

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**EVALUACION DE LA CALIDAD MICROBIOLOGICA DE REFRESCOS
NATURALES NO PASTEURIZADOS COMERCIALIZADOS EN EL INTERIOR
Y LOS ALREDEDORES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

**LUIS GUILLERMO ESCALANTE ESCOBAR
ROXANA MELANY ORTIZ HERNANDEZ**

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 2010

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS MICROBIOLOGICO

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de graduación en primer lugar a **Dios**, por sus enormes bendiciones, porque aún en los momentos de angustia y dificultad siempre respondió a mis suplicas y me guó e iluminó a lo largo de mi vida. Principalmente por haber puesto en mi camino a esa persona tan especial, a ese ángel que me acompañó y me dio la fuerza de voluntad, el deseo y la motivación para llegar hasta aquí y concluir exitosamente una etapa más en mi vida.

A mi familia por haberme brindado lo necesario para superarme, **especialmente mi madre**, que a pesar de la distancia siempre se sacrificó por darme mis estudios, por ser un hombro en el cual apoyarme, por alentarme a salir adelante, por ayudarme, por estar siempre pendiente de mis necesidades, por creer en mí y por enseñarme el poder de orar y recurrir a Nuestro Señor.

A mi mejor amiga y compañera de tesis, Melany Ortíz; por su amistad sincera y desinteresada, por su amabilidad, generosidad y apoyo incondicional. Por escucharme y aconsejarme, por su paciencia y confianza, por compartir conmigo momentos inolvidables a lo largo de la carrera. Por ayudarme a madurar, a ser una mejor persona, a ser más positivo y por concederme el honor de realizar juntos este trabajo de graduación.

Guillermo

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de graduación a **DIOS** porque fue él quien me ilumino y me dio la sabiduría para poder sobrellevar todos los obstáculos que surgieron a lo largo de la carrera y me dio las fuerzas para poder culminar mi carrera satisfactoriamente.

A mi familia en especial a mi hija Valeria Rivera porque ella fue y ha sido mi inspiración para seguir adelante, a mi esposo por haber creído en mí, por su paciencia y comprensión, porque gracias a su motivación y su apoyo pude concluir con éxito mi carrera.

A mis padres por haber sido un pilar muy importante en mi vida, que gracias a sus consejos y su apoyo incondicional hoy obtengo este logro que se los dedico con todo mi amor.

A mi hermana por escucharme y aconsejarme por darme ánimos para seguir siempre adelante y por estar siempre al cuidado de mí.

A mis suegros gracias al apoyo que ellos me brindaron, porque en los momentos difíciles cuando yo más los necesite ellos siempre estaban ahí dándome ánimos. Mil gracias!!

A mi amigo y compañero de tesis por compartir sus conocimientos, por su apoyo y comprensión y sobre todo por su amistad tan valiosa que es un tesoro muy grande para mi vida.

Melany

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	22
3.1 Refrescos Naturales	22
3.2 Inocuidad Microbiológica	23
3.3 Buenas Prácticas Higiénicas	24
3.3.1 Procedimiento para el lavado de manos	25
3.3.2 Indumentaria	26
3.3.3 Salud de los manipuladores	26
3.3.4 Almacenamiento de los refrescos	27
3.3.5 Preparación de refrescos	27
3.4 Buenas Prácticas de Manufactura	28
3.4.1 Instalaciones	29

3.4.2 Equipos y utensilios	31
3.4.3 Personal	31
3.4.4 Control en el proceso y la producción	32
3.5 Fuentes de contaminación	32
3.6 Microorganismos de interés de acuerdo a la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO 67.18.01:01)	34
3.7 Microorganismos indicadores de higiene y de contaminación fecal	35
3.7.1 Mohos y Levaduras	35
3.7.2 Microorganismos Mesófilos Aerobios	35
3.7.3 Grupo Coliforme Total	36
3.7.4 Grupo Coliforme Fecal	37
3.7.5 Bacterias patógenas causantes de intoxicación alimentaria	37
3.7.6 <i>Escherichia coli</i>	38
3.8 Fermentación en tubos múltiples para miembros del Grupo Coliformes	40
3.8.1 Cálculo y registro del NMP (APHA)	41
3.8.2 Determinación de Coliformes Totales, Fecales y <i>Escherichia coli</i> , por la técnica de Tubos Múltiples (NMP), utilizando un sustrato fluorogénico	41
3.9 Bacterias Patógenas	42
3.9.1 Grupo <i>Pseudomonas</i>	42

3.9.2 Cultivo	43
3.9.3 Características del crecimiento	43
3.9.4 Estructura antigénica y toxinas	44
3.9.5 Identificación	44
3.9.6 Tinción de Gram	44
3.9.7 Pruebas Bioquímicas	45
3.9.7.1 Prueba de Triple-Azúcar-Hierro y Sulfuro de Hidrogeno (TSI y H ₂ S)	45
3.9.7.2 Prueba de Indol	45
3.9.7.3 Prueba de Rojo de Metilo	45
3.9.7.4 Prueba de Movilidad	46
3.9.7.5 Prueba de Voges Proskauer	46
3.9.7.6 Prueba de Citrato	46
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	48
4.1 Tipo de Estudio	48
4.2 Investigación Bibliográfica	48
4.3 Investigación de campo, universo y muestra	49
4.4 Diagnóstico de los puestos de venta de refrescos	49
4.5 Parte Experimental	50

4.5.1 Selección, recolección e identificación de muestras	50
4.5.2 Preparación de la muestra	50
4.5.3 Método para el Recuento Total en Placa de Bacterias	
Mesófilas Aerobias	51
4.5.4 Método para el Recuento Total en Placa de Mohos y Levaduras	52
4.5.5 Coliformes Totales	53
4.5.6 Coliformes Fecales (Medio EC)	53
4.5.7 <i>Escherichia coli</i>	53
4.5.8 <i>Pseudomona sp.</i>	54
4.5.8.1 Tinción de Gram	54
4.5.8.2 Pruebas Bioquímicas	55
4.5.8.2.1 Prueba de Triple-Azúcar- Hierro y	
Sulfuro de Hidrogeno (TSI y H ₂ S)	55
4.5.8.2.2 Prueba de Indol	55
4.5.8.2.3 Prueba de Rojo de Metilo	56
4.5.8.2.4 Prueba de Movilidad	56
4.5.8.2.5 Prueba de Voges Proskauer	56
4.5.8.2.6 Prueba de Citrato	56
 Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	58

Capítulo VI

6.0 Conclusiones

77

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones

80

Bibliografía

Glosario

Anexos

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Fotos de puestos de venta callejera de refrescos, manipuladores de refrescos y estudiantes que consumen dichos refrescos.
2. Datos de agentes infecciosos encontrados en alimentos en El Salvador durante el 2006 y comparación anual de casos de diarrea en El Salvador de 1989-2006.
3. Comparación anual de casos de intoxicación alimentaria en El Salvador de 1989-2006 e incidencia de las principales enfermedades en vigilancia epidemiológica especial en El Salvador durante enero-diciembre 2009.
4. Criterios microbiológicos para las bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2, Norma Salvadoreña Obligatoria 67.18.01:01.
5. Procedimiento para el lavado de manos.
6. Índice de NMP y límites de aceptación del 95 por 100 para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 mL.
7. Ubicación de las ventas de refrescos en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.
8. Mapa del campus central de la Universidad de El Salvador.
9. Tipo de refrescos comercializados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador y etiqueta para identificación de muestras.
10. Procedimiento para preparación de las diluciones de la muestra.

11. Procedimiento Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias.
12. Procedimiento Recuento Total de Mohos y Levaduras.
13. Procedimiento Determinación de Coliformes Totales, Fecales y ***Escherichia coli***.
14. Reporte de enfermedades gastrointestinales en la Universidad de El Salvador de enero a diciembre de 2008 y de abril hasta agosto de 2009.
15. Guía de observación para diagnóstico de las condiciones higiénicas bajo las cuales operan los puestos de venta de refrescos ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.
16. Informe de resultados obtenidos de los análisis microbiológicos de refrescos naturales realizados durante el mes de Octubre de 2009.
17. Pruebas bioquímicas.
18. Resultado de pH tomado a muestras de cada tipo de refresco en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.
19. Material y Cristalería.
20. Equipos, Medios de Cultivo y Reactivos.

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág.
1. Reacciones bioquímicas de <i>Pseudomona sp.</i>	46
2. Guía de observación para diagnóstico de las condiciones higiénicas bajo las cuales operan los puestos de venta de refrescos ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador	58
3. Resultados de Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias	64
4. Resultados de Recuento Total de Mohos y Levaduras	65
5. Resultados de NMP para Coliformes Totales	66
6. Resultados de NMP para Coliformes Fecales	67
7. Identificación de patógenos (<i>Escherichia coli</i>)	68
8. Identificación de patógenos (<i>Pseudomona sp.</i>)	69
9. Resumen de los parámetros evaluados en muestras de refrescos naturales no pasteurizados.	70
10. Resultado de pruebas bioquímicas para identificación de <i>Pseudomona sp.</i>	71
11. Resultado de pruebas bioquímicas para identificación de <i>Pseudomona sp.</i>	72

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág.
1. Puestos de venta ubicados en aceras cerca de paradas de autobuses frente a Universidad de El Salvador.	59
2. Espacio con el que cuentan los puestos para comercializar refrescos.	60
3. Malas prácticas de higiene de los vendedores que comercializan refrescos.	60
4. Vendedores de refrescos.	61
5. Condiciones bajo las cuales comercializan los refrescos naturales.	62
6. Recuento Total de Mesófilos Aerobios de muestras de refrescos en Agar Plate Count.	71
7. Recuento Total de Mohos y Levaduras de muestras de refrescos en Agar Papa Dextrosa acidificado.	72
8. Determinación de Bacterias Coliformes en muestras de refrescos utilizando como sustrato caldo Rapid Hi Coliform.	72
9. Presencia de fluorescencia con luz ultravioleta en la determinación de <i>Escherichia coli</i> en muestras de refrescos utilizando caldo Rapid Hi Coliform como sustrato.	73
10. Presencia de <i>Pseudomona sp.</i> en Agar Cetrimide.	73
11. Resultado de muestras conformes y no conformes con la norma salvadoreña NSO 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2 por parámetros y en general	74

RESUMEN

RESUMEN

En la actualidad las enfermedades gastrointestinales asociadas a la ingestión de alimentos contaminados han aumentado debido a que la mayoría son causadas por microorganismos que se transmiten a través de ellos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de refrescos naturales no pasteurizados provenientes de 14 puestos de venta, 7 ubicados en el interior y 7 ubicados en los alrededores de la Universidad de El Salvador; con el fin de determinar si son aptos para consumo humano y si pueden ser una importante fuente de futuras gastroenteritis. Por lo anterior, se realizó una guía de observación para determinar las condiciones de higiene bajo las cuales se comercializan los refrescos y se realizaron muestreos durante 3 semanas, teniendo un total de 42 muestras cuyos resultados de los análisis microbiológicos fueron: 90.48% de las muestras presentan bacterias mesófilas, el 100% mohos y levaduras, el 88.10% bacterias coliformes totales, el 83.33% coliformes fecales y *Escherichia coli* y el 4.76% *Pseudomona sp.*; estos porcentajes exceden los límites establecidos en la norma salvadoreña obligatoria NSO 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2. Se identificaron como fuentes de contaminación: materias primas, refrigeración, instalaciones y las condiciones ambientales, demostrándose que las muestras no son aptas para consumo humano por lo que se recomienda que Bienestar Universitario continúe monitoreando los puestos de venta antes mencionados, hasta lograr que cumplan con la calidad que la norma exige.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Gran parte de la población consume refrescos naturales no pasteurizados en pequeños puestos ubicados en la vía pública cerca de sus lugares de trabajo o estudio, porque representan una alternativa económica. Diversos estudios nacionales e internacionales determinaron que la incidencia de gastroenteritis e intoxicaciones de origen bacteriano transmitidas por alimentos, fueron causadas por refrescos elaborados en la calle con agua y frutas contaminadas principalmente con bacterias coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*. También existe una estrecha relación con los malos hábitos higiénicos de las personas; ya que la mayoría de estos fueron manipulados con manos sucias y elaborados con materiales contaminados y mal lavados ⁽²³⁾; además estos refrescos elaborados a nivel popular están expuestos al calor, polvo, insectos y humo de vehículos. Por lo anterior, se determinó la presencia de bacterias mesófilas, bacterias coliformes, mohos, levaduras y las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Pseudomona sp*; en refrescos naturales no pasteurizados provenientes de 14 puestos de venta, 7 ubicados en el interior y 7 ubicados en los alrededores de la Universidad de El Salvador; para evaluar si estos son aptos o no para el consumo humano y si pueden ser una importante fuente de futuras gastroenteritis. Se realizaron muestreos durante 3 semanas, teniendo un total de 42 muestras; las cuales se analizaron en los laboratorios de microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, en el mes de Octubre de 2009.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- 2.1.1 Evaluar la calidad microbiológica de refrescos naturales no pasteurizados comercializados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Realizar un diagnóstico de las condiciones bajo las cuales operan los establecimientos que comercializan refrescos naturales no pasteurizados ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.
- 2.2.2 Determinar la presencia o ausencia de bacterias mesófilas aerobias, bacterias coliformes, *Escherichia coli*, *Pseudomona sp.*, mohos y levaduras, en los refrescos antes mencionados.
- 2.2.3 Comparar los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados a los refrescos; con los límites establecidos por la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO) 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2.
- 2.2.4 Dar a conocer los resultados obtenidos a la dirección de Bienestar Universitario de la Universidad de El Salvador, para que tomen las medidas más convenientes.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 REFRESCOS NATURALES ⁽²⁷⁾

Los refrescos naturales son bebidas que dan un gran aporte nutricional, ya que se preparan a base del zumo de frutas frescas y hortalizas o de la parte comestible de ellas, en la cual se encuentran grandes cantidades de vitaminas, minerales, fibras e importantes sustancias beneficiosas para el organismo.

Para la preparación de refrescos naturales es necesario tener en cuenta diversos factores que pueden influir en la calidad y la inocuidad de estos.

En primer lugar, elegir las frutas y hortalizas adecuadamente, que se encuentren en su punto óptimo; es decir ni demasiado verdes ni muy maduras; que tengan colores intensos, textura firme y aroma agradable; que no estén golpeadas y de preferencia que provengan de cultivos biológicos.

Seleccionada la fruta es necesario lavarla correctamente con agua, jabón y una solución desinfectante, para eliminar la tierra y todas las posibles bacterias que pudieran encontrarse en la cáscara de la fruta o en el agua; evitando dejarlas en remojo porque podrían perder vitaminas.

Una vez lavada la fruta se exprime o se licúa, dependiendo del tipo de fruta; para obtener el concentrado 100% natural.

Estos concentrados pueden ser mezclados con extractos de otras frutas, leche o sustancias que ayudan a mejorar su sabor como azúcar o vainilla; además puede añadirseles agua y hielo. Es importante conservarlos a temperaturas adecuadas y por tiempos no prolongados; para evitar que los nutrientes que

contienen se degraden o se oxiden, ya que algunos de estos son muy sensibles a algunos agentes físico-químicos como la luz, el oxígeno y la temperatura.

3.2 INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA

Los refrescos pueden prepararse para consumo propio o para terceros, por lo cual para poder comercializarse deben cumplir con ciertas características que determinan su calidad. Entre estas se encuentra la inocuidad, que se refiere al estado de los alimentos que al ser consumidos dan la seguridad que no causarán ningún daño a la salud ⁽²⁸⁾.

La inocuidad está determinada por parámetros microbiológicos establecidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), escritas en la Norma Salvadoreña Obligatoria para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2 NSO 67.18.01:01 (ver Anexo N° 4).

Cualquier refresco cuyo resultado de sus análisis exceda uno o más de los parámetros anteriores, se considera como contaminado ⁽¹³⁾.

En general la producción de alimentos libres de contaminantes no sólo depende del lugar de su producción sino también de los procesos de limpieza, desinfección, elaboración, suministro de agua y de las buenas prácticas higiénicas de las personas que tienen contacto directo o indirecto con ellos; ya que la contaminación de los refrescos puede producirse en cualquier etapa de la cadena de producción, en la cosecha de materias primas, fabricación, distribución, hasta que llegan a manos de los consumidores ⁽¹³⁾.

3.3 BUENAS PRACTICAS HIGIENICAS

Muchas veces la contaminación de los refrescos se da por malos hábitos higiénicos, de personas que no tienen conocimientos al respecto o que no le dan la importancia que amerita, sin saber el grave daño que pueden causar a las personas que consuman dichos refrescos debido a enfermedades que se transmiten a través de los alimentos.

Las buenas prácticas higiénicas (BPH) son normas adecuadas, que dependen de cada persona y que al ser aplicadas correctamente durante la manipulación de refrescos, reducen el riesgo de que éstos sean contaminados. Toda persona que tenga contacto con los alimentos crudos o procesados debe tener ciertos cuidados en su higiene personal, como los que se enumeran a continuación: ⁽²⁷⁾

- Bañarse y asearse correctamente todos los días.
- Mantener las uñas cortas y limpias, sin esmalte.
- Cambiarse la ropa de calle por indumentaria limpia y adecuada.
- Volverse a cambiar la ropa al ir al baño y al terminar las labores.
- Evitar conversaciones mientras se preparan refrescos.
- No toser ni estornudar en dirección a los refrescos.
- Taparse la boca con un pañuelo al toser o estornudar.
- No tocarse ni rascarse otras partes del cuerpo como la nariz, la cabeza, el pelo o las orejas mientras se preparan refrescos.
- No usar maquillaje, uñas o pestañas postizas.
- No usar objetos personales que puedan acumular residuos de alimentos,

sudor o suciedad; como relojes, pulseras o anillos.

- No usar bigote, barba y usar el pelo bien recogido o recortado y limpio.
- Abstenerse de fumar, comer, probar los alimentos con el dedo y/o masticar chicle durante la preparación de los alimentos ⁽²⁷⁾ ⁽⁴³⁾.

El lavado de manos deberá realizarse antes de comenzar la jornada de trabajo y cada vez que se suspenda la manipulación de alimentos en caso de: manipular alimentos crudos y procesados; manipular dinero; toser, estornudar o limpiarse la nariz; manipular basura, ir al baño, tener contacto con animales o insectos, en caso de usar insecticidas, veneno u otros materiales tóxicos ⁽²⁷⁾ ⁽⁴³⁾.

3.3.1 PROCEDIMIENTO PARA EL LAVADO DE MANOS

Para el lavado de manos utilizar jabón desinfectante, un cepillo adecuado para lavarse las uñas y toallas desechables ⁽²⁷⁾; siguiendo el procedimiento descrito a continuación (ver Anexo N° 5):

- Abrir la llave del chorro; enjuagar desde las palmas y el dorso de ambas manos, entre los dedos; hasta los codos.
- Cerrar la llave del chorro y depositar jabón líquido sobre la palma de la mano.
- Frotar las palmas de las manos entre sí y entrelazar los dedos.
- Frotar cada palma contra el dorso de la otra mano y entrelazar los dedos.
- Frotar la punta de los dedos, alrededor de los pulgares y sobre las muñecas.
- Abrir el chorro y enjuagar desde los codos, hacia las manos hasta retirar la espuma y el jabón sin volver a tocar las partes lavadas.

- Con la palma de las manos, tomar agua para enjuagar la llave del chorro retirando toda la espuma.
- Secar las manos y los brazos suavemente, con toallas desechables y con las mismas cerrar la llave del chorro.
- Aplicar solución desinfectante en las manos y dejar secar ⁽²⁵⁾ ⁽²⁷⁾.

3.3.2 INDUMENTARIA

Toda persona que manipule alimentos debe utilizar vestimentas especiales, limpias y adecuadas para dicho fin; con el objeto de proteger la inocuidad de los alimentos. Entre las vestimentas que deben utilizar se encuentran: gorra, cofia o redecilla en la cabeza, para impedir que suciedades del cabello puedan contaminar los alimentos, preferentemente guantes descartables, delantal o ropa especial de color blanco, limpia y zapatos cuyo uso sea exclusivamente en el lugar donde se procesan los refrescos, si es posible deberán usar tapabocas al manipular dichos alimentos ⁽²⁷⁾ ⁽⁴³⁾.

3.3.3 SALUD DE LOS MANIPULADORES

Los manipuladores de alimentos deben gozar de buena salud, la cual debe chequearse periódicamente y registrarse en el expediente personal.

En caso de enfermarse es de suma importancia que busquen asistencia médica.

Para evitar contaminar los refrescos y contagiar a otras personas, deberán evitar manipular alimentos en caso de:

- Tener heridas o raspones en manos, cara o cualquier otra parte del cuerpo que pueda entrar en contacto con los alimentos.
- Tener gripe o síntomas de cualquier enfermedad respiratoria.
- Presentar infección en ojos u oídos.
- Tener náuseas, vómitos, diarrea o fiebre ^{(27) (43)}.

3.3.4 ALMACENAMIENTO DE LOS REFRESCOS

Los refrescos se deben almacenar en lugares limpios, secos, ventilados y protegidos de insectos y de la luz solar; en recipientes bien tapados, manteniendo su temperatura óptima inferior a 10°C, para evitar cualquier degradación o proliferación de origen bacteriano la cual se da rápidamente a temperaturas superiores a los 10°C.

Se debe separar los alimentos crudos de los procesados, si es necesario; utilizando bolsas apropiadas o recipientes plásticos o de vidrio ^{(27) (28) (43)}.

3.3.5 PREPARACION DE REFRESCOS

Antes de preparar refrescos debe verificarse que los utensilios que se van a necesitar se encuentren limpios y desinfectados; realizar las operaciones de limpieza sobre superficies y utensilios, antes y después de procesar cualquier tipo de refrescos y no mientras se están procesando. Utilizar guantes de látex con la certificación correspondiente emitida por las normas locales.

Para poder evitar la contaminación causada por el contacto de alimentos procesados con alimentos crudos es necesario limpiar con agua potable todas

las superficies, después que hayan estado en contacto con los alimentos crudos y antes de utilizarlas con alimentos procesados ^{(27) (28) (43)}.

3.4 BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA

Las buenas prácticas de manufactura (BPM) son normas oficialmente establecidas, que regulan a los manipuladores de alimentos por medio de procedimientos escritos de fabricación y de higiene personal ya establecidos; para minimizar al máximo la contaminación de alimentos causada por una manipulación inadecuada, con la finalidad de obtener productos de calidad que garanticen la salud. Las buenas prácticas de manufactura abarcan todos los procesos y actividades que intervienen en la elaboración de alimentos tales como:

- Las instalaciones en las cuales se preparan los refrescos, así como sus alrededores.
- Los equipos y utensilios que se ocupan para la preparación de refrescos.
- Los lugares destinados al almacenamiento de los alimentos; antes, durante y después del proceso de manufactura.
- Los procedimientos de manufactura y limpieza.
- Así como las buenas prácticas higiénicas del personal que tenga contacto directo o indirecto con los alimentos; en cualquier etapa del proceso de manufactura ya sea en la preparación, en el almacenamiento o en la distribución de los refrescos naturales hasta que son adquiridos por los consumidores ^{(4) (43)}.

3.4.1 INSTALACIONES ⁽⁴⁾ (43)

Las instalaciones destinadas a la elaboración de refrescos; deben estar diseñadas y construidas de tal forma, que su tamaño y diseño facilite el desarrollo de todas las actividades necesarias tales como limpieza, almacenamiento, manejo y fabricación de refrescos. Estas instalaciones deben proteger los refrescos de agentes externos como: animales, insectos, polvos u otros contaminantes como humo o vapor.

Los materiales de construcción deben ser elaborados, de manera que no desprendan sustancias y que no dejen residuo alguno en los alimentos; los pisos deberán ser de material impermeable, lavable y antideslizante. No deberán tener grietas ni irregularidades en la superficie ni entre las líneas de unión, a modo que no acumulen suciedad ni residuos que favorezcan la contaminación y que dificulte limpiarlos.

De igual modo, las paredes y techos deben ser de superficies lisas, sin grietas y pintados con pintura epóxica que evite la retención de humedad y proliferación de mohos, costras y que no desprendan partículas que puedan contaminar los refrescos.

Las ventanas deben estar colocadas de manera que permitan la ventilación y una adecuada iluminación pero que protejan del agua, de insectos y plagas. El lugar debe contar con ventilación adecuada que evite el exceso de calor, pero que al circular el aire no se corra el riesgo de contaminación de los refrescos a causa de cuerpos extraños.

Además las instalaciones deben contar con un suministro de agua potable, la cual se utilizará tanto para fabricación como para la limpieza y desinfección de las instalaciones. Este suministro debe ser suficiente y contar con depósitos adecuados para almacenamiento de agua, así en caso de ser suspendido el servicio, no se detendrán los procesos mencionados anteriormente por falta de agua. Deberán contar con instalaciones para lavarse las manos cada vez que sea necesario, con sistemas de drenajes que no impliquen un riesgo de contaminación para los refrescos, además de contar con jabón desinfectante y toallas de papel para secarse las manos.

También deberán contener recipientes con tapadera para desechos sólidos, los cuales deberán ser lavables y estar ubicados lejos de los refrescos, para evitar la contaminación por roedores, moscas y plagas en general.

Deberá contarse con un programa de limpieza y desinfección escrito, que regule la limpieza de las instalaciones, utensilios y equipos; el cual especifique las tareas por áreas, los responsables de cada tarea, método y frecuencia con la cual se desempeña la limpieza, por lo que todo deberá quedar por escrito. No barrer en seco (en ninguna instalación donde se conserven y/o manipulen alimentos).

Las instalaciones deben estar ubicadas en lugares libres de contaminación de industrias, humo de vehículos, polvo y desechos. Los alrededores deberán estar libres de maleza y de todo aquello que sirva de refugio de insectos, roedores y fauna nociva en general.

3.4.2 EQUIPOS Y UTENSILIOS

Los equipos y utensilios deben ser fácilmente desmontables para facilitar su limpieza, evitando la acumulación de restos de alimentos; deben ser resistentes a la corrosión y a los procedimientos de fabricación y limpieza. De preferencia aquellos utensilios como tablas de picar deben ser diferentes para alimentos crudos y procesados. Limpiar con abundante agua caliente y detergente los utensilios después de haberlos utilizado con alimentos crudos ^{(4) (27) (43)}.

3.4.3 PERSONAL

Todo el personal deberá estar capacitado adecuadamente en la manipulación y preparación de alimentos así como en las BPM de tal forma, que garanticen la producción de alimentos inocuos. Además el personal deberá recibir capacitaciones de BPH, debiendo quedar por escrito el cumplimiento diario de estas y llevarsele controles de salud periódicamente, los cuales serán exámenes generales que comprueben su buena salud; en caso de tener parásitos, el manipulador deberá recibir medicamento y someterse nuevamente a los exámenes con el fin de comprobar que el tratamiento fue efectivo y cuyos resultados se anexarán en un folder de BPM el cual se actualizará periódicamente.

En caso que algún manipulador padezca o sea sospechoso de portar alguna enfermedad que pueda contaminar los alimentos; o posea alguno de los siguientes síntomas: ictericia, diarrea, vómitos, fiebre, dolor de garganta, lesiones de la piel visibles y/o infectadas; secreciones de oídos, ojos o nariz;

deberá notificar a su jefe, quien tiene la responsabilidad de suspender a dicho empleado de sus actividades y enviarlo a revisión médica a fin de recibir el tratamiento adecuado, posteriormente deberá someterse a exámenes que comprueben que ya no representa un riesgo para la salud de los demás manipuladores, ni representa un riesgo para la inocuidad de los alimentos ⁽⁴⁾ (43).

3.4.4 CONTROL EN EL PROCESO Y LA PRODUCCION

El control de procesos abarca todo lo referente al control de la calidad de materias primas y las operaciones necesarias para la producción. Se encarga de verificar y documentar diariamente el análisis de la calidad del agua utilizada en la producción, así como de la calidad y el estado de las materias primas, rechazando todas aquellas que no cumplan con los requerimientos de calidad.

En cuanto a las operaciones de manufactura, las BPM se encargan que exista un manual con todos los procedimientos y operaciones el cual debe contener: diagramas de flujo, operaciones unitarias, análisis de peligros, controles, medidas para proteger el alimento, medidas preventivas, procedimientos de envasado, documentación, registro y otros ⁽⁴¹⁾.

3.5 FUENTES DE CONTAMINACION

Los refrescos naturales debido a que poseen grandes cantidades de nutrientes y no contienen sustancias químicas preservantes; se vuelven un medio propicio para el crecimiento de bacterias; las cuales encuentran en estos alimentos las condiciones necesarias de temperatura, pH, aireación y nutrientes ideales para

poder desarrollarse y así convertir el refresco en un riesgo para la salud de los seres humanos que lo ingieran. No es lo mismo un alimento contaminado que uno deteriorado; ya que los alimentos deteriorados sufren cambios en sus características organolépticas, cambios que se pueden detectar a través de los sentidos; sin embargo, aunque las bacterias pueden causar deterioro de los alimentos, generalmente este tipo de contaminación es imperceptible lo que la hace más peligrosa, ya que el alimento luce normal y agradable; dando una falsa impresión de su calidad y se ingiere sin saber que podría causar enfermedad ⁽³⁰⁾⁽³¹⁾. Las causas y fuentes que originan la contaminación microbiológica de los alimentos son muy diversas, en general pueden llegar a ellos por dos vías: la directa; que es a través del manipulador y la indirecta; que es a través de un intermediario como insectos, los utensilios o el agua con la que se lavan. Estas causas varían según aspectos los cuales se ven involucrados en el proceso de preparación. Estos aspectos son catalogados como factores de riesgo porque favorecen la contaminación y estos pueden ser:

- Las características propias del refresco como son: composición, pH y acidez.
- Proceso de elaboración del refresco; el cual se ve afectado por la recolección transporte, distribución y almacenamiento de frutas y hortalizas.
- La forma de preparar los refrescos, manipulación, suministro de agua ocupado para lavar las manos, los utensilios, las frutas y hortalizas.
- Aditivos que se incorporen a los refrescos tales como hielo, agua o azúcar; pueden estar contaminados y así contaminar el alimento.

- La presentación del refresco; los cuales son comercializados en bolsas plásticas transparentes, que en ocasiones son sopladas para facilitar la transferencia del refresco desde el depósito hasta la bolsa ^{(9) (19)}.

3.6 MICROORGANISMOS DE INTERES DE ACUERDO A LA NORMA SALVADOREÑA OBLIGATORIA (NSO 67.18.01:01)

Estos contaminantes microbiológicos pueden causar enfermedades por sí mismos o por productos de su metabolismo como toxinas generadas a consecuencia de su crecimiento. Sin embargo; los métodos de identificación, aislamiento y enumeración de microorganismos patógenos suelen ser complejos y demandar demasiado tiempo. Esto ha sido la causa de que se utilicen grupos de bacterias de enumeración más fácil y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que el refresco estuvo expuesto a almacenamiento, manipulación y prácticas higiénicas inadecuadas o si fue elaborado con materias primas que no poseen la calidad necesaria para dicho fin. Los grupos de microorganismos que se utilizan con este fin se denominan “Microorganismos indicadores” (Ver Anexo N° 4). Se llaman indicadores ya que su presencia se relaciona con microorganismos patógenos, los cuales se utilizan para reflejar el riesgo que representa su presencia en los alimentos debido a su capacidad de causar enfermedades. Dentro de los microorganismos más importantes que se encuentran en refrescos naturales y que se utilizan como indicadores de contaminación están: bacterias mesófilas aerobias, mohos, levaduras, bacterias coliformes y ***Escherichia coli*** ⁽³¹⁾.

3.7 MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE Y DE CONTAMINACION FECAL

3.7.1 MOHOS Y LEVADURAS

Los mohos y levaduras se pueden encontrar como parte de un alimento o como agentes contaminantes. Se encuentran en el ambiente en forma de esporas, las cuales resisten el calor y contaminan los equipos y utensilios lavados inadecuadamente; provocando el deterioro fisicoquímico de las materias primas. Debido a su metabolización de carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos; originan mal olor alterando el sabor y el color de refrescos contaminados. Además pueden sintetizar sustancias tóxicas resistentes al calor y a los métodos de esterilización convencionales, son capaces de soportar algunas sustancias químicas así como la irradiación, pudiendo contribuir al crecimiento de bacterias patógenas ⁽²⁶⁾. El recuento de estos microorganismos se realiza en agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10%, después de incubarse a temperatura ambiente de 3 a 5 días ^{(2) (26)}.

3.7.2 MICROORGANISMOS MESOFILOS AEROBIOS

Se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer entre 15 y 45°C, con un rango óptimo de 35°C, son contaminantes de los alimentos y posibles causantes de enfermedad intestinal, en la industria de alimentos es considerado como el grupo indicador más grande que existe. El recuento elevado indica la posible presencia de patógenos y predicen la posibilidad de que el alimento este próximo a descomponerse ^{(8) (26)}.

3.7.3 GRUPO COLIFORME TOTAL

El grupo coliforme está formado por todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, gram negativas, no formadoras de esporas y con forma de bastón corto, que fermentan la lactosa produciendo gas y ácido en 48 horas a 35°C. Pertenecen a este grupo los géneros: ***Escherichia***, ***Citrobacter***, ***Enterobacter*** y ***Klebsiella***. Aunque se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; en general, las bacterias de este género se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, por tal motivo suele deducirse que la mayoría de los coliformes que se encuentran en los alimentos, son introducidos en gran número al medio ambiente por las heces de humanos y animales ⁽¹⁰⁾.

Tradicionalmente se los ha considerado como indicadores de contaminación fecal, en el control de calidad del agua destinada a la fabricación de alimentos de consumo humano; debido a que en los medios acuáticos, los coliformes totales son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Así mismo, su número en refrescos es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan, mayor es la gravedad de la descarga de heces. Sin embargo, debido a que no todos los coliformes son de origen fecal, se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efecto de emplearlos como indicadores de contaminación. Por lo cual se distinguen los coliformes totales que comprende la totalidad del grupo y los coliformes fecales aquellos de origen fecal.

Desde el punto de vista de la salud pública, esta diferenciación es importante, puesto que permite asegurar con alto grado de certeza que la contaminación que presenta el refresco es de origen fecal ^{(8) (31)}.

3.7.4 GRUPO COLIFORME FECAL

Son bacterias que forman parte del grupo coliforme total y se utilizan para detectar la presencia de *Escherichia coli*. Son definidas como bacilos gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ dentro de las 48 ± 2 horas. La especie más predominante de este grupo es la *Escherichia coli*, que constituye una gran porción de la población intestinal humana. Su presencia indica limpieza y desinfección inadecuada de materias primas, utensilios y equipos; mal procedimiento para lavarse las manos o la utilización de agua contaminada con heces fecales para realizar las actividades antes mencionadas ^{(2) (10)}.

3.7.5 BACTERIAS PATOGENAS CAUSANTES DE INTOXICACION ALIMENTARIA

La ingestión de alimentos que contengan bacterias patógenas o enterotoxinas bacterianas es causa de enfermedades gastrointestinales, por lo tanto se consideran no aptos para el consumo humano. Entre estas se encuentra la *Escherichia coli*, cuya presencia puede implicar la presencia de otros microorganismos patógenos como *Salmonella tiphy*, *Vibrio sp.* y parásitos como *Entamoeba sp* ⁽²⁾.

3.7.6. *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra habitualmente formando parte de la flora normal de los intestinos de los seres humanos. Microscópicamente es una bacteria en forma de bacilo, aerobia y aerobia facultativa, que consta de una pared celular delgada debido a una capa de péptidoglucano, por lo que impide que el reactivo de tinción (cristal violeta), sea retenido en el interior de la célula clasificándose como gram negativa; estructuralmente la mayoría forma fimbrias y pilis los cuales le sirven para desplazarse, así como también microcápsulas. Macroscópicamente forma colonias puntiformes, convexas, mucosas y cremosas. Esta bacteria sólo se encuentra en forma vegetativa, no forma esporas. Se caracteriza por ser un patógeno intestinal capaz de causar enfermedad diarreica en el hombre y en los animales. Cuando la *Escherichia coli* se encuentra habitando en tejidos fuera del intestino, induce a procesos inflamatorios febriles, cuyos síntomas a menudo se pueden confundir con los ocasionados por otras bacterias entéricas. Muchos de estos procesos pueden originarse en zonas específicas entre las cuales podemos mencionar vías respiratorias, meninges o vías urinarias en más de un 70% de los casos como consecuencia de una perforación intestinal o por ingestión de alimentos contaminados. El cuadro clínico que se presenta más frecuentemente en este tipo de infecciones es diarrea acuosa, cólico y procesos febriles. En la actualidad, las formas patógenas han sido relacionadas con la enfermedad transmitida por alimentos y son cinco tipos principales de

Escherichia coli patógenos: *Escherichia coli enteropatógeno* (EPEC), *Escherichia coli enterotoxigénico* (ETEC), *Escherichia coli enteroinvasor* (EIEC), *Escherichia coli enteroagregativa* (ADEC) y *Escherichia coli enterohemorrágico* (EHEC) ⁽¹⁰⁾. Las primeras investigaciones sobre *Escherichia coli* patógeno se centraron en las cepas que causan diarrea principalmente en los niños. Posteriormente se admitió que la mayoría de estos organismos eran de los serogrupos O específicos ⁽³¹⁾. Estos organismos se hallan en el tracto gastrointestinal de los portadores y por lo tanto, son excretados en las heces. La transmisión de estas bacterias a los humanos puede ocurrir por medio de la leche, refrescos y los jugos sin pasteurizar, por alimentos contaminados, por manipuladores de alimentos infectados que practican una defectuosa higiene personal o por contacto con agua contaminada de aguas residuales humanas. Las medidas importantes para prevenir la intoxicación alimentaria incluyen la formación de operarios en técnicas de manipulación inocua de alimentos e higiene personal ^{(8) (10)}.

El aislamiento de esta bacteria muestra un alto grado de certeza de contaminación de origen fecal (alrededor del 99%). No es absoluta, porque se han aislado cepas de *Escherichia coli* que no tienen origen fecal, por lo que no se puede distinguir si la contaminación proviene de excretas humanas o animales, debido a que la *Escherichia coli* de origen animal y la de origen humano son idénticas, lo cual puede ser importante; debido a que la contaminación que se desea controlar es la de origen humano ⁽¹⁰⁾.

3.8 FERMENTACION EN TUBOS MULTIPLES PARA MIEMBROS DEL GRUPO COLIFORMES

La prueba estándar de fermentación en tubos múltiples es específica para el grupo coliforme; los resultados del estudio de los tubos y diluciones replicados se reportan en término de número más probable (NMP) de microorganismos existentes por 100 mL de refresco.

Este número basado en determinadas fórmulas de probabilidad, es un cálculo de la densidad media de coliformes de la muestra. La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Se obtiene una información más satisfactoria cuando el mayor inóculo de refresco estudiado, muestra gas en alguno o en todos los tubos y el más pequeño muestra gas en ninguno o en la mayoría de los tubos. La densidad bacteriana puede calcularse mediante la fórmula facilitada por medio de la tabla que utiliza el número de tubos positivos en las diluciones múltiples (Ver Anexo N° 6) ⁽²⁴⁾. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar menor que el número real de densidad bacteriana.

Existen procedimientos de alta temperatura para separar microorganismos del grupo coliformes totales de los coliformes fecales. El fundamento de esta prueba es la temperatura (44.5 °C), a la cual deben incubarse los coliformes fecales procedentes del intestino de los animales de sangre caliente ^{(8) (10) (15)}.

3.8.1 CALCULO Y REGISTRO DEL NMP (APHA)

Calcular y registrar el número de hallazgos positivos de microorganismos del grupo coliforme en términos del número más probable (NMP). Las tablas indican los valores del NMP para distintas series de siembras y resultados. En ellas se contemplan límites de confianza del 95% para cada valor del NMP, reportar el valor del número de tubos positivos y negativos en forma de NMP/100 mL.

Los resultados obtenidos en microbiología no muestran una distribución estadística normal; para conseguir una distribución más simétrica, los datos obtenidos deben ser transformados a logaritmo base 10₍₁₀₎.

3.8.2 DETERMINACION DE COLIFORMES TOTALES, FECALES Y *Escherichia coli*, POR LA TECNICA DE TUBOS MULTIPLES (NMP), UTILIZANDO UN SUSTRATO FLUOROGENICO.

El método consta de una sola etapa que consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de refresco en una serie de tubos conteniendo medio de cultivo fluorogénico (Fluorocult® caldo LMX; Laurel sulfato-MUG-X-GAL o caldo Rapid Hi Coliform) y luego son incubados a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas. El caldo fluorogénico contiene un cromógeno, 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido (X-GAL), el cual es hidrolizado por la enzima β -D-galactosidasa que es producida por las bacterias coliformes totales, ocasionando un cambio de color en el caldo de amarillo claro a azul-verde que indica y confirma prueba positiva para coliformes totales durante 24 a 48 horas.

Así mismo, el caldo contiene un fluorógeno, 4-metilumberiferil- β -D-glucoronido (MUG), el cual es hidrolizado por la enzima β -D-glucoronidasa que es producida por la bacteria ***Escherichia coli***, ocasionando una fluorescencia en el caldo bajo la luz ultravioleta de onda larga (336 nm) que indica la presencia de esta bacteria.

Para confirmar la presencia de ***Escherichia coli*** debe comprobarse la producción de indol en los tubos que presentan fluorescencia, utilizando el reactivo de Kovac indol (solución de p-dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico); por medio del desarrollo de un anillo color violeta que indica una reacción positiva ^{(10) (29) (41)}.

3.9 BACTERIAS PATOGENAS ⁽³¹⁾

3.9.1 GRUPO *Pseudomonas*

Las especies de ***Pseudomonas*** se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y el agua, puesto que proliferan en ambientes húmedos debe prestársele especial atención a tuberías de agua potable. Son bacilos aerobios, motiles, gram negativos, se encuentran de manera aislada, en pares o en cadenas cortas. Algunas cepas producen bactericinas, sustancias bactericidas de tipo viral, a las cuales son resistentes pero que son activas contra otras cepas de la misma especie; ciertas cepas producen piocianina el cual es un pigmento que permite identificar dichas cepas.

La ***Pseudomona aeruginosa*** es el principal patógeno de este grupo y es de gran interés debido a que es invasora y toxigénica; ocasionalmente coloniza al

ser humano produciéndole infecciones, generalmente a personas con defensas bajas. Se encuentra a menudo en escaso número en la flora intestinal normal y en la piel del ser humano. Otras especies de *Pseudomonas* producen enfermedad con muy poca frecuencia.

3.9.2 CULTIVO

Pseudomonas aeruginosa es un aerobio obligado que crece con facilidad en muchos tipos de medios de cultivo y produce en ocasiones un olor dulzón o de uvas. Forma colonias redondas, lisas, con color verdoso fluorescente. Con frecuencia produce el pigmento azuloso no fluorescente piocianina, que se difunde en agar. Otras especies de *Pseudomonas* no producen piocianina. Muchas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* elaboran también el pigmento fluorescente pioverdina, que imparte un color verdoso al agar, el pigmento rojo oscuro piorrubina o el pigmento negro piomelanina. Puede producir muchos tipos de colonias y da la impresión de un cultivo de especies de bacterias mixtas, estas colonias pueden mostrar actividades bioquímicas y enzimáticas distintas y diversos patrones de sensibilidad a los agentes antimicrobianos.

3.9.3 CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO ⁽³¹⁾

Crece con facilidad entre 37 a 42°C, en la mayor parte de los medios de cultivo diferenciales para bacilos gram negativos aunque en ocasiones crece más lentamente; es oxidasa positiva, no fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa.

3.9.4 ESTRUCTURA ANTIGENICA Y TOXINAS ⁽³¹⁾

Los pelos (fimbrias) se extienden desde la superficie de la célula y promueven la adhesión sobre células epiteliales del huésped. Posee exopolisacáridos (alginatos), lipopolisacáridos y toxinas que causan enfermedades mortales como envenenamiento sanguíneo.

3.9.5 IDENTIFICACION ⁽³¹⁾

La identificación casi siempre se basa en la morfología de las colonias, positividad a oxidasa, presencia de pigmentos característicos, pruebas bioquímicas y crecimiento a 42°C.

3.9.6 TINCION DE GRAM ⁽²⁰⁾

Se hace un frotis utilizando una gota de solución salina sobre una lámina portaobjetos, se fija el frotis flameando la lámina suavemente con un mechero. Se le agrega un colorante (cristal violeta) para teñir las células bacterianas, un mordiente (lugol) que fija el colorante a la pared bacteriana, un decolorante (alcohol-acetona), solvente no polar que permite la salida del colorante de aquellas bacterias que poseen una pared celular con una delgada capa de peptidoglucano (gram negativo); para finalizar se da la contra tinción usando safranina que tiñe las bacterias que no fueron teñidas con el cristal violeta.

Esta técnica se basa en las características de la pared celular bacteriana la cual por su incapacidad de retener el cristal violeta en el interior de la célula, la bacteria se torna rosada por lo que se clasifica como gram negativa.

3.9.7 PRUEBAS BIOQUIMICAS ⁽⁸⁾ ⁽²⁰⁾

Se realizan distintas pruebas para determinar si la bacteria es capaz de utilizar sustratos específicos en su metabolismo; esto se verifica por medio de cambios en los medios de cultivo y se interpretan los resultados de acuerdo a la tabla de pruebas bioquímicas para determinar si el microorganismo es *Pseudomona sp.*

3.9.7.1 PRUEBA DE TRIPLE-AZUCAR-HIERRO Y SULFURO DE HIDROGENO (TSI Y H₂S) ⁽⁸⁾

Se fundamenta en la capacidad de las bacterias de aprovechar los sustratos en medio aerobio o anaerobio, produciendo acidez o alcalinidad en el medio que origina cambios de color tanto en la superficie como en el fondo del medio.

3.9.7.2 PRUEBA DE INDOL ⁽²⁰⁾

Cuando las bacterias son capaces de utilizar el triptófano, este se oxida liberando indol como subproducto, el cual al reaccionar con el reactivo de Kovac forma un anillo violáceo en la superficie del caldo el cual se interpreta como prueba positiva.

3.9.7.3 PRUEBA DE ROJO DE METILO ⁽²⁰⁾

Se realiza en un medio denominado VP en el que se realiza la prueba de Voges Proskauer. Las bacterias acidifican el medio y al agregar el indicador rojo de metilo se mantiene la coloración rosada, esto se interpreta como prueba positiva. Si el pH es superior a 6, se da un viraje del indicador a color amarillo lo cual determina que la prueba resulta negativa.

3.9.7.4 PRUEBA DE MOVILIDAD ⁽⁸⁾

Esta prueba determina si la bacteria posee estructuras que le permitan movilizarse, con la ayuda de un asa en punta se pica verticalmente el medio SIM solidificado en un tubo de ensayo. El crecimiento se observa tanto en el área inoculada como en el medio que no fue inoculado lo que se interpreta como prueba positiva.

3.9.7.5 PRUEBA DE VOGES PROSKAUER ⁽²⁰⁾

Se detecta la presencia de Acetil Metil Carbinol el cual se extrae con alfa naftol, posteriormente se oxida a diacetilo agregando hidróxido de potasio y oxígeno del ambiente. El desarrollo de un color rosado se considera resultado positivo.

3.9.7.6 PRUEBA DE CITRATO ⁽²⁰⁾

La bacteria es capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono y energía, se utiliza el medio solidificado Citrato Simmons que contiene sales de amonio, citrato y el indicador azul de bromo timol; el cual vira el color del medio de verde a azul, resultado de la liberación de amoníaco que provee basicidad al medio.

Bacteria	TSI			Indol	Rojo de Metilo	VP	Citrato	Movilidad
	Bisel	Fondo	H ₂ S					
<i>Pseudomona sp.</i>	Alcalino	Ácido	-	-	-	-	+	+

Cuadro N° 1. Reacciones bioquímicas de ***Pseudomona sp.***

“+” = positivo “-” = negativo

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

- Prospectivo: Basado en investigación bibliográfica de hechos actuales respaldados mediante análisis experimentales.
- Campo: Se recolectaron muestras en los puestos de venta de refrescos naturales no pasteurizados, ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.
- Experimental: Las muestras recolectadas se analizaron en el laboratorio de microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

Se consultaron libros, trabajos de graduación y revistas en:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de las Ingenierías de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Facultad de Química y Farmacia, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Consulta a CONACYT.
- Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO, UNIVERSO Y MUESTRA

- Universo: está conformado por catorce puestos de venta de refrescos naturales, siete puestos ubicados en el interior y siete ubicados en los alrededores de la Universidad de El Salvador (Ver Anexo N° 7 y 8).
- Muestra: está conformada por los refrescos naturales no pasteurizados que se comercializan sin hielo en bolsas plásticas, en los puestos antes mencionados (Ver Anexo N° 9).
- Muestreo: se recolectó una muestra de refresco en cada uno de los 14 puestos de venta; durante un período de tres semanas, haciendo un total de 42 muestras de refrescos. Se tomaron tres muestras de diferentes tipos de refresco en aquellos puestos con mayor variedad; para dar un mayor respaldo a los resultados obtenidos y así dar una mayor confiabilidad, mayor precisión y exactitud a los resultados obtenidos.

Las muestras se recolectaron de la misma manera que son comercializadas, inmediatamente se transportaron en hielera hasta el laboratorio de microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) para sus respectivos análisis, los cuales se realizaron en el mes de Octubre de 2009.

4.4 DIAGNOSTICO DE LOS PUESTOS DE VENTA DE REFRESCOS

Se observaron minuciosamente los puestos que comercializan refrescos naturales no pasteurizados ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador (Ver Anexo N° 7 y 8). Por medio de una guía de

observación se determinaron las condiciones de higiene bajo las cuales operan dichos puestos (Ver Anexo N° 15). Se determinó el porcentaje de puestos que no cumplen con las condiciones mínimas de higiene para comercializar refrescos naturales.

4.5 PARTE EXPERIMENTAL

4.5.1 SELECCION, RECOLECCION E IDENTIFICACION DE MUESTRAS

- De cada puesto de venta se recolectó una muestra de refresco sin hielo, en bolsa plástica, de aproximadamente 100 mL colocándolas posteriormente en bolsas plásticas transparentes con cierre hermético (ziploc) con su respectiva etiqueta (Ver Anexo N° 9).
- Inmediatamente se colocaron en una hielera sin hielo, limpia y desinfectada, y se transportaron al laboratorio de microbiología de alimentos.

4.5.2 PREPARACION DE LAS DILUCIONES DE LA MUESTRA

- Se desinfectó el exterior de la bolsa que contenía la muestra, posteriormente se homogenizó la muestra con movimientos por inversión hasta que todas las partículas de refresco estuvieran suspendidas.
- Se midieron 10 mL de la muestra de refresco con una pipeta Mohr despuntada, y se colocó en un frasco que contenía 90 mL de agua peptonada al 0.1%; se rotuló como dilución 10^{-1} y posteriormente se homogenizó.
- De la primera dilución se midieron 10 mL con otra pipeta de Mohr, estéril y despuntada; se colocó la muestra en un frasco de vidrio conteniendo 90 mL de

agua peptonada al 0.1%, se rotuló como dilución 10^{-2} y se homogenizó.

- De la dilución anterior se midieron 10 mL con otra pipeta Mohr, despuntada y estéril, se colocaron en un frasco de vidrio conteniendo 90 mL de agua peptonada 0.1% y se rotuló como dilución 10^{-3} . Se mezcló con 25 movimientos por inversión y se dejó en reposo (Ver Anexo N° 10). ⁽²⁴⁾

4.5.3 METODO PARA EL RECUESTO TOTAL EN PLACA DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS

Se realizó el análisis para cada dilución por duplicado, de la siguiente manera:

- Se distribuyeron sobre la mesa de trabajo 6 placas estériles correctamente rotuladas en su tapa indicando el medio, la fecha, la dilución y el código de la muestra.
- Se midió exactamente 1mL de dilución 10^{-1} y se transfirió a cada placa marcada con dilución 10^{-1} .
- Se vertió medio fundido, a 45°C, de Agar Plate Count.
- Se mezclaron las placas por técnica de ocho sobre una superficie lisa y horizontal, cerca del mechero y luego se dejó solidificar.
- Se repitió el procedimiento para las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .
- Se preparó una placa control con 15 mL de medio para descartar las colonias procedentes del ambiente.
- Se incubaron las placas en posición invertida por un período de 24 h a 35°C.
- Se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas con ayuda de un cuenta colonias (Ver Anexo N° 11). ⁽²⁴⁾

4.5.4 METODO PARA EL RECUESTO TOTAL EN PLACA DE MOHOS Y LEVADURAS

Para el recuento de mohos y levaduras se realizó el análisis para cada dilución por duplicado, de la siguiente manera:

- Se distribuyeron 6 placas estériles en la mesa de trabajo, correctamente rotuladas en su tapa indicando el medio, la fecha, la dilución y el código de la muestra.
- Se midió exactamente 1 mL de dilución 10^{-1} y se transfirió a cada placa marcada con dilución 10^{-1} .
- Se añadió medio fundido a aproximadamente 45°C , de Agar Papa Dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10%, a las placas rotuladas con dilución 10^{-1} .
- Se homogenizó el medio vertido sobre las placas que contenían la muestra, por medio de la técnica de ocho cerca de un mechero encendido, sobre una superficie lisa y horizontal.
- Se repitió el procedimiento para las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .
- Se preparó una placa control con 15 mL de medio para descartar las colonias procedentes del ambiente.
- Se incubaron las placas a temperatura ambiente en posición invertida por un período de 5 días.
- Se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas con la ayuda de un cuenta colonias (Ver Anexo N° 12). ⁽²⁴⁾

4.5.5 COLIFORMES TOTALES ⁽²⁴⁾

Se tomó un set de diez tubos conteniendo 10 mL de caldo Rapid Hi Coliform para cada muestra y se procedió de la siguiente manera:

- Se pipeteó y transfirió a cada uno de estos tubos, 10 mL de la muestra evitando el contacto de la pipeta con la boca o a las paredes del tubo.
- Se homogenizaron los tubos y se incubaron a 35°C por 24 horas.
- Se observó coloración verde azulada que indicó la presencia de coliformes totales. Se comparó el número de tubos positivos con la tabla para obtener el valor de NMP correspondiente a cada muestra (Ver Anexo N° 6 y 13).

4.5.6 COLIFORMES FECALES (MEDIO EC) ⁽²⁴⁾

Los tubos con caldo Rapid Hi Coliform que resultaron positivos se colocaron bajo una lámpara de luz ultravioleta. La fluorescencia indicó la presencia de ***Escherichia coli***. (Ver Anexo N° 13). A partir de cada uno de estos tubos, se transfirieron tres asadas a tubos que contenían caldo EC (***Escherichia coli***) y campana de Durham. Se incubaron en baño maría con flujo y temperatura constante a 44.5°C por 24h. Se observó la formación de gas atrapado en la campana de Durham que indica la presencia de coliformes fecales.

4.5.7 *Escherichia coli* ⁽²⁴⁾

A cada tubo con fluorescencia, se le agregó 3 gotas del reactivo de Kovac y se observó la formación de un anillo color violeta, que confirmó la presencia de ***Escherichia coli***. (Ver Anexo N° 13)

4.5.8 *Pseudomona sp.* ⁽³⁶⁾

De la prueba de coliformes totales se seleccionó un tubo positivo por cada muestra; luego con un asa estéril, se tomó una asada y se estrió cuidadosamente en placas conteniendo agar Cetrimide, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 35°C.

La presencia de colonias amarillentas con olor característico confirma la presencia de *Pseudomona sp.*

4.5.8.1 TINCION DE GRAM ⁽²⁰⁾

Con un asa estéril se tomó una colonia amarilla en agar cetrimide.

El inóculo se estrió en forma de espiral en el centro de una lámina porta objetos que contenía una pequeña gota de solución salina 0.9%, y se extendió por toda la lámina.

Se fijó la preparación flameando la lámina suavemente con un mechero.

Se cubrió el frotis con 15 gotas de cristal violeta y se dejó reposar durante 1 minuto sobre una superficie horizontal. Se lavó con agua destilada todo el residuo de cristal violeta, se cubrió la preparación con solución de lugol y se dejó reposar durante 1 minuto sobre una superficie horizontal.

Se lavó con agua el exceso de lugol, se colocó alcohol-acetona sobre el frotis dejándolo en contacto durante 15 segundos.

Se lavó la preparación rápidamente con agua destilada y se colocó sobre la preparación 5 gotas de safranina. Se dejó secar, posteriormente se observó al

microscopio con ayuda del objetivo de inmersión (100x) y se identificó la presencia de bastones cortos gram negativos.

4.5.8.2 PRUEBA DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA ^{(8) (20)}

Se realizaron los siguientes análisis bioquímicos a colonias seleccionadas por presentar pigmentación amarilla en agar cetrimide, que presuntivamente eran de *Pseudomona sp.*

4.5.8.2.1 PRUEBA DE TRIPLE-AZUCAR-HIERRO Y SULFURO DE HIDROGENO (TSI y H₂S)

Las colonias seleccionadas se inocularon haciendo una picada en el centro hasta el fondo del medio triple azúcar hierro; con la ayuda de un asa en punta, posteriormente se estriaron suavemente sobre el bisel. Se Incubaron los tubos por 24h a 35°C y se interpretaron los cambios del medio (Ver Anexo N° 17).

4.5.8.2.2 PRUEBA DE INDOL

Se inoculó una asada de colonias seleccionadas, en un tubo con caldo triptófano y se incubó por 24h a 37°C. Luego se extrajo el triptófano añadiendo 4 gotas de éter, se dejó reposar durante 5 minutos, posteriormente se añadieron 10 gotas de reactivo de Kovac lentamente por las paredes del tubo, se observó la formación de un anillo violáceo en la superficie el cual se interpreta como prueba positiva (Ver Anexo N° 17).

4.5.8.2.3 PRUEBA DE ROJO DE METILO

Se inoculó una asada de colonias seleccionadas, en un tubo con caldo MR-VP y se incubó durante 24h a 37°C. Luego se agregaron 4 gotas de reactivo rojo de metilo y se observó la coloración final del medio. Coloración roja indica prueba positiva (Ver Anexo N° 17).

4.5.8.2.4 PRUEBA DE MOVILIDAD

Se tomó una asada de colonia sospechosa con la ayuda de un asa en punta, se inoculó verticalmente en un tubo con medio agar SIM (sulfuro-indol-movilidad), picando hasta la mitad del tubo. Se incubó por 24h a 37°C observándose crecimiento en todo el medio de cultivo (Ver Anexo N° 17).

4.5.8.2.5 PRUEBA DE VOGES PROSKAUER

Se tomó una asada de colonias seleccionadas, se inoculó en caldo MR-VP (rojo de metilo-Voges Proskauer) y se incubó durante 24h a 37°C. Se agregó 0.6 mL de solución de alfa naftol, se agitó, posteriormente se añadió 0.2 gotas de hidróxido de potasio al 40%, se agitó, dejándose en reposo durante 20 minutos. No se observó cambio de coloración (Ver Anexo N° 17).

4.5.8.2.6 PRUEBA DE CITRATO

Con la ayuda de un asa en punta, se tomó una asada de colonias seleccionadas, se inoculó en medio Citrato Simmons incubándolo a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se observó el cambio de coloración del medio de verde a azul que indica prueba positiva (Ver Anexo N° 17).

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Previo a la recolección y procesamiento de muestras se realizó un diagnóstico por observación en 7 puestos de venta de refrescos ubicados en el interior y 7 puestos ubicados en los alrededores de la Universidad de El Salvador. El diagnóstico incluía diferentes variables entre las que se encuentran la ubicación de los puestos, espacio en las instalaciones, conservación de refrescos, entre otros (Ver Anexo N° 15); que permitieron recolectar información de los parámetros relacionados con las condiciones higiénicas bajo las cuales operan dichos puestos; obteniéndose el porcentaje de puestos no conformes con los requerimientos mínimos de higiene según buenas prácticas higiénicas y buenas prácticas de manufactura. Los resultados conformes y no conformes se presentan en letra negra en la siguiente tabla.

Cuadro N° 2. Guía de observación para diagnóstico de las condiciones higiénicas bajo las cuales operan los puestos de venta de refrescos ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.

Parámetros	% Cumple			% No cumple		
	Interior	Exterior	Total	Interior	Exterior	Total
¿Los puestos están ubicados en lugares libres de contaminación?	71.43	0.00	35.71	28.57	100.00	64.29
¿Cuentan con el espacio adecuado para el desarrollo de las actividades?	57.14	14.29	28.57	42.86	85.71	71.43
¿Proveen protección a los refrescos contra agentes externos?	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
¿Están contruidos con materiales que no contaminen los refrescos?	57.14	0.00	28.57	42.86	100.00	71.43
¿Cuentan con suministro de agua potable?	57.14	0.00	28.57	42.86	100.00	71.43
¿El personal utiliza redecillas en el cabello?	57.14	14.29	35.71	42.86	85.71	64.29
¿El personal utiliza indumentaria adecuada?	57.14	14.29	35.71	42.86	85.71	64.29

Cuadro N° 2. Continuación.

Parámetros	% Cumple			% No cumple		
	Interior	Exterior	Total	Interior	Exterior	Total
¿El personal usa objetos personales o maquillaje?	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
¿El personal se lava las manos después de recibir el dinero?	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
¿Los utensilios son adecuados?	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00
¿Los utensilios se encontraban limpios?	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00
¿Se almacenan los refrescos en un lugar adecuado?	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00
¿Se mantienen los refrescos a una temperatura adecuada para su conservación?	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00
¿Poseen recipientes con tapadera para los desechos sólidos?	100.00	42.86	71.43	0.00	57.14	28.57



Figura N° 1. Puestos de venta ubicados en aceras cerca de paradas de autobuses frente a Universidad de El Salvador.

La figura N° 1 muestra las condiciones bajo las cuales los puestos comercializan refrescos naturales; exponiéndolos a humo de vehículos, polvo de las calles, hojas de árboles e insectos. Debido a que las instalaciones no proveen suficiente protección contra agentes externos, los refrescos corren el riesgo de contaminarse. Así mismo, los puestos que se encuentran en el interior de la

Universidad de El Salvador, operan bajo condiciones nada favorables, debido a que algunos no cuentan con instalaciones comercializando los refrescos al aire libre exponiéndolos a diferentes contaminantes.



Figura N° 2. Espacio con el que cuentan los puestos para comercializar refrescos.

La figura N° 2 muestra el espacio reducido con el que cuentan el 71.43% de los puestos de venta para desarrollar todas las actividades necesarias tales como: limpieza, desinfección de utensilios, instalaciones, manejo, fabricación de refrescos y flujo del personal dentro del puesto.



Figura N° 3. Malas prácticas de higiene de los vendedores que comercializan refrescos.

La figura N° 3 muestra las malas prácticas higiénicas que realizan los vendedores de refrescos en el 71.43% de los puestos de venta; ya que estos puestos no cuentan con suministro de agua potable que les permita realizar la limpieza de utensilios constantemente, trasiegan los refrescos de una forma inadecuada, no cuentan con instalaciones para lavarse las manos después de recibir dinero y cada vez que sea necesario. Además, dichos puestos no cuentan con sistemas de drenaje que no impliquen un riesgo de contaminación para los refrescos.



Figura N° 4. Vendedores de refrescos.

La figura N° 4 muestra personal que labora en los puestos de comercialización de refrescos, en su mayoría no utilizan redecillas para el cabello ni vestimenta apropiada para la manipulación de los refrescos. Además estos portan objetos personales como relojes, aritos, anillos; que pueden acumular residuos de alimentos y suciedad.



Figura N° 5. Condiciones bajo las cuales comercializan los refrescos naturales.

La figura N° 5 muestra las condiciones de conservación de los refrescos naturales antes de ser comercializados. El 100% de los puestos de venta almacenan los refrescos en hieleras u ollas de aluminio; sin embargo el mismo porcentaje mantiene los refrescos sin refrigerar, a temperatura ambiente ya que los mantienen separados del hielo por tiempos prolongados desde su fabricación hasta la comercialización, lo cual favorece el crecimiento de microorganismos mesófilos.

Además de observar las condiciones de higiene de los establecimientos donde se preparan los refrescos, se evaluaron diferentes muestras de refrescos naturales no pasteurizados provenientes de los 14 puestos de venta; 7 ubicados en el interior y 7 ubicados en los alrededores de la Universidad de El Salvador, para determinar su calidad microbiológica. Los análisis que se le realizaron a las muestras son específicos y nos brindan información referente a la calidad de las materias primas empleadas en su elaboración, si los manipuladores de alimentos cumplen con las buenas prácticas higiénicas, si las condiciones de

almacenamiento y conservación son las ideales y si el establecimiento brinda la protección adecuada contra la contaminación ambiental de las áreas aledañas. Los parámetros evaluados fueron: Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias, que brindan información acerca de la calidad de las materias primas tanto de las frutas como del agua; ya que frutas demasiado maduras o en estado de descomposición presentan valores de mesófilos por encima de lo establecido en las normas. Determinación de Bacterias Coliformes por el método de número más probable, indica el grado de exposición del refresco a heces fecales, ya sea humanas o animales, debido a manipulación antihigiénica, lavado inadecuado de frutas, utensilios, equipos o por utilización de agua contaminada con material fecal; Recuento Total de Mohos y Levaduras, que indica las condiciones ambientales inadecuadas bajo las cuales se elaboran los refrescos así como la inadecuada limpieza de utensilios e instalaciones. Determinación de bacterias patógenas: ***Escherichia coli*** y ***Pseudomona sp.***, indican si el refresco ha sido elaborado con agua que no ha sido potabilizada adecuadamente, ya que se encuentra contaminada con bacterias con alto potencial de causar enfermedades en seres humanos. Previo a los análisis se tomo el pH de las muestras (Ver Anexo N° 18), el cual sirve como complemento para determinar los factores que favorecieron la proliferación de las bacterias. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de cada parámetro, de los cuales aquellos datos resaltados en letra negrita, representan los resultados conformes con la norma.

Cuadro N° 3. Resultados de Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias

Límite Microbiológico establecido por la norma NSO 67.18.01:01			<1000 UFC/mL
Código de puesto	Tipo de muestra	UFC/mL	Resultado
1 A	Limonada	2930	No Conforme
	Tamarindo	355	Conforme
	Granadilla	973	Conforme
2 A	Arrayán	196,000	No Conforme
	Limonada	1455	No Conforme
	Arrayán	44,750	No Conforme
1B	Maracuyá	9740	No Conforme
	Jamaica	2393	No Conforme
	Maracuyá	3577	No Conforme
2B	Horchata	19960	No Conforme
	Arrayán	11540	No Conforme
	Horchata	11747	No Conforme
3B	Jamaica	1130	No Conforme
	Horchata	2592	No Conforme
	Horchata	3813	No Conforme
4B	Tamarindo	2920	No Conforme
	Tamarindo	1115	No Conforme
	Tamarindo	1317	No Conforme
1C	Agua de coco	>6500000	No Conforme
	Horchata de coco	25000	No Conforme
	Agua de coco	14500	No Conforme
1E	Tamarindo	1880	No Conforme
	Tamarindo	4000	No Conforme
	Tamarindo	8250	No Conforme
2E	Chan	7810	No Conforme
	Chan	2200	No Conforme
	Chan	12018	No Conforme
1F	Naranja	220	Conforme
	Naranja	1522	No Conforme
	Guanaba/Piña	6393	No Conforme
2F	Piña	13975	No Conforme
	Tamarindo	64500	No Conforme
	Arrayán	56575	No Conforme
3F	Arrayán	6153	No Conforme
	Cebada	30975	No Conforme
	Cebada	150500	No Conforme
1G	Limonada	7777	No Conforme
	Cebada	8075	No Conforme
	Tamarindo	940	Conforme
1H	Ensalada	18843	No Conforme
	Jamaica	1698	No Conforme
	Tamarindo	2723	No Conforme

Cuadro N° 4. Resultados del Recuento Total de Mohos y Levaduras

Límite Microbiológico establecido por la norma NSO 67.18.01:01			<20 UFC/mL
Código de puesto	Tipo de muestra	UFC/mL	Resultado
1 A	Limonada	2410	No Conforme
	Tamarindo	447	No Conforme
	Granadilla	1587	No Conforme
2 A	Arrayán	29,700	No Conforme
	Limonada	1290	No Conforme
	Arrayán	255,000	No Conforme
1B	Maracuyá	12650	No Conforme
	Jamaica	568	No Conforme
	Maracuyá	18607	No Conforme
2B	Horchata	3310	No Conforme
	Arrayán	4518	No Conforme
	Horchata	5067	No Conforme
3B	Jamaica	43	No Conforme
	Horchata	270	No Conforme
	Horchata	703	No Conforme
4B	Tamarindo	95	No Conforme
	Tamarindo	410	No Conforme
	Tamarindo	148	No Conforme
1C	Agua de coco	5788	No Conforme
	Horchata de coco	23650	No Conforme
	Agua de coco	2093	No Conforme
1E	Tamarindo	2411	No Conforme
	Tamarindo	2955	No Conforme
	Tamarindo	6500000	No Conforme
2E	Chan	305	No Conforme
	Chan	462	No Conforme
	Chan	330	No Conforme
1F	Naranja	95	No Conforme
	Naranja	3500	No Conforme
	Guanaba/Piña	16200	No Conforme
2F	Piña	2190	No Conforme
	Tamarindo	498000	No Conforme
	Arrayán	69500	No Conforme
3F	Arrayán	3800	No Conforme
	Cebada	627	No Conforme
	Cebada	6500000	No Conforme
1G	Limonada	6137	No Conforme
	Cebada	245	No Conforme
	Tamarindo	125	No Conforme
1H	Ensalada	86000	No Conforme
	Jamaica	6557	No Conforme
	Tamarindo	5523	No Conforme

Cuadro N° 5. Resultados de NMP para Coliformes Totales

Límite Microbiológico establecido por la norma NSO 67.18.01:01			<1.1 NMP/100 mL
Código de puesto	Tipo de muestra	NMP/ 100mL	Resultado
1 A	Limonada	<1.1	Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme
	Granadilla	>23	No Conforme
2 A	Arrayán	>23	No Conforme
	Limonada	16.1	No Conforme
	Arrayán	>23	No Conforme
1B	Maracuyá	>23	No Conforme
	Jamaica	>23	No Conforme
	Maracuyá	>23	No Conforme
2B	Horchata	>23	No Conforme
	Arrayán	>23	No Conforme
	Horchata	>23	No Conforme
3B	Jamaica	>23	No Conforme
	Horchata	>23	No Conforme
	Horchata	>23	No Conforme
4B	Tamarindo	>23	No Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme
1C	Agua de coco	>23	No Conforme
	Horchata de coco	>23	No Conforme
	Agua de coco	>23	No Conforme
1E	Tamarindo	>23	No Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme
	Tamarindo	<1.1	Conforme
2E	Chan	>23	No Conforme
	Chan	>23	No Conforme
	Chan	>23	No Conforme
1F	Naranja	<1.1	Conforme
	Naranja	<1.1	Conforme
	Guanaba/Piña	<1.1	Conforme
2F	Piña	>23	No Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme
	Arrayán	>23	No Conforme
3F	Arrayán	>23	No Conforme
	Cebada	>23	No Conforme
	Cebada	16.1	No Conforme
1G	Limonada	>23	No Conforme
	Cebada	>23	No Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme
1H	Ensalada	>23	No Conforme
	Jamaica	>23	No Conforme
	Tamarindo	>23	No Conforme

Cuadro N° 6. Resultados de NMP para Coliformes Fecales

Límite Microbiológico establecido por la norma NSO 67.18.01:01			<1.1 NMP/100 mL
Código de puesto	Tipo de muestra	NMP/ 100mL	Resultado
1A	Limonada	<1.1	Conforme
	Tamarindo	<1.1	Conforme
	Granadilla	1.1	No Conforme
2A	Arrayán	>23	No Conforme
	Limonada	<1.1	Conforme
	Arrayán	>23	No Conforme
1B	Maracuyá	>23	No Conforme
	Jamaica	9.2	No Conforme
	Maracuyá	16.1	No Conforme
2B	Horchata	2.2	No Conforme
	Arrayán	>23	No Conforme
	Horchata	1.1	No Conforme
3B	Jamaica	5.1	No Conforme
	Horchata	23	No Conforme
	Horchata	23	No Conforme
4B	Tamarindo	6.9	No Conforme
	Tamarindo	5.1	No Conforme
	Tamarindo	1.1	No Conforme
1C	Agua de coco	16.1	No Conforme
	Horchata de coco	23	No Conforme
	Agua de coco	12	No Conforme
1E	Tamarindo	>23	No Conforme
	Tamarindo	12	No Conforme
	Tamarindo	<1.1	Conforme
2E	Chan	12	No Conforme
	Chan	9.2	No Conforme
	Chan	1.1	No Conforme
1F	Naranja	<1.1	Conforme
	Naranja	<1.1	Conforme
	Guanaba/Piña	<1.1	Conforme
2F	Piña	>23	No Conforme
	Tamarindo	3.6	No Conforme
	Arrayán	3.6	No Conforme
3F	Arrayán	>23	No Conforme
	Cebada	>23	No Conforme
	Cebada	12	No Conforme
1G	Limonada	23	No Conforme
	Cebada	23	No Conforme
	Tamarindo	1.1	No Conforme
1H	Ensalada	23	No Conforme
	Jamaica	3.6	No Conforme
	Tamarindo	1.1	No Conforme

Cuadro N° 7. Identificación de Patógenos (*Escherichia coli*)

Límite Microbiológico establecido por la norma NSO 67.18.01:01			Ausencia
Código de puesto	Tipo de muestra	Identificación de <i>Escherichia coli</i>	Resultado
1A	Limonada	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Granadilla	Presencia	No Conforme
2A	Arrayán	Presencia	No Conforme
	Limonada	Ausencia	Conforme
	Arrayán	Presencia	No Conforme
1B	Maracuyá	Presencia	No Conforme
	Jamaica	Presencia	No Conforme
	Maracuyá	Presencia	No Conforme
2B	Horchata	Presencia	No Conforme
	Arrayán	Presencia	No Conforme
	Horchata	Presencia	No Conforme
3B	Jamaica	Presencia	No Conforme
	Horchata	Presencia	No Conforme
	Horchata	Presencia	No Conforme
4B	Tamarindo	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Presencia	No Conforme
1C	Agua de coco	Presencia	No Conforme
	Horchata de coco	Presencia	No Conforme
	Agua de coco	Presencia	No Conforme
1E	Tamarindo	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
2E	Chan	Presencia	No Conforme
	Chan	Presencia	No Conforme
	Chan	Presencia	No Conforme
1F	Naranja	Ausencia	Conforme
	Naranja	Ausencia	Conforme
	Guanaba/Piña	Ausencia	Conforme
2F	Piña	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Presencia	No Conforme
	Arrayán	Presencia	No Conforme
3F	Arrayán	Presencia	No Conforme
	Cebada	Presencia	No Conforme
	Cebada	Presencia	No Conforme
1G	Limonada	Presencia	No Conforme
	Cebada	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Presencia	No Conforme
1H	Ensalada	Presencia	No Conforme
	Jamaica	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	Presencia	No Conforme

Cuadro N° 8. Identificación de Patógenos (*Pseudomona sp.*)

Límite Microbiológico establecido por la norma NSO 67.18.01:01			Ausencia
Código de puesto	Tipo de muestra	Identificación de <i>Pseudomona sp.</i>	Resultado
1A	Limonada	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Granadilla	Ausencia	Conforme
2A	Arrayán	Ausencia	Conforme
	Limonada	Ausencia	Conforme
	Arrayán	Ausencia	Conforme
1B	Maracuyá	Ausencia	Conforme
	Jamaica	Ausencia	Conforme
	Maracuyá	Ausencia	Conforme
2B	Horchata	Ausencia	Conforme
	Arrayán	Ausencia	Conforme
	Horchata	Ausencia	Conforme
3B	Jamaica	Ausencia	Conforme
	Horchata	Presencia	No conforme
	Horchata	Ausencia	Conforme
4B	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
1C	Agua de coco	Ausencia	Conforme
	Horchata de coco	Ausencia	Conforme
	Agua de coco	Ausencia	Conforme
1E	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
2E	Chan	Ausencia	Conforme
	Chan	Ausencia	Conforme
	Chan	Ausencia	Conforme
1F	Naranja	Ausencia	Conforme
	Naranja	Ausencia	Conforme
	Guanaba/Piña	Ausencia	Conforme
2F	Piña	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
	Arrayán	Ausencia	Conforme
3F	Arrayán	Ausencia	Conforme
	Cebada	Ausencia	Conforme
	Cebada	Ausencia	Conforme
1G	Limonada	Ausencia	Conforme
	Cebada	Presencia	No conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme
1H	Ensalada	Ausencia	Conforme
	Jamaica	Ausencia	Conforme
	Tamarindo	Ausencia	Conforme

Cuadro N° 9. Resumen de los parámetros evaluados en muestras de refrescos naturales no pasteurizados.

Código de puesto	Tipo de muestra	RTBMA	RTML	CT	CF	Determinación de Patógenos		Resultado Final
						<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona sp.</i>	
Criterios Microbiológicos NSO 67.18.01:01		<1000 UFC/mL	<20 UFC/mL	<1.1 NMP/100mL	Ausencia			
1 A	Limonada	2930	2410	<1.1	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	355	447	>23	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
	Granadilla	973	1587	>23	1.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
2 A	Arrayán	196,000	29,700	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Limonada	1455	1290	16.1	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
	Arrayán	44,750	255,000	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
1 B	Maracuyá	9740	12650	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Jamaica	2393	568	>23	9.2	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Maracuyá	3577	18607	>23	16.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
2 B	Horchata	19960	3310	>23	2.2	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Arrayán	11540	4518	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Horchata	11747	5067	>23	1.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
3 B	Jamaica	1130	43	>23	5.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Horchata	2592	270	>23	23	Presencia	Presencia	No Conforme
	Horchata	3813	703	>23	23	Presencia	Ausencia	No Conforme
4 B	Tamarindo	2920	95	>23	6.9	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	1115	410	>23	5.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	1317	148	>23	1.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
1 C	Agua de coco	>6500000	5788	>23	16.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Horchata de coco	25000	23650	>23	23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Agua de coco	14500	2093	>23	12	Presencia	Ausencia	No Conforme
1 E	Tamarindo	1880	2411	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	4000	2955	>23	12	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	8250	6500000	<1.1	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
2 E	Chan	7810	305	>23	12	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Chan	2200	462	>23	9.2	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Chan	12018	330	>23	1.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
1 F	Naranja	220	95	<1.1	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
	Naranja	1522	3500	<1.1	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
	Guanaba/Piña	6393	16200	<1.1	<1.1	Ausencia	Ausencia	No Conforme
2 F	Piña	13975	2190	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	64500	498000	>23	3.6	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Arrayán	56575	69500	>23	3.6	Presencia	Ausencia	No Conforme
3 F	Arrayán	6153	3800	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Cebada	30975	627	>23	>23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Cebada	150500	6500000	16.1	12	Presencia	Ausencia	No Conforme
1 G	Limonada	7777	6137	>23	23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Cebada	8075	245	>23	23	Presencia	Presencia	No Conforme
	Tamarindo	940	125	>23	1.1	Presencia	Ausencia	No Conforme
1 H	Ensalada	18843	86000	>23	23	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Jamaica	1698	6557	>23	3.6	Presencia	Ausencia	No Conforme
	Tamarindo	2723	5523	>23	1.1	Presencia	Ausencia	No Conforme

Cuadro N° 10. Resultado de pruebas bioquímicas para identificación de *Pseudomona sp.*

Prueba	Código del puesto	
	3B	1G
Movilidad	Positivo	Positivo
Indol	Negativo	Negativo
Citrato	Positivo	Positivo
Rojo de metilo	Negativo	Negativo
Voges Proskauer	Negativo	Negativo
TSI	Bisel alcalino/Fondo ácido	Bisel alcalino/Fondo ácido
Tinción de Gram.	Negativo	Negativo

RECUESTO TOTAL DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS

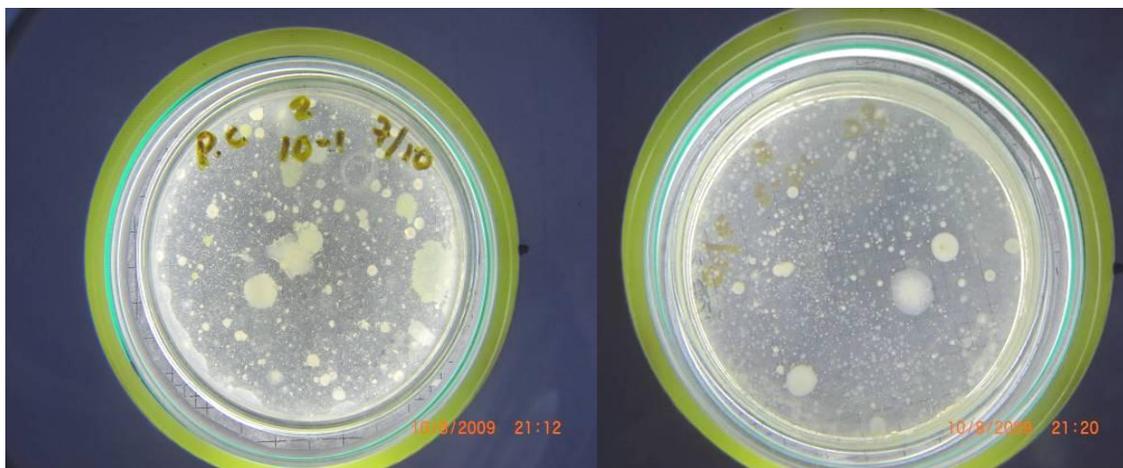


Figura N° 6. Recuento Total de Mesófilos Aerobios de muestras de refrescos en Agar Plate Count.

La figura N° 6 muestra el recuento elevado de microorganismos mesófilos aerobios en el 90.48% de las muestras analizadas. Estas muestras presentaron recuentos superiores a 1000 UFC/mL el cual es el límite aceptado por la Norma Salvadoreña Obligatoria para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2 NSO 67.18.01:01 por lo que dicho porcentaje de muestras no cumplen con este parámetro (Ver cuadro N° 3).

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS

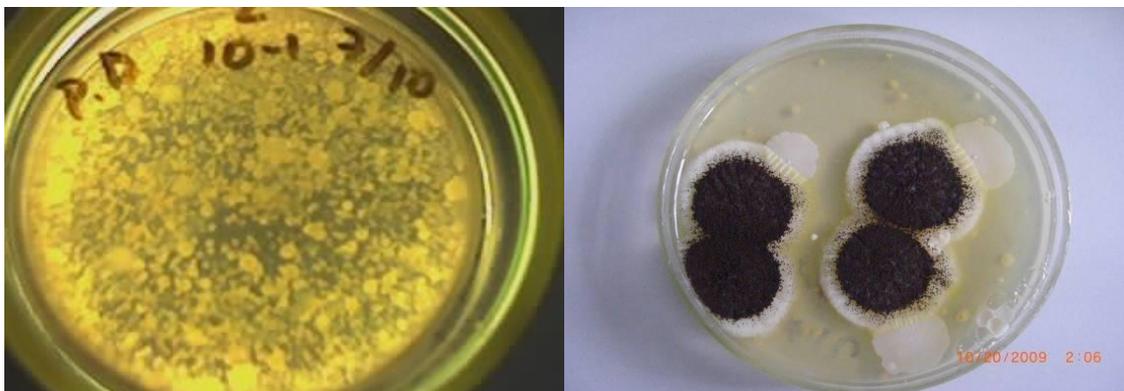


Figura N° 7. Recuento Total de Mohos y Levaduras de muestras de refrescos en Agar Papa Dextrosa acidificado.

En el Recuento Total de Mohos y Levaduras el 100% de las muestras analizadas presentaron valores por encima de 20 UFC/mL, el cual es límite aceptado por la Norma Salvadoreña Obligatoria para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2 NSO 67.18.01:01, por lo que ninguna muestra cumple con este parámetro. La figura N° 7 muestra una variada población de hongos de los cuales sobresale el género *Aspergillus sp.* responsable de producir alteraciones pulmonares y aflatoxinas que producen necrosis, cáncer de hígado y otras enfermedades graves en humanos (Ver cuadro N° 4).

DETERMINACION DE COLIFORMES Y *ESCHERICHIA COLI*



Figura N° 8. Determinación de Bacterias Coliformes en muestras de refrescos utilizando como sustrato caldo Rapid Hi Coliform.

La figura N° 8 muestra prueba positiva para la determinación de Bacterias Coliformes en el 88.10% de muestras de refrescos; las cuales presentaron valores superiores a 1.1 NMP/100mL lo cual indica que solo el 11.90% de las muestras no están contaminadas con bacterias coliformes (Ver cuadros N° 5 y 6).

DETERMINACION DE MICROORGANISMOS PATOGENOS

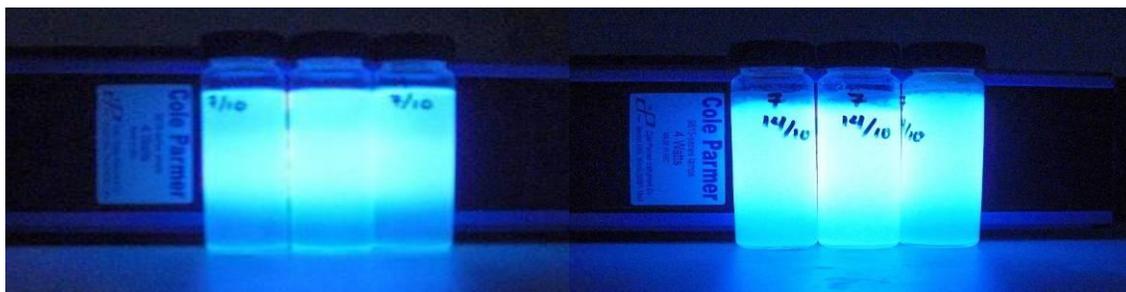


Figura N° 9. Presencia de fluorescencia con luz ultravioleta en la determinación de *Escherichia coli* en muestras de refrescos utilizando caldo Rapid Hi Coliform como sustrato.

La figura N° 9 muestra prueba confirmativa que indica presencia de *Escherichia coli* en el 83.33% de las muestras. Por lo que dichas muestras no cumplen con este criterio microbiológico, ya que la norma salvadoreña obligatoria para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2 NSO 67.18.01:01 especifica la ausencia de microorganismos patógenos (Ver cuadro N° 7).

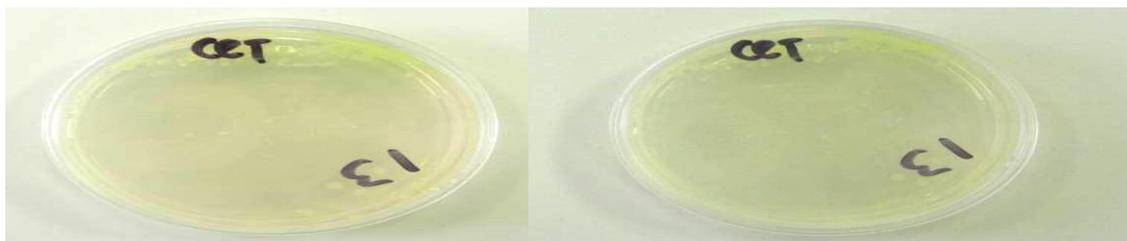


Figura N° 10. Presencia de *Pseudomona sp.* en Agar Cetrimide.

La figura N° 10 muestra la presencia de *Pseudomona sp.* en el 4.76% de muestras de refrescos analizadas en agar cetrimide, en el cual se observó la formación de colonias con pigmentación amarillo-fluorescente; luego de realizarse la tinción de GRAM y las pruebas bioquímicas, se estableció que efectivamente dichas muestras estaban contaminadas con *Pseudomona sp.* (Ver cuadro N° 8).

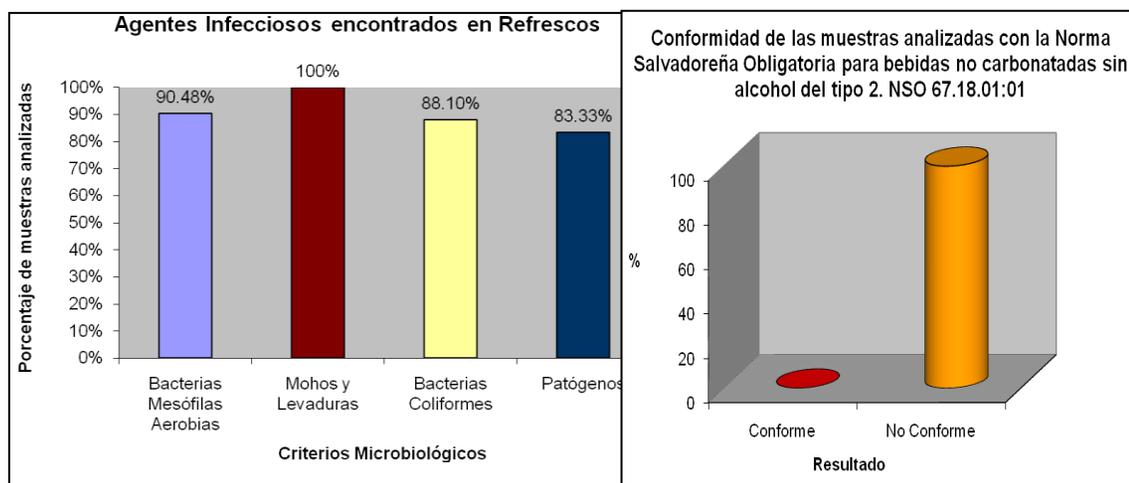


Figura N° 11. Resultado de muestras conformes y no conformes con la norma salvadoreña NSO 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2, por parámetros y en general.

La figura N° 11 muestra el porcentaje de muestras de refrescos naturales conformes y no conformes con la norma salvadoreña obligatoria en general y por parámetros. Debido a que el 100% de las muestras no cumplen con al menos un parámetro de los criterios microbiológicos establecidos en la norma salvadoreña obligatoria NSO 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2, ninguna muestra es apta para consumo humano (Ver Cuadro N° 9).

Después de haber realizado los análisis correspondientes a las muestras de refrescos naturales no pasteurizados durante el período de Octubre de 2009; se le entregó a la Dirección de Bienestar Universitario de la Universidad de El Salvador, una carta informando dichos resultados en un cuadro resumiendo los porcentajes de muestras no conformes por cada criterio microbiológico establecido en la norma salvadoreña obligatoria NSO 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2, incluyendo la conclusión final de los resultados que allí se presentan (Ver Anexo N° 16).

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las condiciones bajo las cuales operan los puestos muestreados no cumplen con los requerimientos mínimos de higiene por falta de instalaciones adecuadas, capacitación de los manipuladores, calidad de las frutas, el agua utilizada en la fabricación y la contaminación ambiental.
2. El 100% de los refrescos analizados no son conservados debidamente refrigerados, por lo que el tiempo excesivo entre la preparación y el consumo es un factor que acelera su deterioro favoreciendo la reproducción de bacterias ya existentes en dichos refrescos.
3. El elevado recuento de mesófilos y los valores obtenidos de pH indica que las frutas estaban demasiado maduras o próximas a descomponerse así como una inadecuada desinfección e higiene de las mismas.
4. El recuento elevado de mohos y levaduras refleja la deficiente e inapropiada higiene de los ingredientes, utensilios e instalaciones utilizados en la elaboración de refrescos; además señala excesiva contaminación ambiental en los alrededores de los puestos demostrando que dichas instalaciones no proveen la suficiente protección contra los agentes externos.
5. La diversidad de hongos encontrados en las muestras indica la presencia de géneros patógenos tales como *Aspergillus niger*, responsables de producir alteraciones pulmonares y aflatoxinas que producen necrosis, cáncer de hígado y otras enfermedades graves en seres humanos.

6. El valor elevado de bacterias coliformes en las muestras de refrescos indica manipulación y prácticas higiénicas inadecuadas del personal y deficiente calidad del agua utilizada en la elaboración de refrescos.
7. El valor elevado de coliformes fecales encontrado en las muestras, indica un alto grado de contaminación de origen fecal por agua contaminada con heces fecales, manipulación y malas prácticas higiénicas del personal. Su presencia favorece la multiplicación de microorganismos patógenos.
8. Al comparar los resultados obtenidos con la NSO 67.18.01:01, se encontró que los siguientes porcentajes sobrepasan los criterios microbiológicos establecidos; 90.48% para mesófilos, 100% para mohos y levaduras, 88.10% para bacterias coliformes, 83.33% para ***Escherichia coli***, 4.76% para ***Pseudomona sp.***
9. Aquellos refrescos que presentan valores de pH cercanos a 6, presentan mayor contaminación ya que los coliformes y la ***Pseudomona sp.*** proliferan en pH neutro, sin embargo los mohos y levaduras están presentes en todas las muestras ya que por su capacidad de formar esporas, sobreviven a pH extremo.
10. El 100% de las muestras de refrescos naturales analizadas no cumplen con lo establecido en la norma NSO 67.18.01:01, por lo que constituyen un riesgo para la salud ya que están contaminados con ***Escherichia coli*** y ***Pseudomona sp.***, microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Lavar bien las frutas con agua potable clorada, jabón y agentes desinfectantes eficaces; además lavarse las manos minuciosamente con agua y jabón antes y después de manipular los refrescos.
2. Que el Ministerio de Salud implemente programas dirigidos a los comerciantes de refrescos, que contribuyan a mejorar la calidad de los refrescos que comercializan.
3. A las autoridades correspondientes concientizar a los comerciantes de refrescos naturales, sobre el riesgo que corre la población al consumir refrescos contaminados.
4. Que el Ministerio de Salud emita un certificado que autorice a los comerciantes de refrescos a venderlos siempre y cuando cumplan con la inocuidad requerida, cuyo certificado debe estar en un lugar visible al momento de comercializar dichos refrescos.
5. A las autoridades correspondientes inspeccionar los puestos de refrescos y las condiciones de higiene mediante las cuales operan con el fin de garantizar la calidad microbiológica de los refrescos que comercializan.
6. A las autoridades competentes desarrollar programas para capacitar en buenas prácticas higiénicas a aquellas personas que comercializan refrescos en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.
7. Dedicar recursos significativos para disminuir la incidencia de enfermedades gastrointestinales asociadas a la ingestión de alimentos contaminados.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Arias, M. y otros. 1989. Análisis bacteriológico de alimentos de venta ambulante (en línea). Revista costarricense de ciencias médicas. 10(2): 51-6. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?!sisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=107644&indexSearch=ID>
2. Ávila P. G. y otros. 2008. Calidad microbiológica de jugos preparados en hogares de Bienestar Familiar en la zona norte de Cundinamarca (en línea). Trabajo de Graduación. Bogotá, Co. Pontificia Universidad Javeriana. 57 p. Consultado 10 jul. 2009. Disponible en: <http://www.cundinamarca.gov.co>
3. Azorín P. 1972. Curso de muestreo y aplicaciones. Madrid, España. Editorial Aguilar.
4. Benítez P. 1996. Good Manufacturing Practices. Madrid, España. Editorial Imprime Graficas Fanny.
5. Bermúdez Recinos, JM. y otros. 1996. Detección de bacterias Coliformes en agua y hielo de ocho plantas industriales del área metropolitana. Trabajo de Graduación Lic. San Salvador. Universidad de El Salvador.
6. Bernal M. I. Cancerígenos y materia fecal en comidas callejeras (en línea). El Heraldo. Co. Consultado 09 jul. 2009. Disponible en: http://www.elheraldo.com.co/ELHERALDO/BancoConocimiento/L/locancerienos_y_materia_fecal_en_comidas_callejeras/locancerienos_y_materia_fecal_en_comidas_callejeras.asp

7. Bienestar Universitario. 2009. Reporte de enfermedades gastrointestinales de enero a diciembre de 2008 y de abril hasta agosto de 2009. San Salvador. Universidad de El Salvador.
8. Borja Orantes, CE. y otros. 2002. Evaluación de la calidad microbiológica de nieves elaboradas artesanalmente y comercializadas en las afueras de los centros educativos del municipio de Mejicanos. Trabajo de Graduación Lic. San Salvador. Universidad de El Salvador.
9. Burgeois, GM. y otros. 1988. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. ES. Ed. Acribia. v. 1, p. 187-191.
10. Cabrera Aguilar, JR. y otros. 2008. Validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico. Trabajo de Graduación Lic. San Salvador. Universidad de El Salvador. 133 p.
11. Calderón, GR. 2001. Informe de la situación de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en El Salvador. Fortalecimiento de los Comités Nacionales del Codex y Aplicación de las Normas del Codex Alimentarius. Proyecto TCP/RLA/0065 FAO/CONACYT. San Salvador.
12. Campos García, EY. y otros. 2004. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de la pulpa de el fruto ***Crescentia alata*** (Morro) en bacterias de origen gastrointestinal. Trabajo de Graduación Lic. San Salvador. Universidad de El Salvador. p. 68.

13. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ESA). 1999. Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.18.01:01. San Salvador, ESA.
14. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ESA). 2009. Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA). 67.04.50:08. San Salvador, ESA. 36 p.
15. Díaz S. 1992. Métodos Normalizados para el análisis de agua potables y residuales. Madrid. ES. p. 9-90.
16. Dirección General para la Salud Pública. 2001. Guía del manipulador de alimentos (en línea). Valencia. ES. Cancillería de Sanidad Valenciana. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: <http://www.costaazahar.com/pdfs/MANIPULADORES.pdf>
17. Earle RL. 1998. Ingeniería de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
18. Eley, A. 1994. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Zaragoza, ES. Ed. Acribia. p. 208.
19. Escartín E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Primera edición. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
20. Facultad de Química y Farmacia. Microbiología y Parasitología. 2009. Manual de laboratorio de microbiología y parasitología. Universidad de El Salvador.

21. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, IT). 1995. Código de prácticas de Higiene para la elaboración y expendio de alimentos vendidos en la vía pública (Norma regional para la América Latina y el Caribe) (en línea). 43. Roma. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=28
22. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, IT). 2004. Manual for trainers in fruit and vegetables safety (en línea). Roma. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: http://www.fao.org/es/esn/CDfruits_en/launch.htm
23. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, IT). 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico (en línea). Roma. Consultado 14 abr. 2009. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/011/i0480s/i0480s00.htm>.
24. FDA (Food and Drug Administration). 2000. Bacteriological Analytical Manual (en línea). 8 rev. Arlington. USA. AOAC (Asociation of Analytical Communities). Consultado 04 oct. 2009. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>
25. Fernández. E. 2009. Diez preguntas clave sobre la higiene de manos (en línea). 2009. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: <http://labbio.bligoo.com>

/content/view/519062/DIEZ-PREGUNTAS-CLAVE-SOBRE-LA-HIGIENE-DE-MANOS.html

26. Frazier WC. 1972. Microbiología de los alimentos. 2 ed. Zaragoza, ES. Ed. Acribia. p. 75-77.
27. Gabin, MM. C2007. Normas para la Higiene y adecuada manipulación de los alimentos (en línea). AR. Consultado 17 jul. 2009. Disponible en: <http://www.nutri-salud.com.ar>
28. González. E. Inocuidad de los alimentos (en línea). Consultado 07 jul. 2009. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos41/inocuidad-alimentos/inocuidad-alimentos.shtml>
29. Hartman, P. y otros. 1982. Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. V. 43, Nº 6. p. 1(9): 1320-1329.
30. Hayes, PR. 1993. Microbiología e higiene de los alimentos. ES. Ed. Acribia. p. 10-14, 21.
31. Jawetz E. y otros. 2004. Microbiología Médica. 18 ed. México D.F. Ed. Manual Moderno. Trad. F. Sánchez. p. 107, 241-243
32. Jay J. Microbiología Moderna de los alimentos. 4 ed. Zaragoza, ES. Ed. Acribia S.A. p. 123, 169, 361, 535.
33. Laboratorio de control de calidad Analiza Calidad. 2008. Microorganismos indicadores (en línea). Madrid. ES. Grupo Analiza Calidad. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/arf2005-1.pdf>.

34. Martínez JR. y otros. 2003. Elaboración de programas formativos para manipuladores de alimentos en el contexto de un sistema HACCP (en línea). Madrid, ES. Imprenta Fareso. Consultado 16 jul. 2009. Disponible en: <http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/Elaboracion%20de%20programas.pdf>
35. Menéndez Guidos, RM. y otros. 1995. Determinación de bacterias Coliformes en muestras de hielo recolectadas en lugares de ventas populares de minutas y refrescos. Trabajo de Graduación Lic. San Salvador. Universidad de El Salvador.
36. Merck. 2005. Microbiology Manual. 12 ed. Darmstadt. Germany. 455 p.
37. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Unidad Nacional de Epidemiología. 2009. Incidencia de las principales enfermedades en vigilancia epidemiológica especial (en línea). San Salvador. ESA. Consultado 11 ene. 2010. Disponible en: http://www.mspas.gob.sv/vigi_epide2009/edad_consolidado2009.asp
38. Moreno B. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Zaragoza, ES. Ed. ACRIBIA.
39. Murillo Rodríguez, M. y otros. 2007. Calidad microbiológica y fisicoquímica de refrescos no carbonatados listos para beber, comercializados en el área metropolitana de San Salvador. Trabajo de Graduación Lic. San Salvador. Universidad de El Salvador.
40. OMS (Organización Mundial de la Salud, SU). 1978. "Aspectos Microbiológicos de la higiene de los alimentos". p. 57-59.

41. Prescott, L. y otros. 1993. Microbiología. 2 ed. Iowa. EUA. WCB Publishers. p. 838-839.
42. Ramis, V. 1996. Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Zaragoza, ES. Ed. Acribia. p. 606.
43. SIECA (Sistema de Información de la Integración Económica Centroamericana). Unión Aduanera Centro Americana de Alimentos y Bebidas. 2004. Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura de la industria de Alimentos y Bebidas Procesados (en línea). Ver. 3. Guatemala. Consultado 15 may. 2009. Disponible en: <http://www.comex.go.cr/acuerdos/centroamerica/Documentos%20del%20Grupo%20Tcnico%20de%20Registros/reglamento%20buenas%20practicass%20Manufactura%20industria.pdf>
44. Universidad de Virginia. 2008. La medicina para el viajero (en línea). EUA. Consultado 13 mar. 2009. Disponible en: http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_travel_sp/ecoli.cfm
45. Utziger. et al. 1992. Calidad microbiológica y valor nutricional de frutas frescas que se venden en puestos callejeros. Revista costarricense de ciencias médicas. 13 (1/2): 17-26.

GLOSARIO

GLOSARIO

- **Alimento contaminado:** aquel que contenga cualquier agente biológico o químico, materia extraña u otras sustancias no añadidas intencionalmente y que pueden comprometer la inocuidad de los alimentos tomados. ⁽¹⁴⁾
- **Anaerobio:** que tiene la capacidad de vivir o metabolizar en ausencia de oxígeno. ⁽¹⁰⁾
- **Anaerobio facultativo:** que suele vivir en presencia de oxígeno, pero puede sobrevivir en ausencia de él. ⁽¹⁰⁾
- **Buenas prácticas de manufactura:** son condiciones de infraestructura y procedimientos establecidos para todos los procesos de producción y control de alimentos, bebidas y productos afines, con el objeto de garantizar la calidad e inocuidad de dichos productos según normas aceptadas internacionalmente. ⁽⁴³⁾
- **Criterio microbiológico de Inocuidad:** define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote y es aplicable a productos comercializados. ⁽¹⁴⁾
- **Cromógeno:** es un sustrato coloreado que es activado por una enzima que produce una coloración final. ⁽⁴¹⁾
- **Desinfección:** es la reducción del número de microorganismos presentes en las superficies de edificios, instalaciones, maquinarias, utensilios, equipos,

mediante tratamientos químicos o métodos físicos adecuados, hasta un nivel que no constituya riesgo de contaminación para los alimentos. ⁽⁴³⁾

- **Fluorogéno:** es un sustrato que produce como resultado de la activación por una enzima específica una fluorescencia final. ⁽⁴¹⁾
- **Indicador microbiológico:** son microorganismos no patógenos frecuentemente asociados a patógenos, utilizados para reflejar el riesgo de la presencia de agentes causantes de enfermedades. ⁽¹⁴⁾
- **Inocuidad de los alimentos:** es la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan. ⁽¹⁴⁾⁽⁴³⁾
- **Límite máximo permitido:** es el valor del parámetro microbiológico máximo permitido en el alimento. ⁽¹⁴⁾
- **Limpieza:** es la eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias objetables. ⁽⁴³⁾
- **Registro sanitario:** es el procedimiento establecido, por el cual los alimentos procesados son aprobados por la autoridad sanitaria de cada Estado Parte para su comercialización. ⁽¹⁴⁾
- **Valor máximo admisible:** corresponde a la concentración de sustancias o bacterias a partir de la cual provoca rechazo por parte de los consumidores o donde existe un riesgo para la salud. La superación de estos valores implica la toma de acciones correctivas inmediatas. ⁽¹⁰⁾

- **Valor recomendado:** corresponde a la concentración de sustancias o densidad de bacterias donde no hay riesgo sobre la salud de los consumidores. ⁽¹⁰⁾
- **Vigilancia Sanitaria:** es la permanente y sistemática evaluación de las condiciones sanitarias de los alimentos ejercida por la autoridad sanitaria competente de cada Estado Parte con el objeto principal de proteger la salud de la población. ⁽¹⁴⁾
- **Unidades formadoras de colonias (UFC):** es el número de microorganismos que pueden formar colonias en siembra por placa estriada o placa vertida, e indica el número de microorganismos viables en una muestra. ⁽⁴¹⁾

ANEXOS

ANEXO Nº 1



a) Venta callejera de refrescos



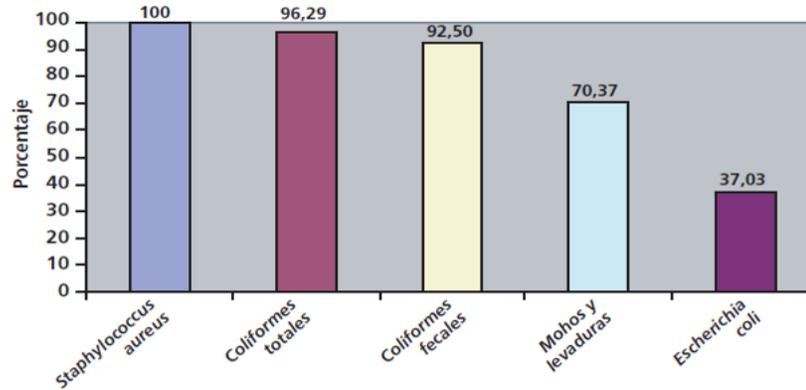
b) Manipuladores de refrescos



c) Estudiantes consumidores de refrescos

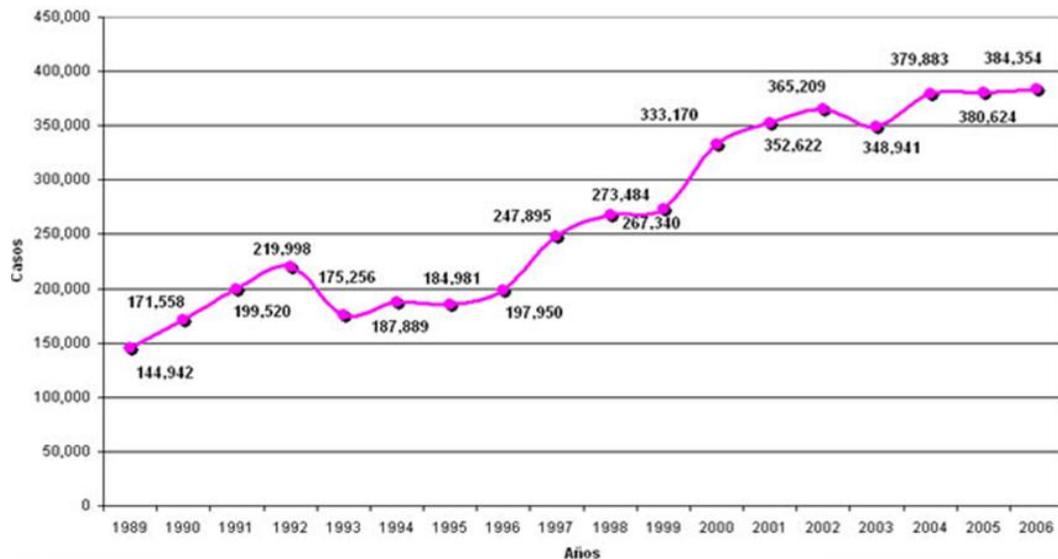
Figura Nº 12. Fotos de puestos de venta callejera de refrescos, manipuladores de refrescos y estudiantes que consumen dichos refrescos.

ANEXO Nº 2



Fuente: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. El Salvador.

- a) Datos de agentes infecciosos encontrados en alimentos en El Salvador durante el 2006⁽²³⁾



- b) Comparación anual de casos de diarrea en El Salvador de 1989-2006⁽³⁷⁾

Figura Nº 13. Datos de agentes infecciosos encontrados en alimentos en El Salvador durante el 2006 y comparación anual de casos de diarrea en El Salvador de 1989-2006.

ANEXO N° 3

Comparación anual de casos de intoxicación alimentaria en El Salvador de 1989-2006.

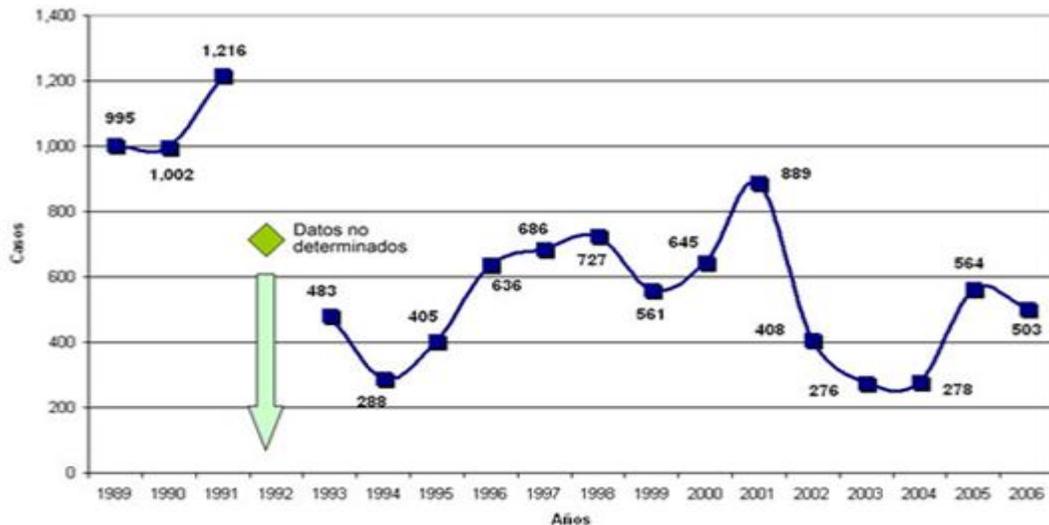


Figura N° 14. Comparación anual de casos de intoxicación alimentaria en El Salvador de 1989-2006 ⁽³⁷⁾

Cuadro N° 11. Incidencia de las principales enfermedades en vigilancia epidemiológica especial en El Salvador durante enero-diciembre 2009 ⁽³⁷⁾

DATOS PRELIMINARES

No.	DIAGNOSTICO	TOTAL ACUMULADO		
		M	F	TOTAL
1	Parálisis Flácida Aguda	43	16	59
2	Sospecha de Sarampión	0	0	0
3	Meningitis Meningocócica	1	1	2
4	Infecciones Respiratorias Agudas	1025802	1435233	2461035
5	Neumonías	28307	23315	51622
6	Diarrea y Gastroenteritis	99814	108567	208381
7	Sospecha de Cólera	0	0	0
8	Intoxicación Alimentaria	75	148	223

ANEXO N° 4

Tabla N° 1. Criterios microbiológicos para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2. Norma Salvadoreña Obligatoria 67.18.01:01 ⁽¹³⁾

Microorganismos	Recuento máximo permitido
Recuento de microorganismos aeróbios (mesófilos) en placa, en unidades formadoras de colonias (UFC), por mililitro.	< 1000
Recuento de hongos y levaduras, en unidades formadoras de colonias (UFC/mL).	< 20
Bacterias coliformes, en número más probable (NMP) por 100 mL	< 1.1
Bacterias patógenas	ausencia

Criterios microbiológicos para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2,
Norma Salvadoreña Obligatoria 67.18.01:01.

ANEXO Nº 5

Procedimiento para el lavado de manos.



Figura Nº 15. Procedimiento para el lavado de manos ⁽²⁵⁾

ANEXO Nº 6

Tabla Nº 2. Índice de NMP y límites de aceptación del 95 por 100 para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 mL ⁽¹⁵⁾

Número de tubos con reacción positiva de un total de diez de 10 mL cada uno	Índice NMP/100 mL	Límites de confianza del 95% (aproximados)	
		Superior	Inferior
0	< 1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	> 23.0	13.5	Infinito

Índice de NMP y límites de aceptación del 95 por 100 para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 mL.

ANEXO N° 7

Cuadro N° 12. Ubicación de las ventas de refrescos en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador

No.	COLOR	UBICACION	CODIGO
INTERIOR UES			
1		Facultad de Química y Farmacia	1 A
2		Facultad de Química y Farmacia	2 A
3		Cafetín 1	1 B
4		Cafetín 2	2 B
5		Cafetín 3	3 B
6		Cafetín 4	4 B
7		Edificio de Filosofía	1 C
ALREDEDORES UES			
8		Entrada 2, Facultad de Jurisprudencia y Ciencias Sociales	1 E
9		Entrada 2, Facultad de Jurisprudencia y Ciencias Sociales	2 E
10		Entrada 3, Facultad de Ciencias y Humanidades	1 F
11		Entrada 3, Facultad de Ciencias y Humanidades	2 F
12		Frente a Entrada 3, Contiguo a ANDA	3 F
13		Entrada 6, Facultad de Química y Farmacia	1 G
14		Frente a Entrada 7, Facultad de Odontología	1 H

Ubicación de las ventas de refrescos en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.

ANEXO N° 8

Mapa del campus central de la Universidad de El Salvador.

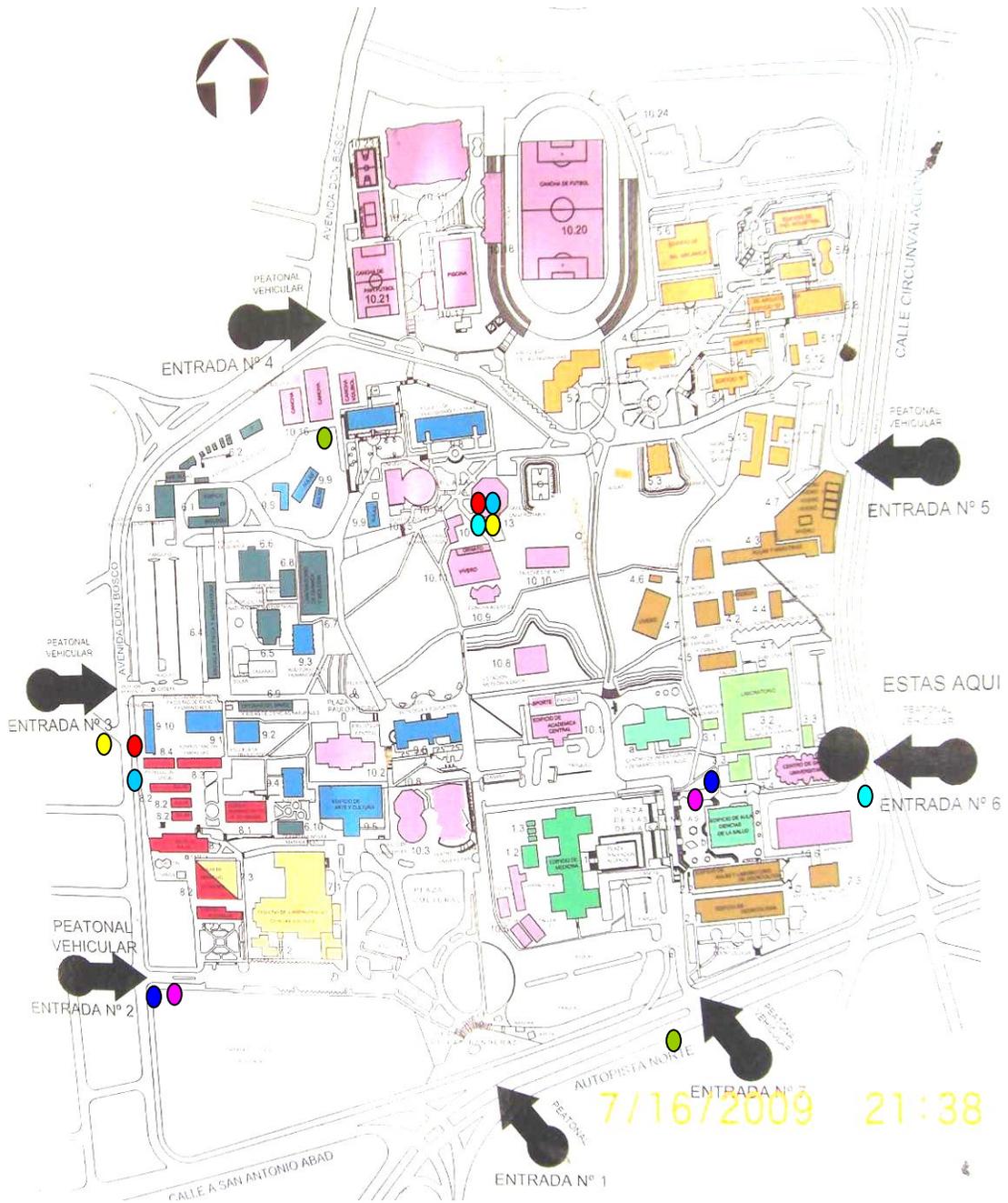


Figura N° 16. Mapa del campus central de la Universidad de El Salvador (UES).

ANEXO N° 9

Cuadro N° 13. Tipo de refrescos comercializados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.

Refresco de Agua de coco	Refresco de Horchata de coco
Refresco de Arrayán	Refresco de Jamaica
Refresco de Cebada	Refresco de Limonada
Refresco de Chan	Refresco de Maracuyá
Refresco de Ensalada	Refresco de Naranja
Refresco de Granadilla	Refresco de Piña
Refresco de Guanaba/Piña	Refresco de Tamarindo
Refresco de Horchata	

Universidad de El Salvador Tesis Grupo 09-09 Etiquetas de muestreo	
Código del puesto: _____	Código de muestra: _____
Tipo de muestra: _____	
Fecha: _____	Hora: _____
Realizado por: Melany Ortíz Testigo: Guillermo Escalante	

Figura N° 17. Etiqueta para identificación de muestras

Tipo de refrescos comercializados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador y etiqueta para identificación de muestras.

ANEXO Nº 10

Procedimiento para preparación de las diluciones de la muestra.

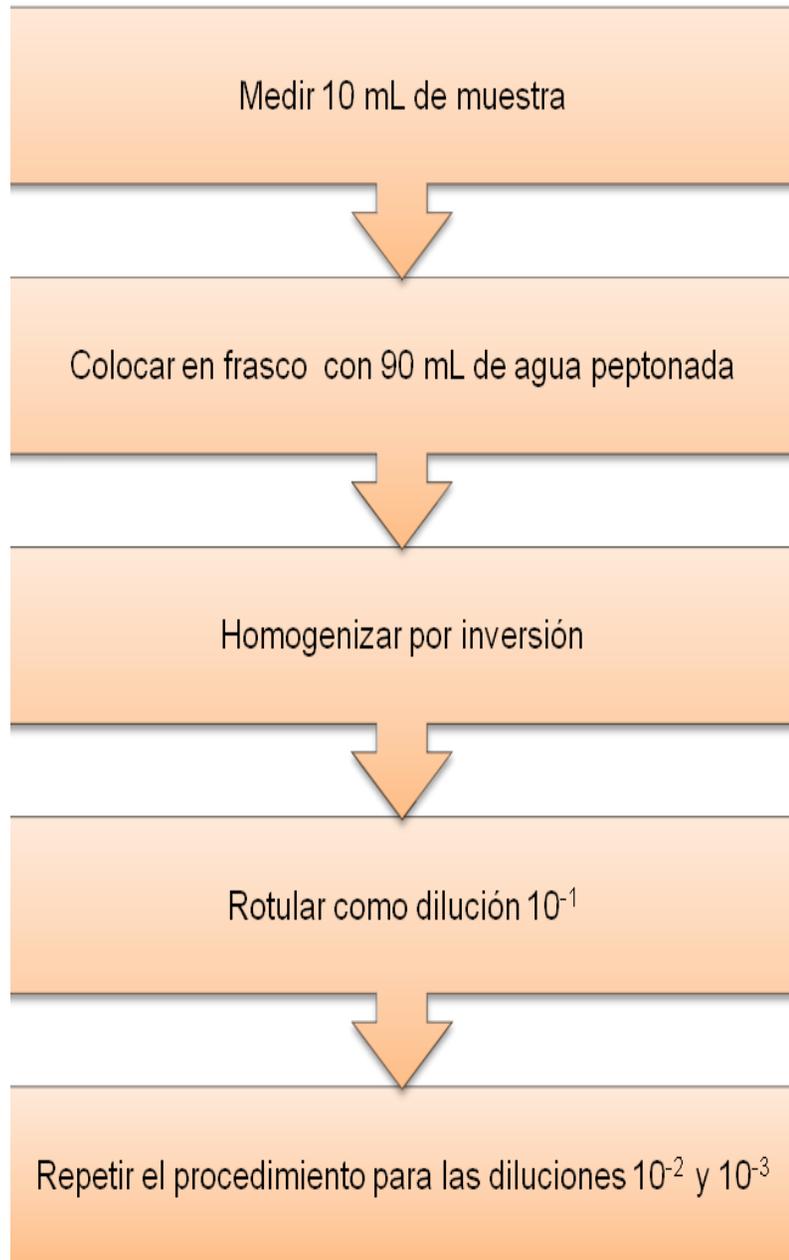


Figura Nº 18. Procedimiento para preparación de las diluciones de la muestra ⁽²⁴⁾

ANEXO N°11

Procedimiento Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias.



Figura N° 19. Procedimiento Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias ⁽²⁴⁾

ANEXO Nº 12

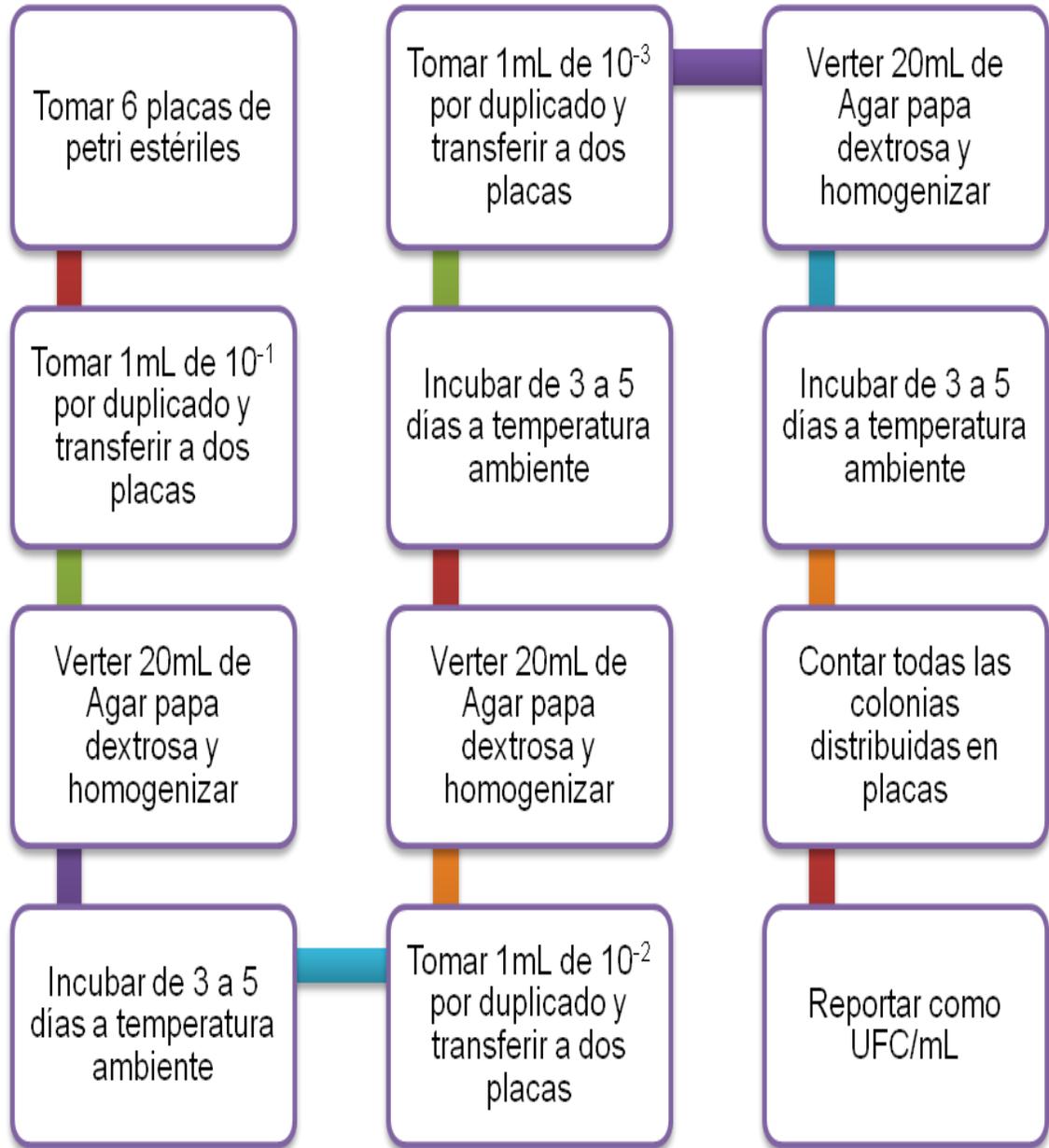
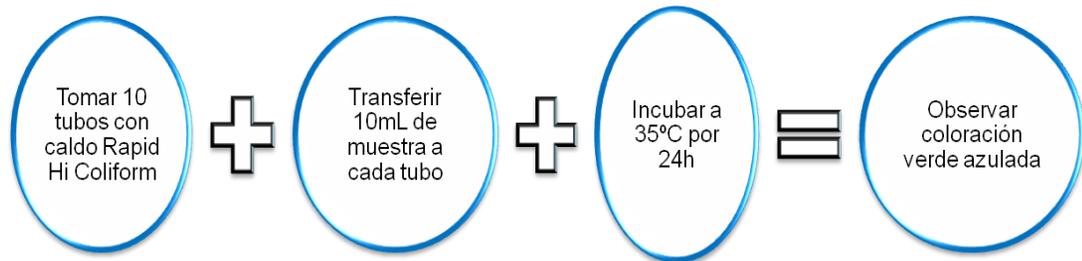
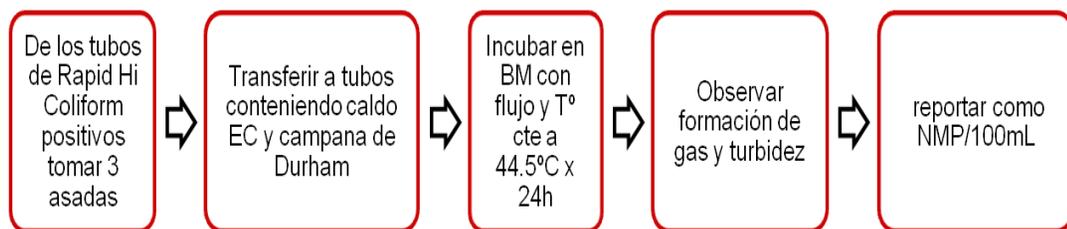


Figura Nº 20. Procedimiento Recuento Total Mohos y Levaduras ⁽²⁴⁾

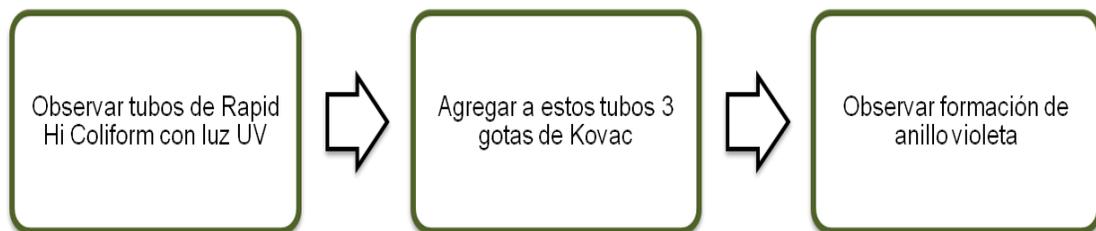
ANEXO Nº 13



a) Determinación de Coliformes Totales ⁽²⁴⁾



b) Determinación de Coliformes Fecales ⁽²⁴⁾



c) Determinación de *Escherichia coli* ⁽²⁴⁾

Figura Nº 21. Procedimiento Determinación de Coliformes Totales, Fecales y *Escherichia coli*.

ANEXO Nº 14

Reporte de enfermedades gastrointestinales en la Universidad de El Salvador de enero a diciembre de 2008 y de abril hasta agosto de 2009

Bienestar Universitario

Reporte de Enfermedades Gastrointestinales de Enero a Diciembre de 2008 y de Abril hasta Agosto de 2009.

CONSULTA MEDICA	AÑO 2008	AÑO 2009	TOTAL
ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES	2,148	1,089	3,237

Los datos registrados en el cuadro anterior reflejan los siguientes diagnósticos:

- Amibiasis intestinal
- Gastroenteritis aguda

En este año no se contabilizó los meses de Enero a Marzo por incapacidad médica del personal encargado de dicha actividad.

Proporcionó datos, personal de Enfermería.

“HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA”



Dirección

Figura Nº 22. Reporte de enfermedades gastrointestinales en la Universidad de El Salvador de enero a diciembre de 2008 y de abril hasta agosto de 2009 ⁽⁷⁾

ANEXO Nº 15

Cuadro Nº 14. Guía de observación para diagnóstico de las condiciones higiénicas bajo las cuales operan los puestos de venta de refrescos ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.

Parámetros	% Cumple			% No cumple		
	Interior	Exterior	Total	Interior	Exterior	Total
¿Los puestos están ubicados en lugares libres de contaminación?						
¿Cuentan con el espacio adecuado para el desarrollo de las actividades?						
¿Proveen protección a los refrescos contra agentes externos?						
¿Están contruidos con materiales que no contaminen los refrescos?						
¿Cuentan con suministro de agua potable?						
¿El personal utiliza redecillas en el cabello?						
¿El personal utiliza indumentaria adecuada?						
¿El personal usa objetos personales o maquillaje?						
¿El personal se lava las manos después de recibir el dinero?						
¿Los utensilios son adecuados?						
¿Los utensilios se encontraban limpios?						
¿Se almacenan los refrescos en un lugar adecuado?						
¿Se mantienen los refrescos a una temperatura adecuada para su conservación?						
¿Poseen recipientes con tapadera para los desechos sólidos?						

Guía de observación para diagnóstico de las condiciones higiénicas bajo las cuales operan los puestos de venta de refrescos ubicados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador

ANEXO Nº 16

Informe de resultados obtenidos de los análisis microbiológicos de refrescos naturales realizados durante el mes de Octubre de 2009



San Salvador, Mayo de 2010

Doctor
Carlos Alexander Ortega Pérez
Director Bienestar Universitario
Universidad de El Salvador
Presente.

Le saludamos muy cordialmente deseándole éxito en todas las labores que desarrolla diariamente.

Por medio de la presente nosotros, Roxana Melany Ortiz y Luis Guillermo Escalante, estudiantes egresados de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, hacemos de su conocimiento los resultados obtenidos en el trabajo de graduación titulado **Evaluación de la calidad microbiológica de refrescos naturales no pasteurizados comercializados en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.** A continuación se presenta la tabla resumen con los porcentajes de muestras no conformes por criterios microbiológicos, comparado con los límites establecidos en la Norma Salvadoreña Obligatoria para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2 NSO 67.18.01:01.

Informe de resultados obtenidos de los análisis microbiológicos de refrescos naturales realizados durante el mes de Octubre de 2009.

Determinación	Porcentaje de muestras no conformes	Recuento máximo Permitido
Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aerobias	90.48%	<1000 UFC/ml
Recuento Total de Mohos y Levaduras	100.00%	<20 UFC/ml
Determinación de Bacterias Coliformes	88.10%	<1.1 NMP/100 ml
Determinación de Microorganismos Patógenos	83.33%	Ausencia

Debido a que todas las muestras no cumplen con al menos un parámetro de los criterios microbiológicos establecidos en la norma salvadoreña obligatoria NSO 67.18.01:01 para bebidas no carbonatadas sin alcohol del tipo 2, ninguna muestra es apta para consumo humano.

Agradeciendo su colaboración, esperando que los resultados anteriores le sean de utilidad, nos suscribimos de usted,

Atentamente,


Roxana Melany Ortiz
Estudiante de Licenciatura
en Química y Farmacia


Luis Guillermo Escalante
Estudiante de Licenciatura
en Química y Farmacia


Vo.Bo. Lic. Salvador Castillo
Decano de la Facultad de
Química y Farmacia


MSc. Coralia de los Angeles González de Díaz
Docente Directora
Facultad de Química y Farmacia



Final 25 Avenida Norte, Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador, C.A. Apdo. Postal 3026
Telefax: (503) 2225-1645 Teléfonos: (503) 2225-4967, (503) 2225-2326, (503) 2225-1500 Extensiones 4900 y 4902

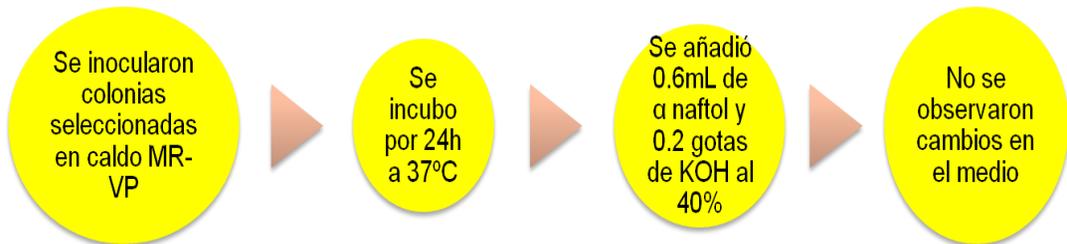
Figura Nº 23. Informe de resultados obtenidos de los análisis microbiológicos de refrescos naturales realizados durante el mes de Octubre de 2009.

ANEXO Nº 17

PRUEBAS BIOQUIMICAS IMVIC



a) Procedimiento prueba de Indol



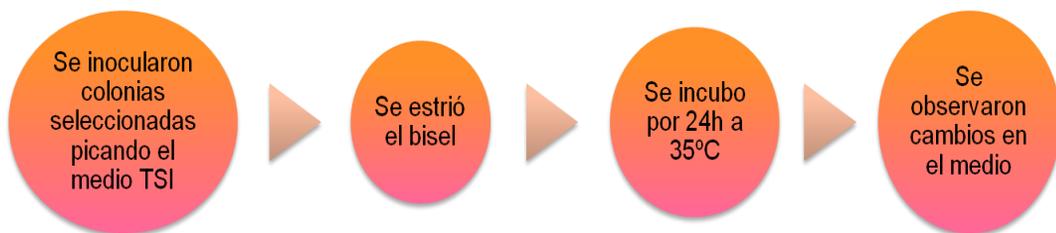
b) Procedimiento prueba de Voges Proskauer



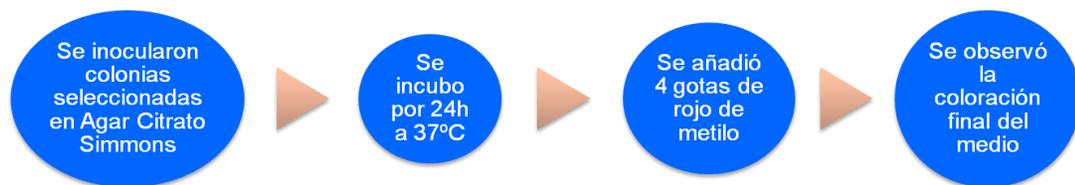
c) Procedimiento prueba de Rojo de Metilo



d) Procedimiento prueba de Movilidad



e) Procedimiento prueba de Triple-Azucar-Hierro y Sulfuro de Hidrogeno (TSI y H₂S)



f) Procedimiento prueba de Citrato

Figura N° 24. Procedimiento de pruebas bioquímicas IMVIC₍₈₎ (20)

ANEXO Nº 18

Cuadro Nº 15. Resultado de pH tomado a muestras de cada tipo de refresco en el interior y los alrededores de la Universidad de El Salvador.

Muestras de refrescos naturales	pH
Limonada	2.5
Jamaica	3
Mora	4
Tamarindo	3
Horchata	6
Agua de coco	5
Chan	3.5
Arrayan	3
Maracuyá	6
Naranja	5
Granadilla	5
Cebada	6
Piña	4
Ensalada	5
Guanaba/Piña	4.5
Horchata de coco	5.5

ANEXO Nº 19

Material y Cristaleria

MATERIAL

- Agitadores
- Algodón
- Asa bacteriológica
- Bandeja de aluminio para tinción
- Bolsas plásticas
- Cajas de petri descartables
- Espátulas
- Fósforos
- Frascos de dilución
- Gasas
- Gradillas
- Guantes
- Hielera
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Papel toalla
- Pipeteadores
- Porta muestra
- Tijeras
- Tirro

CRISTALERIA

- Agitadores
- Beakers de 30, 50, 150, 500, 1000, 2000, 4000 mL
- Cajas de petri
- Campanas de Durham
- Erlenmeyer 250, 2000 mL
- Frascos de dilución
- Láminas cubre objetos
- Láminas porta objetos
- Pipetas Mohr de 1 y 10 mL
- Probetas de 25, 100, 500, 1000 mL
- Tubos de Ensayo con rosca

ANEXO Nº 20

Equipos, Medios de Cultivo y Reactivos

EQUIPO

- Autoclave
- Balanza Semianalítica
- Baño María
- Cabina de Flujo Laminar
- Cuenta colonias
- Esterilizador de asas
- Estufa
- Hot plate/agitador magnético
- Incubadoras
- Lámpara de luz ultravioleta
- Mechero bunsen
- Microscopio
- Refrigeradora

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Cetrimide
- Agar Citrato Simmons
- Agar Papa Dextrosa
- Agar Plate Count
- Agar SIM
- Agar TSI
- Caldo EC
- Caldo Rapid Hi Coliform
- Caldo VP-RM
- Peptona

REACTIVOS

- Aceite de inmersión
- Ácido tartárico 10%
- Alcohol-acetona
- Alfa naftol
- Cristal violeta
- Éter
- Hidróxido de potasio al 40%
- Lugol
- Reactivo de Kovac
- Rojo de metilo