



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL CHOCHO
DESAMARGADO PARA CONSUMO EN LA CIUDAD DE CUENCA”**

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES:

CARLOTA DEL ROCÍO LOJA ALULEMA.

LUIS MAURICIO SANMARTÍN SAGBAY.

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIANA ELIZABETH SAÁ CRUZ.

ASERORAS DE TESIS:

DRA. SILVIA JOHANA ORTIZ ULLOA.

DRA. PAULINA DEL ROCIO ESCOBAR HINOJOSA.

CUENCA – ECUADOR

2014



RESUMEN

El presente trabajo de tesis tiene como finalidad evaluar la calidad microbiológica del grano de chocho desamargado que se vende en la ciudad de Cuenca.

La investigación fue de tipo observacional, descriptiva, prospectiva de corte transversal y fue desarrollada entre octubre de 2013 y marzo de 2014.

Las muestras para el análisis se tomaron de todas las instituciones educativas básicas de las parroquias urbanas de la ciudad mediante un muestreo aleatorio estratificado, resultando en 55 establecimientos de los que se seleccionó al azar al menos a un vendedor de ceviche de chocho. Todas las muestras se seleccionaron y procesaron por protocolos estandarizados y los resultados se compararon con los criterios microbiológicos de la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE) INEN 2390:2004 "Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos".

Los microorganismos indicadores utilizados fueron coliformes totales, *E. coli*, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, analizados mediante el método de placas Petrifilm™.

El análisis estadístico de los datos se desarrolló en los paquetes SPSS v.22 y EPIDAT 3.0.

Se encontró que los indicadores de calidad más afectados fueron los mohos y levaduras con el 94,5 % de las muestras que presentaron recuentos mayores a los establecidos. Le siguieron coliformes totales con 83,6 %, aerobios mesófilos con 56,4 % y *E. coli* con 25,5 %. Aproximadamente el 60 % de las muestras presentó recuentos elevados para 3 o más de los microorganismos indicadores lo que refleja el elevado riesgo para la salud de los consumidores de este tipo de alimentos.

Palabras claves: *Lupinus mutabilis* Sweet, grano de chocho desamargado, calidad microbiológica.



ABSTRACT

This thesis aims at evaluating the microbiological quality of the grain of chocho desamargado sold in the city of Cuenca.

The research was an observational, descriptive, prospective, sectional, was developed between October 2013 and March 2014.

The samples for analysis were taken from all the educational institutions of basic urban parishes of the city using a stratified random sampling resulting in 55 establishments were randomly selected at least ceviche of chocho seller.

All samples were selected and processed by standardized protocols and the results were compared with the microbiological criteria for Ecuadorian Technical Standard (NTE) INEN 2390:2004 "Legumes. Grain desamargado of chocho. Requirements".

The microorganisms used indicators were total coliforms, *E. coli*, aerobic mesophiles, molds and yeasts analyzed using the method of Petrifilm™ plates.

The statistical analysis of the data was developed in the packet SPSS v.22 and EPIDAT 3.0.

It was found that the quality indicators most affected were the molds and yeasts with the 94,5 % of the samples that presented counts higher than the criteria laid down.

Total coliforms followed with 83,6 % aerobic mesophiles with 56,4 % and *E. coli* with 25,5 % Approximately 60 % of the samples presented high counts for 3 or more of the microorganisms indicators reflecting the high risk to the health of the consumers of this type of food.

Keywords: *Lupinus mutabilis* Sweet, grain of chocho desamargado, microbiological quality.



ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTOS	15
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	17
1.1 Chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet)	17
1.1.1 Descripción botánica.	17
1.1.2 Taxonomía.	19
1.1.3 Composición química.	20
1.1.4 Valor nutritivo.	22
1.2 Procesos de obtención del grano de chocho desamargado.....	23
1.2.1 Desamargado tradicional.....	24
1.2.2 Desamargado industrial.	25
1.2.2.1 Fases del desamargado.....	25
1.3 Fuentes de contaminación del grano de chocho	28
1.3.1 Indicadores de calidad microbiológica del grano desamargado de chocho.	29
1.3.1.1 <i>Coliformes totales</i>	29
1.3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	30
1.3.1.3 <i>Aerobios mesófilos</i>	31
1.3.1.4 <i>Mohos y levaduras</i>	32
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	34
2.1 Tipo de investigación.....	34
2.2 Población y área de estudio	34
2.3 Muestreo	34
2.4 Tamaño de la muestra	35
2.5 Toma de muestra	36



2.6	Métodos y técnicas de análisis microbiológico	36
2.6.1	Recuento de microorganismos en placas Petrifilm.....	37
2.6.1.1	Recuento de <i>E. coli</i> y coliformes en placas Petrifilm™	37
2.6.1.2	Recuento de aerobios mesófilos en placas Petrifilm™	38
2.6.1.3	Recuento de mohos y levaduras en placas Petrifilm™	38
2.7	Materiales y medios de cultivo	39
2.8	Preparación de la muestra	40
2.8.1	Procedimiento del análisis microbiológico.....	42
2.9	Cálculos	45
2.10	Análisis estadístico.....	45
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		47
3.1	Evaluación de la reproducibilidad de los recuentos microbianos	47
3.2	Incumplimientos de la norma establecida	49
3.2.1	Coliformes totales.....	51
3.2.2	<i>Escherichia coli</i>	52
3.2.3	Aerobios mesófilos.....	54
3.2.4	Mohos y levaduras.....	55
3.2.5	Calidad microbiológica del grano de chocho desamargado.....	56
CONCLUSIONES		58
RECOMENDACIONES		59
BIBLIOGRAFÍA		60
ANEXOS		67

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Descripción taxonómica del chocho.....	19
Tabla 2: Composición química del chocho desamargado.....	20
Tabla 3: Contenido de minerales del chocho desamargado.	22
Tabla 4: Número de establecimientos educativos seleccionados por parroquias.	35
Tabla 5: Descripción de los resultados por réplica para el recuento de los microorganismos estudiados.....	47
Tabla 6: Coeficientes de correlación de Spearman (r_s) entre los valores de las dos réplicas de cada variable investigada.....	48
Tabla 7: Comparación de los recuentos por réplicas de cada grupo de microorganismo indicador aplicando el Test de los Rangos con Signos de Wilcoxon.....	48
Tabla 8: Comportamiento del cumplimiento de la norma INEN 2390 en cada réplica para <i>E. coli</i>	49
Tabla 9: Porcentaje general de la contaminación del grano de chocho desamargado por cada grupo de microorganismo indicador (n=55).....	50
Tabla 10: Proporción de incumplimientos de 1, 2, 3 o 4 indicadores de calidad microbiológica por parroquia (NTE INEN 2390) expresados en %.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. <i>Lupinus mutabilis</i>	18
Fig. 2. A: Piscina de hidratación. B: Grano de chocho en hidratación.....	25
Fig. 3. A: Cocción. B: Grano de chocho en proceso de cocción.	26
Fig. 4. Piscina de lavado.	27
Fig. 5. Grano desamargado en 72 horas.	27
Fig. 6. Estructura antigénica de <i>Escherichia coli</i>	30
Fig. 7. Esquema ultraestructural de los hongos y levaduras.	33
Fig. 8. Diseño Placa Petrifilm TM	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1: Porcentaje de incumplimientos de la norma INEN vigente para el indicador de calidad Coliformes totales.....	51
Gráfico 2: Frecuencia de incumplimientos de la norma INEN vigente para el indicador de calidad <i>E. coli</i>	53
Gráfico 3: Contaminación microbiológica (aerobios mesófilos) en las muestras de estudio.....	54
Gráfico 4: Comportamiento de los incumplimientos en el conteo de mohos y levaduras en las muestras de estudio.	55
Gráfico 5: Proporción de muestras con 1, 2, 3 o 4 microorganismos indicadores con recuentos por encima de los establecidos en NTE INEN 2390.	56

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2390.	67
Anexo 2: Establecimientos Educativos Seleccionados.	76
Anexo 3: Protocolo de Muestreo de Alimentos.	78
Anexo 4: Modelo de la hoja de recolección de datos.	85
Anexo 5: Guía de interpretación Placas 3M TM Petrifilm TM para el recuento de <i>E. coli</i> / Coliformes.	86
Anexo 6: Guía de interpretación Placas 3M TM Petrifilm TM para el recuento de Aerobios (Cuenta total en placa o aerobios mesófilos).	93
Anexo 7: Guía de interpretación Placas 3M TM Petrifilm TM para el recuento de Mohos y Levaduras.	100
Anexo 8: Historial de resultados del recuento microbiológico por 3M placas Petrifilm de Coliformes totales, <i>E. coli</i> , Aerobios mesófilos, mohos y levaduras en el grano de chocho desamargado recolectado en los establecimientos educativos de la ciudad de Cuenca, expresados en UFC/g y NMP/g.	107



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, *Carlota del Rocío Loja Alulema*, autora de la tesis "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL CHOCHO DESAMARGADO PARA CONSUMO EN LA CIUDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 15 de mayo de 2014.



Carlota del Rocío Loja Alulema

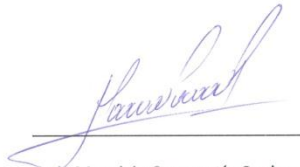
C.I.: 0301535647



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, *Luis Mauricio Sanmartín Sagbay*, autor de la tesis “EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL CHOCHO DESAMARGADO PARA CONSUMO EN LA CIUDAD DE CUENCA”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 15 de mayo de 2014.



Luis Mauricio Sanmartín Sagbay

C.I.: 0104501945



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo, *Carlota del Rocío Loja Alulema*, autora de la tesis "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL CHOCHO DESAMARGADO PARA CONSUMO EN LA CIUDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de mayo de 2014.



Carlota del Rocío Loja Alulema

C.I: 0301535647



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo, *Luis Mauricio Sanmartín Sagbay*, autor de la tesis "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL CHOCHO DESAMARGADO PARA CONSUMO EN LA CIUDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 15 de mayo de 2014.



Luis Mauricio Sanmartín Sagbay

C.I: 0104501945

DEDICATORIA

A Dios por darme las fuerzas para continuar en lo adverso y guiarme por el buen camino.

Con todo mi cariño y mi amor a mi madre Ignacia que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A una persona especial Arturo Garate por su apoyo incondicional durante mi vida académica.

A Mauricio que ha sido el impulso durante mi carrera y el pilar fundamental para la culminación de la misma, que con su apoyo y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable en todo momento.

ROCÍO LOJA

A Dios por ser mi protector y mi fortaleza para continuar en cada etapa de mi vida y gracias a él he logrado concluir mi carrera.

A mi querida madre Angelina, quien es un pilar fundamental en mi vida, ya que con su paciencia y dedicación ha velado por mi bienestar y educación, por brindarme su amor, apoyo incondicional en todo momento.

A mis abuelos por su aprecio y apoyo en los momentos difíciles, cuyo afecto resulta invaluable.

A Rocío a más de ser mi compañera, mi amiga y sobre todo una maravillosa persona que con su amor, comprensión y apoyo incondicional ha sido de gran ayuda para la culminación de esta meta.

MAURICIO SANMARTÍN



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la fortaleza en momentos de debilidad y guiarnos a lo largo de nuestra carrera.

A nuestra directora de tesis Dra. Mariana Saá Cruz por su apoyo incondicional.

A nuestras asesoras de tesis Dra. Johana Ortiz Ulloa y Dra. Paulina Escobar Hinojosa por aceptar ser parte de este proyecto al guiarnos de forma comprometida.

A la Facultad de Ciencias Químicas por brindarnos el espacio e instalaciones del Laboratorio de Alimentos y Nutrición (Proyecto de Alimentación, Nutrición y Salud VLIR-IUC & Universidad de Cuenca).

GRACIAS

ROCÍO LOJA
MAURICIO SANMARTÍN



INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son una de las causas de consulta médicas más frecuentes sin distinción de edad ni condición social. En el Ecuador, el mayor índice de mortalidad infantil esta dado precisamente por ellas, ya sea causado por contaminación por bacterias, virus o parásitos. Según datos del Ministerio de Salud Pública (2010), en la provincia del Azuay en el año 2009 se registraron 31478 números de casos de enfermedades diarreicas transmitidos por alimentos y agua contaminada.

El sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos de la OPS/OMS manifiesta que los principales alimentos involucrados en los brotes de ETAs son: pescados 21,52%, agua 19,51%, carnes rojas 14,20%, lácteos 7,88%, huevo-mayonesa 5,85%, carnes de aves 5,08%, hortalizas-legumbres 2,39% (Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, 2002).

El chocho es una leguminosa que podría representar un agente productor de ETAs posiblemente por la contaminación del grano por bacterias al momento del desamargado o por una manipulación inadecuada, como consecuencia da origen a problemas gastrointestinales.

El grano de chocho desamargado es usado como ingrediente principal del conocido “ceviche de chocho” que es una de las comidas ambulantes consumidas por la comunidad cuencana, especialmente por los niños en las afueras de los establecimientos educativos.

Considerando que el chocho posee un alto valor nutricional en cuanto a proteínas, vitaminas y minerales, es necesario promover su consumo, pero solo bajo un buen control sanitario que permita evidenciar una manipulación adecuada de los alimentos y así prevenir posibles ETAs y garantizar la salud de los consumidores. Por lo expuesto se ha considerado la necesidad de evaluar la calidad microbiológica del grano de chocho desamargado expendido en la ciudad de Cuenca para la generación de información y datos que puedan ser utilizados por las autoridades de control con el fin de fomentar programas de protección de los consumidores de alimentos que se venden de manera ambulante.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)

El chocho, tarwi o lupino (*Lupinus mutabilis*) es una planta leguminosa reconocida como una de las más ricas en nutrientes. Se caracteriza por tener elevado contenido de proteínas y ácidos grasos lo que la constituyen en una excelente alternativa para la nutrición humana y animal. Aunque la planta se originó a lo largo de los Andes, actualmente se encuentra únicamente en Ecuador, Perú y Bolivia, con cierto desarrollo agronómico y agroindustrial. Se destaca por ser resistente a condiciones adversas, como plagas, enfermedades (antracnosis), sequías y heladas (Ortega, Rodríguez y Zamora, 2010). Se estima que el área total del cultivo de chocho en los Andes alcanza las 10000 hectáreas (ha). En el Ecuador, se cultivan 4217 ha de chocho como monocultivo, mientras que en forma asociada con otros productos andinos como quinua y amaranto se cultivan 1757 ha (Suquilanda, 2013).

1.1.1 Descripción botánica. El chocho posee una raíz pivotante y robusta, que alcanza una profundidad de hasta 2 metros. La raíz posee nódulos simbióticos con bacterias del género *Rhizobium* que fijan el nitrógeno atmosférico a la planta.

La altura del tallo fluctúa de 0,50 a 2,80 metros y un promedio de 1,80 metros. El tallo es cilíndrico y leñoso, tiene ramificación en forma de V y un color que varía de verde a gris-castaño, según el grado de tejido leñoso.

Las hojas son palmeadas y digitadas, contienen entre 5 a 12 folíolos oblongo lanceolados y delgados. Se presentan pequeñas hojas estipulares en la base del pecíolo, cuyo color varía entre verde y morado según el contenido de antocianina de la planta.

La inflorescencia es racemosa terminal con varios verticilios florales, mayor en longitud en el eje principal que disminuye en las laterales, cada una de 5 flores, las cuales tienen colores que varían por las antocianinas y flavonas que

contenga la planta, desde el azul, morado, púrpura, celeste y rosado, hasta el amarillo, crema y blanco. La corola está formada por cinco pétalos, un grande denominado estandarte, dos laterales medianos denominados alas y dos inferiores pequeños fusionados denominados quilla.

El fruto es en legumbre pubescente, indehiscente en las cultivadas y con cierta dehiscencia en las semicultivadas y silvestres. De forma elíptica u oblonga. La vaina es alargada de 5 a 12 centímetros, según el número de semilla y pueden contener hasta 9 semillas.

La semilla es lenticular, de 8-10 milímetros de largo y 6-8 milímetros de ancho, con tegumento endurecido que representa el 10 por ciento de la semilla y contiene alcaloides.

Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón y colores combinados como marmoleado, media luna, ceja y salpicado (Villacrés, Rubio, Egas, y Segovia, 2006; Peralta, 2010).



Fig. 1. *Lupinus mutabilis*. Fuente: (Asociación de amigos del jardín botánico de Gijón, 2011 Consultado el 05 de Febrero de 2014, de

<http://www.amigosdelbotanicodegijon.com/actividades/fenologico/junio2011.asp>

1.1.2 Taxonomía. La clasificación taxonómica de *Lupinus mutabilis* Sweet se presenta en la tabla 1.

Tabla 1: Descripción taxonómica del chocho.

División:	Espermatofitos
Sub-División:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledóneas
Sub- clase	Arquiclamideas
Orden	Rosales
Familia	Leguminosa
Sub- Familia	Papilionoideas
Tribu	Genisteas
Género	<i>Lupinus</i>
Especie:	<i>Mutabilis</i>
Nombre científico:	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.
Nombre común:	Chocho, tahuri, tarwi.

Fuente: (Rivadeneira, 1999).

1.1.3 Composición química. El grano de chocho es rico en proteínas y grasas y constituyen más de la mitad de su peso. Según Gross y colaboradores (1988) citado por Caiza (2011) los estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos muestran que la proteína varía de 41- 51% y la grasa de 14-24%. Por lo tanto la proteína es inversamente proporcional al contenido de grasa. Las proteínas están básicamente constituidas por aminoácidos siendo el de mayor proporción en el grano de chocho desamargado la leucina. El contenido de ácidos grasos del grano de chocho se destaca la presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido linoléico (omega 6), el oleico (omega 9) en cantidades significativas y el ácido linolénico (omega 3) en bajas concentraciones. Con relación a los carbohidratos, el contenido de almidón y sacarosa es bajo comparado con los oligosacáridos como la rafinosa y verbascosa, los cuales son eliminados durante el desamargado o eliminación de alcaloides (Caiza, 2011; Urrutia, 2010).

Los alcaloides del grano de chocho desamargado están en bajas concentraciones 0,08 %, siendo los principales la lupanina (46 %), esparteína (14 %), hidroxilupanina (10 %), isolupanina (3 %), n-metilanustifolina (3 %), 13-hidroxilupanina (1 %) (Vinueza, 2011).

Tabla 2: Composición química del chocho desamargado.

PARÁMETROS	VALOR
Humedad	73,6 %
Proteínas	51,06 %
Isoleucina	4,3 %
Leucina	7,4%
Lisina	5,3 %
Metionina	0,4%
Fenilalanina	3,4%
Treonina	3,5%
Valina	3,5%

Histidina	2,2%
Tirosina	3,5%
Triptófano	1,8g
Grasa	20,4 %
Mirístico	Trazas
Palmítico	11,3 %
Palmitoleico	0,2 %
Esteárico	7,3 %
Oleico	52,5 %
Linoléico	28,4 %
Linolénico	2,9 %
Araquidónico	-
Cenizas	2,4 %
Fibra	7,5 %
Extracto Libre de Nitrógeno (ELN)	18,7 %
Alcaloides	0,08 %

Fuente: (Villacrés, Caicedo y Peralta, 2000; Lara, 1999; Navarrete, 2011).

En la Tabla 3 se presenta el contenido de minerales del chocho que es similar al de otras leguminosas. Únicamente los contenidos de fósforo, calcio y magnesio son más elevados (Caiza, 2011).

Tabla 3: Contenido de minerales del chocho desamargado.

CONTENIDO DE MINERALES	VALOR
Calcio	0,4 %
Fósforo	0,4 %
Magnesio	0,2 %
Sodio	0,04 %
Potasio	0,02 %
Hierro	120 Ppm
Manganeso	26 Ppm
Zinc	50 Ppm
Cobre	10 Ppm

Fuente: (Navarrete, 2011).

1.1.4 Valor nutritivo. La proteína del chocho contiene cantidades adecuadas de lisina y leucina que son aminoácidos esenciales, por lo que se considera apropiado para los niños en etapa de crecimiento, mujeres embarazadas y durante la lactancia. Al combinar este alimento con cereales como la quinua o amaranto se logra una excelente complementación de aminoácidos, cuyo valor proteico es comparable al de alimentos de origen animal como la leche, la carne, el queso y el huevo (Navarrete, 2011; Erazo y Terán, 2011).

Las grasas presentes en el grano de chocho poseen ácidos grasos esenciales como el linolénico y linoléico que son importantes para el desarrollo del sistema nervioso central, la función inmunológica y el crecimiento corporal. El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado que tiene la propiedad de aumentar HDL colesterol y reducir el colesterol total, LDL colesterol, los triglicéridos y la resistencia a la insulina, contribuyendo a disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Baldeón, 2012).

La fibra alimentaria ubicada en la cáscara del grano, incluye aquellos componentes del chocho que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas del hombre. Su contenido en el grano desamargado, en promedio asciende a 10,4% y reviste importancia debido a su efecto de saciedad lo que es beneficioso para prevenir la obesidad, combatir el estreñimiento y compresión en el tracto intestinal (Villacrés et al. 2006).

El calcio y el fósforo presentes en el grano de chocho contribuyen en el mantenimiento del sistema óseo, actividad del músculo cardíaco y producción de energía. El equilibrio calcio - fósforo es muy importante, debido a que un exceso de fósforo provoca la formación de fosfatos de calcio insolubles y no reabsorbibles, que acaba por ser eliminados impidiendo la absorción del calcio.

Entre los microelementos del grano chocho sobresale el hierro, este es un mineral básico para la producción de hemoglobina, transporte de oxígeno e incremento de la resistencia a las enfermedades (Villacrés et al. 2006).

El grano de chocho también es una valiosa fuente de vitamina B en sus formas como la Tiamina (B1) fundamental para el proceso de transformación de azúcares, conducción de impulsos nerviosos, metabolismo del oxígeno. La Riboflavina (B2) que favorece a la absorción de proteínas, grasas y carbohidratos. La Niacina (B3) favorece la eliminación de químicos tóxicos del cuerpo y la participación en la producción de las hormonas sexuales y las hormonas relacionadas con el estrés (Navarrete, 2011).

1.2 Procesos de obtención del grano de chocho desamargado

El grano de chocho crudo debido a su alto contenido de lupanina, esparteína y otros alcaloides anteriormente mencionados limitan su consumo directo, por lo que es necesario que el grano sea sometido al proceso de desamargado o deslupinación. El proceso es muy simple y no necesita de maquinaria ni de tecnología cara (Jacobsen y Mujica, 2006).

El proceso de desamargado del grano de chocho presenta las siguientes ventajas y desventajas:

Ventajas.

- Destrucción de la viabilidad de las semillas y de las enzimas indeseables como las lipasas, responsables de la autooxidación de las grasas, a través de la cocción.
- Destrucción de sustancias organolépticas indeseables y principios anti – nutritivos, como los inhibidores de proteasas, las hemaglutininas y el ácido cianhídrico (HCN).
- Eliminación de los oligosacáridos que se encuentran en diversas leguminosas y que producen flatulencia, a través del proceso de lavado (Villacrés, Caicedo y Peralta, 2000).

Desventajas.

- Prolongado tiempo de proceso para eliminar los alcaloides.
- Pérdida de nutrientes como los carbohidratos y algunos minerales.
- Falta de control de calidad en el proceso total y cuestionable sanidad del grano obtenido, debido principalmente a la calidad de agua empleada en el lavado de grano (Villacrés et al. 2000).

El desamargado puede ser realizado de dos formas: desamargado tradicional o desamargado industrial.

1.2.1 Desamargado tradicional. Por siglos, los campesinos de los Andes han eliminado el sabor amargo del grano. En Ecuador el desamargado tradicional comprende la selección, limpieza manual del grano, hidratación, cocción y lavado del grano. (Bacigalupo y Tapia; Tipán, 2007).

La hidratación se realiza en 24 horas y generalmente se realiza en agua de acequias, vertientes y en muy pocos casos se utiliza agua potable. La cocción se realiza en cocinas de leña o a gas y dura una hora. El lavado se realiza en agua corriente de acequias o vertientes durante cuatro o cinco días. El tiempo total para el desamargado artesanal incluye un periodo entre cinco a siete días. (Caicedo, Peralta, Villacrés y Rivera, 2001).

1.2.2 Desamargado industrial. El desamargado industrial del grano de chocho se basa fundamentalmente en la extracción de alcaloides por medio de agua potable.

1.2.2.1 Fases del desamargado. Las fases que deben considerarse para la obtención del alimento en condiciones óptimas para el consumo humano.

- **Hidratación**

La hidratación es la etapa en el cual el grano de chocho absorbe agua y duplica su peso, esta etapa es fundamental antes de la cocción. Se realiza en tanques de hidratación una vez que el agua potable alcanza los 40°C, se disponen las fundas conteniendo 4,5 kg de grano por un tiempo de 14 horas. El contenido de granos hidratados al cabo de 16 horas de remojo en agua a 40°C debe ser al menos del 95%. (Tipán, 2007; Caicedo et al. 2001).

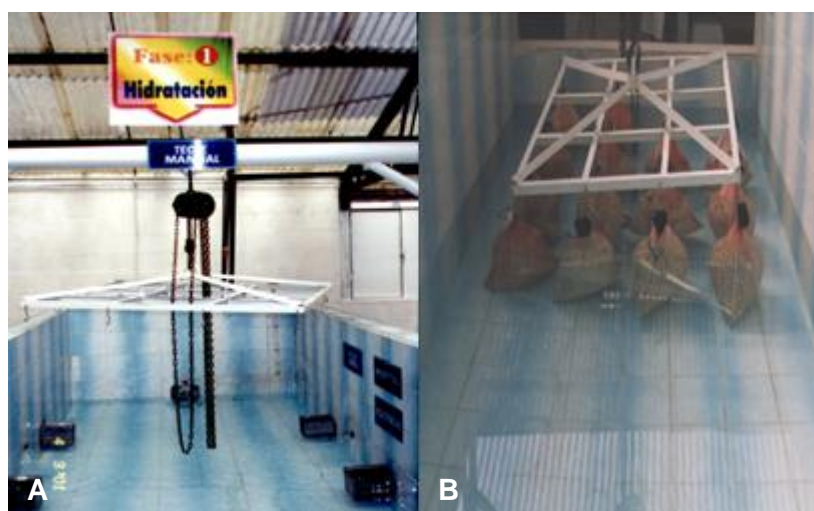


Fig. 2. A: Piscina de hidratación. B: Grano de chocho en hidratación.
Fuente: (Caicedo et al. 2001).

- **Cocción**

Para el chocho hidratado se dispone de ollas con capacidad de 300 kg. Cada una, en la cual se procede a cocinar por un lapso de 45 minutos, al cabo de este tiempo el grano debe estar blando listo para la siguiente etapa (Tipán, 2007).



Fig. 3. A: Cocción. B: Grano de chocho en proceso de cocción. Fuente: (Caicedo et al. 2001).

- **Lavado**

Este proceso consiste en mantener el agua en contacto con el grano. En esta etapa se controla el calentamiento, cloración y agitación del agua. Se realizan tres lavados hasta obtener el grano de chocho desamargado listo para el consumo. Se debe controlar la temperatura (40°C) del agua de lavado por 1 hora después de realizado el cambio, este se realiza cada ocho horas en el día y a las 16 horas del día siguiente. (Caicedo et al. 2001).

La cloración del agua en esta etapa es de vital importancia para la obtención de un producto aceptable para el consumo humano, con un bajo contenido de microorganismos. La dosificación recomendada es de 7,5 g de hipoclorito de calcio (CaClO_2) por 2500 litros de agua. La cloración del agua se realiza en el primero y segundo lavado. (Caicedo et al. 2001).



Fig. 4. Piscina de lavado. Fuente: (Caicedo et al. 2001).

- **Agitación**

Este sistema ayuda a la eliminación de alcaloides y debe darse durante 72 horas mientras se lava el grano (Caicedo et al. 2001).

- **Características finales del grano desamargado**

El contenido de alcaloide en el grano desamargado debe fluctuar entre 0.02-0.07%, a la vista el grano debe ser firme y duro, sin daños en la cáscara, en la parte microbiológica debe presentar ausencia de *Escherichia coli* (Tipán, 2007).



Fig. 5. Grano desamargado en 72 horas. Fuente: (Caicedo et al. 2001).

- **Escurrido**

El chocho antes de salir al mercado es escurrido en una mesa, eliminándose el agua en exceso, para que el chocho pueda ser envasado en bidones (Tipán, 2007).

- **Distribución**

El chocho una vez envasado es distribuido principalmente a las ciudades de Quito, Latacunga, Machachi y el 30% de la producción se destina al Oriente Ecuatoriano (Tipán, 2007).

1.3 Fuentes de contaminación del grano de chocho

En el proceso de desamargado del grano se puede dar una contaminación tanto de origen químico como biológico en la fase de lavado, selección, pesado y almacenado, pudiendo alterar la calidad del grano (Gavilanes Molina, 2003).

La contaminación del grano de chocho se puede dar fundamentalmente por la calidad del agua empleada para el lavado que provienen generalmente de acequias o el agua que llega a las viviendas a través de tuberías, pero sin tratamiento alguno de potabilización, pudiéndose dar una contaminación de origen biológico (Villacrés et al. 2000).

En la selección y pesado del grano las inadecuadas medidas de higiene (incorrecto lavado de manos) y las superficies de contacto mal higienizadas favorecen el crecimiento de los microorganismos (Gavilanes Molina, 2003).

En el almacenamiento la temperatura ambiente favorece la rápida descomposición del grano, favoreciendo al crecimiento de microorganismos y a su vez el grano adquiere una textura, olor y sabor diferente por la descomposición de proteínas y grasas produciendo intoxicaciones alimentarias (Villacrés et al. 2000; Gavilanes Molina, 2003).

1.3.1 **Indicadores de calidad microbiológica del grano desamargado de chocho.**

La detección de grupos o especies de microorganismos, cuyo recuento se realiza con facilidad y su presencia en el alimento (en determinado número) indica que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y/o permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. A estos grupos o especies de microorganismos se denominan “indicadores” y sirven para evaluar tanto la seguridad que ofrecen los alimentos en cuanto a microorganismos y sus toxinas, así como su calidad microbiológica (Castillo y Yanyachi, 2002).

La Norma Ecuatoriana INEN 2390 establece los requisitos de calidad que debe cumplir el grano de chocho desamargado para consumo humano, que incluye los parámetros de aceptabilidad/ausencia de Coliformes totales, *Escherichia coli*, aerobios mesófilos, mohos y levaduras (Instituto Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 2390, 2004). (Anexo 1)

1.3.1.1 Coliformes totales. Los coliformes totales, son un grupo de microorganismos que comprende varios géneros de la familia de las enterobacterias entre las que se destaca *Escherichia coli* que a su vez es perteneciente a los coliformes termotolerantes siendo el más reconocido representante, de contaminación de alimentos por origen fecal.

Este grupo de microorganismos se caracteriza por estar ampliamente difundido en el agua, suelo y es habitante normal del tracto intestinal de la mayoría de animales de sangre caliente incluyendo el hombre (Ordoñez, 2000 citado por Soler León, 2006).

Según la Organización Internacional de Estandarización (ISO 4832) define, los coliformes son bacterias de morfología bacilar, gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativas, no esporógenas y son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas de 35-37 °C ($\pm 0,5$) en un tiempo máximo de 48 horas.

Las bacterias coliformes, por sí mismas, no indican un peligro inmediato para la salud, pero como se desarrollan fácilmente en la mayoría de los alimentos y

son relativamente sensibles al calentamiento, su presencia señala que los alimentos han sido manipulados en malas condiciones de higiene en el curso o después de su elaboración (Castillo et al. 2002).

Este grupo, continúa siendo punto de crítica ya que es definido como un grupo indicador de calidad higiénica aunque dentro de este grupo estén microorganismos que no hacen parte del tracto intestinal si no que son habitantes normales del agua (*Vibrio cholerae*) que por ende no representan ninguna relación con falta de calidad de un producto (Soler León, 2006).

1.3.1.2 *Escherichia coli*. Es un bacilo gram negativo, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forma fimbrias y pilis, muchas cepas producen una pequeña microcápsula y muy pocas elaboran macrocápsula, no fabrica esporas (Pascual y Calderón, 1999).

Hay más de 150 antígenos O distintos y un gran número de antígenos K y H, los cuales son designados por medio de números. La fórmula antigénica para los serotipos se describe al unir una letra (O, K o H) con el numero asignado de los antígenos presentes (ej., O111:K76:H7) (Ryan y Ray, 2011). (Fig. 6)

Tienen información genética en los plásmidos, que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos. El genoma de *Escherichia coli* contiene un total de 5000 genes. (Pascual y Calderón, 1999; Romero Cabello, 2007).

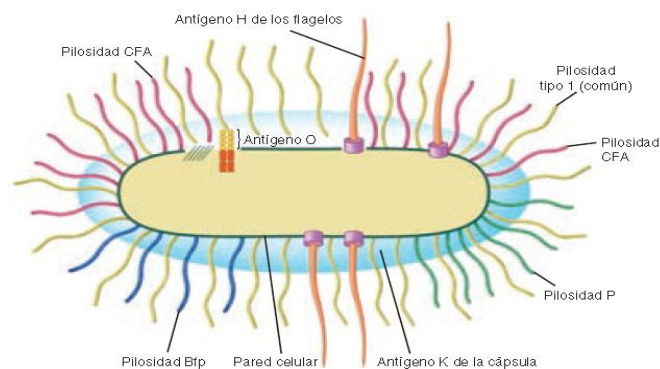


Fig. 6. Estructura antigénica de *Escherichia coli*. Fuente: (Ryan y Ray, 2011).



E. coli se destruye a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación (Romero Cabello, 2007).

Su patogenicidad es bien conocida y se ha asociado a diarrea, colitis hemorrágica, disentería, infecciones urinarias y meningitis entre otras patologías (Bayona, 2009).

Sin embargo, muchas cepas de *E. coli* son más o menos patógenas para el hombre; se dividen en seis grupos:

- *E. Coli* enteroagregante (EAEC)
- *E. coli* enteropatógeno (EPEC)
- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC)
- *E. coli* enteroinvasivo (EICE)
- *E. coli* enterohemorrágico (EHEC)
- *E. coli* difusamente adherente (ADEC) (Forsythe y Hayes, 2002).

1.3.1.3 Aerobios mesófilos. Son 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 (Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1529-5, 2006).

En el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

Tienen un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena.



Excepto en productos que se elaboran por fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos.

La presencia de Aerobios mesófilos en los alimentos puede indicar:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, por tratarse de microorganismos mesófilos de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que esta flora pueda ser mesófila.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto.

Tasas superiores a 10^6 - 10^7 gérmenes por gramo suelen ser ya inicio de descomposición. En general, el recuento de la flora aerobio mesófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos (Pascual y Calderón, 1999).

1.3.1.4 Mohos y levaduras. Los mohos son hongos multicelulares, filamentosos cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas.

Las levaduras son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovoidea, piriforme, cilíndrica, triangular o incluso alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño varía entre 5-20 μm superior al de las bacterias (Instituto Ecuatoriano NTE INEN 1529-10, 1998).

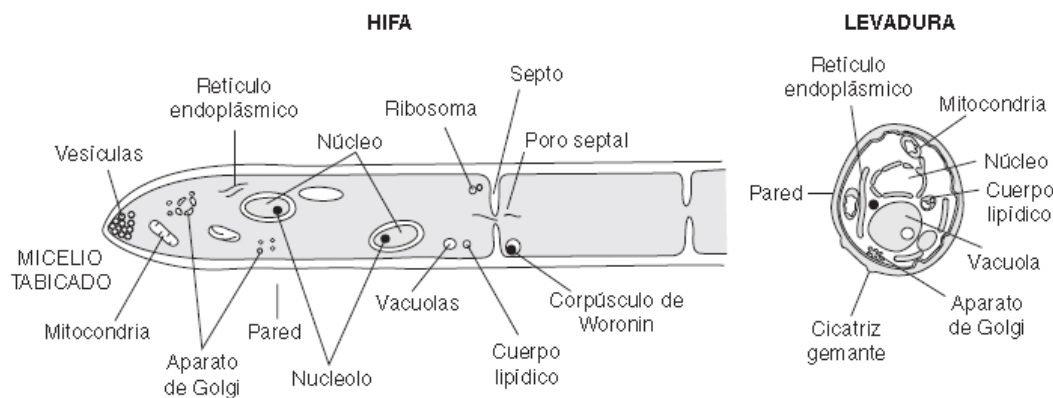


Fig. 7. Esquema ultraestructural de los hongos y levaduras. Fuente: (Arenas, 2009).

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados, provocando el deterioro fisicoquímico de éstos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además, los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada (Borbolla-Sala, Vidal-Pérez, Piña-Gutiérrez, Ramírez-Messner y Vidal-Vidal, 2004).



CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación

Se realizó una investigación observacional, descriptiva, prospectivo de corte transversal.

2.2 Población y área de estudio

El estudio se realizó entre los vendedores ambulantes de ceviche de chocho (desamargado) en las afueras de los establecimientos educativos de Educación Básica de las parroquias urbanas de la ciudad de Cuenca en el período de octubre 2013 - marzo 2014.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición VLIR-IUC, Facultad de Ciencias Químicas.

2.3 Muestreo

Se realizó un muestreo de tipo aleatorio estratificado. Las parroquias fueron definidas como estratos. En cada parroquia se seleccionaron aleatoriamente a los establecimientos educativos de manera proporcional al tamaño de la parroquia (ej., en la parroquia Bellavista existe 18 establecimientos educativos de los cuales se seleccionó 8 establecimientos para el estudio). La lista de los establecimientos educativos por parroquia fué obtenida de la Dirección Provincial de Educación del Azuay del año lectivo 2012-2013 (Tabla 4). Las muestras se obtuvieron de uno de los vendedores ambulantes (selección aleatoria) en las afueras de cada establecimiento seleccionado. (Anexo 2)

El plan de muestreo de esta tesis se basó en el protocolo de muestreo de alimentos proporcionado por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición (Proyecto de Alimentación, Nutrición y Salud VLIR-IUC & Universidad de Cuenca.)

El muestreo se llevó a cabo durante el periodo de Octubre-Noviembre de 2013.

Tabla 4: Número de establecimientos educativos seleccionados por parroquias.

Parroquias	Número de establecimientos educativos	Número de establecimientos educativos seleccionados
BELLAVISTA	18	8
CAÑARIBAMBA	5	2
EL BATÁN	6	2
EL SAGRARIO	9	4
EL VECINO	9	4
GIL RAMÍREZ DÁVALOS	5	2
HUAYNACAPAC	11	5
MACHANGARA	5	2
MONAY	7	3
SAN BLAS	4	2
SAN SEBASTIÁN	13	4
SUCRE	12	5
TOTORACOCHA	6	3
YANUNCAY	16	7
HERMANO MIGUEL	5	2
TOTAL	131	55

2.4 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fué de 55 vendedores ambulantes, los cuales fueron repartidos proporcionalmente al tamaño de los estratos (parroquias), el mismo que se realizó en Excel.



La población total fue de 131 establecimientos educativos de Educación Básica de las 15 parroquias urbanas de la ciudad de Cuenca. Además, se consideró un excedente del 10% con el fin de cubrir la posibilidad de que en las afueras de alguno de los establecimientos escogidos no se encuentre vendedores ambulantes del ceviche de chochos.

2.5 Toma de muestra

Para la toma de las muestras de chocho desamargado se siguió el protocolo de muestreo de alimentos proporcionado por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición (Proyecto de Alimentación, Nutrición y Salud VLIR-IUC & Universidad de Cuenca). (Anexo 3)

La cantidad de muestra primaria (grano desamargado de chocho) utilizado fue mínimo de 100g, los mismos que se colocaron en fundas estériles y fueron transportados al laboratorio en hieleras. Luego se homogenizó la muestra y se tomó 25g seleccionados por el método del cuarteo y luego se realizó el análisis microbiológico por duplicado.

Los 50g restantes de muestra se almacenaron en fundas estériles a una temperatura -20°C para conservación del grano e impedir la reproducción de los microorganismos. (Anexo 4)

2.6 Métodos y técnicas de análisis microbiológico

Las 3M placas Petrifilm están validadas por la Asociación de científicos dedicados a la excelencia en métodos analíticos (AOAC®), Asociación francesa de normalización (AFNOR) por esta razón se puede confiar en la calidad, fiabilidad y la constancia de los resultados (Ramos, 2011). Por lo tanto, para el presente estudio se utilizó las 3M Placas Petrifilm.

2.6.1 Recuento de microorganismos en placas Petrifilm. Las placas comerciales PetrifilmTM se han diseñado para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y número más probable (NMP) en muestras de aguas y alimentos. Consiste en láminas delgadas con un medio de cultivo y un agente solidificante soluble en agua. Además, pueden estar recubiertas por una película de polipropileno para atrapar el gas producido por algunas bacterias. También tienen incorporado indicadores de pH que colorean las colonias para facilitar su identificación, así como una cuadrícula para hacer el recuento de las UFC (Rodríguez, Gamboa, Hernández y García, 2005).

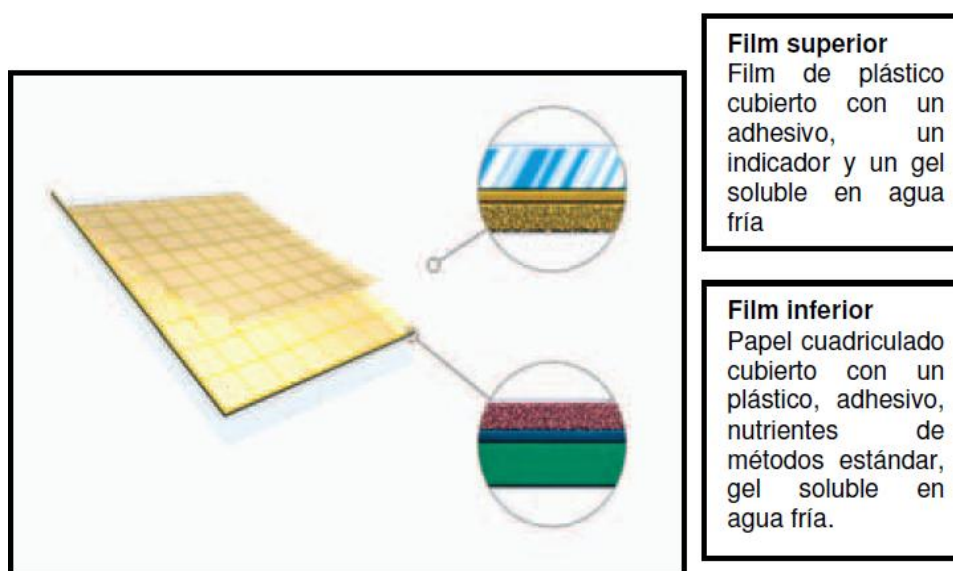


Fig. 8. Diseño Placa PetrifilmTM. Fuente: (Alonso Nore y Poveda Sánchez, 2008).

2.6.1.1 Recuento de *E. coli* y coliformes en placas PetrifilmTM. Las placas PetrifilmTM para recuento de *E. coli* / Coliformes contiene nutrientes del medio Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, indicadores de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido (BCIG) y tricloruro de trifeniltetrazolio (TCC) ubicada en la lámina superior de la placa facilitando la enumeración de las colonias.

Aproximadamente el 97% de las *E. coli* produce beta-glucoronidasa, enzima que reacciona con el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-glucurónido (BCIG)

presente en la placa PetrifilmTM haciendo que la colonia se torne de color azul a rojo-azul. Mientras que los coliformes que crecen en la placa PetrifilmTM se asocian al indicador de tetrazolio, el cual reacciona con la enzima presente en la membrana bacteriana, liberando iones hidrógeno y reduciéndose a formazan, dando lugar a colonias de color rojo.

El gas atrapado alrededor de las colonias de *E. coli* / Coliformes (dentro de aproximadamente el diámetro de una colonia), se da por la fermentación de la lactosa es decir por la producción de ácido y gas, oscureciendo el color del gel por un cambio de pH e indicando colonias confirmadas (3M PetrifilmTM, 2012). (Anexo 5)

2.6.1.2 Recuento de aerobios mesófilos en placas PetrifilmTM. Es un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo tetrafenil tetrasolium clorado (TTC), que facilita el recuento de las colonias. Las Placas PetrifilmTM Aerobic Count (AC) se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc. (Anexo 6)

2.6.1.3 Recuento de mohos y levaduras en placas PetrifilmTM. La placa PetrifilmTM para el recuento de mohos y levaduras constan de un medio de cultivo que contiene nutrientes de Saboraud, dos antibióticos (clorotetraciclina y cloramfenicol), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de fosfatos (BCIP) que promueve el contraste y facilita el recuento de las colonias. Las levaduras son colonias típicamente pequeñas, con relieve, de color que puede variar desde beige o crema hasta azul verdoso y con bordes delimitados. Los mohos son a menudo colonias planas más grandes, de diversos colores, con bordes no definidos y focos centrales (DILAB, s.f.). (Anexo 7)

2.7 Materiales y medios de cultivo

Materiales	Medios de cultivo
Materiales de laboratorio Balanza analítica Esterilizador Estufas a 25 y 37°C Microscopio estéreo binocular Motor de licuadora Pipeta automática Refrigeradora Pera de succión	Placas Petrifilm™ para <i>E. coli</i> / <i>Coliformes</i> (EEUU; proveedor: 3M Ecuador; Lote: 2014-07 KD) Placas Petrifilm™ para <i>Aerobios Mesófilos</i> (EEUU; proveedor: 3M Ecuador; Lote: 2014-07 KD) Placas Petrifilm™ para <i>Mohos y Levaduras</i> (EEUU; proveedor: 3M Ecuador; Lote: 2014-07 KD)
Material de vidrio	Agua de peptona al 0.1%
Cajas de Petri Erlenmeyer Probetas Varillas Lámpara de alcohol Pipeta serológica 10 ml Probetas Tubos de tapa rosca Frascos homogenizadores.	
Material secundario	
Fundas estériles Hielera Cucharas Agua destilada Puntas estériles Algodón Desinfectante	

2.8 Preparación de la muestra

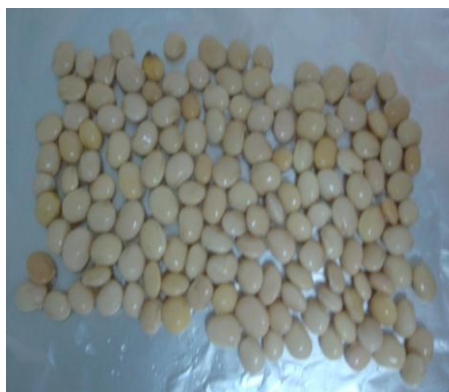
- Se pesó 100g de muestra.



- Se colocó la muestra en papel aluminio y se homogenizó con una cuchara estéril.



- Se seleccionó la muestra por el método del cuarteo (Se dividió en nueve segmentos iguales y se procedió a tomar la muestra de los extremos y del centro).



- Se pesó 25g de muestra en cajas petri estériles



- Inmediatamente los 25g de muestra pesada fueron adicionados a 225 ml de agua de peptona al 0,1% para realizar la dilución 1/10 (10^{-1}).



- Finalmente se homogenizó la muestra con el agua de peptona al 0,1% utilizando una licuadora.



2.8.1 Procedimiento del análisis microbiológico.

- Se colocó las Placas Petrifilm™ en una superficie plana y nivelada, previamente rotulados.



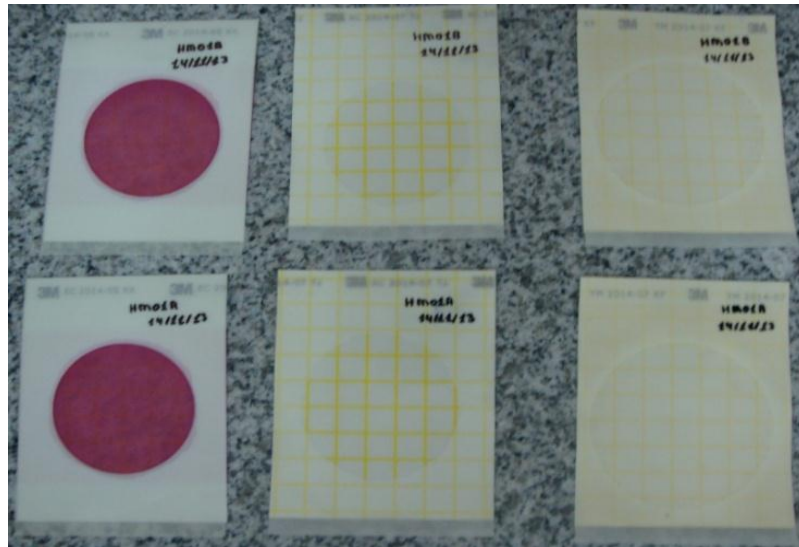
- Se levantó la lámina semitransparente (film protector) superior de la placa petrifilm y se colocó 1 mL de muestra en el centro de la placa sin hacer burbujas. Se dejó caer el film protector suavemente.



- Se colocó el dispersor cubriendo totalmente la muestra y se presionó suavemente para distribuir la muestra sobre el área circular.



- Se esperó alrededor de un minuto a que solidifique el gel.



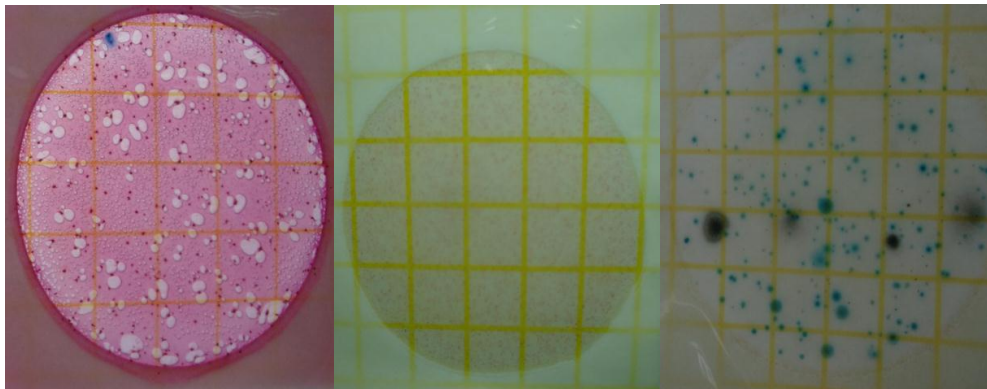
- Se incubó a 37°C las placas de *E. coli* / Coliformes y aerobios mesófilos, por un tiempo de 24 h para Coliformes y 48 h para *E. coli* y aerobios mesófilos.



- Se incubó a 25°C las placas de Mohos y Levaduras durante 72 horas.



- Transcurrido el tiempo de incubación se contó las colonias y se realizó los cálculos correspondientes.



Cuando las colonias fueron muy numerosas para contar (MNPC) se procedió hacer diluciones seriadas de la muestra, se tomó 1 mL de dilución 10^{-1} y se agregó a un tubo de 9 mL de agua de peptona al 0,1% para obtener una dilución 10^{-2} , y a partir de esta se tomó 1 mL de dilución 10^{-2} y se agregó a un tubo de 9 mL de agua de peptona al 0,1% para obtener una dilución 10^{-3} y se sembró en las placas Petrifilm™.

2.9 Cálculos

Para calcular el número de UFC/g y NMP/g se aplicó la siguiente fórmula.

$$N = \Sigma C \times f = \text{UFC/g y NMP/g}$$

Dónde:

N=Número de UFC por gramo

Σ Colonias= Suma de las colonias contadas en las placas

f = factor de dilución utilizado

f = 10

f= 1000

$$N = \Sigma C \times 10 = \text{UFC/g y NMP/g}$$

$$N = \Sigma C \times 1000 = \text{UFC/g y NMP/g}$$

2.10 Análisis estadístico

Los datos se procesaron en los paquetes estadísticos SPSS v. 20.0 y EPIDAT 3.0. Se describió el comportamiento de cada variable mediante los cálculos de la media, mediana, los rangos, la desviación estándar y los cuartiles. Considerando que las muestras iniciales no siguen una distribución normal los análisis de comparaciones entre conjuntos de datos de una variable se evaluaron por pruebas no paramétricas o de distribución libre, que no tienen en cuenta la normalidad de los valores obtenidos.

Para comparar los conteos de las dos réplicas se empleó el test de los rangos con signo de Wilcoxon (Bellera et al., 2010). Antes de ello se evaluó la relación entre los datos de la primera y segunda determinación en cada variable, mediante el coeficiente de correlación de Spearman y la determinación del coeficiente de concordancia kappa de Cohen en caso de que no coincidieran los recuentos de ambas determinaciones.



Por último, para comparar dos o más proporciones se empleó la prueba Chi-cuadrado de Pearson.

En todos los casos, el nivel de significancia empleado fue para $P < 0,05$.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la reproducibilidad de los recuentos microbianos

La validez de los resultados presentados en este trabajo se evaluó parcialmente mediante la reproducibilidad de los valores obtenidos para cada variable en dos determinaciones sobre la misma muestra.

Considerando la no distribución normal de los resultados y la presencia en algunos casos de conteos iguales a cero que impedían la transformación logarítmica directa de los datos (tabla 5), se decide entonces aplicar métodos no paramétricos de análisis. (Anexo 8)

Tabla 5: Descripción de los resultados por réplica para el recuento de los microorganismos estudiados. *

MICROORGANISMOS	N	Media	Desviación típica	Mín.	Máx.	Percentiles		
						25	50 (Mediana)	75
RÉPLICA 1								
<i>Coliformes totales</i>	55	16778,73	81987,047	0	600000	200,00	650,00	3000,00
<i>E. coli</i>	55	9,09	27,303	0	150	,00	,00	10,00
<i>Aerobios mesófilos</i>	55	101330,18	337079,694	0	1680000	350,00	1100,00	2330,00
<i>Mohos y levaduras</i>	55	71527,82	183195,230	230	840000	1880,00	5100,00	20040,00
RÉPLICA 2								
<i>Coliformes totales</i>	55	16371,82	79319,802	0	580000	190,00	700,00	2900,00
<i>E. coli</i>	55	10,73	31,556	0	180	,00	,00	10,00
<i>Aerobios mesófilos</i>	55	103584,47	345641,213	0	1660000	390,00	1166,00	2200,00
<i>Mohos y levaduras</i>	55	72679,27	186386,177	210	864350	1800,00	5290,00	21700,00

*: Los valores presentados se corresponden a las UFC/g y NMP/g en los casos correspondientes.

La tabla 6 muestra los valores de coeficientes de correlación de Spearman para cada variable microbiológica analizada. En todos los casos se tienen valores

muy altos, cercanos a la unidad. Esto indica una estrecha relación positiva entre los recuentos de las réplicas empleadas por variable analizada.

Tabla 6: Coeficientes de correlación de Spearman (r_s) entre los valores de las dos réplicas de cada variable investigada.

	MICROORGANISMO			
	<i>Coliformes totales</i>	<i>E. coli</i>	Aerobios mesófilos	Mohos y levaduras
r_s	0,993	0,997	0,995	0,998
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

r_s : coeficiente de correlación de Spearman, P: probabilidad de error tipo I, comparando r_s con el valor cero.

A pesar de esta elevada relación entre los valores de cada réplica por microorganismo evaluado, esto no quiere decir que coincidan exactamente entre ellos (Hauke and Kossowski, 2011). Por eso se decide evaluar si se presentan diferencias significativas entre la distribución de los datos de las dos determinaciones por variable analizada.

Al aplicarse el Test de los Rangos con Signos de Wilcoxon (Bellera et al., 2010), se pudo observar que las réplicas de los recuentos de *E. coli* presentan diferente distribución, lo que indica que la segunda replica tiende a dar datos de valor mayor que la primera replica (tabla 7).

Tabla 7: Comparación de los recuentos por réplicas de cada grupo de microorganismo indicador aplicando el Test de los Rangos con Signos de Wilcoxon.

	Coliformes totales 2 - Coliformes totales 1	<i>E. coli</i> 2 – <i>E. coli</i> 1	Aerobios mesófilos 2 - Aerobios mesófilos 1	Mohos y levaduras 2 - Mohos y levaduras 1
Z	-0,480	-2,124	-1,051	-1,536
P	0,631	0,034	0,293	0,125

Z: estadígrafo de contraste aproximado a la distribución normal; P: probabilidad de error tipo I que evalúa las diferencias entre los recuentos de las réplicas 1 y 2.

No obstante lo anterior, antes de desechar los resultados para esta variable o hacer un análisis diferente, se decide evaluar si existen discrepancias en la clasificación de las muestras en cuanto a cumplimiento de la norma INEN vigente. Para ello se determinó el coeficiente de concordancia *Kappa* de Cohen, el cual resultó tener el valor máximo 1,0 (López de Ullibarri Galparsoro y Pita Fernández, 1999). De esta forma se demostró que el 100 % de las determinaciones de ambas réplicas coinciden en la caracterización microbiológica de la muestra estudiada (tabla 8).

Tabla 8: Comportamiento del cumplimiento de la norma INEN 2390 en cada réplica para *E. coli*.

		Réplica1		K
		Cumple	No cumple	
Réplica 2	Cumple	41	0	1,00
	No cumple	0	14	

K: kappa de Cohen.

Con estos resultados se decide entonces unir los valores de los resultados de ambas réplicas para valorar de forma conjunta el comportamiento de los incumplimientos de la norma establecida para estos microorganismos.

3.2 Incumplimientos de la norma establecida

En la tabla 9 se recogen los resultados generales del comportamiento de la contaminación microbiológica del chocho vendido en el total de las instituciones investigadas. La prueba chi-cuadrado indica que existen diferencias en cuanto a la frecuencia de contaminación según el grupo de microorganismos

estudiados (ver tabla). En este sentido, es muy notoria la contaminación por mohos y levaduras y por microorganismos coliformes. En el primero de los casos 52 de las 55 muestras (94,5 %) analizadas incumplían lo establecido en la norma vigente; mientras que por su parte las bacterias coliformes lo hacían en 46 determinaciones (83,6 %).

Tabla 9: Porcentaje general de la contaminación del grano de chocho desamargado por cada grupo de microorganismo indicador (n=55).

Microorganismo	Valor Normal (UFC/g)*	Norma	Muestras Contaminadas**	% contaminación del total
<i>Coliformes totales^a</i>	$10 - 10^2$	NTE INEN 2390:2004	46	83,6
<i>E. coli</i>	Ausencia	NTE INEN 2390:2004	14	25,5
<i>Mesófilos aerobios</i>	$18 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$	NTE INEN 2390:2004	31	56,4
<i>Mohos y levaduras</i>	$0 - 5 \cdot 10^2$	NTE INEN 2390:2004	52	94,5
$X^2 = 63,6429$; 3 grados de libertad; $P < 0,001$				

*: Se refiere al rango propuesto en la norma citada; **: se refiere a la cantidad de muestras que no cumplen la norma; ^a: en el caso de Coliformes totales el recuento se expresó en NMP/g según la norma vigente.

Aunque los resultados sugieren que los incumplimientos por contaminación de *E.coli* (25,5 %) fue menor que para los demás grupos de microorganismos indicadores, es importante resaltar el papel que juega la detección de esta bacteria en los alimentos, ya que es un fuerte indicador de contaminación fecal.

3.2.1 Coliformes totales. Los resultados para coliformes totales indicaron una elevada frecuencia de incumplimientos de la norma vigente para el grano de chocho desamargado. Entre las muestras estudiadas solo 16,4% cumplían la norma para este indicador de calidad microbiológica (gráfico 1).

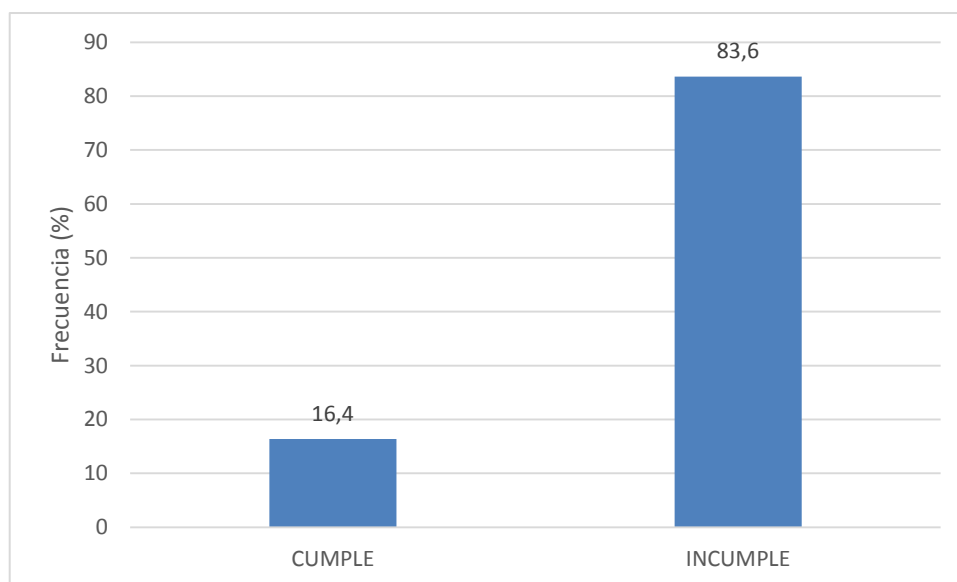


Gráfico 1: Porcentaje de incumplimientos de la norma INEN vigente para el indicador de calidad Coliformes totales.

Estudios previos en el país hacen referencia a la elevada presencia de estos microorganismos en este tipo de alimentos. Por ejemplo, en un estudio realizado en cuatro provincias de Ecuador se indicó que el grano de chocho preparado artesanalmente para la comercialización tiene una elevada contaminación por coliformes, fundamentalmente asociado al uso de fuentes de agua de mala calidad (Caicedo y Peralta, 2000). Se debe tener en cuenta además que el uso de agua de buena calidad y de agentes antimicrobianos como el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno, no garantizan la eliminación total de los agentes patógenos, los que ante condiciones favorables pueden desarrollarse a niveles potencialmente infectantes (Allauca Chávez, 2005; Carrión Moreno, 2006; Saper, 2001; Gil et al., 2009; Beuchat and Ryu, 1997; Chigor et al., 2010).

La contaminación microbiológica de alimentos expendidos en las calles no es un tema nuevo. Investigaciones al respecto realizadas por toda Latinoamérica sugieren que esto es un evento relativamente frecuente que está asociado fundamentalmente a problemas en el almacenamiento y manejo de los productos que se comercializan y consumen crudos o mínimamente elaborados/procesados (Caballero et al., 1998; De Curtis et al., 2000; Almeida et al., 1996; Félix Fuentes et al., 2005; Lengomin Fernández et al., 1997; Boyona, 2009).

3.2.2 *Escherichia coli*. La *E. coli* es una bacteria propia de la flora intestinal. Luego su presencia en los alimentos es un fuerte indicador de contaminación fecal.

En el presente estudio, aproximadamente el 25% de las muestras mostró presencia de *E. coli*, indicando probablemente una mala higiene personal y de los alimentos (gráfico 2).

La contaminación del grano de chocho desamargado por microorganismos de origen fecal también ha sido descrito por autores nacionales, especialmente en el grano comercializado por productores artesanales (Caicedo y Peralta, 2000).

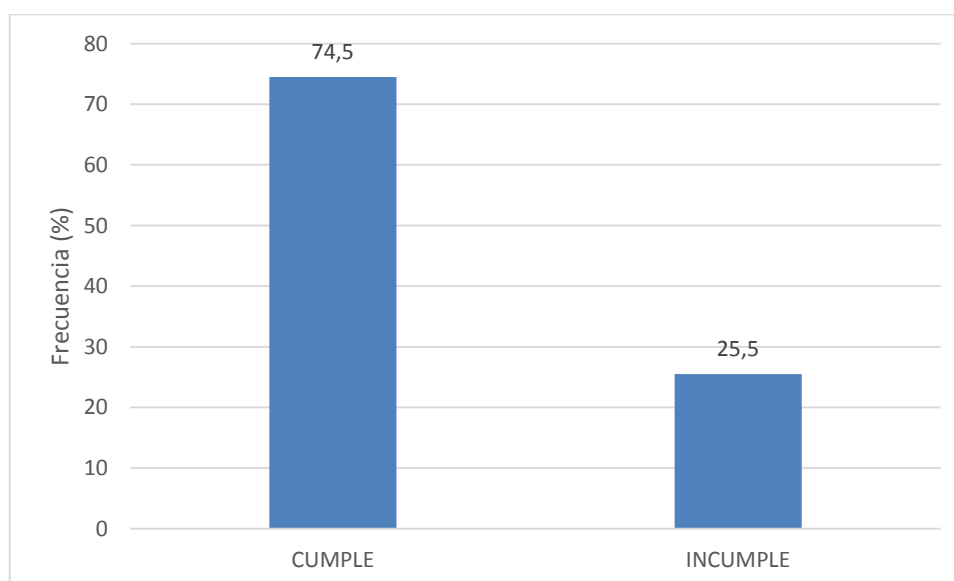


Gráfico 2: Frecuencia de incumplimientos de la norma INEN vigente para el indicador de calidad *E. coli*.

La presencia de este microorganismo en un elevado porcentaje de las muestras analizadas es preocupante. Si bien la patogenicidad depende de la cepa de *E. coli* que infecte el organismo, en muchas ocasiones su presencia suele estar acompañada de otros enteropatógenos como *Salmonella* spp. y *Shigella* (Almeida et al., 1996).

La contaminación fecal en los alimentos comercializados en las calles es un problema en América Latina descrito por varios autores. El estudio de Almeida et al. (1996) hace casi 20 años en importantes ciudades de Suramérica y Centro América indica que en algunas regiones la *E. coli* podía afectar la calidad de hasta un 50 % de los productos ofertados. Estudios de otros países como Canadá, Estados Unidos, México y Sudáfrica indican que este microorganismo puede presentarse en alrededor de 8 % a 20 % de las frutas y vegetales que se venden frescos o listos para el consumo en ensaladas como es el caso de la cebolla, ingrediente indispensable del ceviche de chocho. Aunque este alimento no fue controlado en el presente trabajo, no se descarta su posible contribución a la contaminación del producto terminado y comercializado listo para el consumo.

En esta misma línea de investigaciones, los resultados de múltiples trabajos apoyan el planteamiento de que la contaminación de los alimentos por *E. coli* está estrechamente ligada a la higiene personal y a la venta de alimentos crudos o pobremente procesados (Félix –Fuentes et al., 2005; de Curtis et al., 2000; Rivera Jacinto et al., 2009; Boyona, 2009). Otros investigadores relacionan la presencia de este microorganismo al uso de agua de riego contaminada (Chigor et al., 2010; Tauxe, 1997; Beuchat and Ryu, 1997; Berger et al., 2010; Castro-Rosas et al., 2012). Cualquiera que sea la posible causa, la presencia de *E. coli* en aproximadamente el 25 de cada 100 muestras sugiere un alto riesgo de enfermedades gastrointestinales en los estudiantes que consumen este alimento.

3.2.3 Aerobios mesófilos. En el presente trabajo este indicador de calidad se vio afectado en más del 50 % de las muestras, indicando también una elevada frecuencia de contaminación microbiológica (gráfico 3).

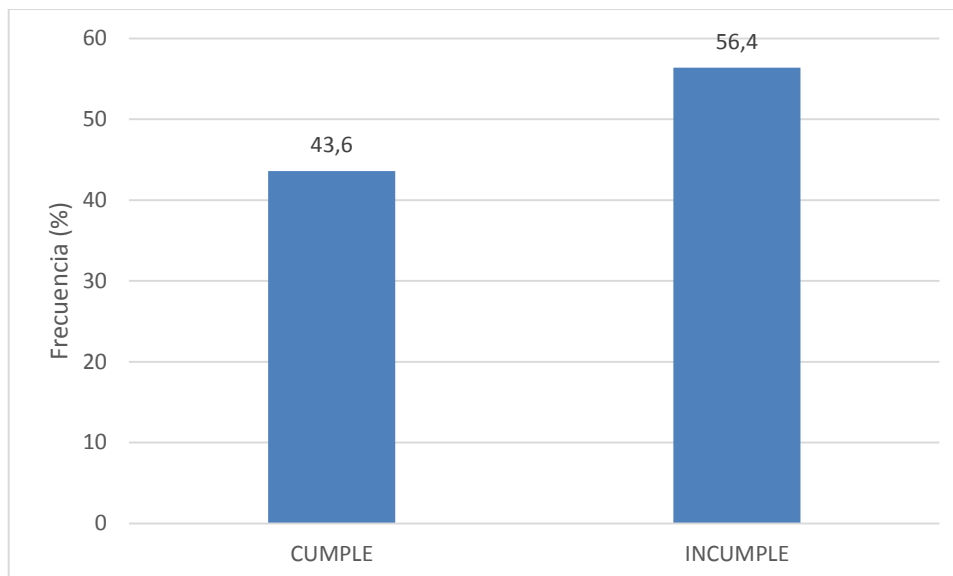


Gráfico 3: Contaminación microbiológica (aerobios mesófilos) en las muestras de estudio.

Una de las posibles causas de esta elevada contaminación por aerobios mesófilos puede estar asociada nuevamente al empleo de agua y materia prima de mala calidad, así como a una deficiente higiene de los alimentos según estudios previos a nivel nacional (Carrión Moreno, 2006; Allauca Chávez, 2005).

Investigaciones de otras regiones del mundo indican que las frutas y vegetales frescos que se venden en los supermercados y granjas pueden contener de por sí recuentos de microorganismos aerobios mesófilos mayores a 10^6 UFC/g (Abadías et al., 2008), lo mismo que fue observado en más del 50 % de las muestras provenientes de algunas parroquias como El Sagrario (Mediana = $1,2 \cdot 10^6$ UFC/g).

3.2.4 Mohos y levaduras. En esta investigación, la presencia de hongos o levaduras estuvo afectando la calidad de más del 90 % de las muestras investigadas (gráfico 4).

Por lo general, la corteza de los frutos y hojas de los vegetales que se venden crudos o semielaborados en los mercados, poseen recuentos de hongos superiores a 10^5 UFC/g en más del 80 % de las muestras (Abadías et al., 2008). Salvando diferencias en cuanto al tipo de alimento evaluado y los puntos de corte empleados, los resultados del presente estudio están en concordancia con ello.

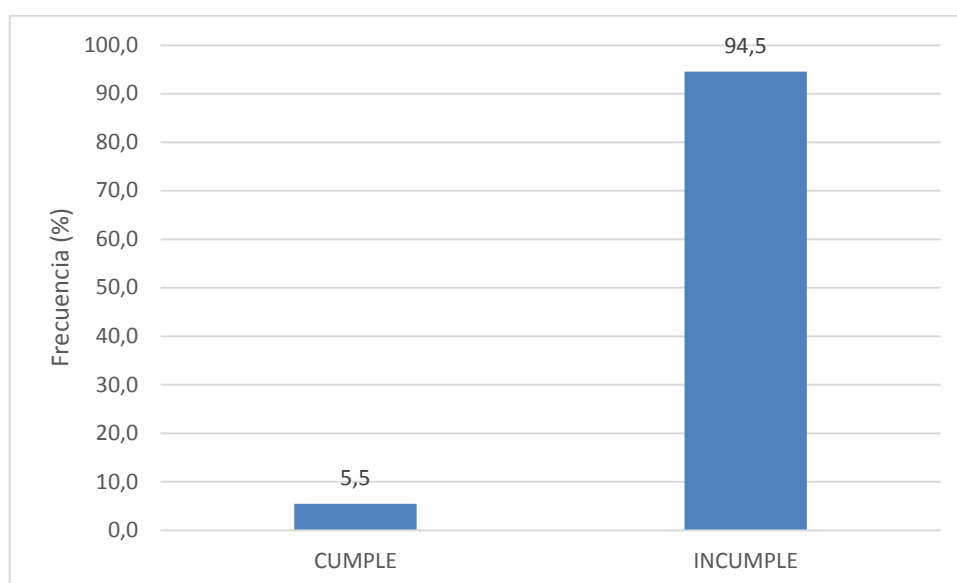


Gráfico 4: Comportamiento de los incumplimientos en el conteo de mohos y levaduras en las muestras de estudio.

Otros estudios nacionales sugieren que el crecimiento de los mohos y levaduras en el agua empleada para el lavado del chocho es un evento frecuente que se debe considerar, con recuentos en muchos casos muy superiores a las normas establecidas en el país (Carrión Moreno, 2006).

3.2.5 Calidad microbiológica del grano de chocho desamargado. La contaminación microbiana del grano de chocho vendido en los establecimientos educativos investigados es extremadamente alta. Obsérvese en el gráfico 5 que el 100 % de las determinaciones tenía al menos un parámetro fuera de las recomendaciones de la norma INEN.

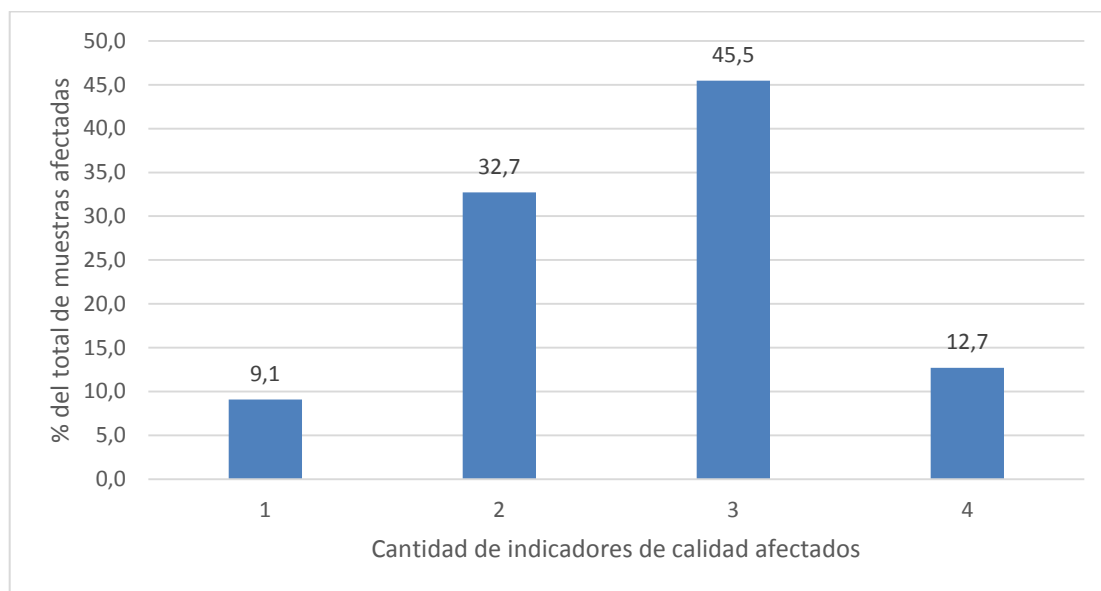


Gráfico 5: Proporción de muestras con 1, 2, 3 o 4 microorganismos indicadores con recuentos por encima de los establecidos en NTE INEN 2390.

Es notorio que de las muestras analizadas aproximadamente el 60 % presentó recuentos elevados para 3 o más microorganismos indicadores de la calidad del grano de chocho desamargado. En la tabla 10 se resume el comportamiento de los incumplimientos por parroquia, siendo preocupantes las de El Sagrario, El Vecino y Cañaribamba donde el 100 % de las muestras tomadas presentaron alteraciones en tres o más indicadores de calidad.

Tabla 10: Proporción de incumplimientos de 1, 2, 3 o 4 indicadores de calidad microbiológica por parroquia (NTE INEN 2390) expresados en %.

PARROQUIA	Cantidad de indicadores de calidad microbiológica afectados*.			
	1	2	3	4
BELLAVISTA	12,5	50,0	25,0	12,5
SUCRE	60,0	0,0	0,0	40,0
SAN SEBASTIAN	25,0	25,0	50,0	0,0
GIL RAMIREZ	0,0	50,0	50,0	0,0
HUAYNACAPAC	0,0	40,0	60,0	0,0
EL SAGRARIO	0,0	0,0	75,0	25,0
YANUNCAY	0,0	42,9	42,9	14,3
EL VECINO	0,0	0,0	100,0	0,0
EL BATAN	0,0	50,0	0,0	50,0
TOTORACocha	0,0	66,7	33,3	0,0
MACHANGARA	0,0	50,0	50,0	0,0
MONAY	0,0	33,3	66,7	0,0
CAÑARIBAMBA	0,0	0,0	100,0	0,0
HERMANO MIGUEL	0,0	50,0	0,0	50,0
SAN BLAS	0,0	50,0	50,0	0,0
TOTAL	9,1	32,7	45,5	12,7

*: Se refiere a la presencia de uno o más microorganismos indicadores con recuentos por encima de los requisitos de la norma vigente.

De forma general, los resultados presentados en este trabajo deberían tomarse como punto de partida para implementar medidas de control a nivel de las autoridades de salud de la ciudad de Cuenca. Aunque no se evaluó la frecuencia de consumo del chocho en dichas instituciones, el hecho de que en todas existan al menos un vendedor de chocho con indicadores microbiológicos inaceptables y que de estos más del 50 % tenga tres o más grupos de microorganismos indicadores con recuentos elevados, no solo sugiere una muy pobre calidad del producto, sino además un elevado riesgo de enfermedades transmitidas por este tipo de alimento.

CONCLUSIONES

1. De forma general se puede concluir que la calidad microbiológica es deficiente en el grano de chocho desamargado ingrediente principal del ceviche que se venden en las afueras de los establecimientos educativos de las parroquias urbanas de la ciudad de Cuenca cuyo consumo representa un alto riesgo epidemiológico porque son preparados y vendidos en deficientes condiciones higiénicas.
2. Los principales microorganismos detectados fueron mohos y levaduras, seguidos de coliformes totales y aerobios mesófilos los que estuvieron elevados en más del 90 %, 80 % y 50 % de las muestras respectivamente.
3. Aproximadamente el 25 % de las determinaciones presentaron indicios de contaminación fecal, lo que se considera inaceptable considerando el elevado riesgo a la exposición de microorganismos potencialmente patógenos.
4. Los establecimientos educativos de las parroquias El Sagrario, El Vecino y Cañaribamba, fueron las más afectadas donde el 100 % de los vendedores de chocho aportaron muestras con tres o más de los microorganismos indicadores con recuentos por encima de los valores recomendados por la norma.

RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo vigilancias sanitarias periódicas para controlar el riesgo epidemiológico que presume el consumo de este tipo de alimento y determinar si la elevada contaminación encontrada fué producto del azar o si se mantiene durante todo el año.
2. Investigar entre los productores de chocho desamargado cuáles son sus prácticas de manufactura y almacenamiento para poder identificar posibles puntos de contaminación durante el proceso de preparación del chocho desamargado con el fin de educar a los manipuladores sobre los mejores procedimientos para garantizar la inocuidad de este alimento.
3. Considerando la elevada contaminación microbiológica detectada en el chocho que se vende en las afueras de los establecimientos educativos, se recomienda investigar la presencia de otros microorganismos potencialmente patógenos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Listeria* spp., entre otros, que aunque no están considerados en la norma vigente pudieran aportar datos valiosos para el abordaje higiénico-epidemiológico de las enfermedades transmitidas por los alimentos en los niños de los planteles educativos urbanos de la ciudad de Cuenca.



BIBLIOGRAFÍA

1. 3M Petrifilm™. (2012). Placas para Recuento de *E. coli* y *Coliformes*. Consultado el 5 de Septiembre de 2013, de http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=66666UuZjcFSLXTtMxMy5xfyEVuQEcuZgVs6EVs6E666666--&fn=PEC%20Interp%20Guide_spa.pdf
2. Allauca Chávez, VV. (2005). *Desarrollo de la tecnología de elaboración de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) germinado fresco para elevar el valor nutricional del grano*. Tesis de grado previa a la obtención del título de Doctora en Bioquímica y Farmacia. Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
3. Almeida, CR., Schuch, DMT., Gelli, DS., Cuéllar, JA., Díez, AV, Escamilla, JA (Editores) (1996). Contaminación microbiana en los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socioeconómicas de sus vendedores y consumidores. División de Prevención y Control de Enfermedades; Organización Panamericana de la Salud.
4. Alonso Nore, L. X., & Poveda Sánchez, J. A. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3M™ para el análisis de alimentos. Tesis de grado previa a la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia.
5. Anderson Pascual, M., Calderón, V., & Pascual. (1999). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas (Segunda ed.). Díaz de Santos.
6. Arenas, R. (2009). Micología Médica Ilustrada (Tercera ed.). México: McGraw-Hill.
7. Asociación de amigos del jardín botánico de Gijón. (2011). Factoría Vegetal: Altramuz, lupino, chocho. Consultado el 05 de Febrero de 2014, de



<http://www.amigosdelbotanicodegijon.com/actividades/fenologico/junio2011.asp>

8. Bacigalupo, A., & Tapia, M.E. (s. f.). Agroindustria del Tarwi. Consultado el 27 de Noviembre de 2013, de <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro10/cap05.htm>
9. Baldeón Salgado, P. E. (2012). Procesamiento del Chocho (*Lupinus Mutabilis* Sweet) para la obtención de leche y yogurt como alimentos alternativos de consumo humano. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
10. Bayona R, M. A. (2009). Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. *Revista UDC A Actualidad & Divulgación Científica*, 12(2), 9-17.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v12n2/v12n2a02.pdf>
11. Bellera CA., Marilyse J. and JA. Hanley (2010). Normal Approximations to the Distributions of the Wilcoxon Statistics: Accurate to What N? Graphical Insights. *J Statist Educ*; 18 (2):1-17.
12. Berger, CN., Sodha, SV., Shaw, RK., Griffin, PM., Pink, D., Hand, P., et al. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*; 12(9):2385-97.
13. Beuchat, LR. And Ryu, LH. (1997). Produce handling and processing practice. *Emerging Infect Dis*; 3(4):459-65.
14. Borbolla-Sala, M. E., del Rosario Vidal-Pérez, M., Piña-Gutiérrez, O. E., Ramírez-Messner, I., & Vidal-Vidal, J. J. (2004). Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, *coliformes fecales*, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco*, (2), 221-232.
15. Busta, FF., Suslow TV., Parish, ME., Beuchat, LR., Farber, JJ., Garret, EH., et al. (2003). The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogen in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Rev Food & Food Safe*; 2(Suppl):179-85.



16. Caballero Torres, A., Carrera-Vara, JA., Lengomín-Fernández, ME. (1998). Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 12(1):7-10.
17. Caicedo, C. y Peralta, E. (Editores). (2000). Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho en Ecuador. Programa Nacional de Leguminosas. Estación Experimental Santa Catalina. Boletín 89.
18. Caicedo, C., Peralta, E., Villacrés, E., & Rivera, M. (2001). Poscosecha y mercado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador. Publicación Miscelánea.
19. Caiza Ayala, J. E. (2011). Obtención de hidrolizado de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral (Doctoral dissertation, QUITO/EPN).
<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4387>
20. Carrión Moreno, MJ. (2006). Reutilización del efluente del desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis previa a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos. Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.
21. Castillo Alegría, M. M., & Yanyachi Pajuelo, M. I. (2002). Evaluación de la calidad higiénico sanitarias en fórmulas de nutrición enteral usado en dos hospitales de la ciudad de Lima. Tesis previa a la obtención del título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor San Marcos, Lima, Perú.
22. Castro- Rosas, J., Cerna-Cortés, JF., Méndez-Reyes, E., López-Hernández, D., Gómez-Aldapa, CA., Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready – to – eat *salads*, from the area where crops are irrigated with untreated sewage water. *In J Food Microbiol*; 156:176-80.
23. Chigor, VN., Umoh, VJ., Smith, SI. (2010). Occurrence of *Escherichia coli* O157 in a river used for fresh produce irrigation in Nigeria. *Afr J Biotechnol*; 9(2):178-82.



24. De Curtis, ML., Franceschi, O., De Castro, N. (2000). Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. *ALAN* 2000; 50(2):177-82.
25. DILAB. (s.f.). *Placas 3M Petrifilm*. Consultado el 07 de Marzo de 2014, de http://198.245.61.109/~dilababm/index.php?option=com_content&view=article&id=138%3Aplacas&catid=45%3Acatalogo&Itemid=99
26. Erazo Sandoval, J. E., & Terán Zumarraga, L. S. (2011). Elaboración de Galletas Integrales enriquecidas con Quinoa (*Chenopodium quinoa* L.) y Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) edulcoradas con Panela. Tesis previa a la obtención del título de Ingenieros Agroindustriales. Facultad de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.
27. Félix Fuentes, A., Campos Baypoli, ON., Meza Montenegro, M. (2005). Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Rev Salud Pub Nutr*, 6(3).
28. Forsythe, S. J., & Hayes, P. R. (2002). Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. Zaragoza (España): ACRIBIA, S.A.
29. Gavilanes Molina, M. K. (2003). *HACCP para la planta de desamargado de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) y especificaciones de calidad del grano: HUSL-57N-5Z3L*. INIAP Archivo Histórico, Riobamba.
30. Gil, MI., Selma, MV., López-Gálvez, F., Allende, G. (2009). Fresh-cut product sanitization and wash water disinfection: Problems and solutions. *Int J Food Microbiol*; doi:10.1016/j.ifofood.micro.2009.05.021.
31. Hauke J and Kossowski, T (2011). Comparison of values of pearson's and spearman's correlation coefficients on the same sets of data. *QUAESTIONES GEOGRAPHICAE*; 30(2):87-93.
32. Instituto Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 1529-10. (1998). *Control Microbiológico de los alimentos*. Mohos y Levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. Quito-Ecuador.
33. Instituto Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 1529-5. (2006). *Control microbiológico de los alimentos*. Determinación de la cantidad de microorganismos Aerobios Mesófilos. REP. Quito-Ecuador.



34. Instituto Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 2390. (2004). Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos. Quito-Ecuador.
35. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. (2002). Sistema regional de información para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires: Panalimentos OPS/OMS.
36. Jacobsen, S. E., & Mujica, A. (2006). El Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés. Botánica Económica de los Andes Centrales, 28, 458-482.
37. Lara Garófalo, A. K. (1999). Estudios alternativos tecnológicos para el desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba - Ecuador.
38. Lengomin Fernández, ME., Caballero Torres, A., Monterrey Gutiérrez, P., Arcia Torres, J. (1997). Riesgos en la venta de alimentos en las calles. *Rev Cubana Aliment y Nutr* 1997; 11(2):79-83.
39. López de Ullibarri Galparsoro I, Pita Fernández, S. (1999). Medidas de concordancia: el índice Kappa. *Cad Aten Primaria*;6:169-171
40. Ministerio de Salud Pública. (2010). Indicadores Básicos de Salud Ecuador.
41. Navarrete Parra, M. V. (2011). Extracción, Refinación, y Caracterización Físico-Química y Nutracéutica del Aceite de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis previa a la obtención del título de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias. Universidad DSpace ESPOCH, Riobamba, Ecuador, 2011.
42. Ortega-David, E., Rodríguez, A., David, A., & Zamora-Burbano, Á. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59(1), 111-118. de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169916223012>
43. Peralta, E. 2010. Producción y distribución de semilla de buena calidad con pequeños agricultores de granos andinos: chocho, quinoa, amaranto. Publicación Miscelánea No. 169. Programa Nacional de



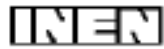
- Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. 68 p.
44. Ramos Endara, J. A. (2011). Comparación de los recuentos de las placas Petrifilm TM E. coli / Coliformes para la determinación de Coliformes totales y E. coli con el medio m-Colibblue24 para análisis de agua potable.
45. Rivadeneira Ruales, J. E. (1999). Determinación de los niveles óptimos de fertilización química en cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), en tres localidades de la Sierra ecuatoriana. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito, Ecuador.
46. Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., López-Obregaso, J. Contaminación fecal en hortalizas que se expendan en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2009; 26(1):45-48.
47. Rodríguez Cavanilli, E., Gamboa Coronao, M., Hernández Chavarría, F., & García Hidalgo, J. D. (2005). Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
48. Romero Cabello, R (2007). Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias (3^a ed., pp. 753-766). México: Editorial Medica Panamericana.
49. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2011). Sherris, Microbiología médica. México, DF.
50. Sapers, GM. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technol Biotechnol*; 39(4):305-11.
51. Soler León, J. P. (2006). Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la norma *ISO NTC 17025*. Tesis previa a la obtención del título de Microbióloga Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2006.
52. Suquilanda Valdivieso, M. B. (2013). Producción orgánica de cultivos andinos (manual técnico).



53. Tauxe, R.V. (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infect Dis*; 3(4):425-34.
54. Tipán, C. (2007). Incidencia de la contaminación microbiológica sobre la textura del grano de chocho desamargado “(*Lupinus mutabilis* Sweet) (Doctoral dissertation).
<http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/906>
55. Urrutia, G. W. (2010). Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de Aislado proteico a partir de Tarwi (*Lupinus mutabilis*). Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay, Perú.
56. Villacrés, E., Caicedo, C., & Peralta, E. (2000). Diagnóstico del procesamiento artesanal, comercialización y consumo de chocho. Zonificación Potencial, Sistemas de Producción y Procesamiento Artesanal del Chocho.
57. Villacrés, E., Rubio, A., Egas, L., & Segovia, G. (2006). "Usos alternativos del Chocho". Boletín Divulgativo N° 333, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Departamento de Nutrición y Calidad de los alimentos, Quito-Ecuador.
58. Vinuesa Sarmiento, M. G. (2011). Diseño de un suplemento nutricional a base de chocho para niños de edad escolar en la ciudad de Quito. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Universidad de las Américas, Quito, Ecuador, 2010.

ANEXOS

Anexo 1: Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2390.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2 390:2004

**LEGUMINOSAS. GRANO DESAMARGADO DE CHOCHO.
REQUISITOS.**

Primera Edición

PULSES. LUPIN UNBITTER GRAIN. SPECIFICATIONS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de alimentos, granos, granos y cereales, chocho, requisitos.
AG 05.04-415
CDU: 633.3
CIIU: 1110
ICS: 67.080

CDU: 633.3
ICS: 67.080

INEN

CIU: 1110
AG 05.04-415

Norma Técnica
Ecuatoriana
Voluntaria

LEGUMINOSAS.
GRANO DESAMARGADO DE CHOCHO.
REQUISITOS.

NTE INEN
2 390:2004
2005-09

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los requisitos de calidad que debe cumplir el grano de chocho desamargado para consumo humano.

2. DEFINICIONES

2.1 Para los efectos de esta norma, se adoptan las definiciones contempladas en la NTE INEN 2 389 y, las que a continuación se detallan:

2.1.1 Grano desamargado. Producto comestible limpio húmedo, que ha sido sometido a un proceso de desamargamiento (térmico-hídrico), de color predominantemente blanco-crema, sabor y olor característico, libre de olores extraños y del sabor amargo.

2.1.2 Grano imperfecto. Grano de chocho no hidratado, manchado interna o externamente, decolorado, delgado o desnudo y todo pedazo de grano de chocho, cualquiera que sea su tamaño.

2.1.3 Grano dañado. Grano que ha sufrido deterioro, debido a la acción de microorganismos y otras causas.

2.1.3.1 Grano dañado por microorganismos. Grano que ha sido alterado en sus características organolépticas debido a la acción de microorganismos dañinos.

2.1.3.2 Granos desnudos y/o pelados. Comprende todo grano de chocho desprovisto total o parcialmente de su cáscara (testa o cubierta).

2.1.4 Olores objetables. Todos aquellos olores diferentes del característico del grano de chocho desamargado.

2.1.5 Chocho infectado. Grano con presencia parcial o total de microorganismos vivos como hongos, bacterias y levaduras.

2.1.6 Chocho limpio. Aquel que no contiene impurezas.

2.1.7 Grado muestra. Es el grano de chocho que no cumple con los requisitos de calidad establecidos en esta norma.

3 CLASIFICACIÓN

3.1 El grano de chocho de acuerdo al porcentaje que queda retenido en los tamices de 9 mm (28/64 plg.), 8 mm (26/64 plg.) y 7 mm (25/64 plg.) (NTE INEN 1 515) se clasifica en los siguientes tipos:

3.1.1 Grano de chocho tipo I. Es aquel formado por granos de color uniforme, retenidos en una criba o zaranda de 9,0 mm de diámetro.

3.1.2 Grano de chocho tipo II. Es aquel formado por granos de color uniforme, que pasan la criba de 9,0 mm y quedan retenidos sobre la criba de 7,0 mm.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Tecnología de alimentos, granos, granos y cereales, chocho, requisitos.

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquileo Moreno E8-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

4. DISPOSICIONES GENERALES

4.1 Designación

4.1.1 El grano de chocho desamargado para el consumo humano se designa por su nombre y tipo seguido de la norma de referencia.

Ejemplo: Grano de chocho desamargado Tipo I. NTE INEN 2 390.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 El grano de chocho desamargado para el consumo humano debe cumplir los requisitos indicados en las tablas 1, 2 y 3.

TABLA 1: Composición química proximal del chocho desamargado

REQUISITOS	UNIDAD	VALOR	MÉTODO DE ENSAYO
Humedad	%	72 – 75	INEN 1 235
Materia Seca	%	28 – 25	INEN 1 235
Proteína	%	50 – 52	AOAC 955.04
Grasa	%	19 – 24	AOAC 920.85
Fibra	%	7 – 9	AOAC 962.09
Cenizas	%	1,9 – 3,0	AOAC 942.05
ELN. (ver nota 1)	%	12,0 – 22,0	Por diferencia
Energía	cal/g	5 369 – 6 476	Aplicación de la Ecuación 1
Alcaloides	%	0,02 – 0,07	Von Baer, D. y colaboradores. 1979 (ver nota 2)

Nota 1: ELN. = Extracto Libre de Nitrógeno = $100 - (\text{fibra} + \text{proteína} + \text{grasa} + \text{cenizas})$.
Nota 2: Método modificado por Vera, C., Escuela Politécnica Nacional, 1982, Quito.

TABLA 2: Análisis microbiológico del chocho desamargado

REQUISITOS	UNIDAD	VALOR	MÉTODO DE ENSAYO
Recuento aerobios totales	UFC/g	$18 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	NTE INEN 1 529-5
Recuento coliformes totales	NMP/g	$10 - 10^2$	NTE INEN 1 529-7
Recuento de hongos y levaduras	UFC/cm ²	$0 - 5 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-10
<i>Escherichia coli</i>		Ausencia	NTE INEN 1 529-8
Tipificación <i>E. Coli</i> 0157 HT		Ausencia	NTE INEN 1 529-8

UFC = Unidades Formadoras de Colonias.
NMP = Número Más Probable.

TABLA 3: Análisis físico del chocho desamargado

REQUISITOS	UNIDAD	VALOR
Chucho dañado (clima), máx.	%	0,2
Chucho dañado (insectos), máx.	%	0,2
Con alteración de color, máx.	%	0,2
Material vegetal extraño, máx.	%	0,05
Material mineral, máx.	%	0,001

5.1.2 El grano de chocho desamargado para el consumo humano debe estar libre de contaminantes químicos.

(Continúa)

NTE INEN 2 390

2005-09

5.1.3 El color, sabor, olor del grano de chocho desamargado para el consumo humano se determina por evaluación sensorial, de acuerdo con las especificaciones de calidad del producto, establecidas en la tabla 4:

TABLA 4: Especificaciones de calidad del producto desamargado mediante el proceso térmico-hídrico

Descripción	Producto comestible limpio húmedo
Presentación	Natural, uniforme, color blanco-crema preferentemente
Olor	Característico, libre de olores extraños
Sabor	Característico del chocho, libre del sabor amargo

5.2 Requisitos complementarios

5.2.1 La temperatura ambiente en el área de pesado, empaçado y sellado no debe pasar de los 17°C.

5.2.2 Comercialización

5.2.2.1 Selección. El grano de chocho desamargado debe ser seleccionado antes del empaçado; en esta etapa se elimina granos de mala calidad. El grano debe presentar un color blanco-crema preferentemente, uniforme, sabor y olor característicos. El grano de color azulado y/o verde, al igual que otros defectos detectables visualmente en estado húmedo, debe ser separado y desechado.

5.2.2.2 Pesada. La pesada debe realizarse en forma aséptica, para evitar que el grano se contamine.

5.2.3 Disposiciones sobre la presentación

5.2.3.1 El contenido de cada envase debe ser homogéneo y estar constituido únicamente por granos de chocho desamargado del mismo origen genético, calidad y tipo.

5.2.4 Almacenamiento. Para prolongar la vida útil del producto al granel o en bolsas de plástico, el grano se debe mantener en refrigeración. También se puede congelarlo, en este caso se produce una ligera modificación de la textura a partir de los seis meses de almacenamiento.

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo

6.1.1 El muestreo se efectuará de acuerdo a la NTE INEN 1 233.

6.2 Aceptación o rechazo

6.2.1 Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos indicados en esta norma, se considera no apta para el consumo humano y se rechaza el lote.

6.2.2 En caso de discrepancia, se repetirán los ensayos sobre la muestra reservada para tales efectos.

6.2.2.1 Cualquier resultado no satisfactorio en este segundo caso, será motivo para rechazar el lote.

6.3 La inspección del grano desamargado de chocho para consumo humano debe ser efectuado por la autoridad competente, quien elaborará su informe basado en las normas establecidas en nuestro país o país de origen.

(Continúa)

7. MÉTODOS DE ENSAYO

7.1 Cálculo de la energía. Se realiza aplicando la siguiente ecuación:

$$E = [(grasa \times 0,0972) + (proteína \times 0,0539) + (fibra \times 0,0458) + (ELN \times 0,0422)] \times 1\,000 \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde:

E = energía, cal/g.

7.1.1 Los resultados obtenidos son similares a los realizados con la bomba calorimétrica.

7.2 Determinación de alcaloides

7.2.1 Determinación cuantitativa de alcaloides [Bon Vaer D. y colaboradores, 1979 (Método modificado por la Escuela Politécnica Nacional, por Vera, C. Julio, 1982, Quito)]

7.2.1.1 Procedimiento

- Pesar 0,2 g de muestra de chocho previamente molida y homogenizada en un mortero.
- Agregar 0,6 g de Óxido de Aluminio Básico, mezclar bien hasta formar un polvo impalpable.
- Añadir 0,2 ml de KOH al 15%, mezclar bien hasta formar una pasta homogénea.
- Transferir a tubos de centrifuga y agregar 6 ml de cloroformo p.a. Mezclar con una varilla y centrifugar por 2 minutos (entré 1 500 y 3 000 rpm).
- Recibir la fase clorofórmica en vasos perfectamente limpios provistos de embudos con algodón en la base del cono, repetir las extracciones por lo menos 10 veces, hasta que 1 ml del último extracto evaporado a sequedad en un vaso de 50 ml, suspendido en 4 ó 5 gotas de ácido sulfúrico 0,01N presente reacción negativa con 3 ó 4 gotas del reactivo de Dragendorff.
- Se lava el embudo por dentro y por fuera con aproximadamente 15 ml de cloroformo.
- Se recogen todos los lavados en el vaso de los extractos, evaporar con calor suave sin llegar a sequedad, dejando en la etapa final 1 ml, que desaparecerá rápidamente al enfriar en un recipiente con agua fría.
- Se agrega 5 ml de ácido sulfúrico 0,01N, dos gotas de rojo de metilo y se titula el exceso de ácido con NaOH 0,01N.
- El contenido de alcaloides se reporta como lupanina.

7.2.1.2 Cálculos

1 ml de H_2SO_4 0,01N equivale a 2,48 mg de lupanina.

$$\% \text{ alcaloides} = \frac{V \text{ } H_2SO_4 \text{ gastado} \times N \text{ } H_2SO_4 \times 24,8 \times \text{factor de corrección}}{\text{Masa de la muestra}} \quad (\text{Ec. 2})$$

8. ENVASADO

8.1 Los granos de chocho desamargados deben envasarse de tal manera que se proteja adecuadamente el producto.

8.2 El material empleado dentro de los envases debe ser nuevo, limpio y de calidad tal que evite cualquier daño externo o interno al producto.

8.3 Los envases deben satisfacer las características de calidad, higiene, ventilación y resistencia para asegurar una manipulación, transporte y conservación adecuados de los granos de chocho desamargado. Los envases deben estar exentos de cualquier materia u olor extraños.

8.4 El empaquete se debe realizar en condiciones asépticas.

(Continúa)

NTE INEN 2 390

2005-09

9. ROTULADO

9.1 Si el producto no es visible para el consumidor, el contenido de cada envase debe llevar una etiqueta con el nombre del alimento, pudiendo constar también el nombre de la variedad.

9.2 Se permite el uso de materiales, en particular papel o sellos, que lleven las especificaciones comerciales, siempre y cuando estén impresos o etiquetados con tinta o pegamento no tóxicos.

9.3 Se verificará el sellado y etiquetado correcto de los empaques. En la etiqueta debe constar la fecha de elaboración, caducidad, peso neto e Información nutricional del grano.

9.4 Fecha de caducidad (expiración):

- | | |
|---|----------|
| - En funda de polietileno y en condiciones ambientales: | 2 días |
| - En funda de polietileno y en refrigeración: | 10 días |
| - En funda de polietileno y en congelación: | 180 días |

(Continúa)

-5-

2004-011

NTE INEN 2 390

2005-09

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 233:1995	Granos y cereales. Muestreo.
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 235:1987	Granos y cereales. Determinación del contenido de humedad.
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 515:1987	Granos y cereales. Cribas metálicas o zarandas y tamices. Tamaño nominal de la abertura.
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-5:1990	Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de microorganismos aerobios mesófilos REP
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-7:1990	Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-8:1998	Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y E. coli.
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-10:1998	Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad.
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 389:2004	Leguminosas. Grano amargo de chocho. Requisitos.

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1 559:2004 Granos y cereales. Cebada. Requisitos. (1 Rev.) Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. Quito, 2004.

Caloedo, C., Peralta, E., Villacrés, E., Rivera, M. Poscosecha y Mercadeo de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Programa Nacional de Leguminosas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, 2 001.

Caloedo, C., Peralta, E. Zonificación Potencial, Sistemas de Producción y Procesamiento Artesanal del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Programa Nacional de Leguminosas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, 2 000.

Organización Mundial de la Salud FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Programa Conjunto Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Codex Alimentarius. Vol. 5B. Roma, 1 994.

The Association of official analytical chemists – AOAC. Official Methods of Analysis. Edited by Kenneth Helrich. Virginia, 1990.

Gross, R. El cultivo y la utilización del tarwi - *Lupinus mutabilis* Sweet. Estudio FAO: Producción y protección vegetal. Editorial GTZ. Roma, 1 982.

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1 560:1987 Granos y cereales. Lenteja en Grano. Requisitos. Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. Quito, 1987.

Von Baer, Dietrich Reimerdes, E. y Feldheim W. Método titrimétrico. Z. Lebensm. Unters Forsch 169. Pág. 27 -31. Alemania, 1979.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 2 390	TÍTULO: LEGUMINOSAS. GRANO DESAMARGADO DE CHOCHO. REQUISITOS.	Código: AG 05.04-415
ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio: 2003-07-15	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		
Subcomité Técnico: GRANOS Y CEREALES		
Fecha de iniciación: 2003-08-13		Fecha de aprobación: 2004-02-19
Integrantes del Subcomité Técnico:		
NOMBRES:	INSTITUCIÓN REPRESENTADA:	
Ing. Eduardo Paralta (Presidente)	INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS - INIAP	
Ing. Elena Villacres	INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS - INIAP	
Ing. Milton Guerrero	ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL - EPN	
Ing. Clara Iza	SERVICIO ECUATORIANO DE SANIDAD AGROPECUARIA - SESA	
Ing. Marcelo Gallo	PRODUCTOR AGRÍCOLA	
Dra. Olga Lucero	FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH	
Ing. Mario Laverde	L'VERDE	
Ing. Hernán Naranjo	ESPE - IASA	
Srta. Karina Gavilanes	ESPOCH - INIAP	
Ing. Rosa Yépez O. (Secretaría Técnica)	INEN	
Otros trámites:		
El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 2005-07-21		
Oficializada como: Voluntaria	Por Acuerdo Ministerial No. 05 653 de 2005-08-31	
Registro Oficial No. 111 de 2005-09-26		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E5-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2) 2 501665 al 2 501691 - Fax: (593 2) 2 557515
Dirección General: E-Mail: furresia@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: colimenes@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: orevas@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: alvarez@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: gallegos@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: hacera@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: jachera@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: janchi@andinasat.net
URL: www.inen.gov.ec

Anexo 2: Establecimientos Educativos Seleccionados.

Parroquia	Establecimientos educativos seleccionados
Bellavista	Padre Carlos Crespi
	3 de Noviembre
	Francisca Dávila
	Julio Matovelle
	Federico Proaño
	Arzobispo Serrano
	Alberto Andrade
	Rafael Aguilar
Cañaribamba	Julio Abad Chica
	Aurelio Aguilar
El Batán	LDU
	Hermano Miguel
El Sagrario	Pio XII
	Ezequiel Crespo
	Otto Arosemena
	Corazón de María
El Vecino	Republica de Chile
	Luis Roberto Bravo
	Mary Coryle
	Carlos Crespi II
Gil Ramírez	Sta. Mariana de Jesús
	Alfonso Cordero
Huayna Cápac	Fe y Alegría
	San José la Salle
	Huayna Capac
	República de Colombia

	Ágora
Machangara	Mario Rizzini
	Gabriel Cevallos
Monay	Iván Salgado
	Catalina Guerrero
	CEBCI
San Blas	Manuela Cañizares
	Luis Cordero
San Sebastián	Hernán Cordero
	Reinaldo Chico
	Uruguay
	Ulises Chacón
Sucre	Remigio Romero y Cordero
	Nuestra Familia
	Bilingüe Interamericano
	Eugenio Espejo
	Panamá
Totoracocha	Abelardo Tamariz
	CEBIN
	Ricardo Muñoz
Yanuncay	Ignacio Escandón
	Leoncio Cordero
	Velasco Ibarra
	Ciudad de Cuenca
	Juan Pablo II
	Nicolás Sojos
	Liceo Americano
Hermano Miguel	Héctor Sempertegui
	Isabel Moscoso

**Anexo 3: Protocolo de Muestreo de Alimentos.**

Manual de Calidad (Standard Operating Procedure)	
SOP 5: Requisitos Técnicos	
5.4: Procedimientos pre-analíticos	
5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal	

UNIVERSIDAD DE CUENCA
Laboratorio de Alimentos y Nutrición-Facultad de Ciencias Químicas
2010

PROTOCOLO DE MUESTREO DE ALIMENTOS**GENERALIDADES DEL TIPO DE MUESTREO**

Tipo de fuente: Alimentos consumidos de venta en la vía pública

Puntos principales de venta en la vía pública: En las afueras de los Establecimientos Educativos de la ciudad de Cuenca en los que se expendan granos de chocho desamargado de consumo directo.

Método de muestreo: *Muestreo estratificado*

Se toman las muestras al azar de estratos definidos (parroquias) dentro de cada una de las cuales se hace una selección aleatoria de los Establecimientos Educativos.

Tamaño del alimento: mínimo 100g.

Número de muestras: 55 vendedores ambulantes, los cuales serán repartidos proporcionalmente al tamaño de los estratos (parroquias).

TIPOS DE MUESTRAS

Muestra primaria: 100g de grano desamargado de chocho tomado del conjunto total del alimento, cada una proveniente de los estratos seleccionados.

Muestra analítica: 25g de grano desamargado de chocho tomado de la muestra primaria.

ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En general, el análisis se hará en muestras recién recogidas. La cantidad de muestra primaria (grano desamargado de chocho) será mínimo 100g, los mismos que se colocaran en fundas estériles y serán transportados al laboratorio en hieleras. Luego se homogenizará la muestra y se tomarán 25g seleccionados por el método del cuarteo para proseguir con el análisis microbiológico el mismo que se realizará por duplicado.

Manual de Calidad (Standard Operating Procedure)

SOP 5: Requisitos Técnicos

5.4: Procedimientos pre-analíticos

5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal

Los 50g restantes de muestra se almacenarán en fundas estériles a una temperatura - 20°C.

REGISTRO DEL ALIMENTO MUESTREADO**1) IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA DE ALIMENTO****a. Identificación botánica****Código:** Número de muestra**Nombre común** Chocho**Nombre científico:** *Lupinus mutabilis* Sweet.**Familia:** Leguminosae (Fabaceae)**Género:** *Lupinus***Especie:** *mutabilis***Nombres alternativos:** Tarwi, chocho, tahuri, lupino (Rivadeneira, 1999).**Tipo de alimento**

Grupo de alimento: Cereales y productos derivados

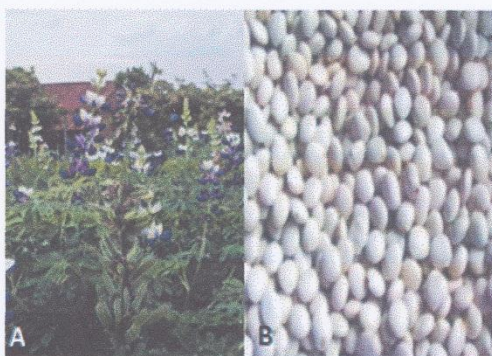
Registro gráfico:

Fig. 1: A) Planta de chocho. B) Grano de chocho. **Fuente:** (Asociación de amigos del jardín botánico de Gijón, 2011 Consultado el 05 de Febrero de 2014, de



Manual de Calidad (Standard Operating Procedure)

SOP 5: Requisitos Técnicos

5.4: Procedimientos pre-analíticos

5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal

UNIVERSIDAD DE CUENCA

Laboratorio de Alimentos y Nutrición-Facultad de Ciencias Químicas

2010

<http://www.amigosdelbotanicodegijon.com/actividades/fenologico/junio2011.asp>; Villacrés et al. 2006).

b. Identificación del alimento muestreado

DEFINICIÓN DE LA MUESTRA A RECOLECTAR

Estado de madurez

Forma: redonda u ovalada

Tamaño: 5-15 mm de largo y 6-8 mm de ancho

Color: blanco- crema (Moreno, 2008)

Método de elaboración:

Proceso de Desamargado Tradicional: comprende la selección, limpieza manual del grano, hidratación, cocción y lavado del grano. (Bacigalupo & Tapia; Tipán, 2007).

La hidratación se realiza en 24 horas y generalmente se realiza en agua de acequias, vertientes y en muy pocos casos se utiliza agua potable. La cocción se realiza en cocinas de leña o a gas y dura una hora. El lavado se realiza en agua corriente de acequias o vertientes durante cuatro o cinco días. El tiempo total para el desamargado artesanal incluye un periodo entre cinco a siete días. (Caicedo, Peralta, Villacrés & Rivera, 2001).

Conservación:

El mantenimiento del grano sumergido en agua y en refrigeración es el sistema más adecuado para prolongar la vida útil del producto (10°C). Se puede también congelar el grano, en este caso se produce una ligera modificación de la textura.

Grado de preparación: Totalmente cocinado

Medio de envasado: No aplica

Estado físico: grano completo, redondeado, solido con un tamaño de 5-15 mm de largo y 6-8 mm de ancho

Manual de Calidad (Standard Operating Procedure) SOP 5: Requisitos Técnicos 5.4: Procedimientos pre-analíticos 5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal	UNIVERSIDAD DE CUENCA Laboratorio de Alimentos y Nutrición-Facultad de Ciencias Químicas 2010
--	---

Recipiente o envoltorio: Fundas de plástico. (Pinto y Tiaguro, 2012; Caicedo et, al 2001)

2) REGISTRO DE LA PROCEDENCIA DE LA MUESTRA RECOGIDA

CODIGO:	NOMBRE COMÚN: Chocho
CIUDAD: CUENCA	FECHA DE RECOLECCIÓN:
ZONA: URBANA	HORA DE RECOLECCIÓN:
PARROQUIA:	LUGAR DE RECOLECCIÓN:
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA:	CODIGO DEL VENDEDOR:
ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA RECOLECTADA:	
FECHA DE RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO:	
DIMENSIONES FÍSICAS DEL GRANO (cm)	NÚMERO DE UNIDADES
PESO DE CADA UNIDAD (g)	PESO TOTAL DEL ALIMENTO RECOGIDO (g)
OBSERVACIONES: _____	
NOMBRE Y FIRMA DE QUIÉN COMPLETA EL REGISTRO:	FECHA DE REGISTRO:

Manual de Calidad (Standard Operating Procedure)

SOP 5: Requisitos Técnicos

5.4: Procedimientos pre-analíticos

5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal

3) DESCRIPCIÓN PROMEDIO DE LA MUESTRA RECOGIDA TOTAL**Código:** Número de muestra**Nombre común:** Chocho**Registro gráfico:****Fig. 2:** Dimensiones del grano de chocho. **Fuente:** (Autores)**Peso total del alimento recogido:** 100g**4) REGISTRO DE LA MANIPULACIÓN EN EL LABORATORIO****Código:** Número de muestra**Nombre común:** Chocho

Método de preparación para el consumo: Se basa en la previa cocción el mismo que consiste en colocar los granos de chocho en una olla cubrir con agua y llevar a ebullición. Luego reducir el calor y cocinar a fuego lento sin tapar revolviendo constantemente hasta que estén suaves.



Manual de Calidad (Standard Operating Procedure)

SOP 5: Requisitos Técnicos

5.4: Procedimientos pre-analíticos

5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal

Método utilizado para tomar muestras analíticas: el método utilizado es el de cuarteo para esto se colocara la muestra sobre una superficie limpia se revuelve varias veces con una espátula luego se divide en nueve segmentos iguales y tomar porciones de muestra de las esquinas y del centro hasta completar la muestra para realizar el análisis.

Método de mezcla y reducción: se homogeneizara la muestra seleccionada por el método del cuarteo junto con el agua de peptona utilizando una licuadora.

Tipo de almacenamiento de muestras analíticas: se conservaran en recipientes de vidrio con una tapadera hermética hasta el momento de realizar el análisis.

Adaptación del libro:

Greenfield, H y Southgate, D.A.T. "Datos de composición de alimentos, obtención, gestión y utilización". 2006. Segunda edición.



Manual de Calidad (Standard Operating Procedure)

SOP 5: Requisitos Técnicos

5.4: Procedimientos pre-analíticos

5.4.1: Protocolo de muestreo de alimentos para análisis proximal

BIBLIOGRAFÍA

Asociación de amigos del jardín botánico de Gijón. (2011). Factoría Vegetal: Altramuz, lupino, chocho. Consultado el 05 de Febrero de 2014, de <http://www.amigosdelbotanicodegijon.com/actividades/fenologico/junio2011.asp>

Bacigalupo, A., & Tapia, M.E. (s. f.). Agroindustria del Tarwi. Consultado el 27 de Noviembre de 2013, de <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro10/cap05.htm>

Caicedo, C., Peralta, E., Villacrés, E., & Rivera, M. (2001). Poscosecha y mercado de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) en Ecuador. Publicación Miscelánea.


Moreno Quiroz, K. A. (2008). Estudio sobre las características nutricionales del chocho y propuesta gastronómica. Tesis previa a la obtención del título de Licenciado en Administración Gastronómica. Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Turismo Y Preservación Ambiental, Hotelería y Gastronomía, Quito.

Pinto Tafur, L. E., & Tiaguaro Herrera, C. A. (2012). Caracterización patológica y molecular de la Antracnosis del tomate de árbol (*Solanum betacea*) y chocho (*Lupinus mutabilis*). Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, Sangolquí – Ecuador.

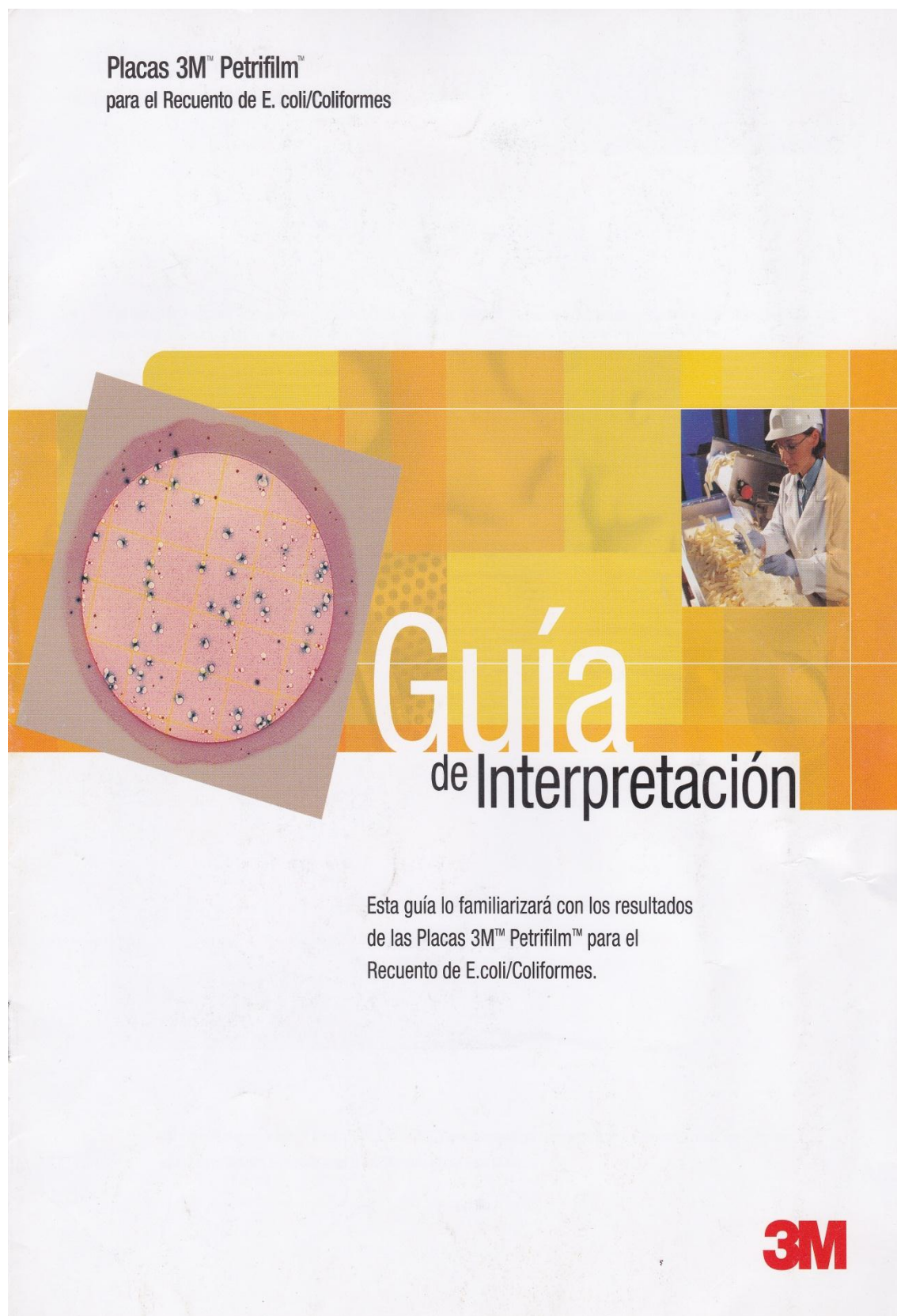
Rivadeneira Ruales, J. E. (1999). Determinación de los niveles óptimos de fertilización química en cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), en tres localidades de la Sierra ecuatoriana. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito, Ecuador.

Villacrés, E., Rubio, A., Egas, L., & Segovia, G. (2006). "Usos alternativos del Chocho". Boletín Divulgativo N° 333, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Departamento de Nutrición y Calidad de los alimentos, Quito-Ecuador.

Anexo 4: Modelo de la hoja de recolección de datos.

CODIGO: 11	NOMBRE COMÚN: Chocho
CIUDAD: CUENCA	FECHA DE RECOLECCIÓN: 23/10/2013
ZONA: URBANA	HORA DE RECOLECCIÓN: 12:20
PARROQUIA: Sacre	LUGAR DE RECOLECCIÓN: Perfigio Crespo y Lorenzo Piedra
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA: Escuela Panamá	CÓDIGO DEL VENDEDOR: 503
ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA RECOLECTADA: Almacenada en fondos estériles. Transportado en hielera	
FECHA DE RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO: 23/10/2013 Hora: 14:30	
DIMENSIONES FÍSICAS DEL GRANO (cm)	NÚMERO DE UNIDADES
1,5 x 1,3	151
PESO DE CADA UNIDAD (g)	PESO TOTAL DEL ALIMENTO RECOGIDO (g)
0,8	104,5
OBSERVACIONES: Vendedor transportaba los chochos en un carro metálico. Tenía el cabello corto, los uñas cortas aparentemente sucias, con las mismas manos recibía el dinero. No usa guantas y con la misma mano recibía el dinero	
NOMBRE Y FIRMA DE QUIÉN COMPLETA EL REGISTRO:	FECHA DE REGISTRO:
 Mauricio Sanmartín	23/10/2013

Anexo 5: Guía de interpretación Placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento de *E. coli* / Coliformes.



Placas™ 3M Petrifilm™ para el Recuento de E. coli/Coliformes

Las Placas 3M™ Petrifilm™ para el Recuento de E.coli/Coliformes (Placa Petrifilm™ EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las E. coli (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por E. coli y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las E. coli producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm™ EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC Internacional y el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bacilos gram-negativos que producen ácido y gas durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm™ EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.



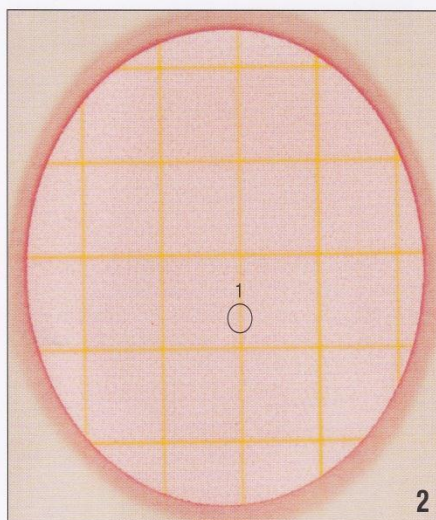
E. coli = 49 (colonias azules con gas)

Total coliformes = 87 (colonias rojas y azules con gas)

La identificación de los coliformes puede variar de país a país (ver la sección de incubación y temperaturas en las "Recomendaciones de uso").

Método validado por la AOAC Internacional

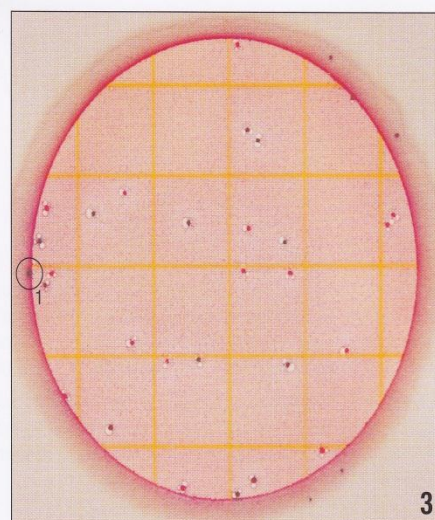
(NO use esta placa sola para la detección de E. coli O157. Como la mayoría de otros medios para enumeración de E. coli coliformes, esta placa no indicará específicamente si está presente alguna cepa O157).



No crecimiento = 0

Observe el cambio de color del gel de las figuras 2 a 8. Mientras el recuento de *E. coli* o coliformes aumenta, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado.

Las burbujas del fondo son características del gel y no son el resultado del crecimiento de *E. coli* o coliformes. Ver el círculo 1.

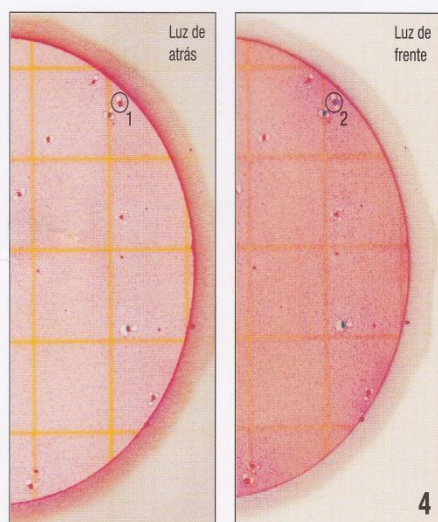


Recuento de *E. coli* = 13

Recuento Coliformes Totales = 28

El rango de recuento de la población en las Placas Petrifilm™ EC es de 15 a 150.

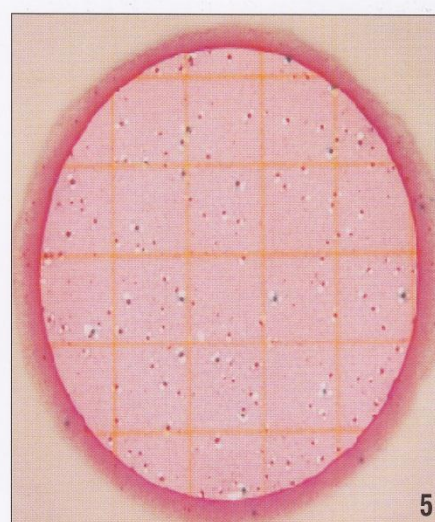
No cuente las colonias que aparecen sobre la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo. Ver el círculo 1.



Recuento de *E. coli* = 3

Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia.

El círculo 1 muestra una colonia rojo-azul cuyo conteo se hizo con luz de atrás. El círculo 2 muestra la misma colonia con luz de frente. El azul precipitado es más evidente en el círculo 2.

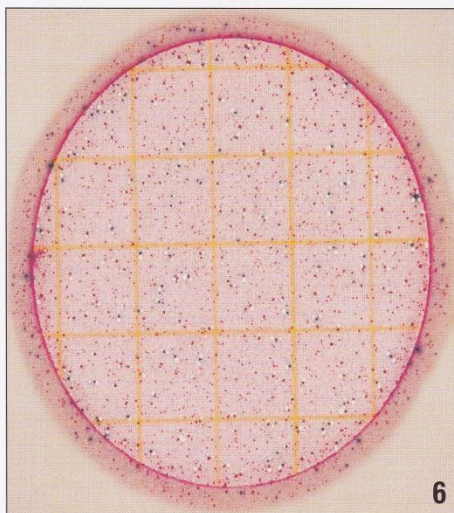


Recuento de *E. coli* = 17

Recuento estimado de Coliformes Totales = 150

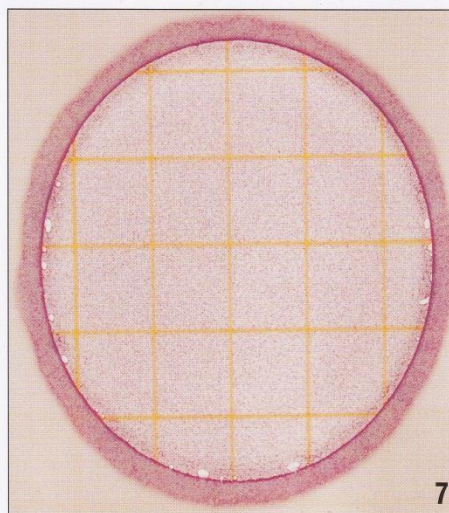
El área circular de crecimiento es de aproximadamente 20 cm². El recuento estimado se puede hacer en las placas que contienen más de 150 colonias, al contar el número de colonias en uno o más de los cuadrados representativos y al determinar el promedio por cuadrado. Multiplique el número promedio por 20 y determine el conteo estimado por placa.

MNPC (Muy Numerosas Para Contar):
para obtener un recuento más preciso, diluya más la muestra



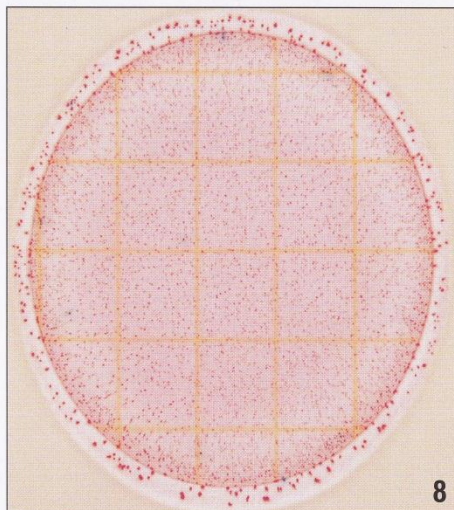
Recuento aprox. $\sim 10^6$

Las Placas Petrifilm™ EC con colonias que son MNPC, tienen una o más de las siguientes características: Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y el oscurecimiento del gel de un color rojo a un azul púrpura.



Recuento aprox. $\sim 10^6$

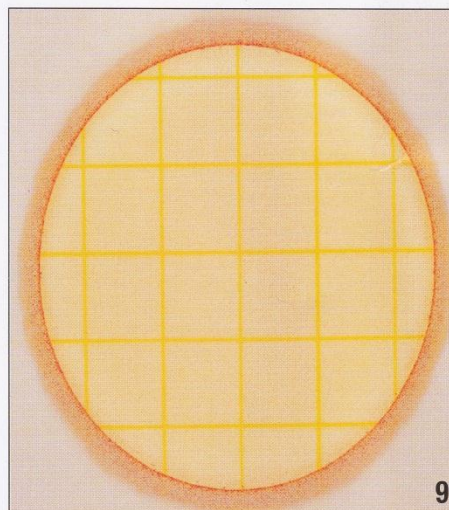
Una alta concentración de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se haga azul púrpura.



Recuento presuntivo de *E. coli* ~ 8

Recuento estimado de Coliformes Totales aprox. $\sim 10^6$

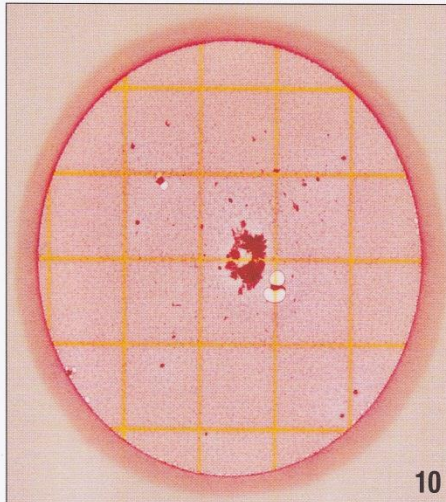
Cuando existen niveles altos de coliformes (10^6), algunos tipos de *E. coli* pueden producir menos gas y las colonias azules pueden ser menos definitivas. Cuente todas las colonias azules sin gas y/o zonas azules como *E. coli* presuntiva. Si es necesaria la confirmación, aísle las colonias azules sin gas para su posterior identificación.



Recuento aprox. $\sim 10^6$

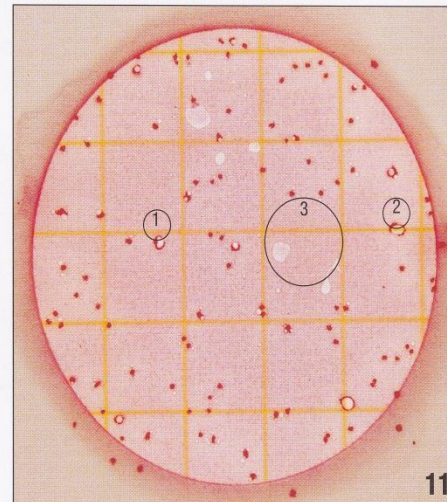
Cuando un número alto de organismos no-coliformes, como las *Pseudomonas*, estén presentes en las Placas Petrifilm™ EC, el gel puede volverse amarillo.

Burbujas



Recuento total de coliformes = 3

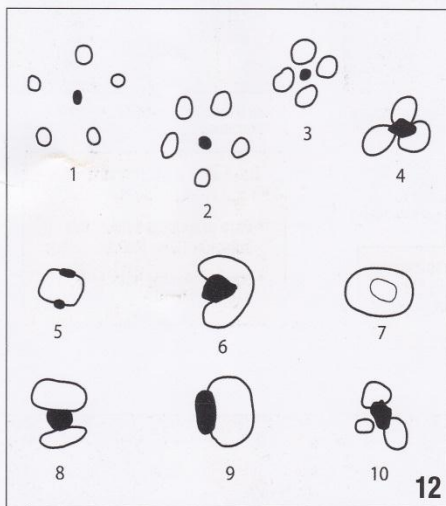
Las partículas de alimento tienen forma irregular y no tienen burbujas de gas.



Recuento Coliformes Totales = 78

Los patrones de burbujas pueden variar. El gas puede romper la colonia y así, esta última 'delinea' a la burbuja. Vea los círculos 1 y 2.

Las burbujas pueden aparecer como resultado de una inoculación impropia o de aire atrapado dentro de la muestra. Tienen forma irregular y no se asocian con una colonia. Vea el círculo 3.



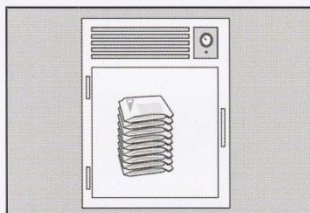
Los ejemplos 1 a 10 muestran varios patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Todas deben ser enumeradas.

3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli / Coliformes

Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

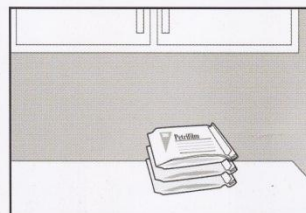
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas 3M™ Petrifilm™ tienen un tiempo de vida útil de **18 meses** desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.

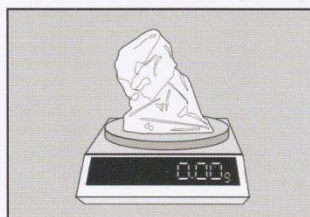


2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ($\leq 77^{\circ}\text{F}$) y una humedad relativa $\leq 50\%$. **No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos.** Utilice las Placas Petrifilm™ máximo un mes después de abierto el paquete.

Preparación de la muestra



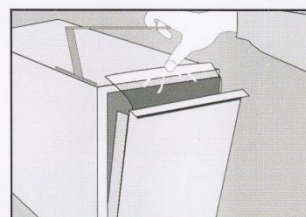
4 Prepare una dilución de una muestra de alimento.* Pese o pipetee la muestra en un recipiente adecuado, como una bolsa Stomacher, una botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado.

*Vea las indicaciones para Productos Lácteos y Jugos.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/l de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; solución salina de peptona (método ISO 6887); buffer de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

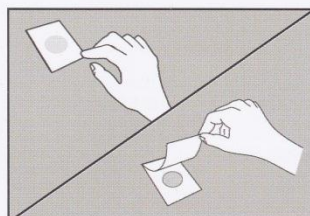


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

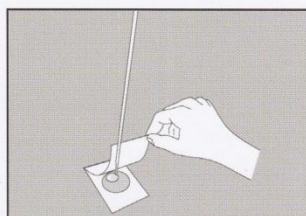
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

- Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
- Para productos básicos: use solución 1N de HCL.

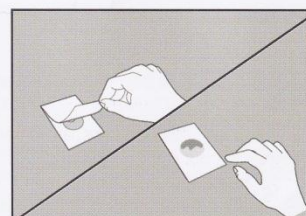
Inoculación



7 Coloque la Placa Petrifilm™ en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.



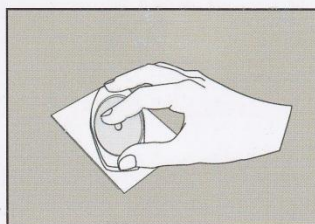
8 Con la Pipeta Electrónica 3M, o una pipeta equivalente perpendicular a la Placa Petrifilm™, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película inferior. **Asegúrese de no tocar la placa con la punta de la pipeta.**



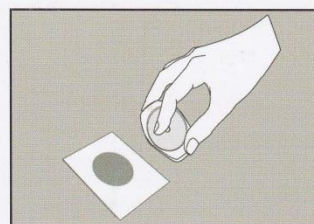
9 Baje con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire. **No la deje caer.**



10 Con el lado **liso** hacia abajo, coloque el dispensador en la película superior sobre el inóculo.

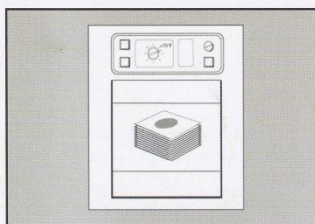


11 Presione **suavemente** el dispensador para distribuir el inóculo sobre el área circular. No gire Ni deslice el dispensador.



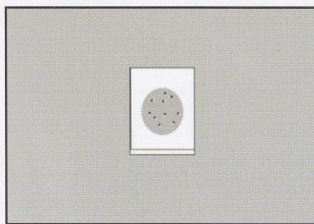
12 Levante el dispensador. Espere, por lo menos un minuto, a que solidifique el gel.

Incubación

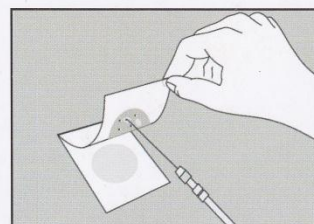


13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas Petrifilm™ pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de Interpretación para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su posterior identificación. Levante la película superior y tome la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos aprobados más conocidos son:

• **AOAC método oficial 991.14**

Para coliformes:

Incubar 24 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C.

Para E. coli:

Incubar 48 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C.

• **AOAC método oficial 998.08**

Para E. coli (carnes, aves, mariscos):

Incubar 24 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C.

• **Método NMKL (147.1993)**

Para coliformes:

Incubar 24 h \pm 2 h a 37 °C \pm 1 °C.

Para E. coli:

Incubar 48 h \pm 2 h a 37 °C \pm 1 °C.

Comentarios adicionales

• Nota: Recuerde inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente Placa.

• Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: www.3M.com/microbiology.

RMC

Reactivos y Medios de Cultivo

Cdla. Profesor Aguirre Abad Mz. 1A SL.49
junto a edificio TAMASA

Telfs: 2283282 - 2283270 - 2291671

2291673 - Fax: (593-4) 2294346

E-mail: acrespo@rmc-ec.com

Sucursal Quito: Av. América N35-29 y Hernández Girón
Ofic. 303 - Telefax: 2448290 - 2448292

3M

3M Argentina
0800 333 3547
541 1 4469 8200

3M Bolivia
800 102 102
59 13 3412 195

3M Brasil
0800 155150
551 9 3838 7000

3M Chile
562 4 1037 46

3M Costa Rica
506 22771000 Fax.
506 22603838

3M Colombia
01800113636
571 410 8555

3M Ecuador
593 42800 777

3M El Salvador
503 22100834

3M República Dominicana
1809 530 6560
ext 318, 322 499

3M Guatemala
502 2379 3636

3M Honduras
50 45 5187 77

3M Jamaica
87 69 37 38 5965

3M México
52 55 52 702216
52 55 52 702212
01800 700 9600

3M Nicaragua
5052 6529 88

3M Panamá
50 72 36 52 22

3M Paraguay
5952 16 19 9229

3M Perú
51 12 2427 28

3M Puerto Rico
78 76 2046 00

3M Trinidad
1868 62 38 917

3M Uruguay
59 82 4093 341 ext 228

Petrifilm es una marca registrada de 3M.
Favor reciclar.
© 3M 2009.
Reservados todos los derechos.
70-2008-8105-3

Anexo 6: Guía de interpretación Placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento de Aerobios (Cuenta total en placa o aerobios mesófilos).

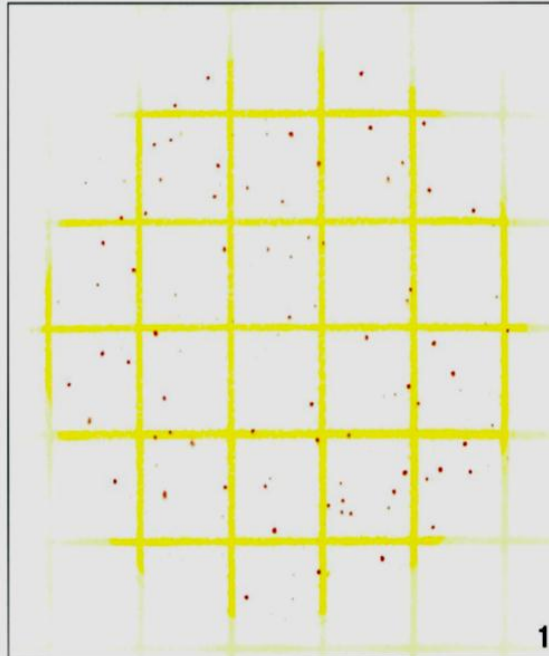


Placas 3M Petrifilm™

Placas para el Recuento de Aerobios AC

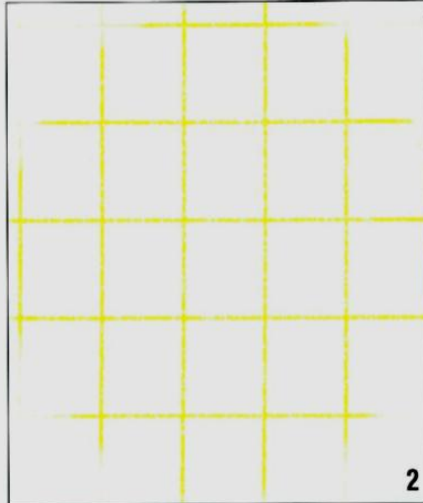


Las Placas 3M™ Petrifilm™ para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) son un medio de cultivo listo para usar, que contiene los nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento total de bacterias aerobias en productos, superficies, etc.



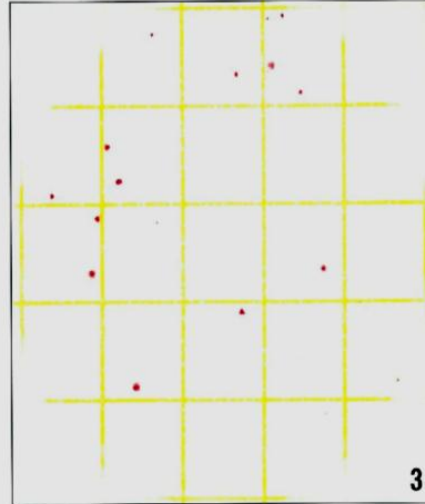
Conteo de Bacterias Aerobias =152

El indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuente todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.



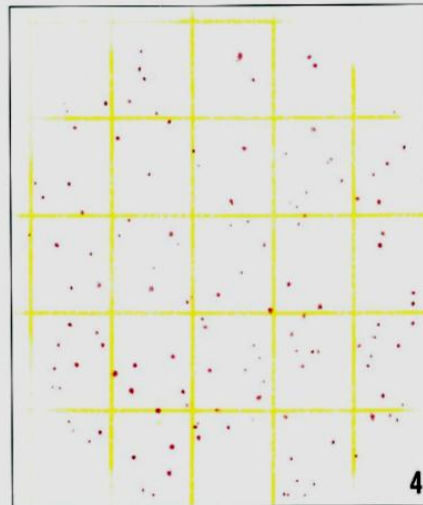
Conteo de Bacterias Aerobias = 0

La Placa Petrifilm™ para Recuento de Aerobios Totales es de fácil interpretación. La figura 2 muestra una placa sin crecimiento de colonias.



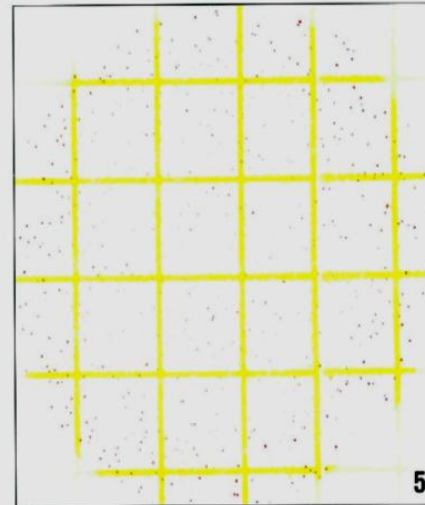
Conteo de Bacterias Aerobias = 16

La figura 3 muestra una Placa Petrifilm™ AC con crecimiento bajo de colonias.



Conteo de Bacterias Aerobias = 143

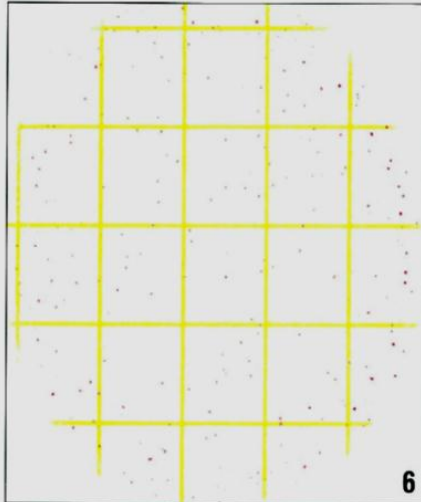
El rango recomendado de conteo en la Placa Petrifilm™ AC está entre 25-250 colonias. Obsérvese la figura 4.



Conteo de Bacterias Aerobias = 560 "estimado"

Cuando el número de colonias es mayor a 250 (como se puede observar en la figura 5), por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1 cm^2) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación de Petrifilm™ AC es de 20 cm^2 .

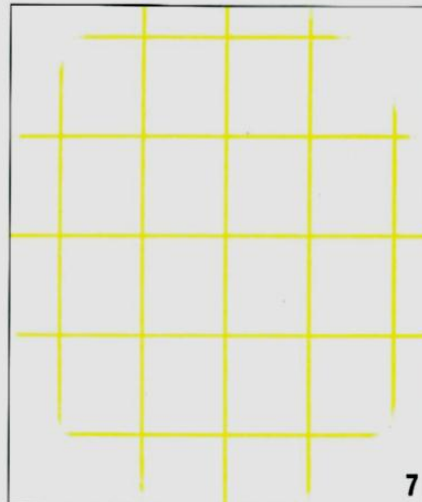
**MNPC (muy numeroso para contar):
para obtener mejores resultados, diluya su muestra.**



Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC

Conteo estimado: 10^9

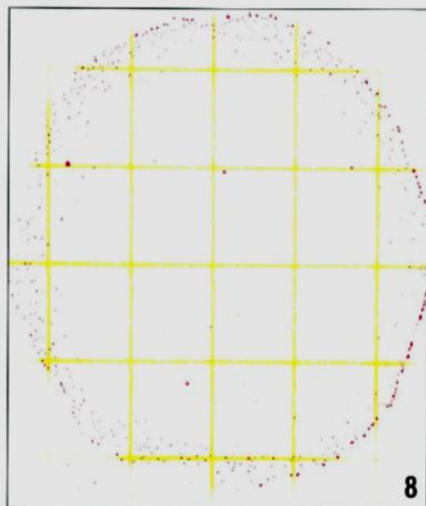
La figura 6 muestra una Placa Petrifilm™ AC con colonias muy numerosas para contar.



Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC

Conteo estimado: 10^9

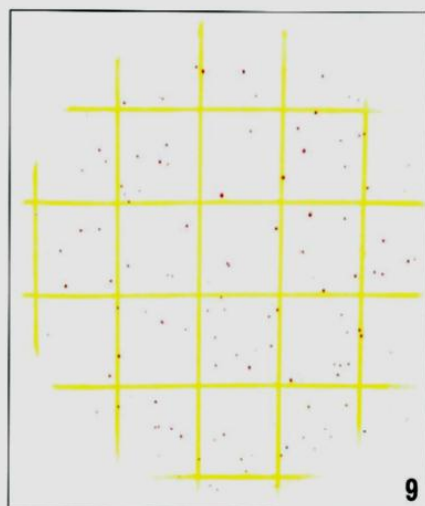
Con recuentos muy altos, el área total de crecimiento puede virar o tornarse rosa, como se muestra en la figura 7. Usted podría observar colonias individuales sólo en el borde del área de crecimiento. Registre este resultado como muy numeroso para contar (MNPC).



Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC

Conteo estimado: 10^9

Ocasionalmente, la distribución de las colonias puede aparecer de forma desigual, no homogénea, como se muestra en la figura 8. Esto también es una indicación de un resultado MNPC.

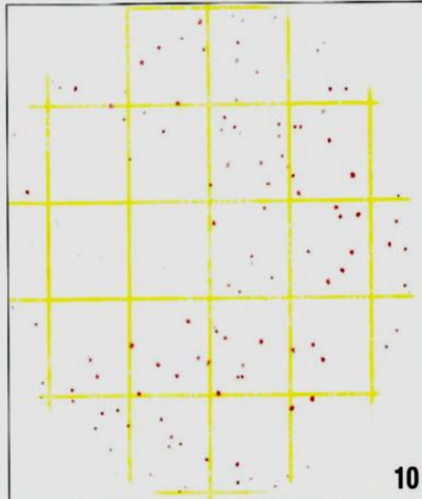


Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC

Conteo estimado: 10^9

Las colonias de la figura 9 podrían confundirse como contables a primera vista. Sin embargo, si usted observa detalladamente el borde o filo del área de crecimiento, podrá visualizar una alta concentración de colonias. Registre este resultado como MNPC.

Licuefacción del gel y partículas de productos

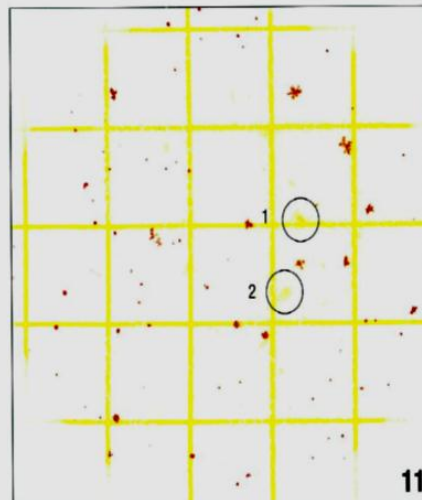


Conteo de Bacterias Aerobias = 160

Como se aprecia en la figura 10, algunas especies de bacterias pueden llegar a licuar el gel de las Placas Petrifilm™ AC.

Cuando esto ocurra:

1. Determine el promedio en los cuadros no afectados y estime los resultados.
2. Realice conteos preliminares para verificar el crecimiento; la licuefacción generalmente se presenta de manera tardía.



Conteo de Bacterias Aerobias = 83

Debido a que en las Placas Petrifilm™ AC las colonias de aerobios se tiñen de rojo, se las puede diferenciar de partículas o residuos de producto, ya que éstos tienen una forma irregular y color opaco (observe los círculos 1 y 2 de la figura 11).

Placas 3M™ Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios

Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

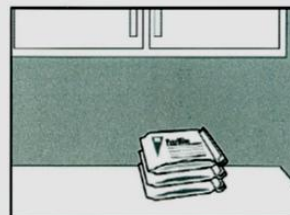
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas 3M™ Petrifilm™ tienen un tiempo de vida útil de **18 meses** desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.

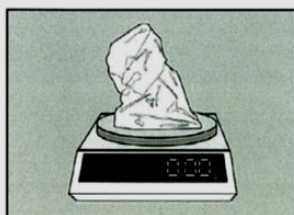


2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y sellelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ($\leq 77^{\circ}\text{F}$) y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas 3M™ Petrifilm™ máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelos en congelación. Para usar las placas, saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes descritas hasta su fecha de caducidad.

Preparación de la muestra



4 Prepare una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipetelee la muestra en un contenedor apropiado de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/l de KH_2PO_4 , y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; solución salina de peptona (método ISO 6887); buffer de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfato o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

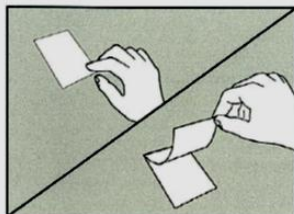


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

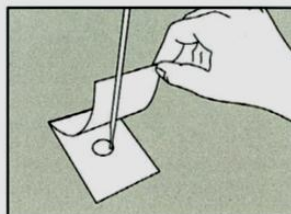
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

- Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
- Para productos básicos: use solución 1N de HCL.

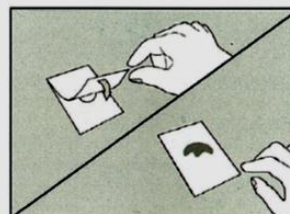
Inoculación



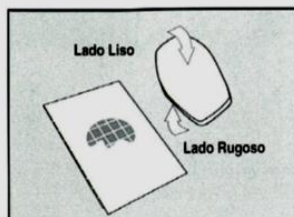
7 Coloque la Placa 3M™ Petrifilm™ en una superficie plana y nivelada. Levante la lámina semitransparente superior.



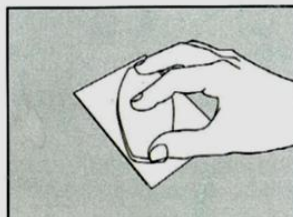
8 Con la Pipeta Electrónica 3M, o una pipeta equivalente perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película inferior. Asegúrese de no tocar la placa con la punta de la pipeta.



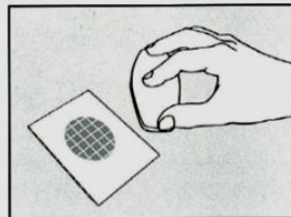
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.



10 Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispensador o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

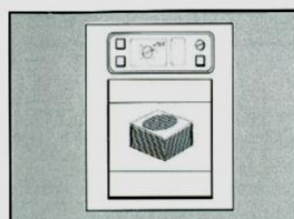


11 Presione suavemente el dispensador o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No gire ni deslice el dispensador. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.



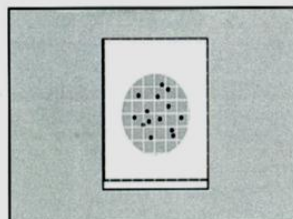
12 Levante el dispensador o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

Incubación

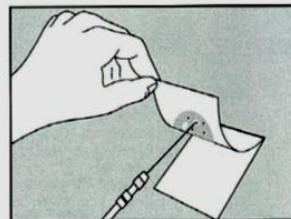


13 Incube sin necesidad de invertir las placas en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente de agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas 3M™ Petrifilm™ pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de interpretación para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

El tiempo de incubación y las temperaturas varía según el método.

El método mas conocido es:

- **AOAC método oficial 986.33**
(leche y productos lácteos)
Incubar 48 hrs. (± 3 hrs.) a 32°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- **AOAC método oficial 990.12**
Incubar 48 hrs. (± 3 hrs.) a 35°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- **AFNOR método validado 3M 01/1-09/89**
Incubar 72 hrs. (± 3 hrs.) a 30°C .
- **Método MNKL 146.1993**
Incubar 72 hrs. (± 3 hrs.) a 30°C .

Comentarios adicionales

- Nota: Recuerde inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente Placa.
- Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: www.3M.com/microbiology

RMC

Reactivos y Medios de Cultivo

Cdla. Profesor Aguirre Abad Mz. 1A SL.49

junto a edificio TAMASA

Telfs: 2283282 - 2283270 - 2291671

2291673 - Fax: (593-4) 2294346

E-mail: acrespo@rmc-ec.com

Sucursal Quito: Av. América N35-29 y Hernández Girón

Ofic. 303 - Telefax: 2448290 - 2448292

3M

3M Argentina
0800 333 3547
541 1 4469 8200

3M Bolivia
800 102 102
59 13 3412 195

3M Brasil
0800 155150
551 9 3838 7000

3M Chile
562 4 1037 46

3M Costa Rica
506 22771000 Fax.
506 22603838

3M Colombia
01800113636
571 410 8555

3M Ecuador
593 42800 777

3M El Salvador
503 22100834

3M República Dominicana
1809 530 6560
ext 318, 322 499

3M Guatemala
502 2379 3636

3M Honduras
50 45 5187 77

3M Jamaica
87 69 37 38 5965

3M México
52 55 52 702216
52 55 52 702212
01800 700 9600

3M Nicaragua
5052 6529 88

3M Panamá
50 72 36 52 22

3M Paraguay
5952 16 19 9229

3M Perú
51 12 2427 28

3M Puerto Rico
78 76 2046 00

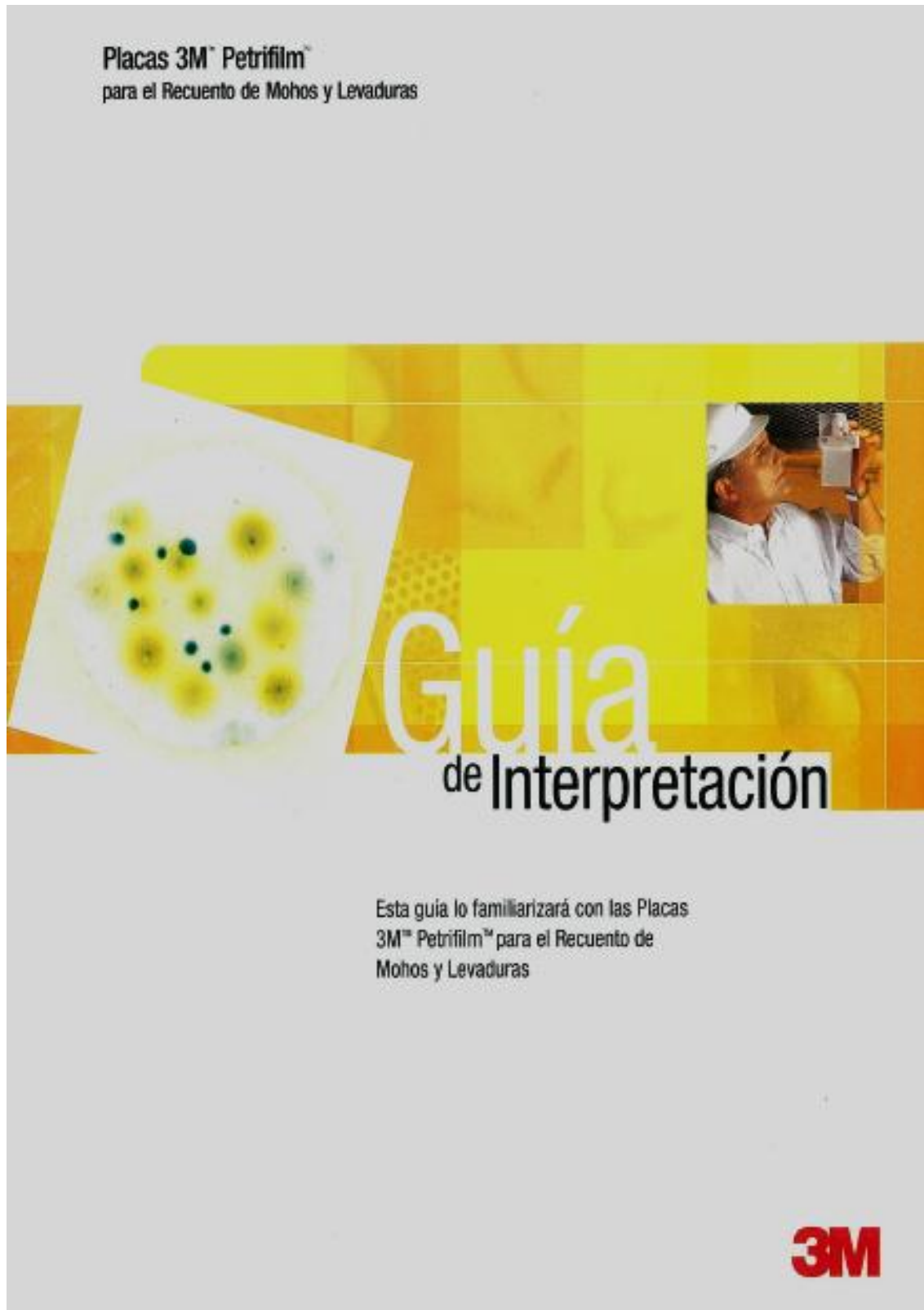
3M Trinidad
1868 62 38 917

3M Uruguay
59 82 4093 341 ext 228

3M Venezuela
02012 95 78 039

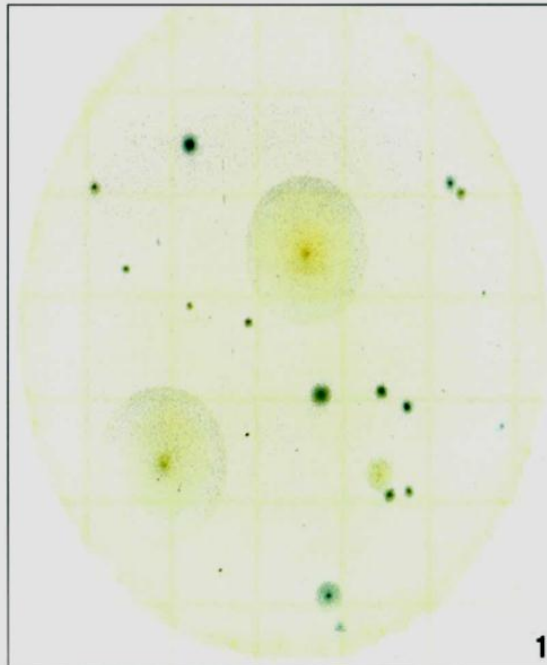
Petrifilm es una marca registrada de 3M.
Favor reciclar.
© 3M 2009.
Reservados todos los derechos.
70-2008-8102-0

Anexo 7: Guía de interpretación Placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento de Mohos y Levaduras.



Placas 3M PetrifilmTM Para el Recuento de Mohos y Levaduras

Las Placas 3MTM PetrifilmTM para Recuento de Mohos y Levaduras (Yeast & Molds, YM) son un medio de cultivo listo para usarse, que contienen nutrientes de Saboraud, dos antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de fosfatos (BCIP) que promueve el contraste y facilita el recuento de las colonias.



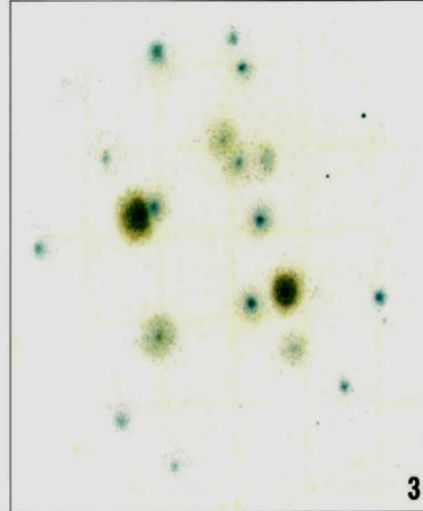
Recuento total = 20
Recuento de Levaduras = 16
Recuento de Mohos = 4

La Placa 3MTM PetrifilmTM de la Figura 1 contiene colonias tanto de Mohos como Levaduras.



Recuento de Mohos y Levaduras = 0

En la Figura 2 se muestra una Placa 3M™ Petrifilm™ sin crecimiento de Mohos ni Levaduras.

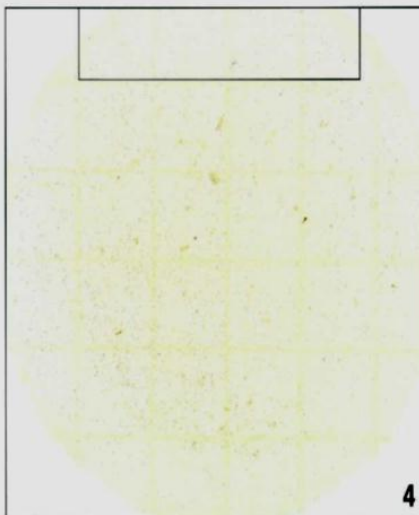


Recuento estimado total 500

Recuento estimado de Levaduras 480 /

Recuento de Mohos = 21

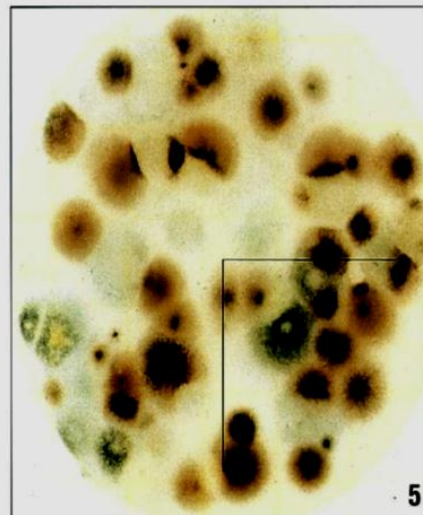
Cuando el número de colonias es mayor a 150, el recuento debe ser estimado. Determine el promedio de colonias en 1 cuadrado de la placa (1 cm²) y multiplíquelo por 30 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación de 3M™ Petrifilm™ es de 30 cm². Las colonias de levaduras pueden tomar diversos tonos, desde color beige (como se ve en esta foto) hasta rosa, o color azul verdoso.



Recuento de Levaduras = MNPC

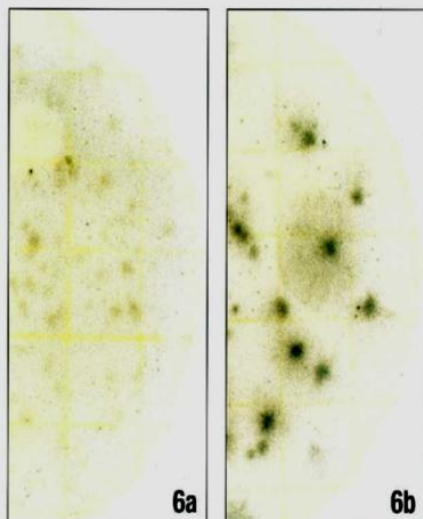
Recuento estimado de Levaduras >10⁴

La Figura 4 corresponde a una Placa 3M™ Petrifilm™ que es muy numerosa para contar (MNPC). Las colonias azules pequeñas (resaltadas en el recuadro) del borde del área de crecimiento se encuentran presentes a través de toda la placa, pero menos visibles.



Recuento estimado de Mohos = 64

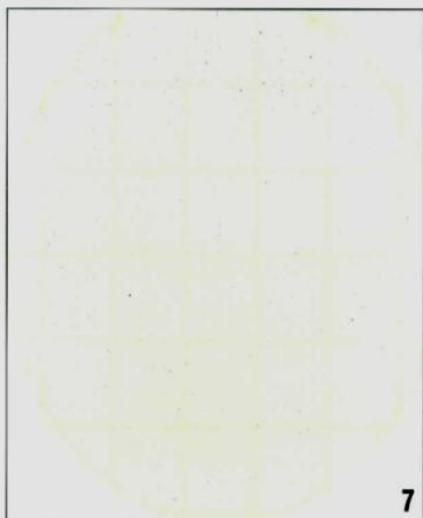
Las colonias de Mohos de la Figura 5 están empezando a unirse y superponerse una encima de otra en la placa. Cuente cada margen de colonia o enfoque. La placa se puede dividir en secciones para facilitar el recuento. En este ejemplo aproximadamente 1/4 de la placa se ha contado, luego se multiplicó este valor por 4, para obtener el recuento estimado de esta placa. La sección dividida contiene 16 Mohos.



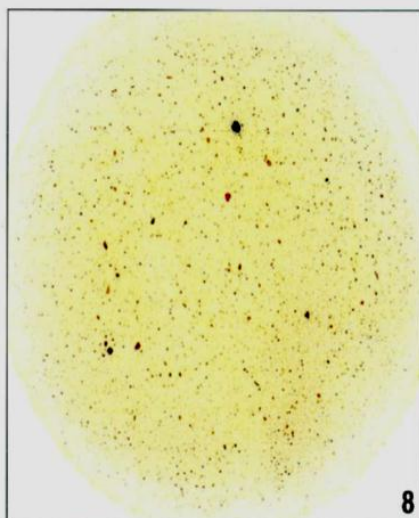
Recuento de Mohos MNPC / Recuento de Mohos = 64

Las Placas que se muestran en las Figuras 6A y 6B son de la misma muestra. La Figura 6A corresponde a una dilución 1:10 y tiene colonias que son muy pequeñas, tenues y numerosas, haciendo muy difícil su recuento. La Figura 6B corresponde a la dilución 1:100 y evidencia cómo diluyendo las muestras se pueden obtener placas con crecimientos deseables (15 – 150), lo que facilita el recuento. Como en la mayoría de los medios de crecimiento, en un medio ambiente altamente competitivo (como la figura 6A) el crecimiento típico de las colonias se va a ver inhibido. Para muestras altamente contaminadas como ésta, se recomienda hacer mayores diluciones para obtener conteos más exactos y poder observar crecimientos típicos del crecimiento de las colonias (como se puede ver en la figura 6B).

Reacción de Fosfatasa



Recuento de Mohos y Levaduras = 0



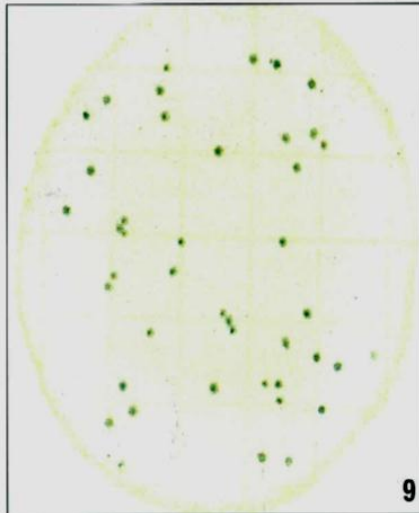
Recuento de Mohos y Levaduras = 0

La Placa 3M™ Petrifilm™ cuenta con un indicador de fosfatasa. Por eso algunos alimentos crudos y procesados que contienen fosfatasa pueden causar un cambio de color azul en el gel de la Placa 3M™ Petrifilm™. Se pueden observar dos tipos de reacciones: un color uniforme azul de fondo o puntos de color azul intenso. En la figura 7 se observa el color uniforme azul de fondo, mientras que la figura 8 se encuentran los puntos de color azul, lo que es más común en especies y productos granulados. La figura 8 evidencia partículas de alimento que produjeron fosfatasa. Para reducir la reacción de fosfatasa, siga una de las siguientes técnicas:

- 1. Diluya la muestra:** diluciones sucesivas minimizarán la producción del color azulado en el fondo de la placa o la presencia de los puntos intensos color azulados.
- 2. Preparación de la muestra:** Homogeneice la muestra y permita que se asiente unos minutos antes de inocular la placa. Tome la muestra del centro del frasco de dilución o utilice filtros para separar las partículas grandes del volumen de inóculo a sembrar en la placa.
- 3. Revise y anote:** Observe las placas entre las 24 - 30 horas de incubación y anote si existe cualquier cambio de color que pueda ayudarle a la interpretación final de los resultados.

Diferenciación Macroscópica

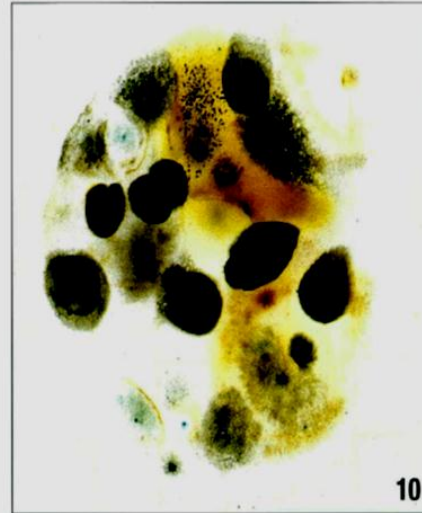
Si es necesario diferenciar las colonias de Mohos y levaduras en las Placas Petrifilm™ YM, observe una o más de las características típicas que aquí se muestran:



Conteo de Levaduras = 43

La Figura 9 muestra colonias típicas de Levaduras, que incluyen las siguientes características:

- Las colonias son pequeñas.
- Tienen filos o bordes definidos.
- El color de las colonias puede variar desde beige o crema, hasta azul verdoso.
- Tienen apariencia abultada, es decir, con una tercera dimensión: convexas.
- Son de color uniforme, no difusas.



Conteo de Mohos = 29

La Figura 10 muestra colonias típicas de Mohos, que incluyen las siguientes características:

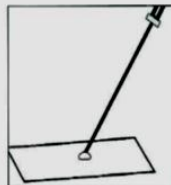
- Las colonias son grandes.
- Tienen bordes difusos, sin límite definido.
- El color de las colonias puede variar, ya que los Mohos producen una variedad de pigmentos; por ejemplo: café, beige, naranja, azul verdoso, etcétera.
- Las colonias tienen apariencia plana.
- Tienen un centro oscuro y se expanden difusamente alrededor del mismo.

Diferenciación Microscópica

Los Mohos y Levaduras son organismos relacionados y no siempre se puede distinguir entre ellos sin la identificación microscópica.



Para aislar colonias para su posterior identificación, levante la película superior y repique una colonia del gel utilizando un asa o dispositivo similar.



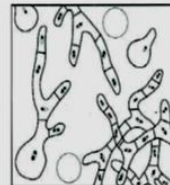
Transfiera la colonia a una gota de agua estéril colocada en un porta objetos para microscopio y coloque encima el cubre objetos; obsérvela bajo microscopio.



Las Levaduras típicamente tienen forma ovalada y se pueden ver como brotadas o abultadas.



Los Mohos típicamente aparecen como estructuras ramificadas, como hilos o filamentosas (micelios).



También se pueden encontrar Mohos en diferentes etapas de germinación.

3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de Mohos y Levaduras

Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

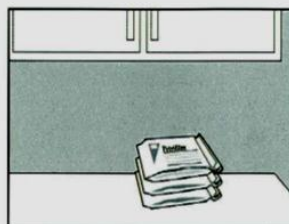
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ (46°F). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas 3M™ Petrifilm™ tienen un tiempo de vida útil de **12 meses** desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el sobre y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas. Utilice las Placas Petrifilm™ máximo 1 mes después de abierto el paquete.



3 Mantenga los paquetes cerrados a temperaturas $\leq 25^{\circ}\text{C}$ (77°F) y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, colóquelos en un contenedor hermético (tipo funda con cierre) y guárdelos en congelación. Para usar las placas, saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes de describir hasta su fecha de caducidad.

Preparación de la muestra



4 Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipetee la muestra dentro de un contenedor estéril, como una bolsa homogeneizadora, frasco de dilución u otro recipiente estéril.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: buffer Butterfield (buffer IDF fosfato, 0.0425 g/l de KH₂PO₄ y con pH ajustado a 7.2), agua de peptona al 0.1%, solución salina de peptona (método ISO 6887), agua peptonada buferada (método ISO 6579), solución salina (0.85 a 0.90%), caldo Lethen libre de bisulfato o agua destilada.

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfato o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento. Si se encuentra especificada la utilización de buffer de citrato, sustitúyalo con cualquiera de los diluyentes citados arriba y caliéntelo hasta 45°C .

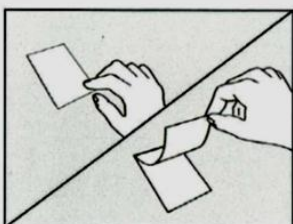


6 Mezcle u homogeneice la muestra mediante los métodos usuales.

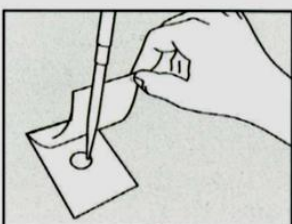
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

- Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
- Para productos básicos: use solución 1N de HCL.

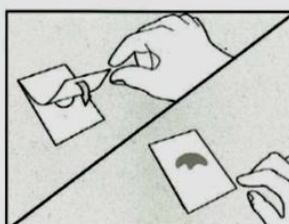
Inoculación



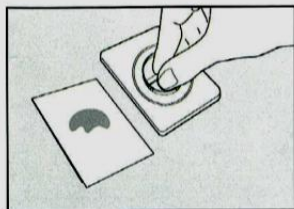
7 Coloque la Placa Petrifilm™ en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.



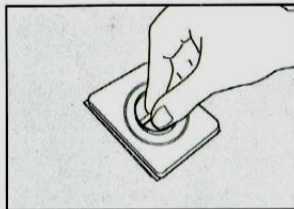
8 Con la Pipeta Electrónica 3M, o una pipeta equivalente perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película inferior. Asegúrese de no tocar la placa con la punta de la pipeta.



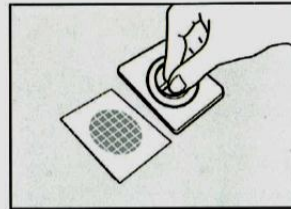
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la muestra.



10 Sosteniendo la barra cruzada del dispersor para Mohos y Levaduras, colóquelo sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

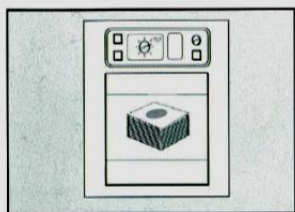


11 Presione suavemente el dispersor para distribuir la muestra. No gire ni destice el dispersor.



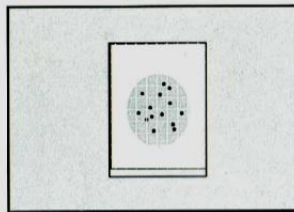
12 Levante el dispersor. Espere por lo menos 1 minuto para permitir que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

Incubación



13 Incube las placas cara arriba en grupos de hasta 20 unidades a 20 °C-25 °C por 3-5 días. Algunos Mohos pueden crecer rápidamente, por lo que puede ser útil leer y contar las placas a los 3 días, ya que las colonias más pequeñas se verán más oscuras que los Mohos ya crecidos a los 5 días. Si las Placas presentan demasiado crecimiento al día 5, registre el resultado obtenido al día 3 como "estimado". Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las placas Petrifilm™ pueden ser contadas en un contador de colonias estándar o con una fuente de luz amplificada.

El tiempo de incubación y las temperaturas varía según el método.

El método mas conocido es:

- AOAC Método oficial 997.02 (en alimentos)

Incubar 5 días entre 21 °C y 25 °C.

RMC

Reactivos y Medios de Cultivo

Cdla. Profesor Aguirre Abad Mz. 1A SL.49
junto a edificio TAMASA

Telfs: 2283282 - 2283270 - 2291671

2291673 - Fax: (593-4) 2294346

E-mail: acrespo@rmc-cc.com

Sucursal Quito: Av. América N35-29 y Hernández Girón
Ofic. 303 - Telefax: 2448290 - 2448292

3M

3M Argentina
0800 333 3547
541 1 4469 8200

3M Bolivia
800 102 102
59 13 3412 195

3M Brasil
0800 155150
551 9 3838 7000

3M Chile
562 4 1037 46

3M Costa Rica
506 22771000 Fax.
506 22603838

3M Colombia
01800113636
571 410 8555

3M Ecuador
593 42800 777

3M El Salvador
503 22100834

3M República Dominicana
1809 530 6560
ext 318, 322 499

3M Guatemala
502 2379 3636

3M Honduras
50 45 5187 77

3M Jamaica
87 69 37 38 5965

3M México
52 55 52 702216
52 55 52 702212
01800 700 9600

3M Nicaragua
5052 6529 88

3M Panamá
50 72 36 52 22

3M Paraguay
5952 16 19 9229

3M Perú
51 12 2427 28

3M Puerto Rico
78 76 2046 00

3M Trinidad
1868 62 38 917

3M Uruguay
59 82 4093 341 ext 228

3M Venezuela
02012 95 78 039

Petrifilm es una marca registrada de 3M.
Favor reciclar.
© 3M 2009.
Reservados todos los derechos.
70-2008-8104-6

Anexo 8: Historial de resultados del recuento microbiológico por 3M placas Petrifilm de Coliformes totales, *E. coli*, Aerobios mesófilos, mohos y levaduras en el grano de chocho desamargado recolectado en los establecimientos educativos de la ciudad de Cuenca, expresados en UFC/g y NMP/g.

Número	Parroquia	Código de la muestra	Recuento de Coliformes totales (NMP/g)	Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	Recuento de Aerobios mesófilos (UFC/g)	Recuento total de Mohos y levaduras (UFC/g)
1	EL BATAN	EB01A	30	30	10	3640
		EB01B	20	40	10	3030
2	BELLAVISTA	B02A	260	0	0	7520
		B02B	220	0	0	6620
3	BELLAVISTA	B03A	20	0	0	1360
		B03B	10	0	0	1350
4	BELLAVISTA	B04A	210	0	0	3000
		B04B	220	0	0	3050
5	BELLAVISTA	B05A	2200	0	0	17000



		B05B	1800	0	10	17430
6	SUCRE	S02A	110	0	10	18000
		S02B	80	0	10	18200
7	SAN SEBASTIAN	SS01A	10	0	0	1360
		SS01B	10	0	0	1400
8	GIL RAMIREZ	GR01A	0	10	10	2000
		GR01B	0	10	10	1800
9	HUAYNA CAPAC	HC01A	5000	0	0	1110
		HCO1B	4200	0	0	1110
10	HUAYNA CAPAC	HC02A	270	0	0	5000
		HC02B	290	0	0	5290
11	SUCRE	S03A	3000	10	46000	35000
		S03B	2900	10	45800	34740
12	SUCRE	S04A	40	0	0	52000
		S04B	40	0	0	55400
13	SUCRE	S05A	40	0	10	198000



		S05B	30	0	20	195530
14	EL SAGRARIO	ES01A	1100	0	980000	18800
		ES01B	1050	0	985400	21700
15	EL SAGRARIO	ES02A	1660	0	1680000	20040
		ES02B	1600	0	1660000	18900
16	EL SAGRARIO	ES03A	300	150	1360000	14000
		ES03B	460	180	1504000	14150
17	EL SAGRARIO	ES04A	570	0	1150	10680
		ES04B	640	0	1230	10800
18	BELLAVISTA	B01A	200	0	750	660
		B01B	320	0	690	690
19	YANUNCAY	Y02A	210	0	600	1920
		Y02B	170	0	500	1870
20	EL VECINO	EV01A	240	10	360	13800
		EV01B	300	30	450	15900
21	EL VECINO	EV02A	390	130	350	840000



		EV02B	300	140	390	864350
22	EL VECINO	EV04A	600	0	3200	2180
		EV04B	550	0	4000	2210
23	GIL RAMIREZ	GR02A	470	0	600000	2370
		GR02B	640	0	610820	2500
24	SAN SEBASTIAN	SS04A	650	0	1390	1260
		SS04B	740	0	1590	1160
25	SAN BLAS	SB01A	380	0	2400	420
		SB01B	430	0	2200	560
26	SAN BLAS	SB02A	2000	0	770	14400
		SB02B	2200	0	890	15900
27	EL BATAN	EB03A	2200	10	1300	5400
		EB03B	2000	10	1220	5100
28	BELLAVISTA	B08A	1470	40	1430	11400
		B08B	1420	50	1560	13500
29	TOTORACOCHA	T02A	890	0	550	960



		T02B	960	0	630	960
30	YANUNCAY	Y03A	75000	0	4200	22800
		Y03B	73050	0	4200	22200
31	YANUNCAY	Y04A	90000	0	1240	450
		Y04B	90000	0	1360	500
32	YANUNCAY	Y05A	18000	10	930	25800
		Y05B	18600	10	1166	28200
33	YANUNCAY	Y07A	600000	0	850	5100
		Y07B	580000	0	930	4800
34	HUAYNA CAPAC	HC05A	64000	0	840000	700
		HC05B	63200	0	823000	720
35	MONAY	M03A	1370	0	780	653000
		M03B	1180	0	650	667500
36	TOTORACOCHA	T01A	80	0	7600	4200
		T01B	80	0	8000	4500
37	TOTORACOCHA	T03A	920	0	5200	1120



		T03B	840	0	4400	1000
38	MACHANGARA	MA01A	5200	0	1470	1880
		MA01B	4800	0	1390	1860
39	SUCRE	S01A	1600	10	1620	2000
		S01B	1600	10	1520	1890
40	YANUNCAY	Y01A	3800	0	2330	5100
		Y01B	4200	0	2380	5700
41	BELLAVISTA	B07A	2400	0	1800	1180
		B07B	2400	0	1820	1080
42	EL VECINO	EV03A	2000	30	290	186000
		EV03B	2600	30	340	191200
43	SAN SEBASTIAN	SS05A	6000	0	1100	6270
		SS05B	6000	0	1180	6330
44	BELLAVISTA	B06A	130	0	4800	6690
		BO6B	190	0	4800	7260
45	HUAYNA CAPAC	HC03A	170	0	1080	47000



		HC03B	170	0	1100	46230
46	MACHANGARA	MA02A	6400	0	590	2030
		MA02B	6800	0	570	2110
47	MONAY	M02A	230	20	630	610000
		M02B	190	30	670	607100
48	HUAYNA CAPAC	HC04A	5400	0	1280	1050
		HC04B	6000	0	1320	950
49	MONAY	M01A	8000	0	990	32430
		M01B	7600	0	1030	31570
50	YANUNCAY	Y06A	6000	0	1110	4510
		Y06B	5600	0	1140	4840
51	CAÑARIBAMBA	C01A	680	0	7600	9290
		C01B	700	0	7400	8330
52	CAÑARIBAMBA	C02A	540	0	1500	2920
		C02B	620	0	1410	3260
53	HERMANO MIGUEL	HM01A	120	10	1760	446000



		HM01B	120	20	1800	451820
54	HERMANO MIGUEL	HM02A	100	30	860	553000
		HM02B	80	20	840	561000
55	SAN SEBASTIAN	SS03A	170	0	1260	230
		SS03B	230	0	1300	210