

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



**DETERMINACION DE LA INOCUIDAD MICROBIOLOGICA DE REFRESCOS**  
**ARTESANALES A BASE DE FRUTAS COMERCIALIZADOS EN LOS**  
**DIFERENTES MERCADOS DEL CENTRO HISTORICO DE SAN SALVADOR**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

**KARLA EUNICE CASTELLON MORALES**

**MARIA ISIDORA TORRES**

**PARA OPTAR AL GRADO DE**  
**LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

**NOVIEMBRE 2009**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

**SECRETARIO**

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**

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

**ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: CALIDAD AMBIENTAL**

MSc. Cecilia Haydeè Gallardo de Velásquez

**ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: MICROBIOLOGICO**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

**DOCENTE DIRECTORA**

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios Todopoderoso y la Virgen Santísima** por habernos ayudado y permitido culminar nuestra carrera, además de llenarnos de sabiduría para enfrentar cualquier reto.

**A nuestros padres** por ayudarnos a salir adelante con sus esfuerzos y sacrificios, para poder finalizar una etapa más de nuestras vidas.

**Al resto de nuestra familia** por darnos su sincero apoyo al acompañarnos con sus oraciones y bendiciones.

**Al comité de trabajos de graduación** Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo. Coordinadora General, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, MSc. María Evelin Sánchez de Ramos, MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz. Docente directora. Por toda la ayuda en el proceso de graduación y la paciencia para guiarnos en este proceso.

**Al personal de laboratorio** por su colaboración durante el desarrollo de nuestra tesis.

**A nuestros amigos y compañeros** que siempre estuvieron ayudándonos en cualquier situación.

**Eunice e Isidora**

## **DEDICATORIA**

**A Dios Misericordioso y la Virgen Santísima**, por haberme dado la sabiduría necesaria para triunfar en mi carrera profesional.

**A mis padres José Luís Castellón y Rosy del Carmen Morales**, por ser los pilares en mi vida y apoyarme en todo momento.

**A mis hermanos Javier, Larissa y Luis**, con mucho cariño que de una u otra forma colaboraron para que lograra este triunfo.

**A mis abuelos Carmen Palacios (In Memory) y Benjamín Morales** que siempre estuvieron en oraciones y al pendiente de mi.

**A mi compañera de tesis Ichi**, por tenerme paciencia y haber compartido experiencias juntas.

**A mis amigos** que siempre estuvieron apoyándome, gracias por su amistad.

**Eu**

## **DEDICATORIA**

**Dios Todopoderoso y la Virgen Santísima** por ser mi fortaleza y ayudarme en cada momento de mi vida, por ayudarme a culminar mi meta.

**A mi querida madre María Jesús Torres** por darme consejos y su apoyo incondicional y sobre todo guiarme en el camino de la vida.

**Al resto de mi familia** por darme su apoyo y ayudarme por medio de sus oraciones.

**A mi compañera de tesis Karla** por brindarme su ayuda y comprensión en cada momento.

**A mis amigos y compañeros** por creer en mí, darme su apoyo en el momento que lo necesitaba, por su amistad tan valiosa e incondicional.

## **INDICE**

### **Pág.**

Resumen

Capítulo I

1.0 Introducción xviii

Capítulo II

2.0 Objetivos

Capitulo III

3.0 Marco Teórico 23

3.1 Definición de fruta 23

3.2 Clasificación de las frutas 23

3.3 Composición Química 25

    3.3.1 Agua 25

    3.3.2 Glúcidos 25

    3.3.3 Fibra 26

    3.3.4 Vitaminas 26

    3.3.5 Sales minerales 26

    3.3.6 Valor calórico 26

    3.3.7 Proteínas y grasas 27

    3.3.8 Aromas y pigmentos 27

3.4 Características Estructurales 28

3.5 Microflora de las frutas 28

3.6 Tipos de podredumbre causada por microorganismos	
en frutas	29
3.7 Bebidas no carbonatadas sin alcohol (refrescos)	31
3.7.1 Bebida de frutas	31
3.7.2 Bebida artesanal	32
3.8 Clasificación y designación del producto	32
3.8.1 Refresco casero	32
3.8.2 Refrescos hervidos	32
3.8.3 Refrescos diluidos con agua fría o caliente	33
3.9 Requisitos relativos a los insumos e ingredientes	33
3.10 Materias primas	33
3.11 Fuente de contaminación	34
3.12 Mecanismo de contaminación	34
3.13 Enfermedades transmitidas por alimentos	35
3.13.1 Caso de brotes	36
3.14 Requisitos del área o lugar de preparación	36
3.15 Requisitos relativos al manipulador	38
3.16 Requisitos para la elaboración	39
3.17 Microorganismos indicadores	40
3.17.1 Microorganismos mesófilos aerobios	40
3.17.2 Coliformes	42
3.17.3 Coliformes totales y coliformes fecales	44

3.17.4 Mohos y levaduras	48
Capitulo IV	
4.0 Diseño metodológico	52
4.1 Tipo de estudio	52
4.1.1 Campo	52
4.1.2 Experimental	52
4.2 Investigación bibliográfica	52
4.3 Investigación de campo, universo y muestra	53
4.3.1 Universo	53
4.3.2 Muestras	53
4.3.3 Muestreo	53
4.3.4 Cálculos estadísticos para la determinación del número total de muestras a analizar	53
4.4 Parte experimental	56
4.4.1 Procedimiento para el muestreo	56
4.4.2 Identificación de la muestra	56
4.4.3 Preparación de la muestra y diluciones	56
4.4.4 Determinación y recuento de bacterias mesófilas aerobias	57
4.4.5 Prueba para coliformes totales	57
4.4.6 Prueba para coliformes fecales	57
4.4.7 Prueba para <i>Escherichia coli</i>	57

4.4.8 Recuento de mohos y levaduras	58
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de resultados	60
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	71
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	74
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

## **ABREVIATURAS**

**ETA:** Enfermedad de transmisión alimentaria

**NMP:** Número más probable

**mL:** Mililitros

**UFC:** Unidad formadora de colonias

**g:** Gramos

**°C:** Grados centígrados

**L:** Litros

**mm:** Milímetros

**NOS:** Norma obligatoria salvadoreña

**mg:** Miligramos

**Kcal:** Kilo calorías

**IMVIC:** Indol, Rojo de metilo, Voges proskauer, Citrato

**BMA:** Bacterias Mesófilas Aeróbicas.

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Mapa de ubicación de los mercados del Centro Histórico de la Zona Metropolitana de San Salvador.
2. Criterios microbiológicos para las bebidas no carbonatadas sin alcohol NSO 67.18.01:01.
3. Preparación de medios de cultivo
4. Índice de NMP para 100 mL de muestra, para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean dos porciones de 10 ml.
5. Lista de chequeo.
6. Etiqueta para identificar las muestras de refrescos recolectadas en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador.
7. Datos de sabor y número asignado a las muestras recolectadas en los mercados del Centro Histórico de San Salvador.
8. Procedimiento para la preparación de muestras, recuento de bacterias mesófilas aerobias y de mohos y levaduras.
9. Prueba para bacterias coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.
10. Carta de resultados enviada a las autoridades de salud.
11. Fotos de los diferentes refrescos que se venden en los mercados del Centro Historico de San Salvador.

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	pág.
1. Composición típica en porcentos de algunas frutas.	27
2. Perfil microbiológico general de frutas una vez cosechadas.	29
3. Resultados obtenidos mediante lista de chequeo para los 12 Puestos.	60
4. Resultados obtenidos para la determinación de Coliformes totales, Coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> .	62
5. Resultados obtenidos para el recuento de Bacterias Mesófilas aerobias.	66
6. Resultados obtenidos para el recuento de mohos y Levaduras.	67
7. Porcentaje de refrescos que no cumplen con la especificación de la norma salvadoreña (NSO 67.18.01:01).	69

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	pág.
1. Gráfico de las preguntas realizadas en la lista de chequeo.	61
2. Tubos positivos en la determinación de coliformes totales	63
3. Tubos positivos en la determinación de coliformes fecales	64
4. <b>A</b> Tubos positivos para la prueba de coliformes totales	
<b>B</b> Tubos negativos para la prueba de coliformes totales	64
5. Prueba presuntiva para <i>Escherichia coli</i> por medio de la lámpara de luz UV, la fluorescencia producida en los tubos indica posible presencia de <i>Escherichia coli</i> .	65
6. Prueba confirmativa para <i>Escherichia coli</i> con reactivo de Kovac, la formación de un anillo violeta indica reacción positiva, lo cual confirma la presencia de este microorganismo	65
7. Diferentes diluciones para el Recuento de Bacterias Mesofilas Aerobias.	67
8. Diferentes diluciones para el Recuento de mohos y Levaduras	68
9. Gráfico de las muestras de refrescos que no cumplen con la especificación de la norma salvadoreña (NSO 67.18.01:01)	69

## RESUMEN

Los refrescos elaborados artesanalmente a base de frutas son consumidos por la mayoría de la población por su sabor refrescante, ya que la mayoría de la materia prima utilizada (frutas) posee propiedades nutricionales importantes.

Este tipo de alimento por no ser pasteurizado constituye una fuente de riesgo para la salud de la población consumidora, por lo que conocer su calidad es importante.

El objetivo del estudio fue determinar la inocuidad microbiológica de refrescos artesanales a base de frutas comercializados en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador (Mercado Central, Sagrado Corazón, Tinety, Ex Cuartel y Belloso) en el periodo 2009.

De acuerdo a la formula establecida, se llevo a cabo un muestreo aleatorio estratificado para determinar el numero de muestras a tomar de cada puesto de refresco ubicados en cada mercado, para lo cual se realizo una prueba piloto, haciendo un total de 24 muestras de refrescos a base de frutas, si las muestras analizadas cumplen con las especificaciones establecidas por la NSO 67.18.01:01, será necesario volver a muestrear, pero si no cumplen no será necesario.

Se realizo la determinación de bacterias coliformes totales, en caldo Fluorocult LMX, luego se determino las bacterias coliformes fecales en tubos con caldo EC, se realizo el recuento de bacterias mesófilas aerobias, utilizando medio de cultivo Agar Plate Count, así mismo se determino la presencia de ***Escherichia***

**coli** a partir de los tubos positivos para coliformes totales, se observó por medio de la lámpara de luz ultravioleta la fluorescencia producida, y la formación del anillo color violeta al agregar reactivo de Kovac, posteriormente se realizó el recuento de mohos y levaduras utilizando como medio de cultivo Agar Papa dextrosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis realizados a las muestras se encontró la presencia de **Escherichia coli**, la cual debe estar ausente en un alimento. Se encontraron valores altos de coliformes totales, coliformes fecales, bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras.

Por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos estos sobrepasan los límites declarados por la NSO 67.18.01:01, por lo tanto no son aptas para el consumo humano.

Por lo que se recomienda a las entidades correspondientes realizar monitoreos constantes para verificar que los refrescos se preparen bajo las más estrictas normas de higiene y reducir de esta manera la carga microbiana.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

La mayoría de las frutas se cultivan en un ambiente natural y son vulnerables a la contaminación con agentes patógenos.

Los refrescos preparados a base de frutas pueden constituir una fuente de riesgo para la salud, por ser un alimento no pasteurizado.

Según estudios nacionales e internacionales señalan que la contaminación microbiológica que presentan los refrescos es debido a la mala calidad del agua y a la manipulación que se somete el producto durante su elaboración.

Debido a esto se debe mantener un control sanitario, ya que cualquier tipo de contaminante representa un serio riesgo para la salud, al mismo tiempo existe probabilidad de contraer alguna enfermedad que puede ir desde enfermedades leves hasta serios problemas infecciosos que pueden causar la muerte, siendo los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas los mas vulnerables.

En este estudio se determino la inocuidad microbiológica a 24 refrescos artesanales a base de frutas comercializados en los puestos de los 5 mercados del Centro Histórico de San Salvador (Mercado central, Sagrado corazón, Tinety, Ex cuartel, Belloso).

Se realizo un muestreo estratificado considerando cada mercado como un estrato, en donde se realizo una prueba piloto para determinar el número de muestras a tomar de cada estrato, con la fórmula correspondiente.

En el análisis de las muestras se determino el recuento de bacterias mesófilas aerobias, recuento de mohos y levaduras, determinación de bacterias

coliformes totales y coliformes fecales y la identificación de ***Escherichia coli***, se llevaron a cabo en los Laboratorios de microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el periodo de Agosto- Octubre de 2009.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la inocuidad microbiológica de refrescos artesanales a base de frutas comercializados en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Identificar las condiciones en las que se venden los refrescos

artesanales a base de frutas en los diferentes puestos de los cinco mercados del Centro Histórico de San Salvador, por medio de una lista de chequeo. (Ver anexo 5).

2.2.2 Realizar análisis microbiológicos (Coliformes totales, Coliformes fecales y *Escherichia coli*) en las muestras seleccionadas.

2.2.3 Realizar recuento total de microorganismos aerobios mesófilos y de mohos y levaduras a las muestras seleccionadas.

2.2.4 Dar a conocer a las entidades correspondientes (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)) sobre los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de refrescos.

2.2.5 Comparar los resultados con la Norma Productos alimenticios. Bebidas no carbonatadas sin alcohol. Especificaciones. NSO 67.18.01:01. Criterios microbiológicos para las bebidas no carbonatadas sin alcohol.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

## 3.0 MARCO TEORICO

### 3.1 DEFINICION DE FRUTA.

La fruta es el conjunto de frutos comestibles que se obtienen de plantas cultivadas o silvestres, pero a diferencia de los otros alimentos vegetales (hortalizas y cereales) las frutas poseen un sabor y aroma intensos y presentan unas propiedades nutritivas diferentes, por ello la fruta suele tomarse como postre, fresca o cocinada. Conviene comerlas cuando están maduras. (26)

Las frutas son ovarios maduros de una flor generalmente la porción comestible, es la parte carnosa que cubre las semillas, son tanto más blandas cuanto más pectina soluble tienen. (3)

Las frutas en general son ácidas y azucaradas, se agrupan según diversas clasificaciones, las cuales dependen principalmente de su estructura botánica, su composición química y las condiciones climáticas. (9)

### 3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS FRUTAS (26)

Por la semilla que contenga el fruto, las frutas se clasifican en:

- **Frutas de hueso o carozo:** son aquellas que tienen una semilla grande y de cáscara dura, como el albaricoque o el melocotón.
- **Frutas de pepita:** son las frutas que tienen varias semillas pequeñas y de cáscara menos dura como la pera y la manzana.
- **Fruta de grano:** son aquellas frutas que tienen infinidad de minúsculas semillas como el higo.

Por el tiempo desde su recolección, la fruta se clasifica en:

- **Fruta fresca**, si el consumo se realiza inmediatamente o a los pocos días de su cosecha, de forma directa, sin ningún tipo de preparación o cocinado.

- **Fruta seca o fruta pasa**: es la fruta que tras un proceso de desecación se puede consumir a los meses, e incluso años después de su recolección como las pasas.

Otros grupos de fruta comprenden:

- **Fruta cítrica** como la lima y la naranja.
- **Fruta tropical** como la banana, coco, kiwi y piña.
- **Fruta del bosque** como las frambuesas, zarzamoras.
- **Fruto seco** como las almendras, nueces y castañas.

Por el proceso de maduración de la fruta, se clasifican en: frutas climatéricas y no climatéricas. En la maduración de las frutas se produce un proceso acelerado de respiración dependiente de oxígeno. Esta respiración acelerada se denomina subida climatérica y sirve para clasificar a las frutas en dos grandes grupos:

- **Frutas climatéricas**: son las que sufren bruscamente la subida climatérica.

Entre las frutas climatéricas tenemos: manzana, pera, plátano, melocotón.

Estas frutas sufren una maduración brusca y grandes cambios de color, textura y composición. Normalmente se recolectan en estado pre climatérico, y se

almacenan en condiciones controladas para que la maduración no tenga lugar hasta el momento de sacarlas al mercado.

- **Frutas no climatéricas:** son las que presentan una subida climatérica lentamente y de forma atenuada. Entre las no climatéricas tenemos: naranja, limón, mandarina, piña, uva, melón y fresa. Estas frutas maduran de forma lenta y no tienen cambios bruscos en su aspecto y composición. Presentan mayor contenido de almidón. La recolección se hace después de la maduración porque si se hace cuando están verdes luego no maduran, solo se ponen blandas.

### **3.3 COMPOSICION QUIMICA** <sup>(26)</sup>

La composición química de las frutas depende sobre todo del tipo de fruta y de su grado de maduración.

**3.3.1 Agua:** Más del 80% y hasta el 90% de la composición de la fruta es agua. Debido a este alto porcentaje de agua y a los aromas de su composición, la fruta es muy refrescante.

**3.3.2 Glúcidos:** Entre el 5% y el 18% de la fruta está formado por carbohidratos. El contenido puede variar desde un 20% en el plátano hasta un 5% en el melón, sandía y fresas. Las demás frutas tienen un valor medio de un 10%. El contenido en glúcidos puede variar según la especie y también según la época de recolección. Los carbohidratos son generalmente azúcares simples como fructosa, sacarosa y glucosa, azúcares de fácil digestión y rápida

absorción. En la fruta poco madura encontramos, almidón, sobre todo en el plátano que con la maduración se convierte en azúcares simples.

**3.3.3 Fibra:** Aproximadamente el 2% de la fruta es fibra dietética. Los componentes de la fibra vegetal que podemos encontrar en las frutas son principalmente pectinas y hemicelulosa. La piel de la fruta es la que posee mayor concentración de fibra, pero también es donde podemos encontrar algunos contaminantes como restos de insecticidas, que son difíciles de eliminar si no es con el pelado de la fruta. La fibra soluble o gelificante como las pectinas forman con el agua mezclas viscosas. El grado de viscosidad depende de la fruta de la que proceda y del grado de maduración. Las pectinas desempeñan por lo tanto un papel muy importante en la consistencia de la fruta.

**3.3.4 Vitaminas:** Como los carotenos, vitamina C, vitaminas del grupo B. Según el contenido en vitaminas podemos hacer dos grandes grupos de frutas:

- **Ricas en vitamina C:** contienen 50 mg /100g. Entre estas frutas se encuentran los cítricos, también el melón, las fresas y el kiwi.

- **Ricas en vitamina A:** Son ricas en carotenos, como melocotón y ciruelas.

**3.3.5 Sales minerales:** Al igual que las verduras, las frutas son ricas en potasio, magnesio, hierro y calcio. Las sales minerales son siempre importantes pero sobre todo durante el crecimiento para la osificación. El mineral más importante es el potasio. Las que son más ricas en potasio son las frutas de hueso como la cereza, ciruela, melocotón.

**3.3.6 Valor calórico:** El valor calórico vendrá determinado por su concentración en azúcares, oscilando entre 30-80 Kcal/100g.

**3.3.7 Proteínas y grasas:** Los compuestos nitrogenados como las proteínas y los lípidos son escasos en la parte comestible de las frutas, aunque son importantes en las semillas de algunas de ellas. Así el contenido de grasa puede oscilar entre 0,1 y 0,5%, mientras que las proteínas pueden estar entre 0,1 y 1,5%.

**3.3.8 Aromas y pigmentos:** La fruta contiene ácidos y otras sustancias aromáticas que junto al gran contenido de agua de la fruta hace que ésta sea refrescante. El sabor de cada fruta vendrá determinado por su contenido en ácidos, azúcares y otras sustancias aromáticas. El ácido málico predomina en la manzana, el ácido cítrico en naranjas, limones y mandarinas y el ácido tartárico en la uva. Por lo tanto los colorantes, los aromas y los componentes fenólicos astringentes aunque se encuentran en muy bajas concentraciones, influyen de manera crucial en la aceptación organoléptica de las frutas.

**Cuadro N° 1.** Composición típica en porcentaje de algunas frutas. <sup>(8)</sup>

ALIMENTO	CARBOHIDRATOS	PROTEINAS	GRASA	CENIZA	AGUA
Plátano	24.0	1.3	0.4	0.8	73.5
Naranja	11.3	0.9	0.2	0.5	87.1
Manzana	15.0	0.3	0.4	0.3	84.0
Fresa	8.3	0.8	0.5	0.5	89.9
Melón	6.0	1.6	1.2	1.4	92.8

### **3.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES** <sup>(9)</sup>

La unidad estructural de la parte comestible de las frutas es la célula parénquima, aun cuando las células parénquima de las diversas frutas son a veces diferentes en tamaño y apariencia, todos tienen esencialmente la misma estructura básica.

Una característica estructural importante de todas las plantas de las frutas es el tejido protector, este puede tener muchas formas pero en general esta compuesto de células parénquimas especializadas que se encuentran prensadas compactamente unas contra otras para formar la piel, la cascara o la corteza, Las células de las superficies de estas estructuras protectoras secretan materias cerosas y forman una película impermeable al agua.

### **3.5 MICROFLORA DE LAS FRUTAS** <sup>(4)</sup>

La superficie de las frutas contiene su propia flora, y además microorganismos contaminantes procedentes del suelo y del agua.

También se pueden encontrar en su superficie cualquiera de sus numerosas especies de mohos y a veces de algunas levaduras, si la superficie externa esta húmeda o ha sido dañada en ella pueden crecer algunos microorganismos durante el tiempo que media entre su recolección y el momento de someterlas a algún tipo de tratamiento o de consumirlas.

**Cuadro N° 2.** Perfil microbiológico general de frutas una vez cosechadas. (4)

Alimento	Microorganismos aislados	Oscilación cuantitativa aproximada.
Frutas	Bacterias: El bajo pH propio de la mayoría de las frutas favorece el predominio de los mohos, se pueden aislar gramnegativas: <b><i>Pseudomonas, Alcaligenes, Erwinia, Xanthomonas, B. Lacticas, Micrococos, Bacillus, Corineformes.</i></b>	Generalmente menos de $10^6$ /g
	Mohos: <b><i>Fusariun, Alternaria, Aureobasidium, Penicillium, Sclerotinia, Botrytis, Rhizopus, Cladosporium, Phoma, Trichoderma.</i></b>	$10^3$ - $10^4$ /g

### **3.6 TIPOS DE PODREDUMBRE CAUSADA POR MICROORGANISMOS EN FRUTAS.** <sup>(4)</sup>

El lavado de las frutas elimina la mayoría de los microorganismos del suelo y la adecuada selección harán disminuir el número de alguno de los mohos y levaduras que intervienen en su alteración. El tipo de alteraciones más corrientes o predominantes de las frutas no solo varía según la especie de la misma, sino también hasta cierto punto de acuerdo a las distintas variedades.

- **Podredumbre blanda por bacterias:** producida por la especie *Erwinia carotovora* y especies emparentadas, que fermentan las pectinas.

De este tipo de podredumbres también se ha aislado *Pseudomonas marginalis* y especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Las frutas y hortalizas afectadas por este tipo de podredumbres parecen estar empapadas en agua, tienen una consistencia blanda y esponjosa, y con frecuencia un olor desagradable. Ejemplo. Melón, Sandía.

- **Podredumbre rosa por mohos:** Producida por la especie *Trichothecium roseum* cuyas esporas son de color rosado. Ejemplo. Melón.

- **Podredumbre por *Fusarium*:** constituidas por diversos tipos de podredumbre producidos por especies del género *Fusarium*. Ejemplo. Plátanos, Melón.

- **Podredumbre verde por mohos:** producida generalmente por especies del género *Cladosporium*, aunque a veces se debe a otros mohos de esporas verdes, por ejemplo a especies del género *Trichoderma*. Ejemplo. Limones, melocotones.

- **Podredumbre parda:** Producidas principalmente por especies del genero *Sclerotinia (Molinia fructicola)*. Ejemplo. Ciruelas, melocotones.
- **Podredumbre gris por mohos:** producida por especies del género *Botrytis*, por ejemplo *B. cinerea*, cuya denominación específica alude al color gris del micelio de este moho. Favorecen este tipo de alteración la humedad y las temperaturas elevadas. Ejemplo. Uvas, Fresas, Melocotones.
- **Podredumbre blanda por Rhizopus:** originada por especies del género *Rhizopus*, por ejemplo *R. stolonifer*. Las especies de este género de mohos originan una podredumbre que con frecuencia es blanda y esponjosa. Muchas veces el crecimiento algodonoso del moho, con un moteado negro correspondiente a los esporangios, recubre grandes masas de alimentos. Ejemplo. Uvas, Fresas.
- **Podredumbre negra:** producida con frecuencia por especies del género *Alternaria*, aunque a veces se debe a especies de los géneros *Ceratostomella, Physalospora* y a otros géneros. Ejemplo. Limones, Higos.
- **Podredumbre azul por mohos:** debida a la especie *Penicillium digitatum* y a otras especies de mohos. El color verde azulado al que debe su denominación este tipo de podredumbre es consecuencia de los acúmulos de esporas de este moho. Ejemplo. Uvas, Limones, Peras.
- **Podredumbre por Alternaria:** producida por *Alternaria tenuis* y por otras especies de este género. Cuando empieza a crecer el moho, las zonas

afectadas adquieren un color pardo-verdoso, luego aparecen en las mismas manchas de color pardo o negro. Ejemplo. Limones, Plátanos.

### **3.7 BEBIDAS NO CARBONATADAS SIN ALCOHOL (REFRESCOS) <sup>(7)</sup>**

Es una bebida no alcohólica que no contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto, elaborada a partir de agua potable, adicionado con azúcar y otros edulcorantes permitidos, saborizantes naturales o artificiales, colorantes naturales o artificiales y acidificantes, con o sin la adición de sustancias preservantes, vitaminas y otros aditivos alimentarios permitidos y que han sido sometidos a un proceso tecnológico adecuado.

#### **3.7.1 BEBIDA DE FRUTAS <sup>(14)</sup>**

Las bebidas a base de frutas pueden clasificarse como jugos, néctares y refrescos, entre otros, y se diferencian entre si básicamente por el contenido de fruta en el producto final; así, un jugo es más concentrado que un néctar y un néctar, a su vez, es más concentrado que un refresco.

Se obtienen exprimiendo o triturando las frutas y añadiendo agua y azúcar. El valor nutritivo de las bebidas de frutas depende sobre todo del tipo de fruta utilizado, de los métodos de procesamiento y del grado de dilución. El contenido en vitaminas es inferior al de la fruta fresca y estas pérdidas dependen también del tipo de fruta. <sup>(26)</sup>

#### **3.7.2 BEBIDA ARTESANAL <sup>(20)</sup>**

Una bebida artesanal es producida por personas ya sea totalmente a mano o con la ayuda de herramientas manuales e incluso medios mecánicos, siempre que la contribución manual directa de la persona siga siendo el componente más importante del producto acabado utilizando materias primas, procedentes de recursos sostenibles como la naturaleza.

### **3.8 CLASIFICACIÓN Y DESIGNACIÓN DEL PRODUCTO** <sup>(12)</sup>

#### **3.8.1 Refresco casero**

Bebida elaborada artesanalmente en base a frutas, cereales u otras materias primas, mediante cocción, trituración o dilución, y mezcla posterior con agua.

#### **3.8.2 Refrescos hervidos**

Bebida elaborada mediante cocción de frutas, cereales u otros en agua con o sin añadido de azúcar y especias.

Los clasificados son: refresco de ciruela, refresco de linaza, refresco de cebada, refresco de durazno, refresco de canela, otros.

#### **3.8.3 Refrescos diluidos con agua fría o caliente**

Bebida elaborada mediante dilución de pulpa y/o jugo de frutas o harina de cereales y leguminosas en agua fría o caliente.

Los clasificados son: refresco de tamarindo, refresco de soya, limonada, Horchata de coco.

### **3.9 REQUISITOS RELATIVOS A LOS INSUMOS E INGREDIENTES** <sup>(12)</sup>

Los elaboradores de bebidas caseras refrescantes aplicarán medidas para:

- Proteger las materias primas alimentarias de la contaminación, por manipulación, contaminación fecal y de otra índole.
- Controlar la contaminación procedente del aire, suelo y agua.
- Seleccionar los alimentos y sus ingredientes con el fin de separar todo material que manifiestamente no sea apto para el consumo humano.
- Proteger los alimentos e ingredientes de la contaminación de plagas o de contaminantes químicos, físicos o microbiológicos, así como de otras sustancias durante la manipulación, el almacenamiento y el transporte cuando corresponda.

### **3.10 MATERIAS PRIMAS** <sup>(12)</sup>

El agua será apta para el consumo humano, es decir agua potable y hervida o embotellada, el azúcar deberá encontrarse en condiciones adecuadas de calidad y se podrán utilizar los diversos tipos (blanca, morena y otros, sin impurezas), las frutas deben ser frescas en buen estado de conservación y protegidos contra la contaminación.

### **3.11 FUENTE DE CONTAMINACION.** <sup>(19)</sup>

La contaminación implica la presencia de sustancias indeseables.

En la inmensa mayoría de los casos, los alimentos no cambian su aspecto u otras de sus características por lo que la contaminación no puede reconocerse a simple vista y pasa inadvertida. En nuestro ámbito, la inocuidad y calidad de

los alimentos deben potenciarse en todos los países ya que las enfermedades de origen alimentario han aumentado considerablemente en todo el mundo durante los últimos 10 años.

### **3.12 MECANISMO DE CONTAMINACION.** <sup>(17)</sup>

Los alimentos se contaminan de diversas maneras porque dada la variedad de fuentes de contaminación, resulta muy fácil el constante intercambio de contaminantes. De esa manera, las bacterias pueden pasar por ejemplo de la materia fecal de personas y animales a la tierra, o a las manos de los manipuladores, o a las aguas y desde allí a los alimentos, sólo para citar unos pocos ejemplos.

- **Contaminación primaria o de origen:** Se presenta durante el proceso mismo de producción del alimento. Actualmente, resulta muy difícil producir vegetales totalmente exentos de contaminantes, con lo cual casi siempre resulta inevitable que algunos alimentos vengan con algún grado de contaminación desde el lugar de producción.

- **Contaminación directa:** Posiblemente es la forma más simple como se contaminan los alimentos y de esa manera los contaminantes llegan al alimento por medio de la persona que los manipula. Ejemplos de este tipo de contaminación pueden ser la que ocurre cuando un manipulador elimina gotitas de saliva al estornudar, o toser en las áreas de proceso, cuando el manipulador con heridas infectadas toca el alimento, cuando sobre el alimento se posan

moscas u otras plagas o cuando un cuerpo extraño se incorpora al alimento durante el proceso.

- **Contaminación cruzada:** Este tipo de contaminación se entiende como el paso de cualquier contaminante (bacteria, producto químico, elemento físico), desde un alimento o materia prima contaminados a un alimento que no lo está a superficies en contacto con este, que se encuentran limpias (mesas, equipos, utensilios).

Este mecanismo casi siempre ocurre de manera imperceptible. Las formas más frecuentes de contaminación cruzada se dan cuando el manipulador permite el contacto de un alimento crudo con uno cocido. El problema más relevante con la contaminación, en especial la producida por bacterias, es que resulta imposible detectarla por medio de los sentidos. De esa manera, resulta imposible “Ver” las bacterias o su reproducción. Solo en algunos casos podría haber evidencias como el olor que podría denotar una posible contaminación por plaguicidas por ejemplo, o la presencia de objetos extraños como un pedazo de vidrio o un tornillo.

### **3.13 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.** <sup>(33)</sup>

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) han sido reconocidas como el problema de Salud Pública mas extendido en el mundo actual y como una causa importante de disminución de la productividad y grandes pérdidas económicas que afectan a países, a empresas y a los consumidores.

El daño que producen las ETA es cada día más preocupante. Actualmente se reconocen más de 250 enfermedades transmitidas por los alimentos. Entre las más frecuentes se encuentran las producidas por ***Salmonella, Campylobacter jejuni, Escherichia coli enterohemorrágica*** y otros.

### **3.13.1 Caso de brotes** <sup>(15)</sup>

Los datos recabados en los Estados Unidos revelan que la proporción general de enfermedades transmitidas por los alimentos atribuidas a las frutas y hortalizas frescas está en aumento. De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, en el período comprendido entre 1973 y 1979 sólo 2% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos registrados en los Estados Unidos se debieron al consumo de frutas y hortalizas frescas. Tal porcentaje aumentó a 6% en el período entre 1990 y 1997; de esta cifra, 50% se atribuyeron a contaminación bacteriana, 7% a virus, 6% a parásitos y 35% a causas sin determinar.

Entre las combinaciones de productos básicos y agentes patógenos involucradas en los brotes recurrentes en el ámbito internacional se encuentran las siguientes:

- Melón/***Salmonella***

- Mangos/***Salmonella***

### **3.14 REQUISITOS DEL AREA O LUGAR DE PREPARACIÓN** <sup>(12)</sup>

Para fijar el lugar de preparación, se tomará en cuenta, que éste no debe estar cerca de focos de infección, como basurales, cloacas y desechos, por el

contrario se fijará en lugares donde sea accesible al agua potable y se pueda limpiar con facilidad.

Los equipos y utensilios serán de material apropiado, como acero inoxidable preferentemente, para que puedan limpiarse y desinfectarse con facilidad. Se mantendrán en buen estado para evitar la contaminación de los alimentos por causa de fragmentos de metales, desprendimientos de yeso, gomas y otros productos químicos.

La mesa de trabajo, el área de almacenamiento de las materias primas y el de los utensilios a usar, serán de tamaño y material adecuado para poder mantenerlos limpios y organizados a fin de evitar la contaminación cruzada.

El área de preparación estará limpia y desinfectada, de tal manera que se reduzca al mínimo el riesgo de contaminación. En ningún caso se permitirá la presencia de algún tipo de mascota.

Los recipientes que se utilizarán para almacenar el agua se lavarán continuamente.

Para la limpieza se usarán lavavajillas y agua potable, para eliminar los residuos de alimentos y la suciedad que puedan constituir una fuente de contaminación.

El agua ya utilizada debe ser eliminada para no representar un foco de contaminación para el agua potable, las frutas, hortalizas, cereales, manipuladores y los alrededores del área de preparación.

No se utilizarán para la preparación de los jugos y refrescos recipientes anteriormente utilizados con sustancias tóxicas, como ser insecticidas, pinturas, resinas y otros.

### **3.15 REQUISITOS RELATIVOS AL MANIPULADOR** <sup>(12)</sup>

El manipulador deberá portar tanto carnet sanitario como de manipulador vigente.

El cabello estará recogido y completamente cubierto durante la manipulación de los alimentos, de igual modo las uñas estarán cortas y limpias.

Vestirá ropa limpia de trabajo, es decir un mandil de color claro que cubra completamente la ropa de calle.

En todo momento, manipulará las frutas y hortalizas con guantes desechables nuevos o limpios, mucho más si tiene una herida o padece de alguna enfermedad que pueda transmitirse por medio de las manos (por ejemplo si tiene diarrea, vómitos, ictericia, fiebre, resfrío, lesiones en la piel visiblemente infectadas, supuración de oídos, ojos o nariz)

Cubrirá heridas o cortes en las manos con vendajes impermeables y, en lo posible evitará recibir dinero.

No realizará actividades como comer, fumar, limpiarse la nariz, cambiar pañales, manipular dinero, sin tener puestos los guantes.

Lavará constantemente manos y guantes con agua potable limpia y jabón (de preferencia jabón líquido), y no limpiará o secará las manos o los utensilios con su mandil, tendrá una toalla limpia sólo para manos y un secador para utensilios.

No llevará anillos en las manos porque contaminan los alimentos cuando toman contacto con ellos, además de que pueden quedarse accidentalmente en los alimentos.

No permitirá que otras personas intervengan en la manipulación de los alimentos y en ningún caso, estornudará o toserá sobre los alimentos.

### **3.16 REQUISITOS PARA LA ELABORACIÓN** <sup>(12)</sup>

Adquirir productos cuyas propiedades organolépticas (olor, sabor, color, textura, etc.) sean de alimentos frescos, o bien que no presenten signos de cualquier tipo de alteración, adulteración y descomposición. Solo adquirir productos, alimenticios en cantidades necesarias a la capacidad del área de almacenamiento y solo la cantidad que se pueda vender en el día.

Los insumos e ingredientes deben recibirse y conservarse en lugares limpios y protegidos.

Productos perecederos deben almacenarse en lugar fresco o bajo refrigeración, si no van a ser usados de inmediato, de igual forma los productos secos en envases separados y limpios.

Los cereales, el azúcar y productos similares, no deben estar húmedos y deben mantenerse en un ambiente seco en recipientes cerrados apropiados a fin de impedir que se produzcan alteraciones o contaminación.

No se debe utilizar frutas y hortalizas en mal estado. Las frutas y hortalizas seleccionadas deben estar protegidas en vitrinas o cubiertas para evitar el sol directo, el polvo y el viento y no estar en contacto directo con los consumidores. Pelar, exprimir y cortar, según proceda, las frutas utilizando equipos y utensilios apropiados e higienizados. Si corresponde conservar en recipientes limpios y cerrados. No utilizar huevos crudos en la preparación de estas bebidas.

### **3.17 MICROORGANISMOS INDICADORES** <sup>(23,29)</sup>

Los grupos (o especies) de microorganismos, cuya enumeración o recuento se realiza con mayor facilidad y presencia en los alimentos (en determinado número) indica que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos o permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. Los grupos o especies utilizadas con estos fines se denominan microorganismos indicadores, y sirven para evaluar tanto la seguridad que ofrecen los alimentos en cuanto a microorganismos y sus toxinas, como su calidad microbiológica.

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar.

Una vez se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador.

### **3.17.1 Microorganismos mesófilos aerobios** <sup>(24)</sup>

Crece a 37°C. El recuento elevado en la placa de estos microorganismos indica la posible proliferación de organismos patógenos dentro del alimento y predicen la posibilidad de que el alimento se descomponga.

#### **- Recuentos en Placa de Bacterias** <sup>(29)</sup>

Los recuentos de bacterias viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar nutritivo que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas del alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Tales recuentos se denominan, en algunos casos con evidente error, recuentos totales en placa, cuando en realidad únicamente pueden contarse aquellas bacterias que pueden crecer en las condiciones ambientales elegidas. En efecto, se obtiene una amplia variedad de condiciones cambiando la composición del medio sólido de cultivo, los gases del ambiente, el tiempo y la temperatura de incubación. Así, por ejemplo, la incubación a temperaturas entre 0 y 7°C favorece el crecimiento

de las bacterias psicotrópicas. Muchos de estos organismos no pueden crecer a 30–37°C, temperaturas más adecuadas para la incubación de los organismos mesófilos tanto patógenos como saprofitos. La incubación a temperaturas aún más elevadas (50-60°C) permite el desarrollo de organismos termófilos, pero inhibe a los mesófilos y a los psicrotrófilos. Pueden seleccionarse también otros grupos para hacer posible su enumeración o recuento añadiendo al agar nutritivo inhibidores selectivos, tales como cloruro sódico, agente con actividad de superficie o colorante, o modificando la composición de la atmósfera del incubador, por ejemplo eliminando el oxígeno. Cada tipo de recuento de gérmenes viables es potencialmente útil para fines específicos, pero el recuento de bacterias aerobias mesófilas es el más comúnmente utilizado para indicar la calidad sanitaria de los alimentos.

### **3.17.2 Coliformes** <sup>(24)</sup>

A este grupo pertenecen las bacterias con forma de bastoncillos, no forman esporas, son Gram negativas, aerobias o aerobias facultativas, fermentan la lactosa con formación de gas al cabo de 48 horas a 35 °C. Son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario poco satisfactorio.

La denominación genérica coliformes designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.

Coliforme significa con forma de coli, refiriéndose a la bacteria principal del grupo, la ***Escherichia coli***, descubierta por el bacteriólogo alemán Theodor von Escherich en 1860. Von Escherich la bautizó como ***Bacterium coli*** ("bacteria del intestino", del griego κολον, *kolon*, "intestino"). Con posterioridad, la microbiología sistemática nombraría el género *Escherichia* en honor a su descubridor. <sup>(16)</sup>

**- Clasificación Científica.** <sup>(16)</sup>

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: ***Enterobacteriaceae***

Géneros: ***Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter.***

**- Características Bioquímicas** <sup>(16)</sup>

El grupo coliformes agrupa a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas:

- Ser aeróbias o anaeróbias facultativas
- Ser bacilos Gram negativos
- Ser oxidasa negativos

- No ser esporógenas.

- Fermentar la lactosa a 35 °C en 48 horas, produciendo ácido láctico y gas.

Las bacterias de este género se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, es decir, homeotermos, pero también ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y vegetales.

Los coliformes se introducen en gran número al medio ambiente por las heces de humanos y animales. Por tal motivo suele deducirse que la mayoría de los coliformes que se encuentran en el ambiente son de origen fecal. Sin embargo, existen muchos coliformes de vida libre.

Tradicionalmente se los ha considerado como indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano en razón de que, en los medios acuáticos, los coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Por tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura.

Asimismo, su número en el agua es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan del agua, mayor es la gravedad de la descarga de heces.

### **3.17.3 Coliformes totales y coliformes fecales** <sup>(16)</sup>

No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efectos de emplearlos como indicadores de contaminación. Se distinguen, por lo tanto, los coliformes totales

que comprende la totalidad del grupo y los coliformes fecales aquellos de origen intestinal.

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 agua es de origen fecal.

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana ya que los coliformes:

- Son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente.
- Están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades.
- Permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas. -

Se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección. (29)

- **Coliformes Fecales** (29)

Se identifican para detectar la presencia de *Escherichia coli* o de variantes estrechamente relacionadas sin necesidad de purificar los medios de cultivo o de proceder a ensayos posteriores. Pueden desarrollarse y fermentar la lactosa a temperaturas superiores a la normal (44 - 44.5 °C). A este grupo pertenecen *Escherichia coli* de los tipos serológicos I y II y son, por lo tanto, útiles para indicar una posible fuente fecal. Son indicadores de limpieza y desinfección inadecuadas o de una industrialización o preparación incorrecta de alimentos, favoreciendo la multiplicación de organismos patógenos. (23)

Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe reunir las siguientes características:

- Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos. -

Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales de sangre caliente.

- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están. -

Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación. -

Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos. -

Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).

-Debe ser fácil de aislar y cuantificar.

- No debe ser patógeno.

Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por ***Escherichia coli*** y ciertas especies de ***Klebsiella***.

Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Otro de los aspectos negativos del uso de los coliformes totales como indicador es el hecho de que algunos coliformes son capaces de multiplicarse en el agua.

Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta denominación está ganando más adeptos actualmente, pues sería una forma más apropiada de definir este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer a una temperatura superior.

La capacidad de reproducción de los coliformes fecales fuera del intestino de los animales es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad, etc. Algunos géneros son autóctonos de aguas con residuos vegetales, como hojas en descomposición. También pueden reproducirse en las biopelículas que se forman en las tuberías de distribución de agua potable. Por estas razones y por la existencia de bacterias que responden a la definición de coliformes que no son de origen fecal y que incluso pueden ser lactosa-negativas (apareciendo como positivas si se aplica la prueba de B-galactosidasa), el grupo de los coliformes totales tiene actualmente poca utilidad como indicador de contaminación fecal.

**- *Escherichia coli* (Clasificación científica)** <sup>(29)</sup>

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: ***Enterobacteriaceae***

Género: ***Escherichia***

Especie: ***Escherichia coli***

Su hábitat natural es la parte baja del intestino de los vertebrados y es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal lo cual puede implicar la presencia simultánea de microorganismos patógenos como ***Salmonella typhi***, ***Vibrio sp.*** Y parásitos como ***Entamoeba sp.*** (25)

***Escherichia coli*** (***E. coli***) es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras. Esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es ++---. (22)

- **Estructura antigénica de *Escherichia coli*** (5,8)

En la actualidad se reconoce al genero ***Escherichia coli***, como una sola especie en la cual hay varios cientos de tipos antigénicos. Los tipos se caracterizan por ser combinaciones diferentes de los antígenos O(antígenos lipopolisacáridos de la pared celular), K (antígenos polisacáridos capsulares) y H (proteínas flagelares antigénicas) por lo que resultan varios miles de serotipos.

**Patogenia y datos clínicos** (5,8)

### **- Infección de las vías urinarias**

Es la causa más común de infección de las vías urinarias y representa casi el 90% de las infecciones primarias de vías urinarias en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos consisten en micción frecuente, disuria, hematuria, y piuria.

### **- Enfermedades diarreicas relacionadas con *Escherichia coli* (5,8)**

Se clasifica por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa enfermedad por un mecanismo distinto. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de intestino delgado y grueso son codificadas por genes en plásmidos. De manera similar, las toxinas suelen ser mediadas por plásmidos.

### **3.17.4 MOHOS Y LEVADURAS (30)**

Las levaduras y los mohos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo, en los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando por ello importantes pérdidas por alteración de frutas frescas y jugos, vegetales, quesos, productos derivados de los cereales, alimentos salazonados y encurtidos, así como en los alimentos congelados y en los deshidratados, cuyo almacenamiento se realiza en condiciones inadecuadas. Además, existe el peligro potencial de producción de micotoxinas por parte de los mohos. Para eliminar o reducir tales problemas, los manipuladores de alimentos susceptibles de enmohecimiento deberán:

- 1) Reducir la carga de esporas, observando unas buenas prácticas higiénicas.
- 2) Reducir los tiempos de almacenamiento y vender los alimentos lo antes posible.
- 3) Almacenar los alimentos congelados a temperaturas inferiores de 12°C.
- 4) Eliminar o reducir el contacto con el aire (mediante envasado o por otros procedimientos).
- 5) Calentar el alimento en su envase final para destruir las células vegetativas y las esporas.
- 6) añadir ácidos para retardar el crecimiento.
- 7) Añadir conservadores químicos, tales como los sorbatos y benzoatos.

Ni el hombre ni los animales deben consumir alimentos visiblemente enmohecidos, excepto, por supuesto, los quesos tales como Roquefort o Camembert y ciertos Salamis que deben sus sabores especiales a algunos mohos.

Las levaduras crecen más rápidamente que los mohos, pero con frecuencia junto a ellos. Mientras que los mohos son casi siempre aerobios estrictos, las levaduras generalmente crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, aunque con mayor rapidez y hasta poblaciones más elevadas en presencia de este gas.

La fermentación es completamente un proceso anaeróbico. En los alimentos frescos y en los congelados, pueden encontrarse números reducidos de esporas y células vegetativas de levaduras, pero su presencia en estos

alimentos es de escaso significado. Sólo cuando el alimento contiene cifras elevadas de levaduras o mohos visibles el consumidor se dará cuenta de la alteración.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLOGICO

### 4.1. Tipo de estudio:

Estudio de campo.

Estudio experimental

**4.1.1. Campo:** Estudio de las muestras y su recolección que se realizó en los puestos de refrescos a base de frutas de los mercados Central, Sagrado corazón, Tinety, Belloso y Ex cuartel del Centro Histórico de San Salvador.

(Ver anexo N°1)

**4.1.2. Experimental:** Determinación de: Recuento de bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras, coliformes totales, coliformes fecales y microorganismos patógenos *Escherichia coli*.

### 4.2. Investigación bibliográfica.

Se realizó en Bibliotecas de:

-Facultad de Química y Farmacia “Dr. Benjamín Orozco” de la Universidad de El Salvador.

-De las Ingenierías de la Universidad de El Salvador.

-Central de la Universidad de El Salvador.

-Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. (USAM)

- Internet.

### **4.3. Investigación de campo, universo y muestra.**

**4.3.1 Universo:** Refrescos de los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador. (Ver anexo N°7)

**4.3.2 Muestras:** 24 muestras de refrescos a base de frutas, que se venden en bolsas plásticas para el consumo de la población, que se seleccionaron de los puestos de los cinco mercados del Centro Histórico de San Salvador.

**4.3.3 Muestreo:** Se realizó en 12 puestos diferentes que comercializan refrescos a base de frutas en los 5 diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador.

Se llevo a cabo un muestreo aleatorio estratificado para determinar el número de muestras a tomar de cada puesto de refrescos; ubicados en cada estrato (mercado), para lo cual se realizó una prueba piloto, de un total de 12 puestos de refrescos ubicados en los 5 mercados del Centro Histórico de San Salvador se tomó por duplicado cada una de las muestras de refrescos a base de frutas, haciendo un total de 24 muestras.

Tomándose de manera aleatoria, a partir de estos resultados se determina el número de muestras a analizar utilizando una formula estadística.

<b>Nº</b>	<b>ESTRATO</b>	<b>Nº DE PUESTOS</b>	<b>CANTIDAD DE MUESTRAS A TOMAR</b>
1	EX CUARTEL	2	4
2	TINETY	2	4
3	BELLOSO	2	4
4	SAGRADO CORAZON	2	4
5	CENTRAL	4	8
TOTAL			24

#### 4.3.4 Cálculos estadísticos para la determinación del número total de muestras a analizar.

Para conocer el número de muestras que se necesitan para el análisis, se efectuó una prueba piloto y a través de los datos obtenidos se resolvió la siguiente fórmula que corresponde a un muestreo aleatorio estratificado. (6)

$$n = \frac{N \sum_{i=1}^L N_i \sigma_i^2}{N^2 \left(\frac{d}{Z}\right)^2 + \sum_{i=1}^L N_i \sigma_i^2}$$

Donde:

n: Tamaño de la muestra

N: Total de puestos.

$N_i$ : Numero de puestos por estrato(Mercados)

Z: grado de confianza del 95%

d : Error muestral máximo permisible en la investigación.

$\sigma_i^2$  = pq: Varianza poblacional para el estrato i. (6)

### Datos obtenidos a partir de la prueba piloto

Z= 1.96 (Valor obtenido a través de tablas de áreas bajo la curva normal)

Pq: Desviación estándar.

P= Muestras que dieron positiva la prueba= 24 muestras  $\approx$  1.0 (muestras a las cuales se les determino que no cumplen con las normas)

q= Muestras que dieron negativa la prueba = 0 muestras  $\approx$  0.0 (muestras a las cuales se les determino que si cumplen con las normas)

d= 0.3 (% de error que en el estudio se permite)

N= 12 Puestos

### Sustituyendo en la formula:

$$\sigma_i^2 = (100)(0) = 0$$

$$\sum Ni\sigma_i^2 = [(4 * 0) + (2 * 0) + (2 * 0) + (2 * 0) + (2 * 0)] = 0$$

$$n = \frac{12(0)}{(12)^2 \left(\frac{0.3}{1.96}\right)^2 + 0} = 0$$

n= 0 muestras

Numero de muestras a muestrear y analizar = **cero muestras**

**Interpretación:** Según los resultados obtenidos en la prueba piloto, y sustituyendo los datos en la fórmula, se obtiene en la prueba piloto un 100.0% de muestras positivas y un 0.0% de muestras negativas, dando como resultado un  $n=0$  en la fórmula, por lo tanto ya no es necesario realizar un análisis posterior a la prueba piloto, ya que las 24 muestras analizadas presentan contaminación.

#### **4.4. PARTE EXPERIMENTAL**

##### **4.4.1 Procedimiento para el muestreo.** (1,10)

Se tomaron 2 muestras de refrescos en bolsa plástica, de cada uno de los puestos de los mercados y se colocaron en una hielera desinfectada a una Temperatura de  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  de tal forma que no se altere la micro flora y características de la muestra, luego se trasladaron a las instalaciones del Laboratorio de microbiología de alimentos en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

##### **4.4.2. Identificación de la muestra**

Cada muestra se identificó como: Numero de muestra, Sabor de refresco, lugar de muestreo, fecha, hora de toma de muestra, análisis requerido, nombre del analista. (Ver anexo N°6)

##### **4.4.3 Preparación de la muestra y diluciones.** (1,10)

Se agitó la muestra para homogenizarla, luego se prepararon las diluciones.

-Para la dilución  $10^{-1}$  se midió asépticamente 10ml de la muestra y se adiciono a 90ml de agua peptonada, se agito para homogenizar.

-Dilución  $10^{-2}$ , se midió 10 ml de la dilución anterior, con una pipeta estéril y se agrego a un frasco de dilución que contenía 90 ml de agua peptonada, se agitó.

-Dilución  $10^{-3}$ , se midió 10ml de la dilución anterior y se añadió en un frasco conteniendo 90 ml de solución diluyente.

Cada dilución se agita antes de su inoculación, no transcurriendo un tiempo mayor de 15 minutos entre la dilución de la muestra y su inoculación. (Ver anexo N°8)

#### **4.4.4 Determinación y recuento de bacterias mesófilas aerobias.** (1,10)

A partir de las diluciones preparadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , se midió 1.0 mL con pipeta y se adicionó a una placa de petri (se realiza por duplicado.)

Luego se le agregó a las placas medio de cultivo agar Plate Count. Se homogenizaron y se dejaron solidificar.

Después que solidifico el medio, se invirtió la placa incubando de 24 – 48 horas a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Luego de incubar las placas, se determinó el número de colonias a través del uso de un cuenta colonias. (Ver anexo N°8)

#### **4.4.5 Prueba para coliformes totales** (1,10)

De la muestra original, se pipetearon 10mL y se colocaron en 10 tubos, conteniendo 10mL de caldo fluorocult (LMX), incubándolos 24 horas a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . (Ver anexo N°9)

#### **4.4.6 Prueba para coliformes fecales** (1,10)

De los tubos que resultaron positivos con caldo fluorocult, se tomó de cada uno 3 asadas con asa de platino, inoculándolos en tubos que contenían caldo EC con campanas de Durham.

Se incubaron a  $44.5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en baño de agua. (Ver anexo N°9)

#### **4.4.7 Prueba para *Escherichia coli***. (1,10)

De los tubos con caldo fluorocult, que dieron coloración azul para la prueba de coliformes totales, se observó la presencia de fluorescencia por medio de una lámpara de luz ultravioleta.

Al añadir dos gotas de reactivo de Kovac a cada uno de los tubos, se observó la formación de un anillo color violeta. (Ver anexo N°9)

#### **4.4.8 Recuento de mohos y levaduras** (1,10)

A partir de las diluciones preparadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , se midió 1.0 mL con pipeta y se adicionó a una placa de Petri (se realizó por duplicado.)

Luego se le agregó a las placas medio de cultivo agar Papa Dextrosa. Se homogenizaron y se dejaron solidificar.

Después que solidificó el medio, se invirtieron las placas incubándolas a temperatura ambiente durante cinco días.

Luego de incubar las placas, se determinó el número de colonias a través del uso de un cuenta colonias. (Ver anexo N°8)

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

El muestreo realizado en los mercados Central, Belloso, Sagrado Corazón, Tinety y Ex cuartel del Centro Histórico de San Salvador, para la obtención de 24 muestras de refrescos a base de frutas de 12 diferentes puestos y su posterior análisis microbiológico en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y desarrollo en salud (CENSALUD), dieron como resultado los datos que a continuación se presentan.

**Cuadro N° 3** Resultados obtenidos mediante lista de chequeo para los 12 Puestos.

Nº	Preguntas	% de los puestos que cumplen.	% de los puestos que no cumplen.	Observaciones
1	¿Usa gorro para cubrirse el cabello?	0	100	
2	¿Se lava las manos antes de manipular los refrescos?	0	100	
3	¿Mantiene bien tapado el producto?	67	33	
4	¿Tiene un cucharón para cada refresco?	100	0	
5	¿Mantiene limpia el área donde trabaja?	100	0	
6	¿Está lejos de focos de contaminación?	100	0	
7	¿Habla o tose al despachar?	0	100	
8	¿Se observan heridas o llagas en las manos?	0	100	Usan anillos y pulseras.
9	¿Maneja dinero a la hora de despachar los refrescos?	92	8	
10	¿Es adecuado el material donde se almacenan los refrescos?	100	0	El material es aluminio.
11	¿Con que agua prepara los refrescos?	100	0	Agua de chorro
12	¿Preparan los refrescos en el momento o los traen ya hechos?	100	0	Los preparan a las 4:30 am

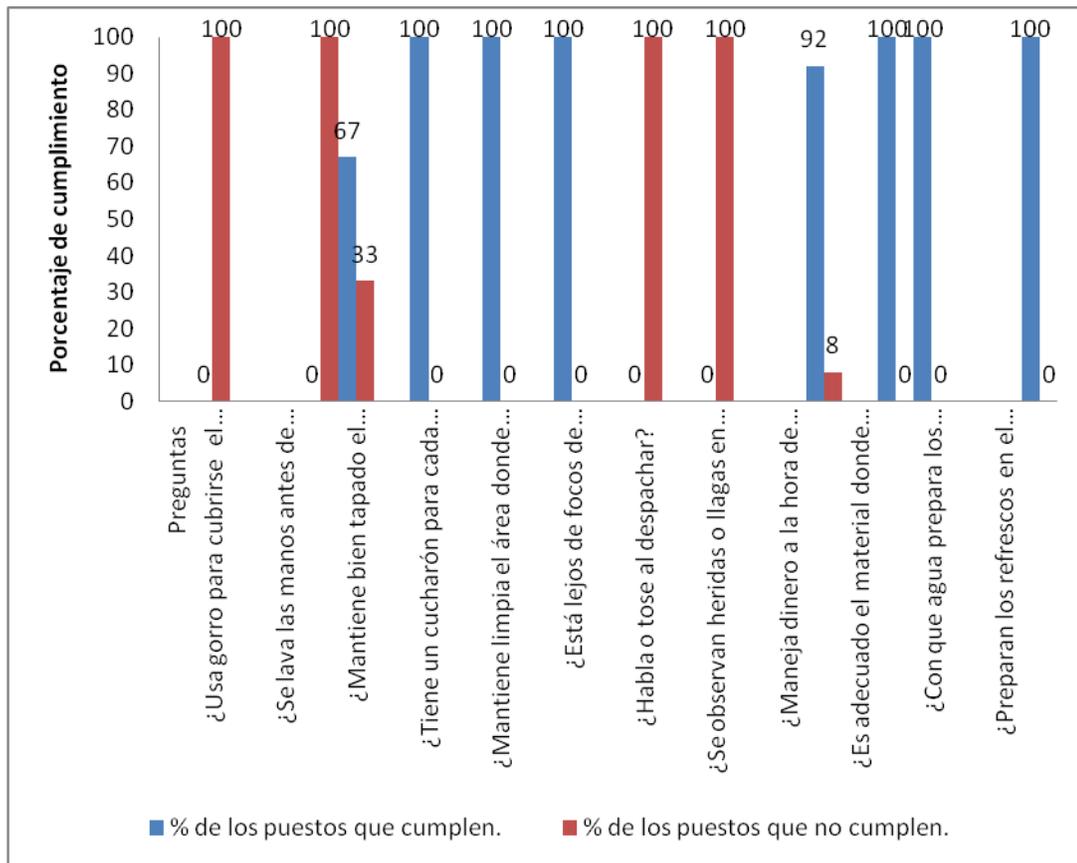


Fig. N°1 Gráfico de las preguntas realizadas en la lista de chequeo

La fig.N°1, refleja los resultados del cuadro N°3 observandose que algunas de las preguntas realizadas, demuestran que no todos los puestos cumplen con las buenas prácticas higiénicas, ya que el 100% de las personas que venden los refrescos no usa gorro para cubrirse el cabello, ni se lavan las manos antes de despachar los refrescos, habla a la hora de despacharlos, además usan anillos y pulseras; dentro de las preguntas que cumplen se encuentra, que todos los puestos están lejos de focos de infección, mantienen aseada el área, usan un cucharón para cada refresco y el material donde se preparan los refrescos es de aluminio.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de una lista de chequeo, indica que no todos los puestos en estudio cumplen con las buenas prácticas higiénicas, estos resultados fueron obtenidos mediante observación. Cabe mencionar que el agua utilizada para la preparación de los refrescos es de chorro, con esta misma lavan las frutas y los recipientes donde los depositan, además las vendedoras manifiestan que los preparan en la mañana, todos los días en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador.

**Cuadro N° 4** Resultados obtenidos para la determinación de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*.

N° de muestra	Determinación de Coliformes Totales(NMP/100 mL)	Determinación de Coliformes Fecales(NMP/100mL)	Identificación de <i>Escherichia coli</i>
1	>23.0	>23.0	Presencia
2	>23.0	9.2	Presencia
3	>23.0	>23.0	Presencia
4	>23.0	>23.0	Presencia
5	>23.0	>23.0	Presencia
6	>23.0	>23.0	Presencia
7	>23.0	>23.0	Presencia
8	>23.0	9.2	Presencia
9	>23.0	>23.0	Presencia
10	>23.0	16.1	Presencia
11	>23.0	>23.0	Presencia
12	>23.0	9.2	Presencia
13	>23.0	12.0	Presencia
14	>23.0	12.0	Presencia
15	>23.0	9.2	Presencia
16	>23.0	>23.0	Presencia
17	>23.0	>23.0	Presencia
18	>23.0	12.0	Presencia
19	>23.0	12.0	Presencia
20	>23.0	12.0	Presencia
21	>23.0	>23.0	Presencia
22	>23.0	9.2	Presencia
23	>23.0	12.0	Presencia
24	>23.0	>23.0	Presencia

En el Cuadro N° 4, se observan los resultados de la prueba para Coliformes totales realizadas a cada muestra, las cuales fueron positivas para todas, encontrándose un valor mayor a 23 NMP/100mL, valor que sobrepasa lo declarado por la Norma Oficial Salvadoreña NSO-67.18.01:01 (Anexo N°2), debido a que el límite establecido debe ser menor a 1.1NMP/100mL, esto indica que durante el cultivo las frutas han sido expuestas a contaminación fecal, ya sea proveniente del agua de riego, el lugar donde las cultivan, así también el tipo de agua para la elaboración de los refrescos.



Fig. N°2 Determinación de coliformes totales

El Cuadro N°4, muestra los resultados obtenidos para Coliformes fecales, obteniéndose valores desde 9.2 hasta mayores de 23 NMP/100mL, valor que sobrepasa lo declarado por la Norma Oficial Salvadoreña NSO-67.18.01:01 (Anexo N°2), debido a que el límite establecido debe ser menor a 1.1NMP/100mL, estos valores confirman que la contaminación fecal es de origen humano o animal y se le atribuye al tipo de agua con que se lavan las

frutas, el agua usada en la preparación de los refrescos y la manipulación de estos.



Fig.N°3 Determinación de coliformes fecales

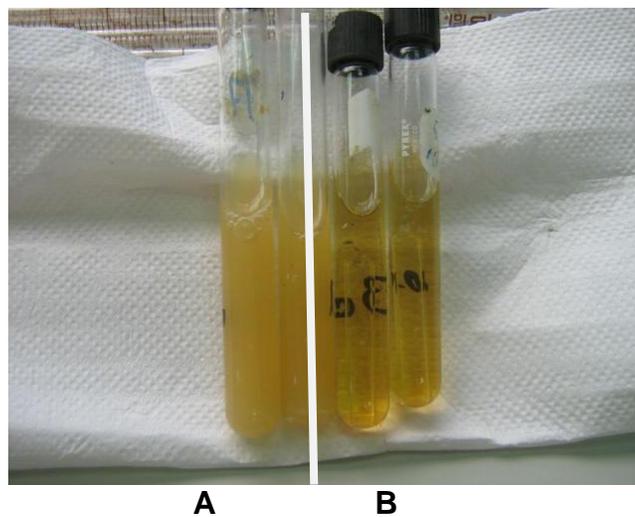


Fig. N°4: **A** Tubos positivos para la prueba de coliformes totales

**B** Tubos negativos para la prueba de coliformes totales

En el Cuadro N°4, se observa la presencia de *Escherichia coli* en todas las muestras analizadas, la cual debe estar ausente, según lo determina la Norma

Oficial Salvadoreña NSO-67.18.01:01 (Anexo N°2), este microorganismo es un claro indicador de la inocuidad microbiológica de los alimentos, quiere decir que el agua con la que se preparan los refrescos no es bacteriológicamente pura, por lo que el refresco no es aceptable para el consumo humano

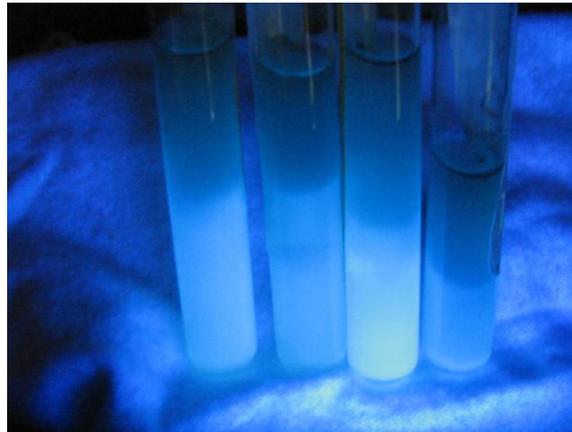


Fig. N°5 Prueba presuntiva para *Escherichia coli* por medio de la lámpara de luz UV, la fluorescencia producida en los tubos indica posible presencia de *Escherichia coli*.

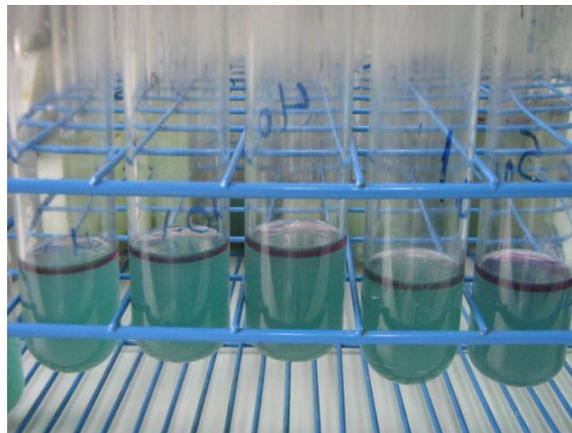


Fig. N°6 Prueba confirmativa para *Escherichia coli* con reactivo de Kovac, la formación de un anillo violeta indica reacción positiva, lo cual confirma la presencia de este microorganismo

**Cuadro N° 5** Resultados obtenidos para el recuento de Bacterias mesófilas Aerobias.

N° de muestra	Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (UFC/mL)	N° de muestra	Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (UFC/mL)	Valor máximo permitido por la NSO-67.18.01:01 en UFC/ mL
1	84,000	13	90,000	<1000
2	3,100	14	3,300	<1000
3	38,000	15	3,100	<1000
4	74,000	16	74,000	<1000
5	3,300	17	9,300	<1000
6	34,000	18	1,100,000	<1000
7	18,000	19	3,300	<1000
8	3,400	20	2,300	<1000
9	24,000	21	74,000	<1000
10	39,000	22	3,400	<1000
11	3,000	23	50,000	<1000
12	3,100	24	84,000	<1000

En el cuadro N°5, se observan los valores obtenidos en el recuento de Bacterias Mesófilas Aeróbicas siendo estos, desde 2,300 hasta de 1,100,000 UFC/mL, valores que están por encima de los límites establecidos por la Norma Oficial Salvadoreña NSO-67.18.01:01 (Anexo N°2), en la cual se especifica que debe ser menor a 1000 UFC/mL, estos resultados indican que el refresco ha tenido una exposición a contaminación por el medio ambiente así también una mala desinfección y limpieza del lugar de trabajo y de las frutas , por lo tanto la proliferación de bacterias se ha visto aumentada.

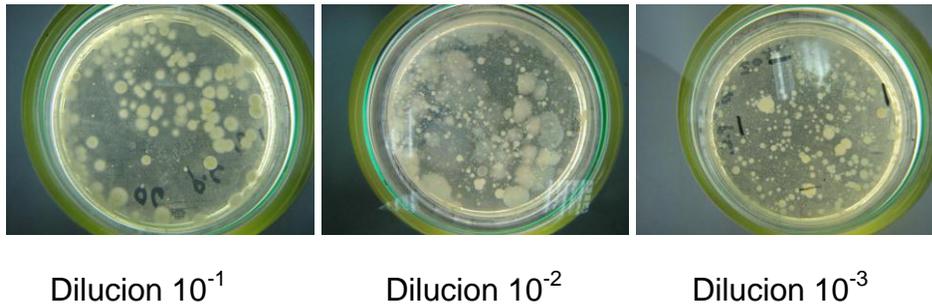


Fig. N°7 Diferentes diluciones para el Recuento de Bacterias Mesofilas Aerobias

**Cuadro N° 6** Resultados obtenidos para el recuento de mohos y Levaduras.

N° de muestra	Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL)	N° de muestra	Recuento de mohos y levaduras (UFC/mL)	Valor máximo permitido por la NSO-67.18.01:01 en UFC/ mL
1	33,000	13	1,134,000	<20
2	18,000	14	37,000	<20
3	133,000	15	18,000	<20
4	47,000	16	47,000	<20
5	133,000	17	51,000	<20
6	280,000	18	82,000	<20
7	48,000	19	37,000	<20
8	125,000	20	300	<20
9	53,000	21	47,000	<20
10	300,000	22	280,000	<20
11	136,000	23	19,000	<20
12	18,000	24	33,000	<20

En el cuadro N°6, se observan los valores obtenidos en el recuento de mohos y Levaduras siendo estos, desde 300 hasta de 1,134,000 UFC/mL, valores que están por encima de los límites establecidos por la Norma Oficial Salvadoreña

NSO-67.18.01:01 (Anexo N°2), en la cual se especifica que debe ser menor a 20 UFC/mL, estos valores indican que durante la producción, almacenamiento y manipulación de las frutas las practicas sanitarias han sido inadecuadas



Fig. N°8 Diferentes diluciones para el Recuento de mohos y Levaduras

A partir de los resultados obtenidos se presenta el siguiente cuadro que muestra el porcentaje en el que no cumplen los refrescos con las normas correspondientes.

**Cuadro N° 7.** Porcentaje de refrescos que no cumplen con la especificación de la norma salvadoreña (NSO 67.18.01:01).

<b>MUESTRAS DE REFRESCOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Muestras que no cumplen</b>	<b>100.00%</b>
<b>Muestras que cumplen</b>	<b>0.00%</b>

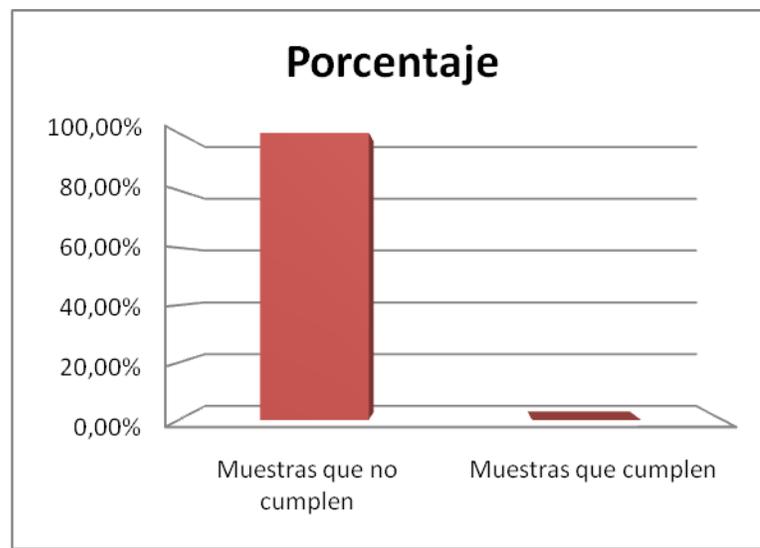


Fig. N°9 Gráfico de las muestras de refrescos que no cumplen con la especificación de la norma salvadoreña (NSO 67.18.01:01)

En la figura N°9 se reflejan los resultados del cuadro N°7, observándose que el 100% de las muestras analizadas no cumplen con las especificaciones declaradas por la norma salvadoreña (NSO 67.18.01:01), por lo que no son aptas para consumo humano.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos en la lista de chequeo realizada, demuestra que no se cumplen las condiciones higiénicas para la venta de los refrescos en los puestos de los mercados del Centro Histórico de San Salvador.
2. En la determinación de coliformes totales y coliformes fecales ninguna de las muestras de refrescos de los diferentes puestos de los mercados del Centro Histórico de San Salvador, se encuentran dentro de los recuentos máximos permitidos (<1.1NMP/mL), establecido por la NSO 67.18.01:01.
3. En las muestras seleccionadas de refrescos, los resultados obtenidos en la determinación de coliformes fecales y *Escherichia coli*, indica una probabilidad mayor de una contaminación con materia fecal humana o animal, esto implica muchos factores desde el lugar donde se cultivan las frutas, el agua de riego, transporte, el agua para la elaboración de los refrescos, el hielo y manipulación de los mismos, entre otros.
4. La presencia de *Escherichia coli* en los refrescos indica que el agua usada para su elaboración no es adecuada para el consumo humano, por lo que no cumplen con las especificaciones exigidas por la NSO 67.18.01:01.
5. Un recuento alto de Bacterias Mesófilas Aerobias indica que en el lugar donde se preparan los refrescos, no se realiza adecuada limpieza y

desinfección, ya que las Bacterias Mesófilas Aerobias, son microorganismos que indican una alta contaminación del área de trabajo.

6. Un recuento alto de Mohos y Levaduras indica malas prácticas sanitarias durante la producción y almacenamiento de los productos, así como el uso de frutas inadecuadas.
7. El agua utilizada para lavar las frutas, recipientes y la elaboración de refrescos es obtenida de grifo.
8. En general, los resultados obtenidos para cada una de las muestras de refrescos analizados, no se considera apta para el consumo humano, porque no cumple con las especificaciones que exige la NOS 67.18.01:01, por lo tanto el producto es considerado no conforme.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## **7.0 RECOMENDACIONES**

1. A las autoridades del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y la Alcaldía de San Salvador, impartir capacitaciones a los inspectores de salud sobre todas las medidas de higiene que deben guardar las personas que elaboran y venden los refrescos en los mercados y la importancia de tener buenas practicas sanitarias.
2. A las personas encargadas de la elaboración de estos productos, que sean conscientes de no usar frutas en mal estado y realizar tanto la limpieza como la desinfección de las frutas, para reducir de esta manera la carga microbiana y que los refrescos puedan ser aptos para consumo humano.
3. A las entidades correspondientes, que realicen inspecciones constantes en los diferentes puestos de refrescos, además realizar monitoreos para verificar que estos alimentos se preparen bajo las más estrictas normas de higiene para que el producto comercializado sea de la más alta calidad.
4. A la Alcaldía Municipal, implementar a través de los gerentes de los mercados, un control sanitario estricto y constante que pueda garantizar la seguridad de los alimentos que consume la población.
5. A las Unidades de Salud cercanas a los mercados, realizar un programa de limpieza y desinfección del área y utensilios en la elaboración de

refrescos que contribuya a mejorar las condiciones en las que se elaboran para garantizar su calidad.

6. Realizar análisis microbiológico al hielo que se utiliza en la preparación de los refrescos.

## BIBLIOGRAFIA

1. AOAC. (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists) 1992. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical (BAM). Manual. 7ed. Estados Unidos de América. P.17-19, 451.
2. APHA. (American Public Health Association).1992. Métodos Normalizados Para El Análisis de Aguas Potables Y Residuales.17ed. España. Díaz de Santos editorial. P. 9-90
3. CONACYT. Productos alimenticios. Bebidas no carbonatadas sin alcohol. Especificaciones. NSO 67.18.01:01.
4. Desrosier N. 1987, Conservación de alimentos, 2ed, México, CIA editorial continental S.A de C.V p. 23.
5. Frazier W.C y otros. 1993, Microbiología de los alimentos, 4ª ed, España (Zaragoza). Editorial Acribia, SA. P. 262.
6. Jawetz y otros. 1996. Microbiología medica. 15 ed. México. Editorial el Manual Moderno. P. 252-253.
7. Mendenhall. S. O. 1987. Elementos de muestreo. México D.F. Grupo editorial Iberoamericana.
8. Murillo. M. 1997. Calidad microbiológica y fisicoquímica de refrescos no carbonatados listos para beber, comercializados en el área metropolitana de San Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, Centroamérica.

9. Pelczar. M. 1982. Microbiología. 4ed. México D.F. Editorial Mc Graw-Hill. P. 525-528.
10. Potter N. 1978. La ciencia de los alimentos. 2ed. México D.F. Editorial Edutex S.A. P. 537-542.
11. Sidney. W. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (AOAC). 14 ed. Estados Unidos de América. P.941-945.
12. Torres. R. 1981. Diccionario de términos médicos. España. 8º ed. Editorial Zirtabe.
13. [http://www.ibnorca.org/02\\_norm/Normas\\_CP12/APNB%20329024.pdf](http://www.ibnorca.org/02_norm/Normas_CP12/APNB%20329024.pdf) Anteproyecto de norma boliviana IBNORCA. Consultado el 12 de febrero de 2009.
14. <http://es.wikipedia.org/wiki/Biopel%C3%ADcula> Consultada el 4 de junio de 2009.
15. [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/200512993433\\_PerfilPr14Bebidas.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200512993433_PerfilPr14Bebidas.pdf). Consultado el 26 de febrero de 2009.
16. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn2005/spn053c.pdf>. Consultado el 12 de marzo de 2009.
17. <http://es.wikipedia.org/wiki/Coliforme> consultada el 10 de marzo de 2009.
18. [www.anmat.gov.ar/Cuida\\_Tus\\_Alimentos/manipuladoresmanualcontribucion fuentes.htm](http://www.anmat.gov.ar/Cuida_Tus_Alimentos/manipuladoresmanualcontribucion fuentes.htm) Consultada el 5 de marzo de 2009.

19. [www.uady.mx/~biomedic/revbiomed/pdf/rb001125.0pdf](http://www.uady.mx/~biomedic/revbiomed/pdf/rb001125.0pdf). Consultado el 16 de marzo de 2009.
20. [www.pehsu.org/az/pdf/alimento.pdf](http://www.pehsu.org/az/pdf/alimento.pdf). Consultado el 5 de marzo de 2009.
21. <http://artesaniasargentinas1.blogspot.com/2008/03/artesana-definiciones.html>. Consultado el 25 de agosto de 2009.
22. [http://www.mspas.gob.sv/pdf/causas\\_frecuentes2008/Causas\\_de\\_Morbilidad2008.pdf](http://www.mspas.gob.sv/pdf/causas_frecuentes2008/Causas_de_Morbilidad2008.pdf). Consultado el 25 de agosto de 2009.
23. [http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli). Consultado el 10 de marzo de 2009.
24. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s01.pdf>. Consultado el 16 de marzo de 2009.
25. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s03.pdf>. Consultado el 16 de marzo de 2009.
26. [http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol12\\_1\\_98/ali01198.html](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol12_1_98/ali01198.html). Consultado el 5 de marzo de 2009.
27. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fruta>. Consultado el 28 de febrero de 2009
28. [http://212.170.241.101/nutricionclinica/fibra/pdf/Nestlé\\_Saber\\_Fibra\\_ficha\\_03.pdf](http://212.170.241.101/nutricionclinica/fibra/pdf/Nestlé_Saber_Fibra_ficha_03.pdf). Consultado el 5 de junio de 2009.
29. <http://www.wordreference.com/definicion/>. Consultado el 5 de junio de 2009.

30. [www.google.com.sv/search?hl=es&q=indicadores+de+contaminacion+fecal+en+aguas&btnG=Buscar&lr=](http://www.google.com.sv/search?hl=es&q=indicadores+de+contaminacion+fecal+en+aguas&btnG=Buscar&lr=). Consultado el 10 de marzo de 2009.
31. [www.analizacalidad.com/arf2005-1.pdf](http://www.analizacalidad.com/arf2005-1.pdf). Consultado el 10 de marzo de 2009.
32. Mapa de los mercados del Centro Histórico de San Salvador. Disponible en Gerencia de Operaciones del Mercado Central. Consultado el 17 abril de 2009.
33. <http://www.wordreference.com/definicion/osificacion>. Consultado el 5 de junio de 2009.
34. <http://aps.sld.cu/bvs/materiales/programa/otros/programaeta.pdf>. Consultado el 6 de febrero de 2009.
35. <http://dicciomed.es/php/diccio.php> Consultado el 5 de junio de 2009.

## **GLOSARIO** (11,13,18,27,28,32,33,34)

**Biopelícula:** O biofilm es un ecosistema microbiano organizado, conformado por microorganismos pertenecientes a diferentes géneros y especies, asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Se caracteriza por la excreción de una matriz adhesiva protectora.

**Brote de ETA:** Episodio en el cual dos o más personas presentan una enfermedad similar después de ingerir alimentos, incluida el agua, del mismo origen y donde la evidencia epidemiológica o el análisis de laboratorio implica a los alimentos y al agua como vehículo de la misma.

**Disuria:** Dolor o dificultad para la emisión de orina.

**Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA):** Es un síndrome originado por la ingestión de alimentos y agua contaminados, vista la evidencia epidemiológica o el análisis de laboratorio.

**Esporangio:** Cavidad donde se originan y están contenidas las esporas en muchas plantas criptógamas

**Glúcido:** Cualquier hidrato de carbono, tanto si es del tipo glucosa como si es glucósido.

**Hematuria:** Presencia de sangre en la orina.

**Hemicelulosa:** Forma parte de las paredes de las diferentes células de los tejidos del vegetal, recubriendo la superficie de las fibras de celulosa y permitiendo el enlace de pectina

**Hipocalóricas:** Que contiene o aporta pocas calorías.

**Ictericia:** Coloración amarilla de la piel y mucosa por presencia de pigmentos biliares en sangre.

**Infecciones alimentarias:** Son las ETA producidas por la ingestión de alimentos y agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos que una vez en la luz intestinal puedan multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí puedan alcanzar otros aparatos y sistemas.

**Lisis:** Destrucción celular por la lisina.

**Micción:** Emisión de orina.

**Osificación:** Transformación en hueso de un tejido del organismo o adquisición de su consistencia o textura

**Pectina:** Polisacárido complejo presente en las paredes celulares de los vegetales, especialmente en las frutas, que se utiliza como espesante en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética

**Piuria:** Presencia de pus en la orina.

**Plásmido:** Elemento replicador extra cromosómico de la célula.

**Pre climatérico:** Es un periodo que incluye las fases de multiplicación y engrosamiento celular, durante las cuales la intensidad respiratoria decrece hasta alcanzar un valor mínimo cuando el fruto tiene su tamaño normal.

**Saprophyto:** Organismo que vive a base de materia orgánica descompuesta.

**Sepsis:** Presencia en sangre u otros tejidos de microorganismos patógenos.

**Tenesmo:** Esfuerzo no efectivo al orinar o defecar.

## **ANEXOS**

**ANEXO N° 1.**

**Mapa de ubicación de los Mercados del Centro Histórico de la  
Zona Metropolitana de San Salvador.**



**Figura N° 1 Mapa de ubicación de los Mercados del Centro Histórico de la Zona Metropolitana de San Salvador. (31)**

**ANEXO N° 2.**

**Criterios microbiológicos para las bebidas no carbonatadas sin  
alcohol. NSO 67.18.01:01**

**Tabla N° 1** Criterios microbiológicos para las bebidas no carbonatadas sin alcohol. NSO 67.18.01:01<sup>(35)</sup>

<b>Microorganismos</b>	<b>Recuento Maximo permitido</b>
Recuento de microorganismos aeróbios (mesofilos) en placa, en unidades formadoras de colonias (UFC/mL)	<1000
Recuento de Mohos 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

\* Tomado de la norma NSO 13.07.01:97 "Agua Potable"

## **ANEXO N° 3**

### **Preparación de medios de cultivo**

## **PREPARACION DE MEDIOS (1,10)**

### **Solución diluyente**

### **Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).**

Fórmula

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de sodio monobásico	34,0g

Agua 1,0L

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 minutos a  $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a  $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

### **Caldo lactosa bilis verde brillante**

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10,0g
Lactosa	10,0g
Sales biliares	20,0 g
Verde brillante	0,0133g

Agua 1,0 L

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario.

Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25 °C.

Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a  $121 \pm 1,0$  °C.

Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

### **Agar papa - dextrosa**

Comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a  $45 \pm 1$ °C, acidificar a un pH de  $3,5 \pm 0,1$  con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido tartárico por 100 ml de medio).

Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro.

Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado.

A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

## **ANEXO N° 4**

**Índice de NMP para 100mL de muestra, para distintas  
combinaciones de resultados positivos y negativos  
cuando se emplean diez porciones de 10 mL**

**Tabla Nº 2** Índice de NMP para 100mL de muestra, para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 mL. (2)

Nº de tubos con reacción positiva de un total de diez de 10 mL cada uno.	Índice NMP/ 100mL
0	<1.1
1	1.1
2	2.2
3	3.6
4	5.1
5	6.9
6	9.2
7	12.0
8	16.1
9	23.0
10	>23.0

**ANEXO N° 5**

**Lista de chequeo**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

**Objetivo:** Identificar las condiciones en las que se venden los refrescos artesanales a base de frutas en los diferentes puestos de los cinco mercados del Centro Histórico de San Salvador

UBICACION: MERCADO \_\_\_\_\_, PUESTO \_\_\_\_\_

LISTA DE CHEQUEO

Nº	Preguntas	% de los puestos que cumplen.	% de los puestos que no cumplen.	Observaciones
1	¿Usa gorro para cubrirse el cabello?			
2	¿Se lava las manos antes de manipular los refrescos?			
3	¿Mantiene bien tapado el producto?			
4	¿Tiene un cucharón para cada refresco?			
5	¿Mantiene limpia el área donde trabaja?			
6	¿Está lejos de focos de contaminación?			
7	¿Habla o tose al despachar?			
8	¿Se observan heridas o llagas en las manos?			
9	¿Maneja dinero a la hora de despachar los refrescos?			
10	¿Es adecuado el material donde se almacenan los refrescos?			
11	¿Con que agua prepara los refrescos?			
12	¿Preparan los refrescos en el momento o los traen ya hechos?			

## **ANEXO N° 6**

**Etiqueta para identificar las muestras de refrescos recolectadas en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador.**

Etiqueta para identificar las muestras de refrescos recolectadas en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador.

Número de muestra:_____
Sabor de refresco:_____
lugar de muestreo:_____
Fecha:_____
Hora de toma de muestra:_____
Análisis requerido:_____
Nombre del analista:_____

## **ANEXO N° 7**

**Datos de sabor y número asignado de las muestras recolectadas  
en los mercados del Centro Histórico.**

**Tabla N° 3** Datos de sabor y número asignado de las muestras recolectadas en los mercados del Centro Histórico.

N° de puesto	N° de muestra	Sabor del refresco	Mercado
1	1	Melón	Ex cuartel
	2	Carao	Ex cuartel
2	3	Tamarindo	Ex cuartel
	4	Coco	Ex cuartel
3	5	Guanaba	Tinety
	6	Arrayan	Tinety
4	7	Carao	Tinety
	8	Tamarindo	Tinety
5	9	Ensalada	Belloso
	10	Jocote	Belloso
6	11	Tamarindo	Belloso
	12	Carao	Belloso
7	13	Mora	Sagrado corazón
	14	Tamarindo	Sagrado corazón
8	15	Carao	Sagrado corazón
	16	Coco	Sagrado corazón
9	17	Carao	Central
	18	Arrayan	Central
10	19	Tamarindo	Central
	20	Naranja	Central
11	21	Coco	Central
	22	Tamarindo	Central
12	23	Maracuyá	Central
	24	Melón	Central

## **ANEXO N° 8**

**Procedimiento para la preparación de muestras, recuento de bacterias mesófilas aerobias y de mohos y levaduras.**

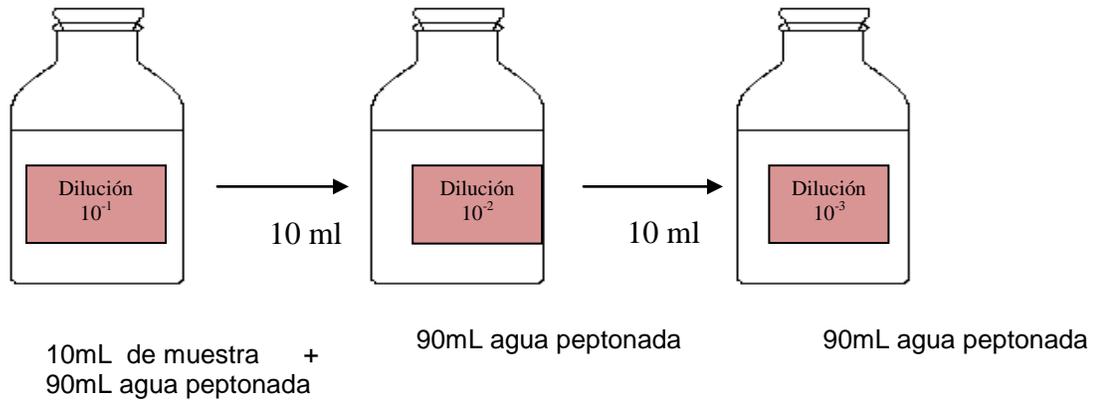
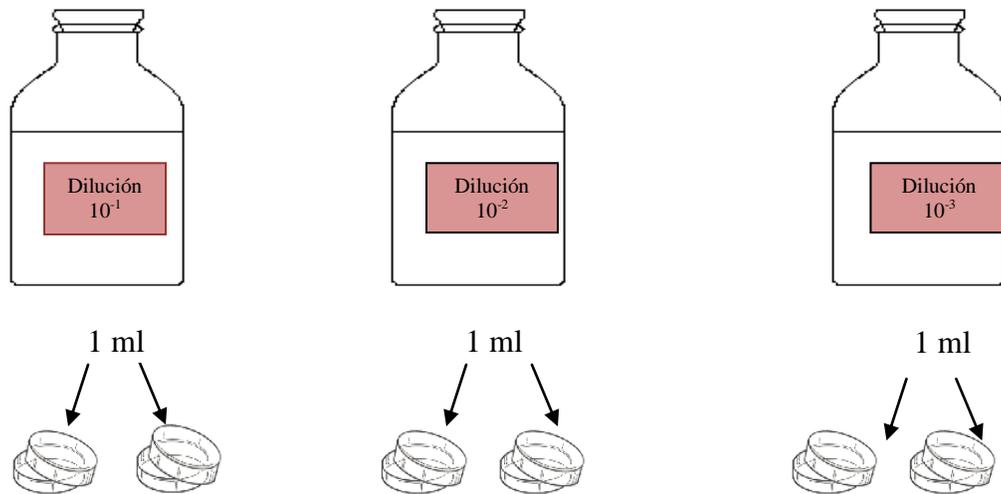
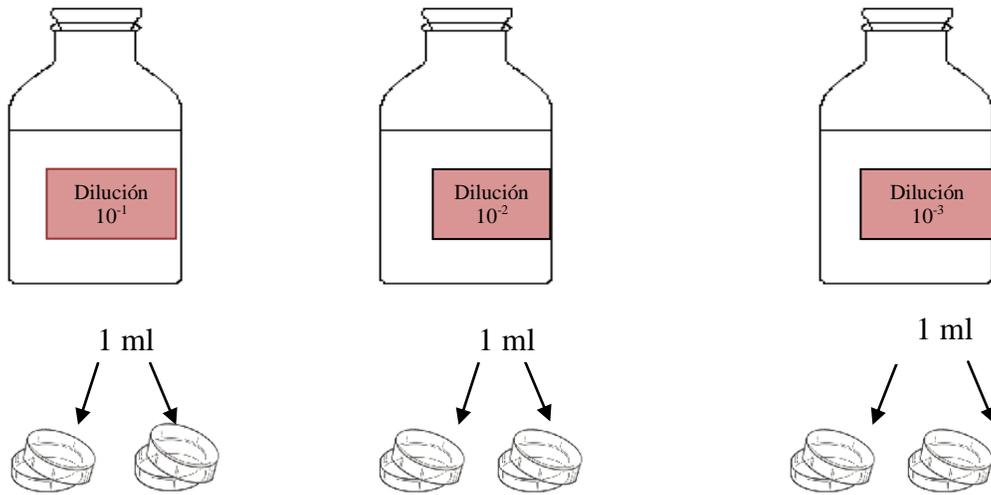


Fig. N°11 Procedimiento para la preparación de la muestra. Preparación de diluciones. (1,10)



20 mL de Agar Plate Count en cada placa de petri.

Fig. N°12 Determinación y Recuento de Bacterias mesófilas aerobias. (1,10)



20 mL de agar papa dextrosa en cada placa de petri.

Fig. N°13 Determinación y Recuento de mohos y levaduras. (1,10)

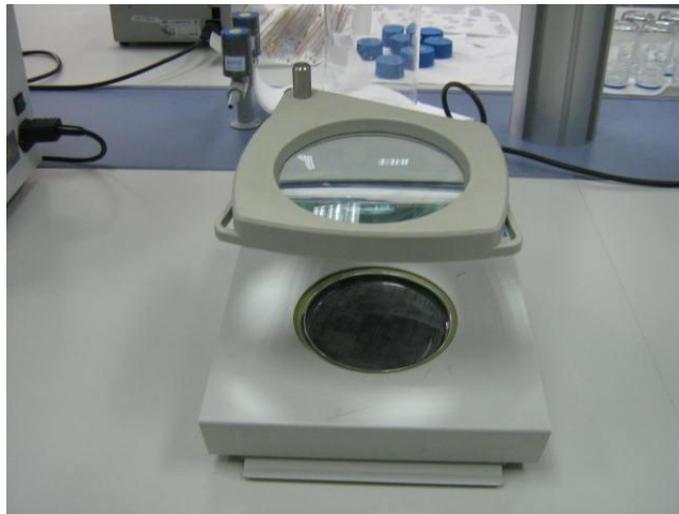


Fig. N°14 Equipo utilizado para contar colonias (Cuenta Colonias).

**ANEXO N° 9**

**Prueba para bacterias coliformes totales, fecales y Escherichia coli.**

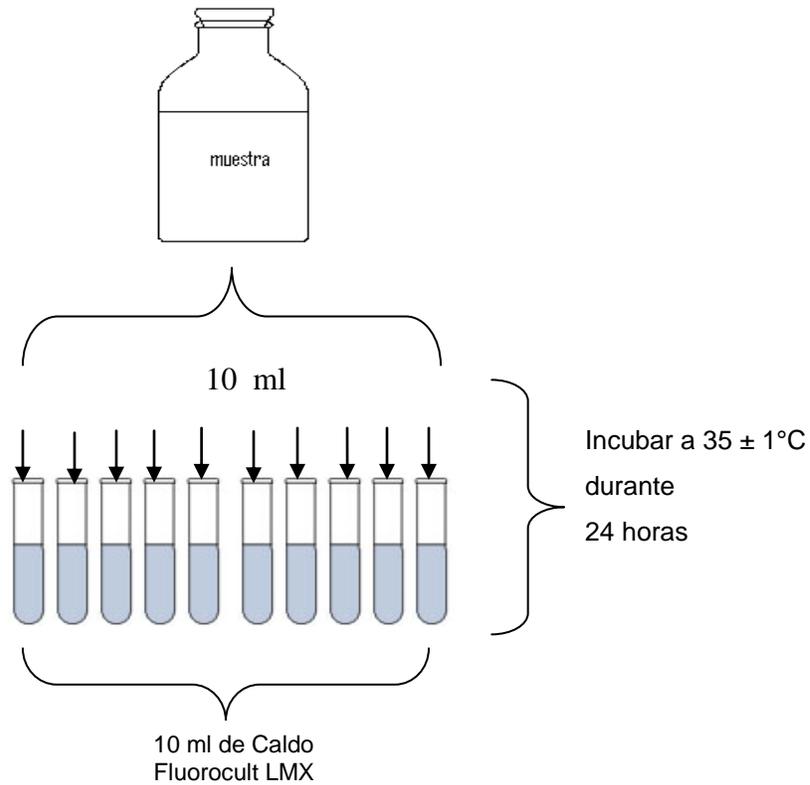


Fig. N°15 Prueba para bacterias coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* (1,10)

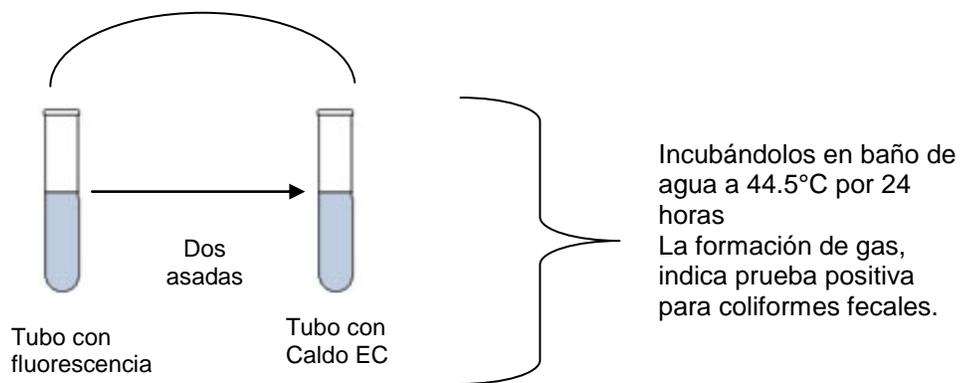


Fig. N°16 Prueba para Coliformes fecales. (1,10)

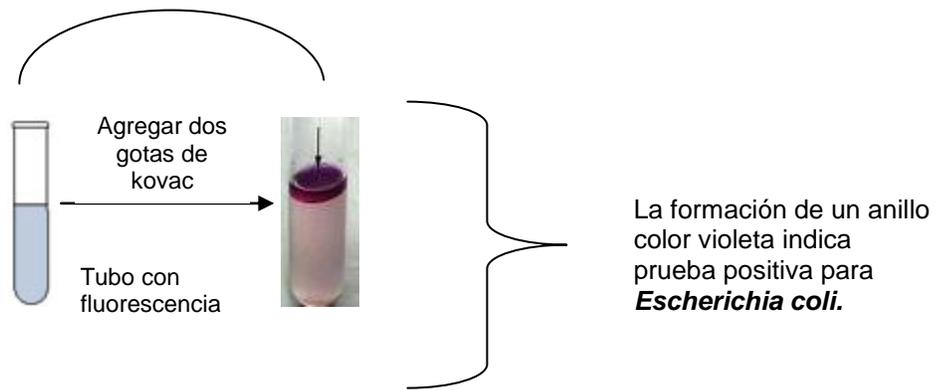


Fig. N°17 Prueba para ***Escherichia coli***. (1,10)

**ANEXO N° 10**

**Carta de resultados enviada a las autoridades de salud.**



FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

San Salvador, 06 de octubre de 2009. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



Ing. Evelyn de Vanegas

Jefe del Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de Calidad

CONACYT

Presente

Reciba un cordial saludo deseándole éxitos en su labor diaria.

El motivo de la presente es para dar a conocer a usted los resultados del análisis microbiológico realizado a 24 muestras de Refrescos artesanales a base de frutas provenientes de puestos de refrescos ubicados en los mercados del Centro Histórico de San Salvador, ya que estamos realizando nuestro trabajo de graduación que lleva por título: "Determinar la inocuidad microbiológica de refrescos artesanales a base de frutas comercializados en los diferentes mercados del Centro Histórico de San Salvador", planteando como uno de nuestros objetivos dar a conocer a las entidades correspondientes, en este caso CONACYT los resultados obtenidos en esta investigación con la finalidad que ustedes los evalúen y puedan realizar otro estudio posterior.

Cabe mencionar que anexo a los resultados se le incluyen las especificaciones de la Norma Oficial Salvadoreña NOS 67.18.01:01 la cual se ha tomado como parámetro para comparar los resultados del estudio, también se le incluye una tabla con los números de los puestos, nombre de los mercados y sabor de los refrescos muestreados a los cuales pertenecen las muestras que se recolectaron para el análisis.

También necesitamos que nos extiendan una carta en la que usted hace constar que ha recibido los resultados, ya que esta irá anexa en el trabajo de graduación.

Agradeciendo de antemano su atención, en espera de una respuesta favorable a nuestra petición.

Atentamente,

F.

Karla Eunice Castellón Morales

F.

María Isidora Torres

Estudiantes egresadas de la Facultad de Química y Farmacia.



F.

Licda. Coralía de los Ángeles Gonzales de Díaz

Docente Director.

**ANEXO N° 11**

**Fotos de los diferentes refrescos que se venden en los mercados  
del Centro Histórico de San Salvador.**



Fig. N° 18 Vendedora de refrescos



Fig. N° 19 Diferentes tipos de refrescos



Fig. Nº 20 Refresco de tamarindo



Fig. Nº 21 Refresco de ensalada