, y de 4 a 99, *Escherichia coli* presuntiva por gramo de un NMP de 2,4 X 10, *Escherichia coli* presuntiva por gramo.

ANEXO A
(informativo)

TABLA A.1 Valores de NMP por gramo de muestra y límites del intervalo de confianza al 95 % (tres tubos)

(cuando se utilizan tres porciones de análisis de 1 g, tres de 0,1 g y tres de 0,01 g)

Número de resultados positivos por volumen de inóculo, ml o g			NMP /ml o /g	log10M	Desviación estándar de log10M	Límites de confianza al 95%		Índice de anomalía	Categoría de anomalía
1,00	0,10	0,01				Inferior	Superior		
0	0	0	<0,30	NA ^a	NA ^a	0	1,1	1,00	1
0	1	0	0,30	-0,5	0,43	0,04	2,3	0,09	1
1	0	0	0,36	-0,4	0,44	0,05	2,7	1,00	1
1	0	1	0,72	-0,1	0,31	0,17	3,0	0,02	2
1	1	0	0,74	-0,1	0,31	0,18	3,1	0,21	1
1	2	0	1,1	0,00	0,26	0,35	3,7	0,02	2
2	0	0	0,92	-0,0	0,32	0,21	4,0	1,00	1
2	0	1	1,4	0,18	0,26	0,42	4,8	0,04	2
2	1	0	1,5	0,17	0,27	0,43	5,0	0,43	1
2	1	1	2,0	0,31	0,23	0,69	6,0	0,02	2
2	2	0	2,1	0,32	0,24	0,71	6,2	0,07	1
3	0	0	2,3	0,36	0,31	0,95	9,7	1,00	1
3	0	1	3,8	0,59	0,31	0,93	16	0,08	1
3	1	0	4,3	0,63	0,33	0,95	19	1,00	1
3	1	1	7,5	0,87	0,30	1,9	30	0,21	1
3	1	2	12	1,1	0,26	3,6	37	0,02	2
3	2	0	9,3	0,97	0,32	2,2	40	1,00	1
3	2	1	15	1,2	0,27	4,4	51	0,42	1
3	2	2	21	1,3	0,34	7,2	64	0,07	1
3	3	0	24	1,4	0,32	5,6	100	1,00	1
3	3	1	46	1,7	0,34	9,6	220	1,00	1
3	3	2	110	2,0	0,32	25	480	1,00	1
3	3	3	=	NA ^a	NA ^a	36	=	1,00	1

^a No disponible.

TABLA A.2 Valores de NMP por gramo de muestra (cinco tubos)

(Cuando se utilizan cinco porciones de análisis de 1 g, cinco de 0,1 g y cinco de 0,01 g)

Número de resultados positivos			Índice NMP	Categoría ^a cuando el número de muestras por lote examinado es					Límites de confianza			
				1	2	3	5	10	295 %	295 %	299 %	299 %
0	0	0	<0,16						0,00	0,65	0,00	0,93
0	0	1	0,18	2	2	2	1	1	0,00	0,65	0,00	0,93
0	1	0	0,18	2	2	2	1	1	0,01	0,65	0,00	0,93
0	1	1	0,38	3	3	3	2	2	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	0	0,37	3	2	2	2	1	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	1	0,56	0	0	0	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
0	3	0	0,56	0	3	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	0	0	0,20	1	1	1	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40
1	0	1	0,40	2	1	1	1	1	0,07	1,00	0,02	1,40
1	0	2	0,60	0	0	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	0	0,40	1	1	1	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40
1	1	1	0,61	3	2	2	2	1	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	2	0,81	0	0	0	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80
1	2	0	0,61	2	1	1	1	1	0,18	1,40	0,09	2,10
1	2	1	0,82	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	0	0,63	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	1	1,0	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
1	4	0	1,1	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8

TABLA A.2 (continuación)

Número de resultados positivos			Índice NMP NPM	Categoría ² cuando el número de muestras por lote examinado es					Límites de confianza			
				1	2	3	5	10	≥95 %	≥95 %	≥99 %	≥99 %
	1	2	1,2	0	0	3	3	3	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	0	0,93	1	1	1	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80
2	2	1	1,2	3	3	2	2	2	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	2	1,4	0	0	0	0	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	3	0	1,2	3	2	2	2	1	0,4	2,5	0,2	3,4
2	3	1	1,4	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	4	0	1,5	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
3	0	0	0,78	1	1	1	1	1	0,21	2,20	0,12	2,80
3	0	1	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,2	0,2	2,9
3	0	2	1,3	3	3	3	2	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	0	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,5	0,2	3,4
3	1	1	1,4	2	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	2	1,7	3	3	3	3	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	0	1,4	1	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	1	1,7	2	2	2	1	1	0,7	3,9	0,5	5,1
3	2	2	2,0	0	3	3	3	3	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	0	1,7	2	2	1	1	1	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	1	2,1	3	3	3	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	2	2,4	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	4	0	2,1	3	3	2	2	2	0,7	4,0	0,5	5,2
3	4	1	2,4	0	3	3	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	5	0	2,5	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	0	0	1,3	1	1	1	1	1	0,4	3,4	0,3	4,4
4	0	1	1,7	1	1	1	1	1	0,5	3,4	0,4	4,4
4	0	2	2,1	3	2	2	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
4	0	3	2,5	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	0	1,7	1	1	1	1	1	0,6	3,9	0,4	5,1
4	1	1	2,1	1	1	1	1	1	0,7	4,1	0,5	5,3
4	1	2	2,6	3	3	2	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	3	3,1	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	0	2,2	1	1	1	1	1	0,7	4,8	0,5	6,1
4	2	1	2,6	2	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	2	3,2	3	3	3	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	3	3,6	0	0	0	0	3	1,3	10,0	0,9	14,7
4	3	0	2,7	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	1	3,3	2	2	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	2	3,9	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7

TABLA A.2 (continuación)

Número de resultados positivos			Índice NMP	Categoría ^a cuando el número de muestras por lote examinado es					Límites de confianza			
				1	2	3	5	10	≥95 %	≥95 %	≥99 %	≥99 %
4	4	0	3,4	2	2	1	1	1	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	1	4,0	3	3	2	2	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	2	4,7	0	0	0	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
4	5	0	4,1	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	5	1	4,8	0	0	3	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
5	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,7	6,6	0,5	9,4
5	0	1	3,1	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
5	0	2	4,3	3	2	2	2	1	0,3	10,0	0,9	14,7
5	0	3	5,8	0	0	0	3	3	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	0	3,3	1	1	1	1	1	1,0	10,0	0,7	14,7
5	1	1	4,6	1	1	1	1	1	1,4	11,3	0,9	14,7
5	1	2	6,3	2	2	1	1	1	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	3	8,4	3	3	3	3	2	3,4	11,0	2,1	27,0
5	2	0	4,9	1	1	1	1	1	1,5	14,9	0,9	20,0
5	2	1	7,0	1	1	1	1	1	2,2	16,6	1,4	23,0
5	2	2	9,4	2	2	1	1	1	3,4	22,0	2,1	28,0
5	2	3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5	2	4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5	3	0	7,9	1	1	1	1	1	2,3	22,0	1,5	27,0
5	3	1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5	3	2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5	3	3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5	3	4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5	4	0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5	4	1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5	4	2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5	4	3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5	4	4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5	4	5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5	5	0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5	5	1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5	5	2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5	5	3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338

NOTA. Los resultados son basados en DE MAN, J.C. MPN tables, corrected. Eur. J. Appl. Bacteriol., 1983, 17, pp. 301-305

^a Para una explicación de las categorías ver ISO 7218

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1529-8
 TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETECCIÓN Y RECuento DE *ESCHERICHIA COLI* PRESUNTIVA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE
 Código IC5: 07.100.30

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación por Consejo Directivo: 1990-02-08 Oficialización con el Carácter de Obligatoria por Acuerdo Ministerial No. 157 de 1990-04-25 publicado en el Registro Oficial No. 433 de 1990-05-09 Fecha de iniciación del estudio: 2015-05-10
---	---

Fechas de consulta pública: 2015-08-13 al 2015-10-12

Comité Técnico de: **Microbiología**
 Fecha de iniciación: 2016-05-06
 Integrantes del Comité:

Fecha de aprobación: 2016-05-25

NOMBRES:

Ing. Lorena Salvador (Presidenta)
 Mdgo. Fernando Sanabria
 Ing. Juan Carlos Cadena
 Ing. Evelyn Carrera
 Ing. Ismael Cuchán
 Bof. Lucía Nevas
 Bgo. Daniel Intriago
 Ing. Verónica Granda (Secretaría técnica)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

AGROCALDIAD
 DISERLAB-PUCE
 MIPRO
 AGROCALIDAD
 AGROCALIDAD
 ARCSA
 LA FABRIL
 INEN

Otros trámites: Esta NTE INEN 1529-8:2016 (Primera revisión) reemplaza a NTE INEN 1529-8:1990.

La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma

Oficializada como: Voluntaria
 Registro Oficial No. 852 de 2016-09-30

Por Resolución No. 16339 de 2016-08-30

9.7 Anexo 7. Análisis organoléptico de las muestras

Escala hedónica

1. Muy malo
2. Malo
3. Regular
4. Bueno
5. Muy bueno

Tratamiento 1

Atributos	1	2	3	4	5
Color					
Olor					
Sabor					

Tratamiento 2

Atributos	1	2	3	4	5
Color					
Olor					
Sabor					

Tratamiento 3

Atributos	1	2	3	4	5
Color					
Olor					
Sabor					

Tratamiento 4

Atributos	1	2	3	4	5
Color					
Olor					
Sabor					

Tratamiento 5

Atributos	1	2	3	4	5
Color					
Olor					
Sabor					

9.8 Anexo 8. Análisis de varianza

Prueba de Friedman

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
SABOR (T7)	102.00	3.77	27	A B
SABOR (T1)	99.00	3.66	27	A B
SABOR (T4)	100.00	3.70	27	A B
SABOR (T6)	102.00	3.77	27	A B
SABOR (T2)	104.00	3.85	27	A B
SABOR (T8)	103.00	3.81	27	A B
SABOR (T9)	106.00	3.92	27	A B
SABOR (T5)	107.00	3.96	27	A B
SABOR (T3)	108.00	4.00	27	A B C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)

Prueba de Friedman

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
OLOR (T7)	105.00	3.89	27	A B
OLOR (T1)	99.00	3.67	27	A B
OLOR (T4)	110.00	4.07	27	A B C
OLOR (T6)	101.00	3.74	27	A B
OLOR (T2)	97.00	3.59	27	A B
OLOR (T8)	99.00	3.67	27	A B
OLOR (T9)	106.00	3.93	27	A B
OLOR (T5)	104.00	3.85	27	A B
OLOR (T3)	99.00	3.74	27	A B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)

Prueba de Friedman

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
COLOR (T7)	92.00	3.41	27	A B
COLOR (T1)	93.00	3.44	27	A B
COLOR (T4)	101.00	3.74	27	A B
COLOR (T6)	99.00	3.67	27	A B
COLOR (T2)	111.00	4.11	27	A B C
COLOR (T8)	108.00	4.00	27	A B C
COLOR (T9)	107.00	3.96	27	A B
COLOR (T5)	95.00	3.52	27	A B
COLOR (T3)	112.00	4.15	27	A B C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
mg/mL Vit C	27	0.48	0.16	16.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	33576.37	10	3357.64	1.49	0.2294
Tratamiento	33538.52	8	4192.31	1.86	0.1378
Repetición	37.85	2	18.93	0.01	0.9916
Error	36007.48	16	2250.47		
Total	69583.85	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=137.79413

Error: 2250.4676 gl: 16

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T1	200.00	3	27.39 A
T2	260.67	3	27.39 A
T3	270.00	3	27.39 A
T4	279.00	3	27.39 A
T9	303.33	3	27.39 A
T6	305.33	3	27.39 A
T8	307.67	3	27.39 A
T7	313.67	3	27.39 A
T5	317.00	3	27.39 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.9 Anexo 9. Informe de resultados de los análisis físico-químicos



INFORME DE RESULTADOS
IDR 10041-2022

Fecha: 17 de Junio del 2022

DATOS DEL CLIENTE						
Nombre	Leonardo Herrera					
Dirección	Guayaquil					
Teléfono	0967268700					
Contacto	Sr. Leonardo Herrera					
DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Agua	Cantidad	Aprox. 200 ml			
No. de muestras	1 (n=1)	Lote	N/A			
Presentación	Fresco embot	Fecha de recepción	30 de Mayo del 2022			
Colecta de muestra	Realizado por el Cliente	Fecha de colecta de muestra	N/A			
CONDICIONES DEL ANALISIS						
Temperatura (°C)	21.5	Humedad (%)	47.8			
Fecha de inicio de Análisis	30 de Mayo del 2022					
Fecha de Finalización del análisis	1 de Junio del 2022					
RESULTADOS						
CODIGO CLIENTE	CODIGO USA	PARAMETROS	METODO	RESULTADOS	Unidad	Límite de Cuantificación
Jugo de Guanábana y Kiwi Muestra 14	UBA 10041-1	Acidez	INEN 381	6.75	%	-
	UBA 10041-2	pH	Potenciometro NTE INEN-ISO 1842 2013 2013-09	4.95	-	-
	UBA 10041-3	*Brix (Sólidos solubles)	INEN 273	10.28	%	-
Observaciones: 1. Los resultados emitidos en este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) recibidas por el laboratorio. No siendo extensiva a cualquier lote. 2. Nomenclatura: N.D. = No Detectable, N.A. = No aplica. 3. Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente, excepto con la aprobación escrita por parte del laboratorio. 4. La información relacionada con la toma de muestra fue proporcionada por el cliente. El Laboratorio no se responsabiliza de la veracidad de la información que ha sido proporcionada por el cliente y que pueda afectar directamente a la validez de los resultados.						

FOR ADM. 04.001 Página 1 de 1



10.1 Anexo 10. Informe de resultados de concentración de vitamina C



INFORME DE RESULTADOS IDR 10041-2022						
						Fecha: 17 de Junio del 2022
DATOS DEL CLIENTE						
Nombre	Leonardo Herrera					
Dirección	Guayaquil					
Teléfono	0987266785					
Contacto	Sr. Leonardo Herrera					
DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Jugo	Cantidad	Aprox. 200 ml			
No. de muestras	1 (n=1)	Lote	N/A			
Presentación	Fresco ámbur	Fecha de recepción	30 de Mayo del 2022			
Colecta de muestra	Realizado por el Cliente	Fecha de colecta de muestra	N.A.			
CONDICIONES DEL ANALISIS						
Temperatura (°C)	21.5	Humedad (%)	42.8			
Fecha de Inicio de Análisis	30 de Mayo del 2022					
Fecha de Finalización del análisis	1 de Junio del 2022					
RESULTADOS						
CODIGO CLIENTE	CODIGO UBA	PARAMETROS	METODO	RESULTADOS	Unidad	Limite de Cuantificación
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 1	UBA 10041 M1	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetric)	0.300	g/ml	-
	UBA 10041 M2			0.120		-
	UBA 10041 M3			0.180		-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 2	UBA 10042 M4	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetric)	0.300		-
	UBA 10042 M5			0.300		-
	UBA 10042 M6			0.182		-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 3	UBA 10043 M7	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetric)	0.210		-
	UBA 10043 M8			0.290		-
	UBA 10043 M9			0.305		-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 4	UBA 10044 M10	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetric)	0.276		-
	UBA 10044 M11			0.260		-
	UBA 10044 M12			0.301		-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 5	UBA 10045 M13	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetric)	0.298		-
	UBA 10045 M14			0.333		-
	UBA 10045 M15			0.320		-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 6	UBA 10046 M16	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetric)	0.278		-
	UBA 10046 M17			0.318		-
	UBA 10046 M18			0.320		-

Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 7	UBA 10047 M19	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetría)	0.289	-
	UBA 10047 M20			0.320	-
	UBA 10047 M21			0.332	-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 8	UBA 10048 M22	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetría)	0.301	-
	UBA 10048 M23			0.300	-
	UBA 10048 M24			0.322	-
Jugo de Guanábana y Kiwi Tratamiento 9	UBA 10049 M25	Vitamina C	AOAC 967.21 (Volumetría)	0.290	-
	UBA 10049 M26			0.320	-
	UBA 10049 M27			0.318	-
Observaciones: <ol style="list-style-type: none"> 1. Los resultados emitidos en este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) recibidas por el laboratorio. No siendo extensivo a cualquier lote. 2. Nomenclatura: N.D. = No Detectable; N.A. = No aplica 3. Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente, excepto con la aprobación escrita por parte del laboratorio. 4. La información relacionada con la toma de muestra fue proporcionada por el cliente. El Laboratorio no se responsabiliza de la veracidad de la información que ha sido proporcionada por el cliente y que puede afectar directamente a la validez de los resultados. 					

FOR ADM. 04 R01

Página 3 de 3


THE BIZZ


Av. Calles 1, Plaza Euzkadi, 48940 Leizor (Vizcaya) España
 Compañía inscrita en el Registro Mercantil de Vizcaya nº 1020/2015
 C.I.F. B-48092218
 I.N.S. 1020/2015
 N.I.C. 1020/2015

www.ubw-labs.com

CERTIFICACIÓN
 Este Documento es un Documento de Trabajo
 con fines de información y no debe ser utilizado para
 fines legales.

DATOS DEL CLIENTE						
Nombre	Leonardo Herrera					
Dirección	Guayaquil					
Teléfono	0953543553					
Contacto	Sr. Leonardo Herrera					
DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Jugo	Cantidad	Aprox. 200 ml			
No. de muestras	1 (n=1)	Lote	N/A			
Presentación	Frasco ámbar	Fecha de recepción	30 de Mayo del 2022			
Colecta de muestra	Realizado por el Cliente	Fecha de colecta de muestra	N.A.			
CONDICIONES DEL ANALISIS						
Temperatura (°C)	21.5	Humedad (%)	42.8			
Fecha de Inicio de Análisis	30 de Mayo del 2022					
Fecha de Finalización del análisis	8 de Junio del 2022					
RESULTADOS						
CODIGO CLIENTE	CODIGO UBA	PARAMETROS	METODO	RESULTADOS	Unidad	Límite de Cuantificación
Jugo de Guanábana y Kiwi Muestra 14	UBA 10041-1	Mohos y levaduras	BAM-FDA CAP. #5 2007 NTE INEN 1529-10	<0	UP/cm ³	<10
	UBA 10041-2	Aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-8	<8	UFC/cm ³	<10
	UBA 10041-3	Coliformes totales	NTE INEN 1529-8	<2	NMP/cm ³	<3
	UBA 10041-4	Coliformes fecales	NTE INEN 1529-8	<1	NMP/cm ³	<3