

**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TEMA**

**Validación del método de muestreo microbiológico en  
el proceso de elaboración de polvo  
de cacao alcalino.**

**AUTOR**

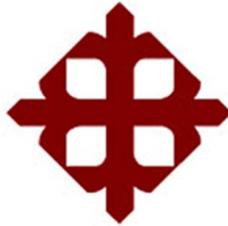
**Madrid Navia Leonel David**

Trabajo de Titulación Previo a la obtención del título de  
**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**  
**con Concentración en Agronegocios**

**TUTOR**

**Ing. Chero Alvarado Víctor Egbert M.Sc.**

**Guayaquil, Ecuador  
2016**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

## **CERTIFICACIÓN**

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. Madrid Navia Leonel David, como requerimiento parcial para la obtención del Título de **Ingeniero Agroindustrial con Concentración en Agronegocios**.

### **TUTOR**

---

**Ing. Víctor Egbert Chero Alvarado M.Sc.**

### **DIRECTOR DE LA CARRERA**

---

**Ing. John Eloy Franco Rodríguez M.Sc.**

**Guayaquil, a los 15 días del mes de marzo del año 2016**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **Leonel David Madrid Navia**

### **DECLARO QUE:**

El Trabajo de Titulación Validación del método de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino previo a la obtención del Título de **Ingeniero Agroindustrial con Concentración en Agronegocios**, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

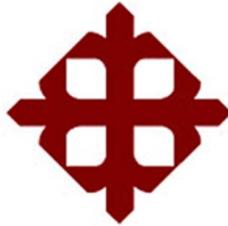
En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del Trabajo de Titulación referido.

**Guayaquil, a los 15 días del mes de marzo del año 2016**

**EL AUTOR**

---

**Leonel David Madrid Navia**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

## **AUTORIZACIÓN**

Yo, **Leonel David Madrid Navia**

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Titulación: Validación del método de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

Guayaquil, a los 15 días del mes de marzo del año 2016

**EL AUTOR**

---

**Leonel David Madrid Navia**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente a mis padres, por todo su apoyo, esfuerzo, sacrificio y respaldo para conmigo y sobre todo por ser el mejor ejemplo que un hijo puede tener.

Mi más sincero agradecimiento y respeto al Ing. Víctor Chero Alvarado, M.Sc. por su valiosa ayuda y guía en el desarrollo de mi trabajo de titulación.

A todos los que conforman la empresa Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. (CAFIESA) y sobre todo al Ing. Jorge Coronel y al Ing. Pedro Cruz por ayudarme, supervisarme y permitirme realizar los análisis en los laboratorios de la empresa.

A todos los grandes amigos que pude conocer a lo largo de mi carrera estudiantil.

Leonel David Madrid Navia

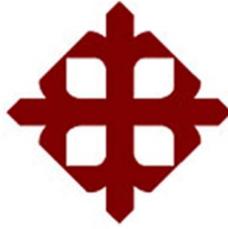
## **DEDICATORIA**

De manera muy especial dedico este trabajo a la Ing. Ruth Navia y al Ec. Leonel Madrid, los mejores padres que esta vida me pudo dar, por ser los pilares fundamentales para conseguir mi primer título profesional.

A mis hermanos Daniel y Stephanie, que siempre me apoyaron y creyeron en mí, esto es para ustedes.

A todos mis amigos de promoción, que estuvieron conmigo desde el inicio de esta aventura académica.

Leonel David Madrid Navia



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**CALIFICACIÓN**

---

**Ing. Víctor Egbert Chero Alvarado M.Sc.  
TUTOR**

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Objetivo General .....	3
1.2 Objetivos Específicos .....	3
Hipótesis.....	3
<b>2 MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Seguridad Alimentaria.....	4
2.1.1 Inocuidad y Calidad.....	5
2.1.2 Limpieza y desinfección .....	6
2.1.3 Agentes desinfectantes .....	8
2.1.4 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) .....	13
2.2 Técnicas Microbiológicas .....	14
2.2.1 Técnicas de Siembra en Cajas Petri por Agotamiento .....	15
2.2.2 Siembra en cajas Petri por Técnicas de siembra en Cuadrantes ...	16
2.2.3 Siembra por profundidad.....	16
2.2.4 Método de Siembra en Placas Petrifilm.....	17
2.3 Normativas y Reglamentos .....	18
2.3.1 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) .....	18
2.3.2 Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN).....	19
2.3.3 Norma ISO 22000:2005 .....	19
2.4 Criterios Microbiológicos .....	20
2.4.1 Microorganismos Indicadores de Contaminación .....	21

<b>3</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	25
3.1	Ubicación geográfica del ensayo .....	25
3.2	Condiciones Climáticas .....	25
3.3	Descripción del proceso de polvo de cacao.....	25
3.4	Materiales.....	26
3.5	Factores estudiados .....	2
3.6	Tratamientos estudiados .....	24
3.6.1	Combinación de tratamientos.....	24
3.7	Diseño experimental.....	25
3.7.1	Análisis de la varianza.....	25
3.7.2	Análisis funcional.....	26
3.8	Manejo del ensayo .....	26
3.8.1	Variables evaluadas.....	26
3.9	Metodología .....	27
3.9.1	Consideraciones para la toma de muestras .....	27
3.9.2	Plan de Muestreo .....	28
3.9.3	Selección de la Muestra .....	29
3.9.4	Método de Muestreo .....	30
3.10	Análisis de datos.....	32
3.10.1	Conteo de Aerobios mesófilos .....	32
3.10.2	Conteo de Coliformes Totales.....	33
3.10.3	Conteo de Mohos y Levaduras .....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
4.1	Resultados de los análisis de aerobios mesófilos.....	34

4.2	Resultados de análisis de mohos-levaduras y coliformes totales .....	37
4.3	Análisis de Varianza.....	39
4.4	Interacción entre factores.....	41
4.4.1	Interacción de prensas .....	41
4.4.2	Interacción de microorganismos .....	43
4.4.3	Interacción lugares de muestreo.....	45
4.4.4	Interacción de todos los factores de estudio.....	47
4.5	Resultados de Validación del método de muestreo microbiológico .....	49
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>52</b>
5.1	Conclusiones .....	52
5.2	Recomendaciones.....	53
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo de desinfectantes.....	10
Tabla 2. Cuadro comparativo para el uso de desinfectantes.....	11
Tabla 3. Dosis para el uso de la solución de ácido per acético.....	12
Tabla 4: Requisitos microbiológicos polvo de cacao alcalino .....	20
Tabla 5: Temperaturas óptimas para el desarrollo de microorganismos .....	22
Tabla 6. Factores y niveles de estudio.....	2
Tabla 7. Combinación de tratamientos.....	24
Tabla 8. Análisis de la varianza hasta grados de libertad .....	25
Tabla 9. Variables en estudio.....	27
Tabla 9. Planificación de toma de muestras y análisis .....	28
Tabla 11. Resultados de análisis Mesofilos Aerobios.....	34
Tabla 12. Resultados en U.F.C aerobios mesófilos.....	35
Tabla 13. Resultados análisis para mohos y levaduras.....	37
Tabla 14. Resultados análisis para coliformes totales.....	38
Tabla 15. Análisis de la Varianza .....	39
Tabla 16. Cuadro de análisis de la varianza.....	40
Tabla 17. Test Duncan prensas.....	41
Tabla 18. Test Duncan microorganismos .....	43
Tabla 19. Interacción prensa x microorganismo.....	44
Tabla 20. Test Duncan lugares de muestreo.....	45
Tabla 21. Microorganismos x lugar muestra.....	46
Tabla 22. Prensas x Lugar muestra .....	46
Tabla 22. Test Duncan Factores prensa, microorganismos y lugares .....	47

Tabla 24. Resultados cuantitativos de mesófilos aerobios en U.F.C .....	50
Tabla 25. Criterios microbiológicos de superficies .....	51

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de aerobios mesófilos .....	36
Gráfico 2. Interacción prensas .....	42
Gráfico 3. Interacción microorganismos .....	43
Gráfico 4. Interacción de los puntos de muestreo .....	45

## RESUMEN

Con la intención de validar el método de muestreo microbiológico en el procesamiento de polvo de cacao alcalino, de la empresa Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. (CAFIESA), se consideró plantearse los siguientes objetivos: aplicar la metodología actual de plan de muestreo microbiológico empleada para el análisis de superficies de contacto en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino; determinar las herramientas estadísticas óptimas que pueden ser aplicadas para validar la metodología del plan de muestreo microbiológico empleada en el proceso de elaboración de polvo de cacao; e identificar los puntos críticos microbiológicos en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino. Lo que conllevó en el presente estudio a determinar la calidad microbiológica de las superficies de los equipos de CAFIESA, específicamente en un equipo de procesamiento denominado prensas. Para el estudio se consideró realizar un *Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial del 4x3x2*, para lo cual se efectuaron 6 repeticiones. En donde los tratamientos fueron las cuatro prensas, y cada tratamiento tiene dos niveles en los que se analizaron tres factores: aerobios mesófilos, mohos-levaduras y coliformes totales. Por consiguiente se tomó los factores microorganismos, prensa y punto de muestreo, dada la interacción que tienen éstos en cada una de las muestras; además de la correlación que tienen las prensas en el momento de la limpieza. El objetivo final fue validar los métodos de muestreo microbiológico cumpliendo con los criterios o límites permitidos.

**Palabras Claves:** mesófilos, coliformes, mohos-levaduras, limpieza, validar.

## ABSTRACT

With the intention to validate the method of microbial sampling in processing cocoa powder alkaline, of the company “Cacaos Finos Ecuatorianos S.A.” (CAFIESA), we considered to consider the following objectives: to apply the current microbiological methodology sampling plan used for the analysis of contact surfaces in the process of preparing alkaline cocoa powder; determine optimal statistical tools that can be applied to validate the methodology of microbiological sampling plan used in the preparation process cocoa powder; microbiological and identify critical points in the preparing process alkaline cocoa powder. This implies that present study to determine the microbiological quality of the surfaces of the equipment CAFIESA, specifically called processing equipment presses. Therefore, the study is considering making a completely randomized factorial design arrangement of 4x3x2, for which 6 repetitions were made. Where treatments were four presses, and each treatment has two levels at which three factors were analyzed: aerobic mesophilic bacteria, yeasts and molds-total coliforms. Therefore microorganism’s factors press and sampling point was taken, given the interaction they had on each of the samples, In addition to the correlation with the presses at the cleaning’s time. With all of this is intended to validate the microbial sampling methods meeting the criteria or limits.

**Key words:** mesophilic, coliforms, mold-yeast, cleaning, validate.

## 1 INTRODUCCIÓN

La inocuidad de alimentos es parte fundamental de la calidad, ya que es una de las metas trazadas por muchas empresas; y el incremento en el consumo de los alimentos por otro lado, exige cada día un control más estricto y eficiente de su calidad.

Con el fin de prevenir enfermedades transmitidas por los alimentos, se debe realizar un control de calidad muy minucioso, el cual debe ser adecuado desde el momento que se obtiene la muestra. Por lo tanto estudiar las metodologías de muestreo, criterios, controles y técnicas microbiológicas, son esenciales para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Cuidar y garantizar la calidad de los alimentos es sumamente importante para una empresa alimentaria como para el consumidor, y justamente por eso, llevar controles microbiológicos estrictos será fundamental. Sobre todo en las superficies que están en contacto directo con los alimentos, ya que hay estudios en los cuales se establece que la contaminación cruzada no solamente se puede dar con el contacto de una persona hacia un alimento; sino también con estructuras, equipos y máquinas que hayan tenido un pésimo proceso de limpieza y desinfección.

Desinfectar las superficies de contacto con los alimentos, en este caso en particular a un equipo específico de producción denominado prensas, este es un equipo por el cual mediante presión separa la manteca y torta de cacao del

licor. A estas prensas se les dará un tratamiento a sus superficies mediante el cual se espera que disminuya y en el mejor de los casos destruya en un 99% los microorganismos presentes, cuidando así la calidad e inocuidad del alimento (FDA, 2015).

Cabe destacar que si no se hace un procedimiento correcto de limpieza, la desinfección no cumplirá su objetivo fundamental (Herrera Dobroski & Troyo Chaves, 2011, pág. 102).

La compañía Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. (CAFIESA) considera importante la validación del método de muestreo requerido para obtener una alta tasa de confiabilidad y calidad de los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos del producto denominado polvo de cacao alcalino.

Es preciso indicar que se toma al producto polvo de cacao alcalino como referencia, debido a que este es el que posee mayor demanda y es el producto estrella de la empresa. Es por eso que CAFIESA tiene la necesidad de realizar un estudio que valide la representatividad del método del plan de muestreo, que ayude eficientemente en la calidad de los resultados de análisis microbiológicos.

Con estos antecedentes se plantearon los siguientes objetivos:

## 1.1 Objetivo General

Validar el método de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino.

## 1.2 Objetivos Específicos

- Aplicar la metodología actual de muestreo microbiológico empleada para el análisis de superficies de contacto en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino, basado en la técnica 3M Quick Swab método oficial AOAC 990.12.
- Determinar los softwares estadísticos óptimos que pueden ser aplicadas para validar la metodología de muestreo microbiológico empleada en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino.
- Identificar los puntos críticos microbiológicos en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino.

## Hipótesis

- **Hipótesis nula (Ho):** El uso de los softwares estadísticos minitab 16 e infostat version libre ayudan a validar el método de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino.
- **Hipótesis alternativa (Ha):** El uso de los softwares estadísticos minitab 16 e infostat versión libre no ayudan a validar el método de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Seguridad Alimentaria

La seguridad alimentaria existe “cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias de alimentos a fin de llevar una vida activa y sana” (Cumbre Mundial Sobre la Alimentación, 1996, pág. 2).

Segura García del Río, (2013, pág. 155) afirma que, aunque en la mayoría de los países del mundo la seguridad alimentaria sigue vinculada a la disponibilidad de alimentos, en nuestro entorno mas inmediato se relaciona con la calidad alimentaria.

En un sin número de ocasiones no se cumple el punto de calidad alimentaria y procesamiento de productos alimenticios sanos y seguros, ya que no se toman muchas veces los controles necesarios para que estos sean seguros e inocuos; y lo que resulta es un alimento con un crecimiento microbiano muy alto que deriva en una contaminación, que a la postre terminará para el consumidor en una intoxicación si es ingerido .

Enfocándonos al aspecto de inocuidad que debe tener un alimento o producto alimenticio, que es fundamental para garantizar esa seguridad alimentaria, se debe tener en cuenta los cuidados de limpieza y asepsia en las superficies y ambiente a lo largo de la cadena de producción y almacenamiento para evitar cualquier tipo de contaminación.

De acuerdo a la resolución 067, ambiente es “cualquier área interna o externa delimitada físicamente que forma parte del establecimiento destinado a la fabricación, procesamiento, preparación, envasado, almacenamiento y expendio de alimentos” (ARCSA, 2015, pág. 3).

### **2.1.1 Inocuidad y Calidad**

Las amenazas que plantean los alimentos no inocuos ponen en riesgo y supone un peligro para la salud de todas las personas a nivel mundial: los niños pequeños, embarazadas, los lactantes, personas mayores y personas con dolencias subyacentes están generalmente indefensos. Millones de personas son afectadas al año por las enfermedades que transmiten los alimentos, en un gran porcentaje a niños sobre todo, y generalmente a países subdesarrollados o en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Se entiende por inocuidad a todo alimento o producto alimenticio que cumpla con la condición de ser seguro y no haga daño a la salud del consumidor.

La inocuidad alimentaria hace alusión a un sin número de riesgos ya sean graves o no, que pueden actuar en los alimentos haciendo a estos perjudiciales o nocivos a la salud del consumidor (FAO, 2010).

En fin, la importancia que tiene la inocuidad para todos los consumidores es fundamental sobre todo en lo que a salud respecta. Y no solo se trata de llevar un control al momento de la producción, ya que cualquier tipo de contaminación se puede llevar a cabo en distintas fases del proceso, incluso antes que la materia prima entre a la planta de producción. Por eso es necesario tomar

medidas de aseguramiento de la calidad en todas las etapas de la cadena productiva.

Hoy por hoy en el Ecuador tocar el tema de la calidad alimentaria, es hablar de obligaciones y compromisos con el sector industrial, comercio y consumidores (Ministerio de Industrias y Productividad, 2012, pág. 12).

Por calidad podemos entender que es todo lo que conlleva producir un bien o servicio satisfaciendo al consumidor con un producto conforme.

### **2.1.2 Limpieza y desinfección**

“La higiene alimentaria comprende todas las medidas necesarias para garantizar la inocuidad sanitaria de los alimentos, manteniendo a la vez el resto de cualidades que les son propias, con especial atención al contenido nutricional” (Loza, Pecho Tataje, & Uribe Quiroz, 2014, págs. 173-174).

Es por eso necesario mantener una higiene estricta a lo largo de toda la cadena productiva, sin olvidarnos también lo fundamental que es llevar la higiene personal, para evitar posibles contaminaciones.

Según la resolución 067, la contaminación es “introducción o presencia de cualquier peligro biológico, químico o físico en el alimento, o en el medio ambiente alimentario” (ARCOSA, 2015, pág. 4).

Por lo cual, los métodos de limpieza y desinfección en equipos, ambientes y superficies son de suma importancia para proteger las características propias

del alimento y así asegurar la calidad e inocuidad de esos productos (ARCSA, 2015, pág. 28).

“Para la limpieza y la desinfección es necesario utilizar productos que no tengan perfume ya que pueden producir contaminantes además de enmascarar otros olores” (Orellana Campoverde, 2015, pág. 97).

De acuerdo a la resolución 067, por limpieza se entiende que “es el proceso o la operación de eliminación de residuos de alimentos u otras materias extrañas o indeseables” (ARCSA, 2015, pág. 6).

Así como son de importantes los procesos de limpieza y desinfección en toda la cadena del ciclo productivo, lo son también los elementos con los cuales se va a realizar esa desinfección.

Se puede decir que desinfección es el proceso físico o químico por medio del cual se busca reducir o bajar la carga microbiana de superficies limpias que estén en contacto con el producto, sin que dicho proceso perjudique la inocuidad y calidad del alimento (ARCSA, 2015, pág. 4).

Las superficies de equipos y máquinas industriales son inertes y por lo mismo las bacterias no pueden vivir ahí, y si lo hacen es por poco tiempo ya que no pueden asentarse correctamente. Ahora, muchas veces las superficies presentan grietas o irregularidades que hacen imposible que se haga una limpieza y desinfección eficiente; provocando a la larga que los microorganismos que están presentes en estas rugosidades sean un potencial riesgo de contaminación (Hernandez & Sastre, 1999, págs. 506-507).

Desinfectar las superficies de contacto con los alimentos, en este caso específico las prensas, es dar un tratamiento a las superficies que entran en contacto con los productos o alimentos por medio de un proceso que disminuye y en el mejor de los casos destruye en un 99 % los microorganismos presentes, cuidando así la calidad e inocuidad del alimento (FDA, 2015).

Cabe destacar que si no se hace un procedimiento correcto de limpieza, la desinfección no cumplirá su objetivo fundamental (Herrera Dobroski & Troyo Chaves, 2011, pág. 102).

### **2.1.3 Agentes desinfectantes**

Los elementos con los que se se plantea realizar una desinfección son muy importantes, y en la industria alimentaria generalmente se usan: agentes clorados, yodados, elementos de amonio cuaternarios, entre otros; a continuación presentamos algunos de estos.

#### **2.1.3.1 Desinfectantes clorados**

Los compuestos clorados son los elementos desinfectantes mayormente usados en las industrias alimentarias, estos son buenos bactericidas y muy eficaces contra hongos; eso si, se debe tener cuidado en donde se los piensa utilizar ya que no en todas las compañías procesadoras de alimentos se acepta su uso (OPS, 2015, pág. 2).

Las ventajas del cloro como desinfectante es que por sus cualidades puede ser almacenado y transportado de manera segura, y es muy efectivo ya que produce una considerable eliminación o disminución de la carga microbiana.

Sus desventajas son lo corrosivo y peligroso que puede llegar a ser cuando esta al aire libre (LENNETECH, 2016, pág. 1).

### **2.1.3.2 Compuestos de amonio cuaternario**

Son aquellos que por lo general, su efecto eliminador de microorganismos requiere de mas tiempo de lo normal para desinfectar una zona o superficie, pero esto no siempre es un inconveniente ya que por ser estables, eliminarán bacterias por un tiempo prolongado, diferenciándose así de otros desinfectantes que pierden su efectividad en ese lapso de tiempo (OPS, 2015, pág. 2).

Estos compuestos tienen una potente acción como detergentes, y su efectividad bactericida se obtiene por la cualidad de entrar en la membrana de los microbios, gracias a las cadenas de carbono hidrófobas. (BETELGEUX, 2014, pág. 6)

### **2.1.3.3 Alcoholes**

Los alcoholes son aquellos agentes que tienen acción inmediata en escasos segundos cuando se los usa, aunque no persisten en el tiempo; son eficaces contra las bacterias gram negativas, positivas, hongos, virus y micobacterias. Su efectividad bactericida es gracias a que entran en la pared celular de los microorganismos e inactivan enzimas desnaturalizando las proteínas (BETELGEUX, 2014, pág. 7).

Los alcoholes son ampliamente usados, no solo en establecimientos de porcesamiento de alimentos, sino tambien en hospitales, dispensarios y en el hogar. La ventaja que estos podrían tener frente a otros desinfectantes es que son de actuación rápida.

A continuación se incluye una Tabla comparativa de los distintos desinfectantes de uso industrial:

**Tabla 1. Cuadro comparativo de desinfectantes.**

<b>Desinfectantes</b>			
<b>TIPO</b>	<b>Clorados</b>	<b>Amonios cuaternarios</b>	<b>Alcoholes</b>
<b>Toxicidad</b>	++	+	+
<b>Corrosión</b>	+++	-	-
<b>Amplio espectro</b>	+++	++	+++
<b>Inactivación materia orgánica</b>	+++	+++	+++

**Fuente:** Moreno , Schade, Rivero, & Smith (2015)

La Tabla 1 indica la comparación de los agentes desinfectantes en diferentes aspectos, claramente nos señala que en niveles de toxicidad y corrosión, los desinfectantes clorados tienen niveles más altos, y solamente en inactivación de materia orgánica y en amplio espectro todos ellos igualan condiciones.

A continuación se evalúa también el uso de desinfectantes, en el siguiente cuadro comparativo:

**Tabla 2. Cuadro comparativo para el uso de desinfectantes.**

<b>Uso de desinfectantes</b>			
<b>TIPO</b>	<b>Clorados</b>	<b>Amonios cuaternarios</b>	<b>Alcoholes</b>
<b>Pisos en general</b>	+	++++	-
<b>Sanitarios</b>	+++	+++	-
<b>Áreas críticas</b>	+++	+	-
<b>Mobiliario</b>	++	++	+
<b>Equipos</b>	-	+	+++
<b>Medicamentos</b>	-	-	+++

**Fuente:** Moreno , Schade, Rivero, & Smith (2015)

En la Tabla 2 se observa claramente que los agentes de amonio son muy utilizados en pisos y sanitarios; los clorados en áreas críticas y sanitarios y los alcoholes son mas usados en equipos y medicamentos.

#### **2.1.3.4 Ácidos Peracéticos**

Otro de los agentes desinfectantes que se utiliza son las soluciones de ácidos peracéticos, las cuales estan constituidas por un balance entre el peróxido de

hidrógeno y el ácido peracético, cabe destacar que este potente microbicida está entre los desinfectantes mas fuertes conocidos (ARAZUL, 2016, pág. 1).

Es necesario mencionar que esta solución de ácido peracético se utiliza para desinfectar las superficies de las prensas específicamente sus bandejas y entrada al triturador. Es recomendable que cuando se utilice esta solución se tomen medidas preventivas y de seguridad como mascarillas y guantes, ya que esta solución tiene un olor muy fuerte y estar expuesto mucho tiempo a este puede causar problemas a la salud.

**Tabla 3. Dosis para el uso de la solución de ácido per acético.**

<b>Ácido peracético</b>	
<b>Equipos</b>	<b>DOSIS</b>
Bandejas de prensas y triturador	300 ml en 20 litros agua
Boca de envasadora de manteca	300 ml en 20 litros agua
Cuchillas de molinos	100 ml en 20 litros agua
Banda de kibbled	300 ml en 20 litros agua

**Fuente:** CAFIESA, (2014)

Lo que indica la Tabla 3 son las dosis que se recomiendan para su uso en sanitización de frutas y verduras, superficies en contacto con alimentos y como esterilizante químico.

#### **2.1.4 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)**

Los análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP), son un conjunto de actividades que conforman un sistema preventivo para asegurar la calidad e inocuidad alimentaria. Este sistema se lo aplica en la industria alimentaria. En este se identifican potenciales peligros y riesgos de contaminación a lo largo de la cadena de producción (PROEcuador, 2013, pág. 3).

De acuerdo con la normativa 067, el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control son “un proceso sistémico preventivo que identifica, evalúa y controla los peligros, que son significativos para la inocuidad del alimento” (ARCSA, 2015, pág. 5).

Un punto crítico de control describe una existencia de un riesgo o peligro en la inocuidad y se aplica un control para prevenir o eliminar dicho peligro (CODEX ALIMENTARIUS, 2002, pág. 1).

##### **2.1.4.1 Puntos críticos microbiológicos**

Un punto crítico microbiológico es aquel en el cual existe un alto riesgo de contaminación sea esta, por pésima manipulación de equipos, higiene personal, superficies mal desinfectadas o por vestimenta indebida del personal operativo.

Los puntos críticos microbiológicos que se evaluaron fueron en las prensas, específicamente en las bandejas de prensas y el triturador de torta de cacao de la prensa.

Según normativa 067, se entiende por punto crítico de control como la “fase en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos y reducirlo a un nivel aceptable” (ARCSA, 2015, pág. 8).

#### **2.1.4.2 Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización (POES)**

Los Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización son un conjunto de prácticas y procedimientos descritos en un manual que debe tener toda empresa de alimentos, en el cual se estandarizará diferentes operaciones además de la limpieza y desinfección, como controles y comprobaciones de procesos; con el fin de prevenir cualquier contaminación y garantizar la inocuidad de los alimentos (INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTOS, 2008, págs. 1-2).

CAFIESA cuenta con un manual de procedimientos operativos estandarizados de sanitización en el cual se registran todas las actividades de limpieza e higiene de cada responsable de área y/o equipos y maquinarias.

## **2.2 Técnicas Microbiológicas**

Los análisis microbiológicos que se realizan en los productos alimenticios competen a una secuencia de técnicas y métodos con diferentes resultados tanto así como alimentos existen; éstas facultan la obtención de un conteo del microorganismo analizado, y su finalidad es satisfacer varios objetivos como determinar su calidad, prácticas higiénicas, tiempo de vida útil o puntos críticos microbiológicos (Gamboa, 2015, pág. 10).

Para cumplir con esta finalidad se debe tener en cuenta procedimientos y pasos a seguir que están fundamentados en reglamentos y normativas estandarizadas o globalizadas.

En Ecuador, un ente regulador es el Servicio Ecuatoriano de Normalización que con sus reglamentaciones busca garantizar la seguridad del consumidor promoviendo la calidad y la mejora continua (INEN, 2015, pág. 1).

Se puede definir una siembra como el conjunto de actividades de colocar microorganismos cultivables en diferentes medios de cultivo; esto se hace desde el momento que tenemos muestras biológicas, muestras de control de calidad de alimentos, muestras de superficies o ambientes (suelos, estructuras, etc). Actualmente las técnicas microbiológicas mas usadas en laboratorios son las de transferencia de bacterias (Rojas Triviño, 2011, pág. 49).

### **2.2.1 Técnicas de Siembra en Cajas Petri por Agotamiento**

Esta técnica lo que busca es conseguir separar colonias por medio de un inóculo. Esto se realiza tomando la caja petri con una mano, haciendo una pequeña pendiente; y con la otra se coge el asa de argolla previamente esterilizada por medio de flameo por fuego directo, esta se enfría en uno de las secciones laterales del agar y se empieza a hacer la estría como indica el anexo 1. Esto se efectúa en todos los lados de la caja (Rojas Triviño, 2011, pág. 50).

### **2.2.2 Siembra en cajas Petri por Técnicas de siembra en Cuadrantes**

La finalidad de esta técnica es que al realizar el rayado o las estrías, se va diluyendo el inóculo en la superficie del agar. Para efectuar esta actividad hay que proceder a dividir en cuatro cuadrantes la caja Petri mediante un marcador o imaginariamente, después tomar el asa previamente esterilizada, posteriormente se toma el inóculo para efectuar el rayado en cada cuadrante sin esterilizar nuevamente el asa de argolla (Rojas Triviño, 2011, pág. 50) (Anexo 2).

Una vez sembradas las cajas Petri, voltearlas e incubarlas a la temperatura y tiempo que corresponda.

### **2.2.3 Siembra por profundidad**

Esta técnica se basa en situar el inóculo en una caja Petri vacía, y después en colocar el medio de cultivo. Es decir, tomar 1ml de la muestra diluida y colocarla en la caja Petri, posteriormente e inmediatamente verter aproximadamente 20 ml del agar, y lentamente mezclamos el inóculo con el medio de cultivo haciendo suaves movimientos de izquierda a derecha de forma circular (NTE INEN 1529-10:98, 1998, pág. 4).

Estas técnicas son las mas usadas en lo que a siembras en placa petri respecta.

#### **2.2.4 Método de Siembra en Placas Petrifilm**

Ésta método de siembra consiste en el uso de placas que contienen un medio de cultivo selectivo listo para colocar la muestra o inóculo diluido. Es una técnica rápida y práctica para realizar análisis microbiológicos, y tiene muchas ventajas frente a otras técnicas, ya que se ahorra tiempo, espacio, trabajo y ciertos gastos (Gamboa, 2015, pág. 15).

Esta técnica es la que se utilizó para realizar todos los análisis correspondientes, básicamente su procedimiento trata de lo siguiente:

Una vez obtenida la muestra diluida, lo que sigue es la siembra. Primero, se coloca la placa petrifilm en una superficie plana y lo siguiente es levantar el film superior (Anexo 3). Luego, pipetear 1 ml de muestra y ubicar la pipeta en una posición perpendicular al film inferior tratando que la muestra caiga en el centro del film, evitando tocarlo.

Posteriormente soltar el film superior evitando que al caer se formen burbujas de aire. Luego ubicar el aplicador en el centro del film superior (Anexo 4) y ejercer un poco de presión al aplicador para poder distribuir la muestra por toda la zona circular. Por último levantar el aplicador y esperar 1 minuto para que se solidifique la muestra y se procede a incubar a la temperatura y tiempo que corresponda (3M , 2010, pág. 3).

Cabe mencionar que las placas petrifilm pueden colocarse en el incubador en grupos de 20, una placa encima de otra, ahorrando así mucho espacio.

“Las placas 3M Petrifilm son métodos reconocidos por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC INTERNATIONAL) como Métodos Oficiales de Análisis (OMA)” (3M, 2016, pág. 1).

El almacenamiento de estas placas debe hacerse con mucho cuidado, si los empaques estan sellados, hay que mantenerlos en refrigeración, pero una vez abierto solo sacar las placas a utilizar y volver a cerrar el empaque pero esta vez almacenar en lugar fresco y seco.

### **2.3 Normativas y Reglamentos**

Todos los temas expuestos en este trabajo están basados en procedimientos que la compañía CAFIESA dispone, los mismos que se encuentran certificados bajo la normativa ISO 22000:2005.

#### **2.3.1 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)**

Las buenas prácticas de manufactura son un grupo de procedimientos indispensables para garantizar el cumplimiento de las conformidades planteadas en lo que a calidad e higiene se refiere (CAFIESA, 2012, pág. 6).

La normativa 067 nos dice que las BPM son un “conjunto de medidas preventivas y prácticas generales de higiene en la manipulación, preparación, elaboración, envasado y almacenamiento de alimentos para consumo humano, con el objetivo de garantizar que los alimentos se fabriquen en condiciones sanitarias adecuadas” (ARCSA, 2015, pág. 4).

Las BPM son fundamentales para alcanzar objetivos de higiene y calidad a lo largo de la cadena productiva.

### **2.3.2 Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN)**

El INEN es el organismo competente en el Ecuador en materia de normalización y reglamentación en temas de seguridad, protección y salud del consumidor (INEN, 2015, pág. 1).

Las normativas técnicas en las que la empresa CAFIESA se avala y sigue los criterios microbiológicos son la INEN 620 y sus derivadas en temas de cacao, estas se aprecian en el Anexo 5.

### **2.3.3 Norma ISO 22000:2005**

La ISO 22000:2005 es una norma internacional la cual indica los lineamientos para establecer un sistema de gestión de seguridad e inocuidad alimentaria, con el fin de controlar e identificar riesgos potenciales en los alimentos que puedan afectar la salud de los consumidores (ISO 22000, 2005).

La importancia del plan HACCP radica fundamentalmente en la identificación y control de todos los peligros, ya que la norma ISO 22000:2005 lo requiere, y a la postre será la clave para la eficacia de este sistema de gestión.

Es necesario resaltar que la compañía Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. (CAFIESA) tiene certificación ISO 22000:2005, y todos sus procedimientos están guiados por este sistema de gestión. Actualmente está en proceso de migración de la ISO 22000:2005 a la FSSC 22000 Versión 03.

## 2.4 Criterios Microbiológicos

Se puede definir a un criterio microbiológico como aquel que nos indica la “aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, incluidos parásitos, y/o en la cantidad de sus toxinas, por unidad de masa, volumen, superficie o lote” (FAO, 2016, pág. 1).

Una de las finalidades de estos criterios es proteger la salud del consumidor procurando que los resultados de los análisis se mantengan o esten dentro del rango de aceptabilidad.

Los criterios microbiológicos que se manejan dentro del método de muestreo estan basados en la norma mexicana (Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación de fomento Sanitario, 1994, pág. 22).

En la Tabla 4 se indican los requisitos microbiológicos permisibles para el producto polvo de cacao alcalino.

**Tabla 4: Requisitos microbiológicos polvo de cacao alcalino**

**U.F.C.: Unidades formadoras de colonias.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Unidad de conteo</b>	<b>Máximo permitido</b>
<b>Mesófilos aerobios</b>	U.F.C.	10000
<b>Mohos y levaduras</b>	U.F.C.	100
<b>Coliformes totales</b>	U.F.C.	Ausencia total

**Fuente: NTE INEN 620 (1989)**

## **2.4.1 Microorganismos Indicadores de Contaminación**

### **2.4.1.1 Aerobios Mesófilos**

Los aerobios mesófilos son todas aquellas bacterias capaces de crecer y desarrollarse óptimamente a una temperatura entre 27 y 35°C. Obviamente, estos al momento de realizar el recuento, indicará la flora total que hay de aerobios sin especificar los tipos de bacterias (Cano, 2006, pág. 13).

Un recuento elevado de aerobios puede significar lo siguiente:

Una materia prima con una alta tasa de contaminación, también puede referirse a una pobre y mala manipulación del alimento durante la cadena productiva. Puede indicar también la presencia de ciertos elementos patógenos que son aerobios y la rápida modificación que sufre el producto (FOOD NEWS LATAM, 2015, pág. 1).

Básicamente lo que nos indica un recuento de aerobios es la calidad y condiciones de higiene que tiene el producto o alimento.

Se puede observar en la Tabla 5 el rango de temperaturas óptimas para el desarrollo de diferentes microorganismos.

**Tabla 5: Temperaturas óptimas para el desarrollo de microorganismos**

<b>Microorganismo</b>	<b>Temperatura óptima</b>
Psicrótrofos	7°C - <5 °C
Mesófilos	30°C – 40 °C
Termófilos	55°C – 75 °C

**Fuente:** Cano (2006)

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos esta basado en el método de 3M Petrifilm Placas para Recuento de Aerobios (Anexo 6).

#### **2.4.1.2 Mohos y levaduras**

Se define a los mohos como “organismos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamdos hifas, cuyo conjunto forma el llamado micelio que puede ser coloreado o no” (NTE INEN 1529-10:98, 1998, pág. 2).

Las levaduras “Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovoidea, periforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias” (NTE INEN 1529-10:98, 1998, pág. 2).

La contaminación por hongos en los alimentos se presenta por una característica en particular que es la de deteriorar los productos alimenticios, dañando su aspecto, forma química, color y evitando que se conserve de la mejor manera. Cabe mencionar que los hongos o alguno de éstos tienen la capacidad de producir toxinas, llamadas micotoxinas (Cano, 2006, pág. 16).

El método utilizado para recuento de mohos y levaduras es el 3M Petrifilm Recuento de Mohos y Levaduras en placas Petrifilm (Anexo 7).

#### **2.4.1.3 Coliformes y Escherichia coli (E. Coli)**

“Son bacterias que a la temperatura especificada (es decir, 30 °C o 37 °C) forman colonias características en Agar cristal Rojo –Violeta neutro-bilis lactosa, y que en la prueba de confirmación causa fermentación con la producción de gas” (NTE INEN-ISO 4832, 2015, pág. 2).

Los coliformes son fermentadores de la lactosa y están representados por algunos microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Generalmente están situadas en el intestino del hombre y animales; normalmente son buenos indicadores de contaminación fecal (Cano, 2006, pág. 22).

La AOAC International y el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de Estados Unidos definen a los coliformes como colonias de bastoncillo gram negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación

metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento (3M , 2010, pág. 2).

De acuerdo con la Norma Técnica Ecuatoriana el E. coli “es una bacteria perteneciente al grupo de los coliformes fecal, capaz de fermentar lactosa a 44 °C con producción de gas , es capaz de producir indol a partir del triptófano; reacciona positivamente a la prueba del rojo de metilo y negativo a la de Voges Proskauer” (NTE INEN 1529-8, 1990, pág. 3).

El método que se utiliza para siembra y recuento de coliformes esta basado en: Recuentos de coliformes y Escherichia coli (PETRIFILM) Norma AOAC 2012 official method 991.14 (Anexo 8).

### **3 MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1 Ubicación geográfica del ensayo**

El presente trabajo se llevó a cabo en la planta de semielaborados de cacao de la empresa Cacaos Finos Ecuatorianos S.A CAFIESA y en su laboratorio, ubicada en el kilómetro 4.5 de la vía Duran-Tambo, Cantón Durán, Provincia del Guayas. Este ensayo fue realizado entre los meses de Octubre y Enero del 2016.

Las coordenadas en las que se encuentra ubicada la planta de procesamiento de Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. son: 2°11'38.4" de latitud sur y 79°49'27.1" de longitud oeste (Anexo 9).

#### **3.2 Condiciones Climáticas**

La temperatura media de esta locación es de 31° centígrados y la mínima es de 25° centígrados, el cantón Duran posee un clima tropical en el cual se dan precipitaciones entre los meses de diciembre y abril, dándose con mas intensidad en los meses de febrero y marzo.

#### **3.3 Descripción del proceso de polvo de cacao.**

El proceso de elaboración de polvo de cacao inicia con la recepción de cacao e ingreso a la tolva para posteriormente ser lavado con agua y vapor. Una vez lavado el grano pasa a un pre secador, que es un tambor rotativo donde se somete a temperaturas de 140 °C. Del pre secador, pasa a unos limpiadores en donde estos clasifican y eliminan los desechos que pueda traer el grano.

Una vez limpio y clasificado el cacao pasa a los tostadores, en el cual el grano estará a temperaturas de 120 °C para quitar la humedad restante y así poder aprovechar todas sus bondades como el aroma y sabor posteriormente en el producto final.

El cacao ya tostado pasa a unas descascaradoras y luego a un proceso de molienda donde el producto resultante será el licor de cacao, este pasa por unos refinadores y posteriormente a un tanque reactor donde se llevará a cabo la esterilización. Luego pasará al cuarto de prensas, en el cual el licor de cacao será sometido a presión obteniendo por medio de esta, la manteca y la torta de cacao, que posteriormente será pulverizada y dosificada con carbonato de calcio para obtener el polvo de cacao alcalino. Se puede apreciar de mejor manera todo el proceso en el Anexo 10.

### **3.4 Materiales**

Para el muestreo fue necesario:

- Mandil
- Cofia
- Mascarilla
- Guantes
- Hisopos 3M Quick Swab
- Hielera

Ya en el laboratorio se requirió:

- Pipeta
- Probeta
- Matraz Erlenmeyer
- Autoclave
- Placa fijador
- Desecador

- Balanza
- Puntas de 1ml
- Frascos termo resistentes
- Incubadora

Como insumos, fue necesario:

- Placas 3M Petrifilm Aerobios
- Placas 3M Petrifilm Coliformes
- Placas 3M Petrifilm Mohos y levaduras
- Alcohol
- Agua de peptona
- Contador de colonias QUEBEC

### 3.5 Factores estudiados

Para el ensayo experimental se estudiaron los siguientes factores y niveles de estudios que se aprecian en la Tabla 6:

**Tabla 6. Factores y niveles de estudio**

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
Prensas	4
Microorganismos	3
Punto de muestra	2

Elaborado por El Autor

### **3.6 Tratamientos estudiados**

Se tomó como tratamientos para el trabajo experimental a los equipos de producción llamados prensas que son cuatro, y en cada una se realizó muestreos microbiológicos en dos puntos de cada prensa (centro y borde). A continuación se detallan los tratamientos.

- **A1:** Prensa 1
- **A2:** Prensa 2
- **A3:** Prensa 3
- **A4:** Prensa 4

#### **3.6.1 Combinación de tratamientos**

Los tratamientos se combinaron con los factores microorganismos y lugar de muestreo:

- B1: Aerobios
- B2: Mohos-levaduras
- B3: Coliformes totales
- C1: Lugar de muestreo centro
- C2: Lugar de muestreo borde

A continuación en la Tabla 7 se detalla la combinación de los tratamientos y factores:

**Tabla 7. Combinación de tratamientos**

	<b>Prensas</b>	<b>Microorganismos</b>	<b>Lugar muestra</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1</b>	A1	B1	C1
<b>2</b>	A1	B1	C2
<b>3</b>	A1	B2	C1
<b>4</b>	A1	B2	C2
<b>5</b>	A1	B3	C1
<b>6</b>	A1	B3	C2
<b>7</b>	A2	B1	C1
<b>8</b>	A2	B1	C2
<b>9</b>	A2	B2	C1
<b>10</b>	A2	B2	C2
<b>11</b>	A2	B3	C1
<b>12</b>	A2	B3	C2
<b>13</b>	A3	B1	C1
<b>14</b>	A3	B1	C2
<b>15</b>	A3	B2	C1
<b>16</b>	A3	B2	C2
<b>17</b>	A3	B3	C1
<b>18</b>	A3	B3	C2
<b>19</b>	A4	B1	C1
<b>20</b>	A4	B1	C2
<b>21</b>	A4	B2	C1
<b>22</b>	A4	B2	C2
<b>23</b>	A4	B3	C1
<b>24</b>	A4	B3	C2

Elaborado por El Autor

Lo que conlleva a realizar un análisis de varianza y un arreglo factorial que se detalla en el punto 3.7.

### 3.7 Diseño experimental

#### 3.7.1 Análisis de la varianza

Se consideró para la realización de este ensayo un *Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial del 4x3x2*, con 6 repeticiones, con un esquema de análisis de la varianza que se puede apreciar en la Tabla 8:

**Tabla 8. Análisis de la varianza hasta grados de libertad**

<b>Fuente de varianza</b>	<b>GL</b>
Tratamientos	23
Prensa	3
Prensa 1 (P1)	1
Prensa 2 (P2)	1
Prensa 3 (P3)	1
Prensa 4 (P4)	1
Microorganismos	2
Mesófilos aeróbios	1
Mohos y levaduras	1
Coliformes	1
Lugar	1
Borde	1
Centro	1
Prensa x Microorganismos	6
Prensa x Lugar	3
Microorganismos x Lugar	2
Prensa x Microorganismos x Lugar	6
Error	120
Total	143

Elaborado por El Autor

### **3.7.2 Análisis funcional**

Para las respectivas comparaciones de los tratamientos se utilizó las pruebas de rangos múltiples de **Duncan al 5% probabilidad**.

## **3.8 Manejo del ensayo**

Durante el manejo del trabajo experimental se siguieron los lineamientos de seguridad de la empresa, previo al ingreso a la planta de procesos y a la manipulación de instrumentos y materiales de muestreo. Cabe indicar que se identificaron los lugares o puntos en los cuales existe un alto riesgo de contaminación de acuerdo con los criterios de del departamento de control de calidad.

Una vez identificados los puntos de riesgo microbiológico, se procedió a realizar los muestreos respectivos, con el método **3M Quick Swab** que en el punto de 3.9 se lo explica con más detalle.

### **3.8.1 Variables evaluadas**

Las variables que se estudian en este ensayo es el resultado del conteo de microorganismos: aerobios mesófilos, mohos-levaduras y coliformes totales que se presentan en la Tabla 9.

Debe considerarse entonces que se tomaron los factores microorganismos, prensa y punto de muestreo, dada la interacción que tienen éstos en cada una de las muestras; además de la correlación que tienen las prensas en el momento de la limpieza y también es preciso indicar que en el apartado 2.4

(Criterios microbiológicos) se mencionan los requisitos microbiológicos específicos para cada una de las prensas.

**Tabla 9. Variables en estudio**

<b>Variable</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Tipo</b>
<b>Prensas</b>	4	
<b>Puntos de muestreo</b>	2	
<b>Microorganismos</b>	3	
<b>Aerobios mesófilos</b>	1	No dependiente
<b>Mohos-levaduras</b>	1	
<b>Coliformes totales</b>	1	
<b>Resultados de conteo microorganismos</b>	1	Dependiente

Elaborado por El Autor

### **3.9 Metodología**

#### **3.9.1 Consideraciones para la toma de muestras**

Se siguieron los lineamientos de seguridad de la compañía Cacaos Finos Ecuatorianos S.A CAFIESA, para la toma de muestras, dentro de las cuales

podemos nombrar: vestimenta adecuada, uso de mascarilla y cofia, lavado y desinfección de manos con alcohol. Esto evitará cualquier tipo de contaminación antes de tocar los materiales de muestreo.

Luego se procedió al rotulado de los hisopos asignando el número de prensa en el que se hizo el muestreo, y así evitar confusiones (Anexo 11).

### 3.9.2 Plan de Muestreo

El plan de muestro se lo realizó primeramente asignando las fechas en las cuales se procederá a efectuar los muestreos y análisis respectivos. La Tabla 9 lo indicará a continuación.

**Tabla 10. Planificación de toma de muestras y análisis**

<b>Fechas de muestreo y análisis microbiológicos</b>	
23 noviembre 2015	Primera toma de muestras y análisis
30 noviembre 2015	Segunda toma de muestras y análisis
07 diciembre 2015	Tercera toma de muestras y análisis
14 diciembre 2015	Cuarta toma de muestras y análisis
21 diciembre 2015	Quinta toma de muestras análisis
28 diciembre 2015	Sexta toma de muestras y análisis

Elaborado por El Autor

Los muestreos se efectuaron después de la realización de la limpieza y desinfección de las prensas. Las fechas y horarios en que se realizaron la toma de muestras y los análisis fueron los días lunes, cabe destacar que de acuerdo a los procedimientos de la compañía, son precisamente esos días en que se realiza la limpieza de toda la planta. El horario en que se desarrolló este trabajo fue entre las 9:00 – 14:00.

De acuerdo a los criterios de los responsables del control de calidad de CAFIESA, se llegó a identificar al cuarto de prensas como el espacio con mayor riesgo de una contaminación cruzada, asignando como los puntos críticos microbiológicos a las 4 prensas. En cada una de estas se establecieron dos puntos críticos de muestreo; uno son las bandejas de prensas y el otro la entrada al triturador de la prensa.

La razón de haber seleccionado al cuarto de prensas como el punto de mayor riesgo de contaminación es la de estar abierta al contacto directo con los alimentos (Torta de cacao) y al ambiente.

### **3.9.3 Selección de la Muestra**

Se seleccionaron las muestras de los lugares más propensos o donde es probable que exista un riesgo elevado de contaminación.

#### **3.9.4 Método de Muestreo**

Como se dijo anteriormente se tomó muestras de dos lugares o puntos de cada prensa.

Los puntos en cuestión para el muestreo se deben enfocar en las áreas en las cuales existe una probabilidad alta de contaminación o en aquellas en las que los agentes desinfectantes tengan un difícil acceso y por lo tanto no ejecuten de la mejor manera su efecto bactericida (FAO & OMS, 2015).

Se entiende por muestra a una pequeña parte o porción representativa de materia de un lote o en este caso de las superficies en cuestión (NTE INEN 537:1980-12, 1980).

El muestreo se lo realizó bajo el método de 3M Quick Swab el cual es una técnica usada con un hisopo para muestreo de superficies. Este ya viene listo para usarse; contiene un líquido llamado Lethen que se encuentra en un bulbo en la parte superior del hisopo, el cual es un caldo que ayuda a neutralizar las partículas desinfectantes que aun estén presentes en la superficie.

A continuación se explica el procedimiento para el muestreo:

- Primero, se identificaron los puntos de muestreo.
- Después, proceder a desinfectarse las manos con alcohol potable y luego tomar la cantidad de hisopos deseada para rotular (Anexo 11).

- Una vez rotulado, ya en el lugar del muestreo sujetar el hisopo ubicando el pulgar en el bulbo y doblarlo o presionarlo en un ángulo de 45°, se escuchara que se rompe y el líquido que contiene caerá al tubo mojando el swab (Anexo 12).
- Fijarse claramente que caiga todo el líquido letheen en el tubo del hisopo, y después sacar el swap procurando formar un ángulo de 30° con respecto a la superficie y se procede a realizar el hisopado o frote tratando de hacerlo en tres direcciones distintas.
- Una vez realizado el hisopado, guardar el hisopo en el tubo y enviar al laboratorio para su respectivo análisis.
- Ya en el laboratorio sacar las placas Petrifilm de recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras (Anexo 13).
- Después, agitar el hisopo para dispersar y mezclar bien el contenido del swab y el líquido. Finalmente quitar el swap y vaciar el contenido del tubo en placa Petrifilm (Anexo 14).
- Por último llevar a incubación respetando los tiempos y temperaturas correspondientes (Anexo 15).

Cabe indicar que este método solo aplica para usarse con placas Petrifilm. Los resultados de la siembra e incubación podrán observarse de 24 a 48 horas para recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales.

Para mohos y levaduras incubar a 25°C esperando obtener resultados en las placas a los 3 y 5 días.

En total se efectuaron 3 hisopados por cada punto o lugar de muestreo, uno por cada microorganismo a analizar, que nos da un total de 24 muestras. Todo esto en un día, en el cual la compañía ejecuta la limpieza y desinfección de las prensas.

Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento de bacterias en las placas, se procede a leer y contabilizar las unidades formadoras de colonias (U.F.C) para esto hay que tener mucha práctica y experiencia.

### **3.10 Análisis de datos**

El análisis de datos se obtendrá de toda la información presentada anteriormente una vez ya codificada, realizando así un estudio de manera detallada que permita relacionar datos y variables para poder así llegar a una conclusión que demuestre la posibilidad de éxito del uso de herramientas estadísticas para validar el plan de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo.

#### **3.10.1 Conteo de Aerobios mesófilos**

El conteo de aerobios es sencillo ya que en la placa, el medio selectivo contiene un indicador rojo el cual colorea todas las colonias. El conteo se lo realiza a todas las colonias independientemente de la intensidad y tamaño (3M, 2016).

### **3.10.2 Conteo de Coliformes Totales**

Las placas Petrifilm de coliformes tienen un medio selectivo que contienen nutrientes Violeta Rojo Bilis, el cual facilita el conteo de coliformes por consiguiente estas colonias se tornan rojas con formación de gas lo que indica presencia de coliformes. El conteo se lo realiza a todas las colonias formadoras o no formadoras de gas, pero son las que tienen gas alrededor de las colonias las que indican existencia de coliformes (3M , 2010).

### **3.10.3 Conteo de Mohos y Levaduras**

El conteo de Mohos y levaduras es un procedimiento sencillo, porque diferenciarlas es muy fácil. El medio selectivo que posee la placa permite el crecimiento de los dos caracterizándose de la siguiente manera:

Las levaduras son colonias generalmente pequeñas de tonalidad azul verdosa y de bordes definidos (Anexo 8).

Los mohos en cambio son colonias grandes de bordes difusos y de color negro o cualquier otro pigmento y son generalmente colonias planas (Anexo 8).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados de los análisis de aerobios mesófilos

Una vez realizados los muestreos y sus respectivos análisis en el laboratorio se procedió a elaborar la tabulación de los resultados obtenidos microbiológicamente, considerando su ausencia o presencia en la placa Petrifilm, por lo cual se obtuvo lo siguiente:

**Tabla 11. Resultados de análisis Mesofilos Aerobios**

Prensas	Puntos Muestreo	RI	RII	RIII	RIV	RV	RVI
P1	L1	+	+	+	+	+	+
P1	L2	+	+	+	+	+	+
P2	L1	+	+	+	+	+	+
P2	L2	+	+	+	+	+	+
P3	L1	+	+	+	+	+	+
P3	L2	+	+	+	+	+	+
P4	L1	+	+	+	+	+	+
P4	L2	+	+	+	+	+	+

**Elaborado por** El Autor

Como se aprecia en la Tabla 10, se realizó el análisis a 4 prensas (P) y 2 lugares (L) o puntos de muestreo. El signo positivo significa que existe crecimiento bacteriano o presencia de aerobios mesófilos en las muestras que

se realizaron mediante el hisopado, por ende si estuviera el signo contrario (-) nos indicaría ausencia del microorganismo en cuestión.

En definitiva se puede decir que los resultados de las muestras de las prensas, dieron positivo a presencia de aerobios mesófilos, cabe mencionar que esto es solo un indicador de presencia o ausencia independientemente de la cantidad de unidades formadoras de colonias que existan, ya que esos datos son los que nos darán una idea más clara sobre los niveles de asepsia y los cumplimientos de los criterios microbiológicos.

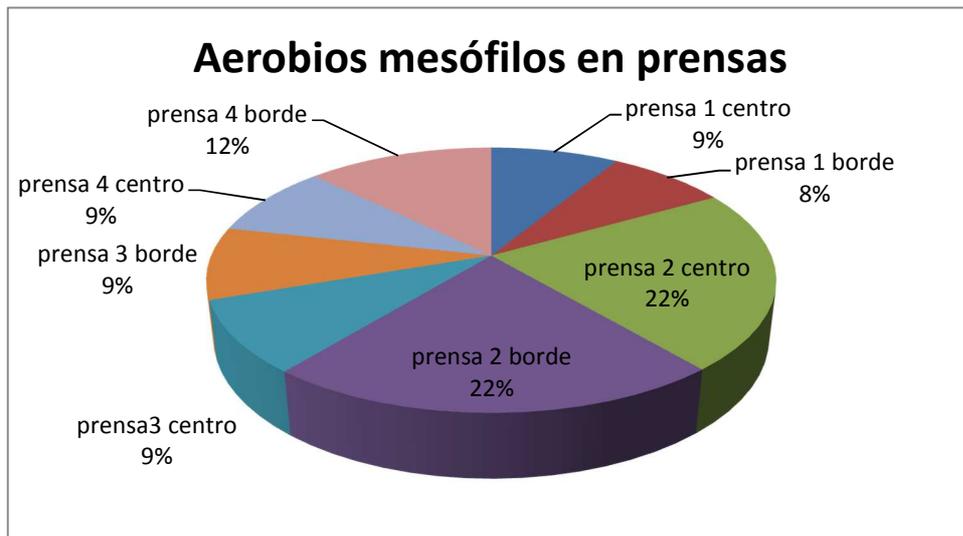
**Tabla 12. Resultados en U.F.C aerobios mesófilos**

Prensas	Puntos Muestreo	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{X}$
P1	L1	100	100	100	90	100	100	98,3
P1	L2	100	70	100	80	100	100	91,7
P2	L1	300	300	200	300	200	200	250,0
P2	L2	400	300	200	200	200	200	250,0
P3	L1	100	100	100	100	100	100	100,0
P3	L2	100	100	100	100	100	100	100,0
P4	L1	100	100	100	100	100	100	100,0
P4	L2	100	200	200	100	200	60	143,3

**Elaborado por El Autor**

La Tabla 11 describe los resultados cuantitativos de los análisis de aerobios mesófilos, de los cuales se puede observar que la prensa 2 es la que tiene datos un poco más elevados en comparación con el resto.

**Gráfico 1.** Distribución de aerobios mesófilos



**Elaborado por El Autor**

El Gráfico 1 indica anterior que hay mayor cantidad de aerobios mesófilos en la prensa 2, por lo tanto hay mayor crecimiento microbiano en ese equipo que en los demás.

Los porcentajes se obtienen de la sumatoria de los resultados cuantitativos de cada prensa y punto de muestreo, por lo que el Gráfico 1 señala que los resultados cuantitativos de la prensa 2 en sus dos lugares de muestreo son elevados en contraste con las prensas 1, 2, y 3. Esto denota que existe un mayor contacto o manipulación con las superficies de este equipo, y no se

estarían aplicando de buena manera los procedimientos de limpieza y desinfección; por lo que supone un crecimiento microbiológico un poco elevado.

A continuación se detallan las Tablas de presencia y ausencia de mohos-levaduras y coliformes totales.

#### 4.2 Resultados de análisis de mohos-levaduras y coliformes totales

Al realizar el conteo respectivo y lectura de resultados de los análisis se pudo confirmar que no hubo crecimiento microbiológico de coliformes totales y de mohos-levaduras, es decir que los resultados obtenidos fueron negativos a estos microorganismos en cuestión y hay ausencia de ellos en los análisis.

A continuación se detallan las siguientes Tablas:

<b>Tabla 13. Resultados análisis para mohos y levaduras</b>									
<b>PRENSA</b>	<b>PTOS. MUESTRA</b>		<b>RI</b>	<b>RII</b>	<b>RIII</b>	<b>RIV</b>	<b>RV</b>	<b>RVI</b>	<b>SUM T1</b>
<b>P1</b>	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
<b>P1</b>	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0
<b>P2</b>	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
<b>P2</b>	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0
<b>P3</b>	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
<b>P3</b>	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0
<b>P4</b>	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
<b>P4</b>	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0

**Elaborado por El Autor**

**Tabla 14. Resultados análisis para coliformes totales**

PRENSA	PTOS. MUESTRA		RI	RII	RIII	RIV	RV	RVI	SUM T1
P1	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
P1	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0
P2	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
P2	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0
P3	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
P3	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0
P4	L1	Punto 1	-	-	-	-	-	-	0
P4	L2	Punto 2	-	-	-	-	-	-	0

**Elaborado por** El Autor

Los resultados de los análisis de las Tablas 12 y 13 respectivamente, nos indican que hay ausencia de estos microorganismos, lo cual significa que no hay crecimiento de mohos-levaduras y coliformes en las superficies de las prensas, por lo tanto se tienen resultados en ceros (0). Por lo que se cumple con los criterios microbiológicos en los análisis de los microorganismos en cuestión.

Estos resultados nos indican que se ha llevado muy bien los controles de limpieza, desinfección y sobre todo de la humedad que pudiera existir en el cuarto de prensas por parte del supervisor de calidad. Y cabe indicar que estos resultados están dentro de lo establecido, ya que en una empresa que produzca polvos o harinas de cualquier tipo no debería dar positivo a mohos por ser un producto seco.

### 4.3 Análisis de Varianza

Con los resultados cuantitativos expresados en unidades formadoras de colonias (U.F.C) de las Tablas 11, 12 y 13, podemos realizar un análisis de varianza con un arreglo factorial 4x3x2 en un diseño completamente al azar.

De acuerdo a esto se tiene lo siguiente:

**Tabla 15. Análisis de la Varianza**

ANDEVA				
Variable	N	R <sup>2</sup>	R Aj	CV
Resultados	144	1.00	1.00	8.24 %

**Elaborado por** El Autor

Al realizar el Análisis de Varianza (ANDEVA) a mi ensayo se obtuvo un coeficiente de variación del 8,24 % en un número de corridas de 144. Esta variación nos indica que los datos están distribuidos de manera normal.

**Tabla 16. Cuadro de análisis de la varianza**

<b>F. V.</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	140.02	23	6.22	1860.10	<0.0001
<b>PRENSA</b>	0.43	3	0.14	43.26	<0.0001
<b>MICROORGANISMOS</b>	141.68	2	70.84	21190.56	<0.0001
<b>LUGAR</b>	1.9E-03	1	1.9E-03	0.57	0.4499
<b>PRENSA*MICROORGANISMO</b>	0.87	6	0.14	43.26	<0.0001
<b>PRENSA*LUGAR</b>	0.01	3	3.8E-03	1.13	0.3398
<b>MICROORGANISMOS*LUGAR</b>	3.8E-03	2	1.9E-03	0.57	0.5644
<b>PRENSA*MICROORG*LUGAR</b>	0.02	6	3.8E-03	1.13	0.3490
<b>ERROR</b>	0.40	120	3.8E-03		
<b>TOTAL</b>	143.42	143			

**Elaborado por El Autor**

Para la presente Tabla se estableció que los grados de libertad (GL) son 120 y un error estimado en 0.0038 %. Con esto podemos considerar de manera rápida que los factores prensas y microorganismos son significativos debido a su valor de p; y la interacción de prensa\*microorganismo es también significativa por la misma razón. Finalmente más adelante en un análisis mejor detallado específicamente Duncan, se podrá analizar con mayor claridad las variables significativas y sus interacciones.

Se indica que los tratamientos establecidos son los equipos en los cuales se tomaron las muestras respectivas, y son las 4 prensas.

Se debe indicar que para la realización de este ANDEVA se consideró el traspaso de los resultados cuantitativos de mesófilos aerobios en función logarítmica.

#### 4.4 Interacción entre factores

A continuación se analiza los factores prensas, microorganismos y lugares de muestreo por medio de la prueba de rangos múltiples Duncan.

##### 4.4.1 Interacción de prensas

Resultado del análisis del test Duncan para prueba de significancia en el factor prensas.

**Tabla 17. Test Duncan prensas**

Test: Duncan Alfa= 0.05

Error: 0.0033 gl: 120

<b>PRENSA</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>	
<b>PRENSA 2</b>	<b>0.79</b>	<b>36</b>	<b>0.01</b>	<b>A</b>
<b>PRENSA 4</b>	<b>0.69</b>	<b>36</b>	<b>0.01</b>	<b>B</b>
<b>PRENSA 3</b>	<b>0.67</b>	<b>36</b>	<b>0.01</b>	<b>B</b>
<b>PRENSA 1</b>	<b>0.66</b>	<b>36</b>	<b>0.01</b>	<b>B</b>

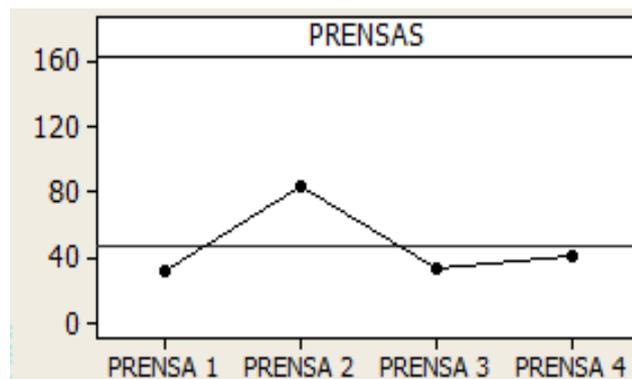
Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Elaborado por El Autor**

Con estos resultados las medias con una misma letra en común no son significativas como es el caso de las prensas 1, 3, 4 en las que no existe significatividad, por lo contrario la prensa 2 es significativa. A continuación se aprecia la interacción que existe entre las prensas.

A continuación se detallan los resultados en el siguiente Gráfico como resultado del análisis del software minitab 16 para corroborar significancia.

**Gráfico 2. Interacción prensas**



**Fuente:** Minitab 16

En el Gráfico 2 se observa que las prensas 1, 3 y 4 están debajo de la línea horizontal que representa a la media, por lo tanto no son significativas, caso contrario ocurre con la prensa 2 que si es significativa por encontrarse por encima de la media.

#### 4.4.2 Interacción de microorganismos

Los resultados de la interacción de microorganismos mediante la prueba de significancia de Duncan es la siguiente:

**Tabla 18. Test Duncan microorganismos**

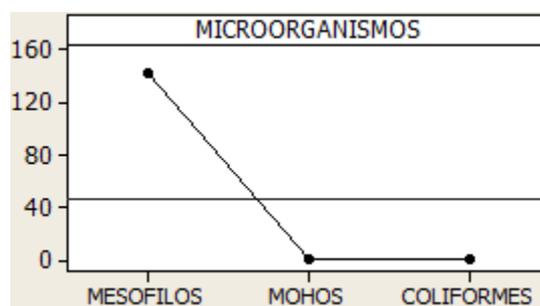
MICROORGANISMO	Medias	n	E.E.	
MESOFILOS	2.10	48	0.01	A
COLIFORMES	0.00	48	0.01	B
MOHOS	0.00	48	0.01	B

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

**Elaborado por** El Autor

Dado a conocer los resultados se entiende que los microorganismos coliformes y mohos no son significativos por tener una letra en común, por el contrario los aerobios mesófilos si son significativos ya que resulta con una letra diferente.

**Gráfico 3. Interacción microorganismos**



**Fuente:** Minitab 16

El Gráfico 3 indica que los microorganismos coliformes totales y mohos-levaduras están debajo de la media que representa la línea horizontal y por eso

no son significativos. El único microorganismo que si es significativo son los mesófilos ya que posee un valor más alto que la media.

Los resultados de las medias de la interacción prensa x microorganismos es la siguiente:

	<b>AxB</b>				
<b>microorganismos</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>
<b>aerobios</b>	1,98	2,40	2,00	2,06	2,11
<b>mohos-levaduras</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>coliformes</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b><math>\bar{X}</math></b>	0,66	0,80	0,67	0,69	<b>0,70</b>

**Elaborado por El Autor**

Lo que indica la Tabla 19 es los promedios de las interacciones prensa y microorganismos, en la cual se aprecia claramente que los aerobios mesófilos están presentes en las prensas, sobre todo en la prensa 2. En contraste con los demás microorganismos que no existió crecimiento.

Cabe recordar que para esto se procedió a pasar todos los resultados en función logarítmica, ya que en un momento dado al meter los datos nos arrojaba resultados aberrantes que no son propios de la experimentación. (Anexo 21)

#### 4.4.3 Interacción lugares de muestreo

El Test Duncan de lugares de muestreo resultó lo siguiente:

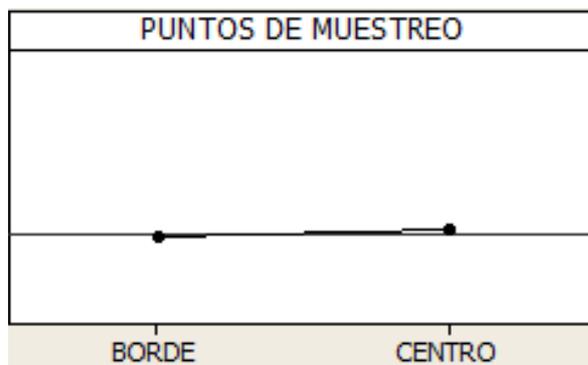
**Tabla 20. Test Duncan lugares de muestreo**

LUGAR	Medias	n	E.E.	
CENTRO	0.71	72	0.01	A
BORDE	0.70	72	0.01	A

Elaborado por el Autor

La Tabla 18 indica que los lugares de muestreo no son significativos y por eso comparten una letra en común.

**Gráfico 4. Interacción de los puntos de muestreo**



Fuente: El Autor

El Gráfico 4 indica que no existe significancia entre los puntos de muestreo, porque la línea que une los puntos borde y centro está casi paralelo a la media, es decir que son casi iguales a la media por lo tanto no se consideran significativos.

Los resultados de las medias de la interacción lugar de muestreo x microorganismo es la siguiente:

**Tabla 21. Microorganismos x lugar muestra  
B x C**

microorganismos	C1	C2	$\bar{X}$
Aerobios	2,10	2,12	2,11
Mohos-levaduras	0	0	0,00
Coliformes	0	0	0,00
$\bar{X}$	0,70	0,71	<b>0,70</b>

**Elaborado por El Autor**

La Tabla 21 indica las medias de la interacción microorganismo x lugar de muestra en la que se aprecia que no hay mucha diferencia entre el lugar de muestreo uno y dos, respectivamente en aerobios, mohos-levaduras y coliformes totales.

Por otro lado los resultados de las medias de la interacción prensa x lugar de muestreo fue la siguiente:

**Tabla 22. Prensas x Lugar muestra  
A x C**

PRENSAS	C1	C2	suma b
<b>A1</b>	0,66	0,65	0,66
<b>A2</b>	0,80	0,80	0,80
<b>A3</b>	0,67	0,67	0,67
<b>A4</b>	0,67	0,70	0,69
suma C	0,70	0,71	<b>0,70</b>

**Elaborado por EL Autor**

La Tabla 22 indica que las medias de esta interacción no muestra diferencia significativa a vista general en todas las prensas y sus lugares de muestreo a excepción de la prensa 2.

#### 4.4.4 Interacción de todos los factores de estudio

La interacción de todos los factores que da el test Duncan de la siguiente manera:

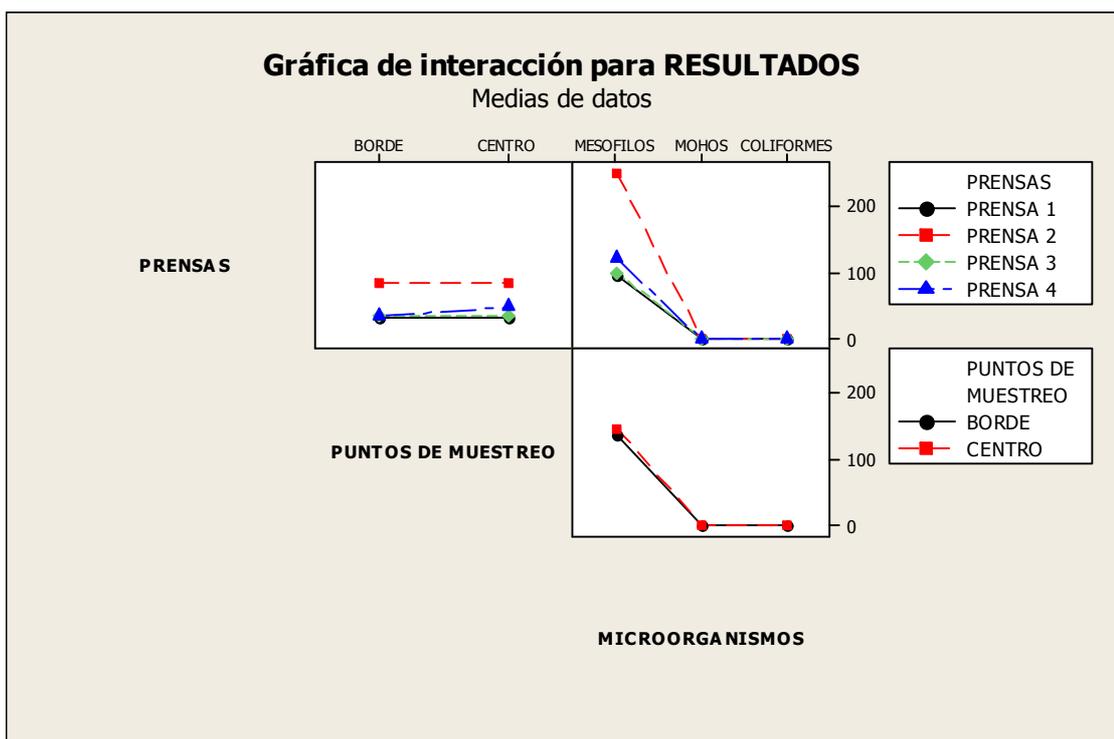
**Tabla 23. Test Duncan Factores prensa, microorganismos y lugares**

PRENSA 2	MESOFILOS	BORDE	2,39	12	0,02	A
PRENSA 2	MESOFILOS	CENTRO	2,38	12	0,02	A
PRENSA 4	MESOFILOS	CENTRO	2,11	12	0,02	B
PRENSA 3	MESOFILOS	BORDE	2,00	12	0,02	C
PRENSA 3	MESOFILOS	CENTRO	2,00	12	0,02	C
PRENSA 4	MESOFILOS	BORDE	2,00	12	0,02	C
PRENSA 1	MESOFILOS	BORDE	1,98	12	0,02	C
PRENSA 1	MESOFILOS	CENTRO	1,97	12	0,02	C
PRENSA 1	MOHOS	BORDE	0,00	12	0,02	D
PRENSA 3	MOHOS	BORDE	0,00	12	0,02	D
PRENSA 4	COLIFORMES	CENTRO	0,00	12	0,02	D
PRENSA 4	COLIFORMES	BORDE	0,00	12	0,02	D
PRENSA 3	MOHOS	CENTRO	0,00	6	0,02	D
PRENSA 3	COLIFORMES	CENTRO	0,00	6	0,02	D
PRENSA 1	COLIFORMES	CENTRO	0,00	6	0,02	D
PRENSA 4	MOHOS	BORDE	0,00	6	0,02	D
PRENSA 4	MOHOS	CENTRO	0,00	6	0,02	D
PRENSA 3	COLIFORMES	BORDE	0,00	6	0,02	D
PRENSA 1	MOHOS	CENTRO	0,00	6	0,02	D
PRENSA 1	COLIFORMES	BORDE	0,00	6	0,02	D
PRENSA 2	COLIFORMES	BORDE	0,00	6	0,02	D
PRENSA 2	COLIFORMES	CENTRO	0,00	6	0,02	D
PRENSA 2	MOHOS	BORDE	0,00	6	0,02	D
PRENSA 2	MOHOS	CENTRO	0,00	6	0,02	D

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Lo que el resultado de Duncan nos indica es que la prensas 2 o el tratamiento 2 es el más significativo del ensayo, ya que está por encima del promedio. También se indica que el tratamiento 4 con el muestreo en el borde de análisis de mesofilos aerobios es el segundo más significativo por encontrarse encima de la media. Finalmente los tratamientos 1, 2, 3, 4 con interacción en cualquier punto de muestreo y análisis de mohos-levaduras y coliformes, no son significativos ya que estos microorganismos arrojaron resultados negativos de presencia, y están por debajo del promedio.

A continuación se aprecia mejor la interacción:



**Fuente:** minitab 16

Estos Gráficos lo que nos indican es la interrelación de todos los factores, prensas, puntos de muestreo y microorganismos; en los cuales se observa que

el factor prensa 2 o tratamiento 2 de color rojo, sobre todo es la que más difiere del resto, por ende como se observa hay significancia en los factores microorganismos, prensas y puntos de muestreo de dicho tratamiento y también hay significancia en el tratamiento 4 o prensa 4 con el muestreo en el borde en el análisis de mesófilos aerobios.

Cabe destacar que todos los resultados se obtuvieron mediante el uso de herramientas estadísticas como los son el minitab 16 version libre y el Infostat, por lo cual este ayudó a validar el método de muestreo en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino, rechazando así la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula.

#### **4.5 Resultados de Validación del método de muestreo microbiológico**

Los resultados de los análisis microbiológicos nos indican que los datos obtenidos están dentro de los parámetros de calidad requeridos según la norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, y de acuerdo al código de prácticas ecuatorianas CPE INEN-CODEX CAC/CL 69, un método o procedimiento se valida cuando los resultados de sus análisis microbiológicos cumplen con los criterios requeridos.

Por lo consiguiente, queda validado el plan de muestreo microbiológico en el procesamiento del polvo de cacao alcalino. A continuación se detallan cuantitativamente los resultados y comparaciones con los criterios microbiológicos.

**Tabla 24. Resultados cuantitativos de mesófilos aerobios en U.F.C**

Prensas	Puntos Muestreo	I	II	III	IV	V	VI	$\bar{X}$
P1	L1	100	100	100	90	100	100	98,3
P1	L2	100	70	100	80	100	100	91,7
P2	L1	300	300	200	300	200	200	250,0
P2	L2	400	300	200	200	200	200	250,0
P3	L1	100	100	100	100	100	100	100,0
P3	L2	100	100	100	100	100	100	100,0
P4	L1	100	100	100	100	100	100	100,0
P4	L2	100	200	200	100	200	60	143,3

Elaborado por El Autor

La Tabla 20 nos indica los resultados cuantitativos de los análisis en unidades formadoras de colonias, por lo que comparando con los criterios de la norma antes mencionada (Tabla 25) los resultados cumplen con los criterios establecidos.

**Tabla 25. Criterios microbiológicos de superficies**

<b>Microorganismo</b>	<b>Unidad de conteo</b>	<b>Máximo permitido</b>
Mesófilos aerobios	U.F.C.	400
Mohos y levaduras	U.F.C.	100
Coliformes totales	U.F.C.	<100

**U.F.C.:** Unidades formadoras de colonias.

**Fuente:** Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación de fomento Sanitario, (1994)

Como se aprecia en la Tabla 25 y comparando con los resultados del conteo de aerobios mesófilos, mohos-levaduras y coliformes totales, se aprecia claramente que todos estos están dentro de los criterios microbiológicos establecidos por la norma.

## 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- Se logró validar el método de muestreo microbiológico en el procesamiento del polvo de cacao alcalino. Debido a que los resultados nos indican que están dentro de los rangos o criterios permitidos que especifica la norma.
- Se aplicó la metodología de muestreo basado en la técnica de 3M Quick Swab mediante la cual se realizaron todos los análisis microbiológicos aportando resultados rápidos y muy fiables en los recuentos estimados.
- De acuerdo a los criterios del supervisor de calidad de CAFIESA se logró identificar que el cuarto de prensas, es el punto crítico de mayor riesgo de contaminación, particularmente en los equipos de producción llamados prensas. Ya que las mismas están en contacto directo con el ambiente y el alimento.
- Se determinó que el software minitab 16 version libre e infostat, son las herramientas estadísticas óptima para validar el método de muestreo microbiológico, ya que al ejecutarlo se pueden evaluar y analizar todas las interacciones posibles, como lo fueron en este ensayo, las prensas, microorganismos y lugares de muestreos o puntos microbiológicos. Por lo tanto se toma la hipótesis nula y se descarta la alternativa.

## 5.2 Recomendaciones

Habiendo analizado las conclusiones se recomienda lo siguiente:

- Un óptimo procedimiento de limpieza en la prensa 2, debido a que los resultados en este equipo fueron los que arrojaron datos un poco elevados respecto a los demás, específicamente en microbiología.
- Para los análisis de superficies y por ende las validaciones se recomienda a Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. CAFIESA, la obtención de un equipo denominado Luminómetro, para verificaciones casi inmediatas de los resultados.
- El mantenimiento que se dé a las prensas cuando se presenten fallos mecánicos, se lo realice un día antes del procedimiento de limpieza y desinfección, para evitar contaminaciones.
- Supervisar la limpieza y desinfección que realizan los operadores en los equipos.
- Actualizar los datos históricos que se tienen de los resultados de los análisis de hisopados en superficies de contacto y medio ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARAZUL. (19 de Enero de 2016). *Ácido Peracético*. Obtenido de arazul.com:  
<http://www.arazul.com/productos/acido-peracetico>
- ARCSA. (30 de Julio de 2015). *controlsanitario.gob.ec*. Obtenido de  
<http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08/Registro-Oficial-Res-042-BPM-Alimentos.pdf>
- ARCSA. (30 de Julio de 2015). *Norma Técnica Sustitutiva de Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Procesados*. Obtenido de controlsanitario.gob.ec:  
<http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08/Registro-Oficial-Res-042-BPM-Alimentos.pdf>
- ARCSA. (21 de Diciembre de 2015). *Normativa Técnica Sanitaria para Alimentos Procesados, Plantas Procesadoras de Alimentos, Establecimientos de Distribución, Comercialización, Transporte y Establecimientos de Alimentación Colectiva*. Obtenido de controlsanitario.gov.ec:  
[http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/12/Resolucion\\_ARCSA-DE-067-2015-GGG.pdf](http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/12/Resolucion_ARCSA-DE-067-2015-GGG.pdf)
- BETELGEUX. (8 de Mayo de 2014). *Desinfectantes Utilizados en la Industria Alimentaria: Características, modo de actuación y aspectos que inciden en su eficacia*. Obtenido de betelgeux.es:  
[http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo\\_boletin\\_Desinfectantes\\_y\\_Modo\\_de\\_accion\\_en\\_IIAA.pdf](http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_boletin_Desinfectantes_y_Modo_de_accion_en_IIAA.pdf)
- CAFIESA. (2012). *Manual de Procedimientos de Buenas Prácticas de Manufactura*. Guayaquil: CAFIESA.
- CAFIESA. (2014). *Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento*. Guayaquil: CAFIESA.
- Cano, S. (5 de Abril de 2006). *Métodos de Análisis Microbiológicos. Normas ISO, UNE...* Obtenido de Scribd:  
<http://es.scribd.com/doc/27307620/metods-aerobios-mesofilos#scribd>

CODEX ALIMENTARIUS. (8 de Abril de 2002). *Código Internacional Recomendado de Prácticas. Principios Generales de Higiene de los Alimentos*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/Y1579S/Y1579s.pdf>

Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación de fomento Sanitario. (29 de Julio de 1994). *PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Especificaciones sanitarias. Cédula de verificación*. Obtenido de Diario Oficial de la Federación: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4721115&fecha=29/07/1994](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4721115&fecha=29/07/1994)

Cumbre Mundial Sobre la Alimentación. (13 de Noviembre de 1996). *Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial*. Obtenido de Depósito de Documentos de la FAO: <http://www.fao.org/docrep/003/w3613s/w3613s00.HTM>

FAO. (19 de Enero de 2016). *PRINCIPIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA APLICACIÓN DE CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS*. Obtenido de [fao.org](http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s04.htm): <http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s04.htm>

FAO, & OMS. (13 de Noviembre de 2015). *Comisión del Codex Alimentarius. Programa Conjunto de la FAO y la OMS Sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos*. Obtenido de Codex Alimentarius: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253a%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-712-47%252FWDs%252Ffh47\\_07s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253a%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-712-47%252FWDs%252Ffh47_07s.pdf)

FDA. (8 de Junio de 2015). *Directivas para la Industria: Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, para Frutas y Hortalizas Frescas*. Obtenido de Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm188933.htm#i>

FOOD NEWS LATAM. (15 de Mayo de 2015). *¿Qué son los Aerobio Mesófilos?* Obtenido de Food News Latam:

<http://www.foodnewlatam.com/inocuidad/53-control-calidad/2499-%C2%BFque-son-los-aerobios-mesofilos.html>

Gamboa, M. (23 de Marzo de 2015). *Actualización de Pruebas de Laboratorio Microbiológicas para el Control de Calidad en Alimentos*. Obtenido de Repositorio

PUCE:  
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8719/MONICA%20GAMBOA%20MONOGRAFIA%20%2023%20marzo%202015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Google Maps. (20 de Enero de 2016). Obtenido de Google Maps:

<https://www.google.com.ec/maps/place/CAFIESA/@-2.2091215,-79.824094,1932a,20y,41.24t/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x902d6956aff29ce1:0xb6b244934d4739d>

Hernandez, M., & Sastre, A. (1999). En *Tratado de Nutrición* (págs. 506-507). Madrid: Díaz de Santos, S.A.

Herrera Dobroski, L., & Troyo Chaves, J. (19 de Mayo de 2011). *Conceptos Básicos para la Manipulación de Alimentos*. Obtenido de ina.ac.cr:  
[http://www.ina.ac.cr/curso\\_manipulacion\\_alimentos/folleto\\_manipulacion\\_2015.pdf](http://www.ina.ac.cr/curso_manipulacion_alimentos/folleto_manipulacion_2015.pdf)

INEN. (15 de Diciembre de 2015). *La Institución*. Obtenido de Servicio Ecuatoriano de Normalización: <http://www.normalizacion.gob.ec/la-institucion/>

INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTOS. (2008). Higiene e Inocuidad de los Alimentos: Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización. *Boletín del Inspector Bromatológico N°9*, 1-2.

ISO 22000. (01 de Octubre de 2005). *ISO 22000:2005. Food safety management systems -- Requirements for any organization in the food chain*. Obtenido de International Organization for Standardization: [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnnumber=35466](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnnumber=35466)

LENNETECH. (19 de Enero de 2016). *Desinfectantes Hipoclorito de sodio*. Obtenido de [lenntech.es](http://www.lenntech.es):  
<http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectantes-hipoclorito-de-sodio.htm>

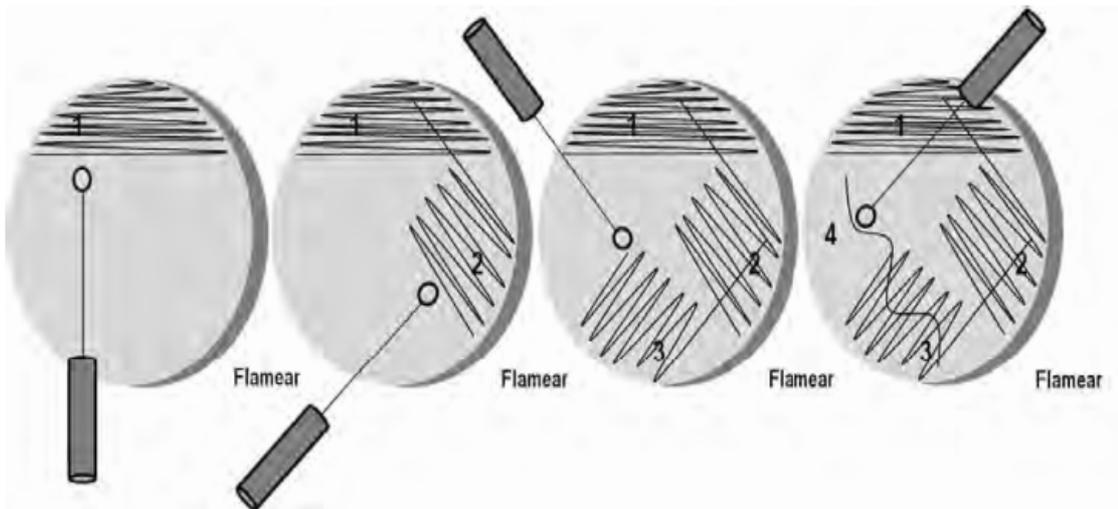
- Loza, V. F., Pecho Tataje, M. C., & Uribe Quiroz, C. P. (2014). EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN EDUCATIVA SOBRE HIGIENE ALIMENTARIA A TRAVÉS DEL CONOCIMIENTO Y PRÁCTICA DE MADRES DEL CENTRO POBLADO CHACARITA. *Revista Enfermería a la Vanguardia*, 173-174.
- Ministerio de Industrias y Productividad. (2012). Calidad, nuestro seguro para ser un país de primer mundo. *País Productivo*, 12-13.
- Moreno , F., Schade, A., Rivero, P., & Smith, C. (15 de Octubre de 2015). *Recomendaciones Prácticas para la Antisepsia y desinfección*. Obtenido de <http://revistas.uv.cl: http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/viewFile/195/176>
- NTE INEN 1529-10:98. (6 de Enero de 1998). *Control Microbiológico de os Alimentos. Mohos y Levaduras Viables. Recuento en Placa por Siembra en Profundidad*. Obtenido de INEN: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.10.1998.pdf>
- NTE INEN 1529-8. (9 de Mayo de 1990). *Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de Coliformes Fecales y E. coli*. Obtenido de Servicio Técnico Ecuatoriano: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.8.1990.pdf>
- NTE INEN 537:1980-12. (29 de Diciembre de 1980). *Muestreo*. . Obtenido de INEN: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0537.1981.pdf>
- NTE INEN 620. (10 de Mayo de 1989). *Norma Técnica Ecuatoriana. Cacao en Polvo*. Obtenido de Servicio Ecuatoriano de Normalización: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0620.1989.pdf>
- NTE INEN-ISO 4832. (13 de Octubre de 2015). *Microbiología de los Alimentos para Consumo Humano y Alimentación Animal. Método Horizontal para la Enumeración de Coliformes. Técnica de Recuento de Colonias*. Obtenido de Servicio Ecuatoriano de Normalización: [http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/10/nte\\_inen\\_iso\\_4832.pdf](http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/10/nte_inen_iso_4832.pdf)
- OMS. (Noviembre de 2015). Obtenido de who.int: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

- OPS. (26 de Mayo de 2015). *Establecimiento: mantenimiento, limpieza y desinfección*. Obtenido de paho.org: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10822%3a2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&catid=7857%3Afood-safety-regulations-bpabpm-introduccion&Itemid=41429&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10822%3a2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&catid=7857%3Afood-safety-regulations-bpabpm-introduccion&Itemid=41429&lang=es)
- Orellana Campoverde, P. A. (22 de Julio de 2015). *Manual de Procedimientos, Buenas practicas de Higiene, Manipulación y Seguridad Alimentaria para el área de Cocina del Hospital Moreno Vázquez, Gualaceo*. Obtenido de Repositorio Institucional Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22380/1/tesis.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (Noviembre de 2015). *who.int*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- PROEcuador. (15 de Julio de 2013). *Guía de Analisis de Peligros y Puntos Críticos de Control - HACCP*. Obtenido de PROEcuador: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/05/GuiaHACCP.pdf>
- Rojas Triviño. (3 de Agosto de 2011). *Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Recuperado el 21 de Enero de 2016, de Scribd: <http://es.scribd.com/doc/173669278/manual-de-microbiologia>
- Rojas Triviño, A. (6 de Septiembre de 2011). *Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Obtenido de Scribd: <https://www.citethisforme.com/es>
- Segura García del Río, B. (2013). EDITORIAL. Incidencia de la seguridad alimentaria en los procesos productivos agroalimentarios. *Revista Mexicana de Agronegocios*, vol. XVII, 155-156.
- 3M . (13 de Mayo de 2010). *Petriefilm Guía de Interpretación*. Obtenido de <http://jornades.uab.cat>: [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petriefilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petriefilm_guias.pdf)
- 3M. (8 de Enero de 2016). *Seguridad de los Alimentos: Análisis de Microorganismos Indicadores*. Obtenido de solutions.productos3m.es: [http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es\\_ES/FoodSafetyEU/Foo](http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/Foo)

dSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/?PC\_Z7\_RJH9U5230ODK  
40IMRSPA7P2O65000000\_nid=2BJ86690LFbe8SD7TQV1GLgl

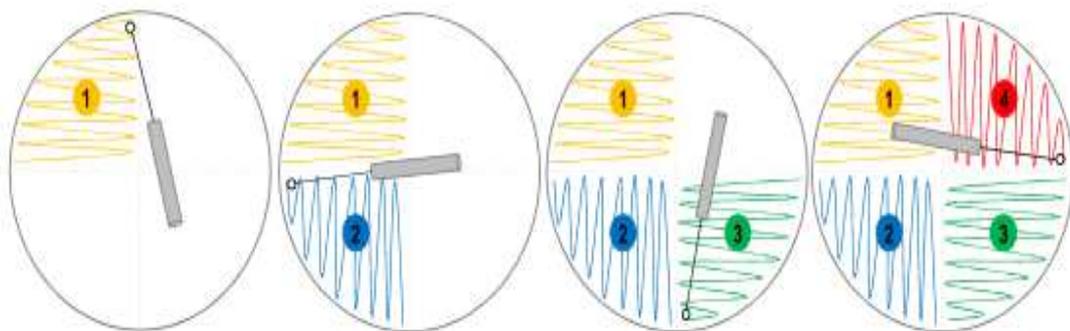
# **ANEXOS**

**Anexo 1: Pasos para la técnica de agotamiento.**



**Fuente:** Rojas Triviño, (2011)

**Anexo 2: Técnica siembra en cuadrantes**



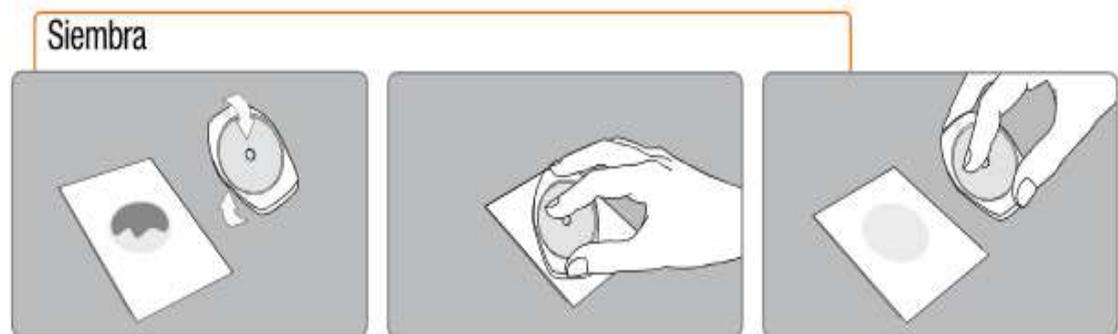
**Fuente:** Rojas Triviño, (2011)

### Anexo 3: Siembra método petrifilm



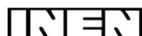
Fuente: (3M , 2010)

### Anexo 4: Dispersión del inóculo en la placa



Fuente: (3M , 2010)

## Anexo 5: NTE INEN 620



CDU: 663-92

AL 02.06-406

<b>Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria</b>	<b>CACAO EN POLVO</b>  <b>REQUISITOS</b>	<b>INEN 620</b> Primera Revisión 1989-04
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJ ETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el cacao en polvo para fabricación industrial, de productos de cacao y chocolate para consumo humano.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. ALCANCE</b></p> <p>2.1 Esta norma comprende únicamente el cacao en polvo proveniente de la pulverización de la torta de cacao.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. TERMINOLOGIA</b></p> <p>3.1 <b>Torta de cacao</b>, producto obtenido al eliminar por prensado mecánico parte de la grasa existente en la pasta de cacao.</p> <p>3.2 <b>Torta de cacao soluble</b>, es el producto obtenido al eliminar por prensado mecánico parte de la grasa existente en la pasta de cacao soluble.</p> <p>3.3 <b>Cacao en polvo</b>, producto obtenido por la pulverización de la torta de cacao.</p> <p>3.4 <b>Cacao en polvo soluble</b>, producto obtenido por la pulverización de la torta de cacao soluble sometida a un adecuado proceso de solubilización.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. DISPOSICIONES GENERALES</b></p> <p>4.1 El cacao en polvo deberá ser elaborado bajo condiciones apropiadas, de materia prima sana, limpia y prácticamente exenta de residuos de plaguicidas u otras sustancias tóxicas.</p> <p>4.2 El cacao en polvo debe presentar características organolépticas (olor, color, sabor) de acuerdo a su composición.</p> <p>4.3 La elaboración de cacao en polvo debe realizarse bajo condiciones sanitarias e higiénicas apropiadas para este producto y con el equipo adecuado.</p> <p>4.4 El producto descrito en esta norma debe estar exento de toda clase de materias vegetales de otra procedencia (féculas, harinas, dextrinas) grasas que no sea manteca de cacao. Además no se deberá agregar cascarilla de cacao, sustancias inerte, colorantes, conservantes u otros productos extraños a su composición natural.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		

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

4.5 Cuando se ensayen por métodos apropiados de toma de muestras y análisis al cacao en polvo deberá estar exento de microorganismos patógenos; no deberán contener substancia tóxica alguna originada de microorganismos, en cantidades que puedan presentar un peligro para la salud.

## 5. REQUISITOS

5.1 El cacao en polvo sometido a ensayos de acuerdo a normas ecuatorianas correspondientes, deberá cumplir con los requisitos establecidos en las tablas 1 y 2 de esta norma.

**Tabla 1. Requisitos de cacao en polvo**

REQUISITO	UNIDAD	CACAO EN POLVO		CACAO EN POLVO SOLUBLE		MÉTODO DE ENSAYO
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Humedad o pérdida por calentamiento	%	—	5	—	6	INEN 1 676
Contenido de grasa	%	8	28	8	28	INEN 535
Cenizas totales	%	—	9	—	10	INEN 533
Cenizas insolubles en ácido	%	—	0,2	—	0,2	INEN 532
Alcalinidad de las cenizas (en carbonato de - potasio)	%	—	5	—	10	INEN 637
Fibra cruda	%	—	6	—	7	INEN 534
Contenido de almidón		—	20	—	20	INEN 636
pH en suspensión al 10%		5,2	6,1	6,8	7,2	*

\* Hasta que exista la respectiva norma INEN la determinación se efectuará siguiendo los métodos de ensayo convencionales normalizados.

**Tabla 2. Requisitos microbiológicos**

REQUISITOS	UNIDAD	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
R.E.P.*	u.f.c**/g	10 000	1 529
Coliformes	u.f.c**/g	10	1 529
E Coli	u.f.c**/g	1	1 529
Salmonella	u.f.c** en 25 g	0	1 529
Mohos y levaduras	u.f.c**/g	100	1 529

\*R.E.P = Recuento estándar en placa.  
\*\* u.f.c. = unidades formadoras de colonias.

## 6. INSPECCION

6.1 El muestreo debe realizarse de acuerdo a norma INEN 537.

6.2 En la muestra extraída se efectuarán los ensayos indicados en los numerales 5.1 y 5.2 de esta norma.

6.3 Si la muestra no cumple con uno o más de los requisitos establecidos en los numerales 5.1 y 5.2 de esta norma se extraerá una nueva muestra y se repetirán los ensayos.

**6.4** Si alguno de los ensayos repetidos no cumpliera con los requisitos establecidos se rechazará el lote correspondiente.

## **7. ETIQUETADO Y ENVASADO**

### **7.1 Envasado.**

**7.1.1** El material del envase debe ser resistente a la acción del producto de manera que no altere su composición y calidad organoléptica.

### **7.2 Rotulado.**

**7.2.1** Los envases deberán llevar un rótulo visible, impreso o adherido con caracteres legibles, redactados en castellano; únicamente con propósito de exportación se permitirá la redacción en otro idioma y llevará la información mínima siguiente: (ver INEN 1 334).

- a) nombre del producto,
- b) nombre y marca del fabricante,
- c) identificación del lote,
- d) contenido neto en unidades del Sistema Internacional, SI,
- e) país de origen,
- f) norma técnica INEN de referencia.

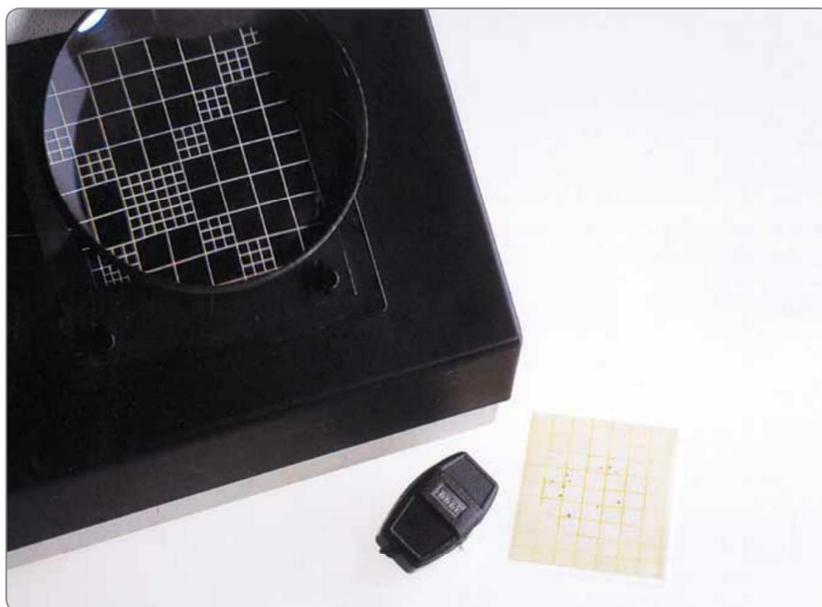
**7.2.2** La comercialización de este producto cumplirá con lo dispuesto en las Regulaciones y Resoluciones dictadas, con sujeción a la Ley de Pesas y Medidas.

**Fuente:** NTE INEN 620, (1989)

## Anexo 6: Recuento en placa Petrifilm aerobios mesófilos

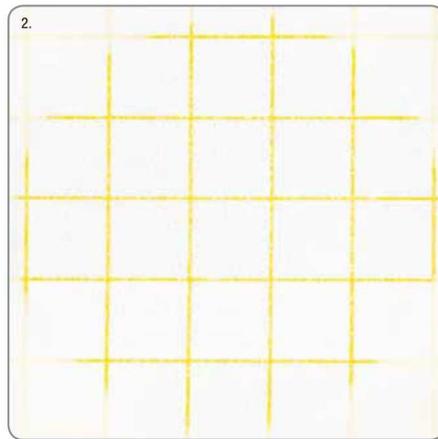


### 3M™ Petrifilm™ Placas para Recuento de Aerobios



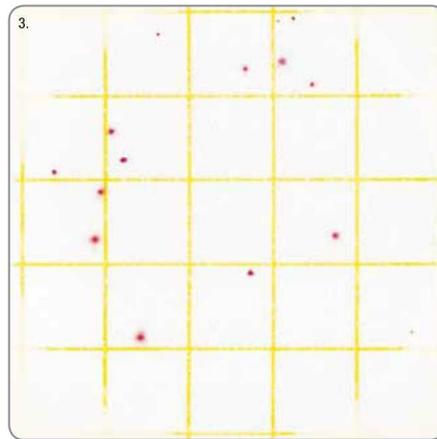
**3M**

## 3M™ Petrifilm™ Placas para Recuento de Aerobios



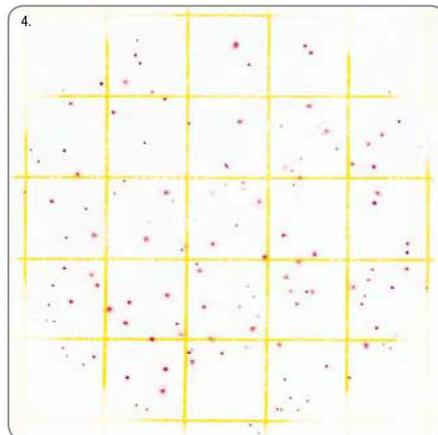
**Recuento = 0**

La interpretación de la placa Petrifilm para Aerobios resulta muy fácil. La Figura 2 muestra una placa Petrifilm Recuento de Aerobios sin colonias.



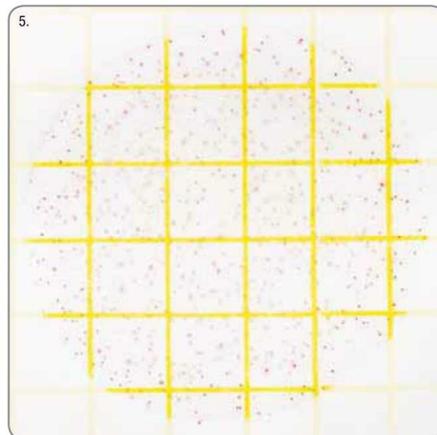
**Recuento = 16**

La Figura 3 muestra una placa Petrifilm Recuento de Aerobios con pocas colonias bacterianas. Un indicador rojo presente en la placa colorea todas las colonias. Contar todas las colonias rojas independientemente de su tamaño y de la intensidad de color. Usar un contador estándar tipo Quebec o un lector de placas 3M™ Petrifilm™ para leer la placa Petrifilm.



**Recuento = 143**

Al igual que con una placa Petri normal, el rango de recuento para una placa Petrifilm de Aerobios es de 10 - 300 colonias. Ver Figura 4.



**Recuento estimado = 420**

Cuando el número de colonias es superior a 300 como ocurre en la Figura 5, se puede realizar una estimación. Contar las colonias de una cuadrícula (1 cm<sup>2</sup>) y multiplicar por 20 para obtener el recuento total por placa. El área de inóculo de una placa Petrifilm de Aerobios es de 20 cm<sup>2</sup> aproximadamente.

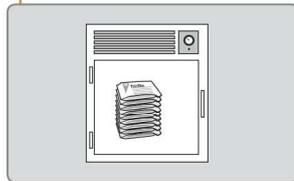
## 3M™ Petrifilm™. Placas para Recuento de Aerobios

Para información detallada acerca de PRECAUCIONES, GARANTÍAS, LIMITACIÓN DE LA RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, así como INSTRUCCIONES DE USO ver folleto de producto en las cajas.

### Instrucciones de uso



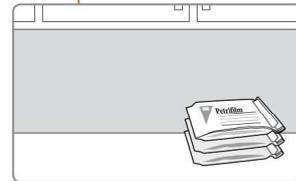
#### Almacenamiento



**1** Refrigerar las bolsas originales sin abrir de las placas Petrifilm. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa o embalaje.



**2** Abrir las bolsas con unas tijeras o cúter por el lado que aparece indicado. Retirar de la bolsa únicamente las placas que vayan a usarse. Volver a cerrar la bolsa doblando el lado abierto y asegurando el cierre con una pinza o cinta adhesiva.

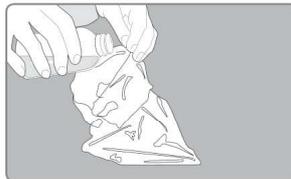


**3** Mantener las bolsas que se han abierto y vuelto a cerrar a  $\leq 21^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 70^{\circ}\text{F}$ ). **No refrigerar las bolsas que han sido abiertas.** En este caso, usar las placas Petrifilm no más tarde de 1 mes desde su apertura.

#### Preparación de Muestra



**4** Preparar una dilución de la muestra de alimento 1:10 o superior. Pesar o pipetear la muestra en una bolsa Whirlpac, bolsa Stomacher, botella de dilución o cualquier otro recipiente estéril apropiado.

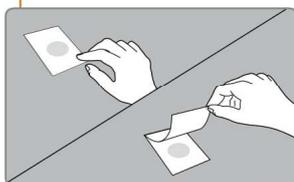


**5** Añadir el diluyente apropiado. Usar diluyentes estándar tales como tampón fosfato, agua de peptona, tampón de Butterfield, solución Ringer, peptona-sal, agua destilada y otros. No usar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.

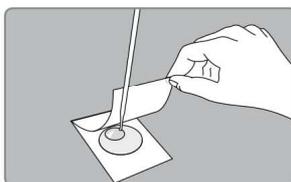


**6** Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales

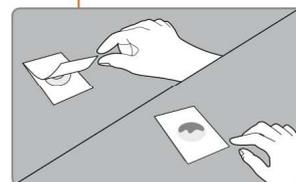
#### Siembra



**7** Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.



**8** Pipetear 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.



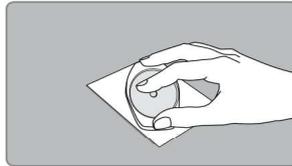
**9** Soltar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hacia abajo.



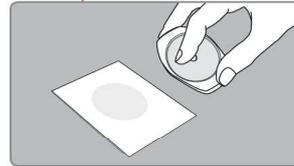
### Siembra



**10** Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usar el aplicador con la cara rebajada hacia abajo (cara lisa hacia arriba).

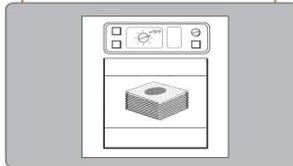


**11** Aplicar presión de **manera suave** sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. **No mover ni girar el aplicador.**



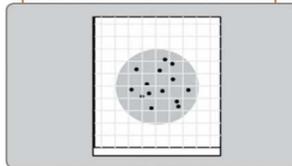
**12** Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel.

### Incubación



**13** Incubar las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas. Incubar a 30 +/-1°C durante 72 +/-2 horas para cualquier tipo de alimento. Consultar otras condiciones particulares de incubación.

### Interpretación



**14** Leer las placas. Usar un lector de placas 3M™ Petrifilm™ contador de colonias estándar Quebec u otros. No usar luz de fondo para la lectura de esta placa, usar luz directa. Consultar la Guía de Interpretación para leer los resultados.

### Comentarios Adicionales

- Los pasos 9 y 10 son específicos de las placas Petrifilm para recuento de aerobios.
- Nota: Sembrar e inmediatamente poner el aplicador con cada placa antes de sembrar la siguiente placa.



**3M España, S.A.**  
**3M Seguridad Alimentaria**  
 C/ Juan Ignacio Luca de Tena, 19-25  
 28027 Madrid  
[www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)



Por favor recicle. Impreso en España  
 ©3M 2009. Todos los derechos reservados. Ref. 1354-101-EU

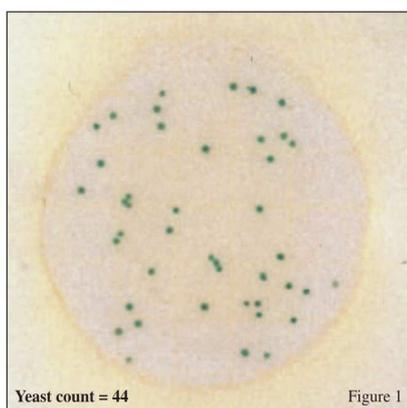
3M y Petrifilm son marcas registradas de 3M

Fuente: (3M , 2010)

## Anexo 7: Recuento de mohos-levaduras en Petrifilm

# 3M Petrifilm™ Levaduras y Mohos

Guía de  
Interpretación



Hacer un recuento con placas Petrifilm Levaduras y Mohos es fácil. Contienen un indicador colorante para levaduras y mohos para proporcionar contraste y facilitar el recuento.

Para diferenciar las colonias de levaduras y mohos en las placas Petrifilm Levaduras y Mohos, buscar una o más de las siguientes características típicas:

### LEVADURAS

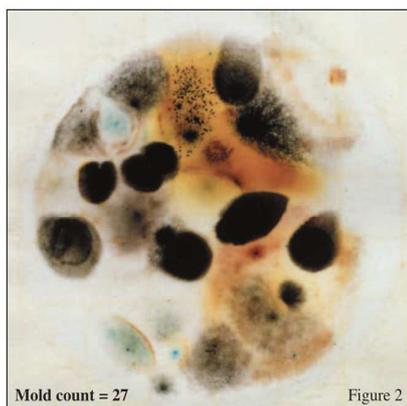
- Colonias pequeñas
- Las colonias tienen bordes definidos
- De color rosa-tostado a azul-verdoso
- Las colonias pueden aparecer alzadas ("3D")
- Generalmente no tienen un foco (centro negro) en el centro de la colonia

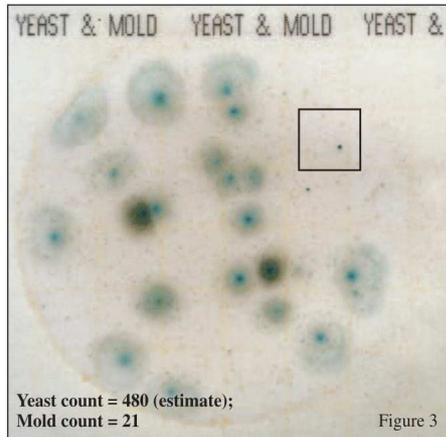
### MOHOS

- Colonias grandes
- Las colonias tienen bordes difusos
- Color variable (los mohos pueden producir sus propios pigmentos)
- Las colonias son planas
- Generalmente con un foco en el centro de la colonia

Las colonias en la figura 1 son ejemplos de levaduras características: colonias pequeñas, de color azul-verdoso, con bordes definidos y sin foco (**Recuento de levaduras = 44**).

Las colonias de la figura 2 son ejemplos de mohos característicos: grandes, colonias de color variable, con bordes difusos y un foco en el centro (**Recuento de mohos = 27**).





## Levaduras

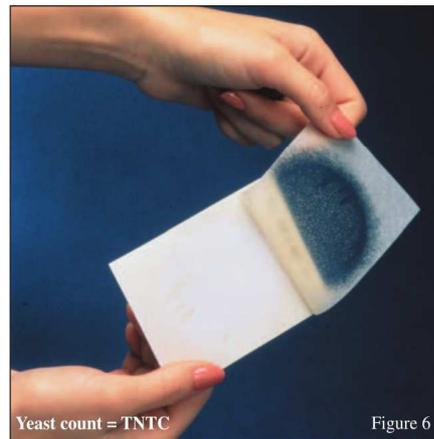
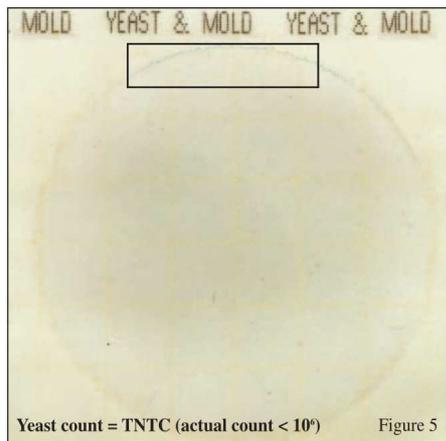
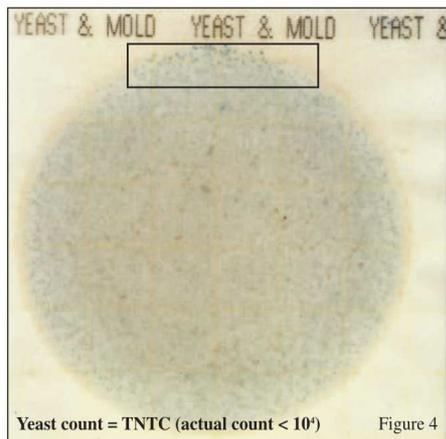
La placa Petrifilm Levaduras y Mohos de la figura 3 contiene un número fácilmente contable de mohos, (colonias grandes, verdes, con bordes difusos y un foco central) y un gran número de colonias de levaduras. Las colonias de levaduras son pequeñas, de color tostado, con bordes definidos y sin foco. Cuando el número de colonias es más de ISO, se debe hacer una estimación: determinar el número medio de colonias en un cuadrado (1 cm<sup>2</sup>) y multiplicar por 30 para obtener el recuento total por placa.

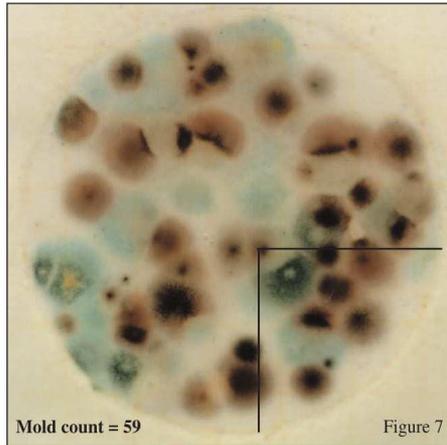
El área inoculada de una placa Petrifilm Levaduras y Mohos es de aproximadamente 30 cm<sup>2</sup> (**Recuento de levaduras = 480 (estimado) ; Recuento de mohos = 21**).

La placa de Petrifilm Levaduras y Mohos de la figura 4 contiene un elevado número de colonias de levaduras, demasiado numeroso para ser contado (TNTC). Las colonias pequeñas y azules en el borde de la placa la diferencian de una placa de mohos TNTC (**Recuento de levaduras = TNTC, recuento actual >10<sup>6</sup>**).

Algunas veces las placas Petrifilm Levaduras y Mohos con un número alto de colonias de levaduras pueden parecer que tengan un crecimiento azul sólo en los bordes (figura 5). También es un recuento de levaduras TNTC (**Recuento de levaduras = TNTC, recuento actual >10<sup>6</sup>**).

Si las placas Petrifilm Levaduras y Mohos parecen no tener crecimiento, levantar el film superior (figura 6). Si hay presentes muchas levaduras, se verán colonias blancas en el gel. Se anota como un recuento de levaduras TNTC (**Recuento de levaduras = TNTC**).

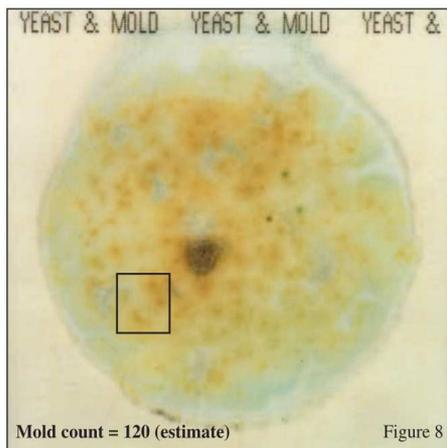




## Mohos

Las colonias de mohos en la placa Petrifilm Levaduras y Mohos de la figura 7 son colonias de pigmentación variable, con bordes difusos y un foco central. Son grandes, empezando a esporular y superponerse entre sí en la placa. Para facilitar el recuento dividir la placa en secciones y buscar focos que permitan distinguir colonias individuales. El recuadro muestra 15 mohos (**Recuento de mohos = 59**).

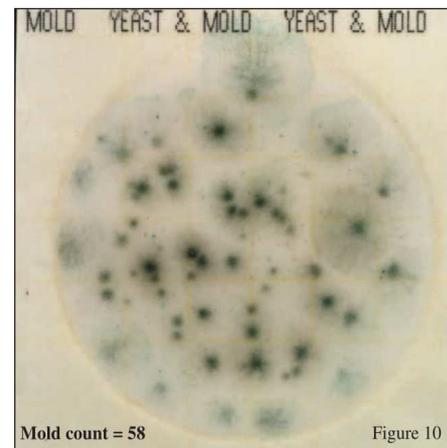
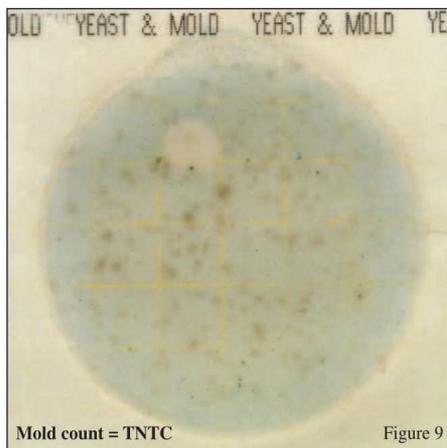
Notar la pigmentación variable con bordes vellosos en la placa de la figura 8, causado por el elevado número de colonias de mohos y la esporulación que ha tenido lugar. Estimar el número contando los focos. En el cuadrado que se muestra hay 4 colonias (**Recuento de mohos = 120 (estimado)**).



Igual que con todos los métodos de recuento en placas, las placas con muchas colonias pueden mostrar características de colonias atípicas. Es importante hacer una correcta dilución para asegurar un recuento exacto.

Las placas Petrifilm Levaduras y Mohos de las figuras 9 y 10 son diluciones 1 : 10 y 1 : 100, respectivamente, del mismo producto. Las colonias de la figura 9 son pequeñas, pálidas y numerosas, haciendo el contaje difícil de estimar. Hay una burbuja como artefacto (**Recuento de mohos = TNTC**).

La dilución del producto para obtener un recuento de colonias en el margen deseado ( 15-150 colonias) facilita el recuento. Los mohos de la figura 10 son grandes, con bordes difusos y focos centrales (**Recuento de mohos = 58**). El apiñamiento de las colonias de la placa en la figura 9 impide su crecimiento típico.

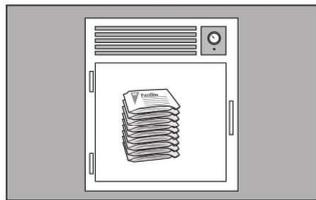


# 3M™ Petrifilm™ Levaduras y Mohos

Instrucciones  
de uso



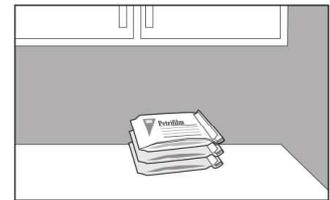
## Almacenamiento



1 Refrigerar las bolsas cerradas. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa.



2 Para cerrar las bolsas, doblar los extremos y cerrarlos con celo.

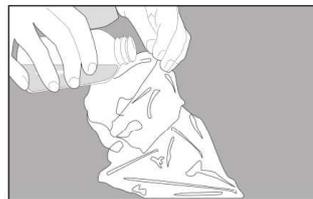


3 Mantener las bolsas cerradas de nuevo a ~21 °C, a <50% HR. No refrigerar las bolsas abiertas. Usar las placas Petrifilm en 1 mes desde su apertura.

## Preparación



4 Preparar una dilución del producto alimenticio a 1:10 o superior. Pesar o pipetear la muestra en una bolsa Whirlpac, bolsa Stomacher, botella de dilución, o cualquier otro contenedor estéril apropiado.

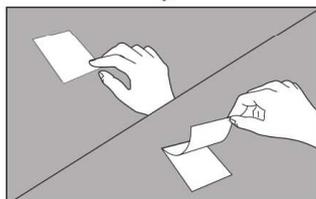


5 Añadir una cantidad adecuada de diluyente. Pueden ser los métodos estándar de tampón fosfato, agua peptonada al 0,1 %, triptona sal, agua destilada, solución salina fosfato tamponada o tampón de Butterfield. No utilizar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.

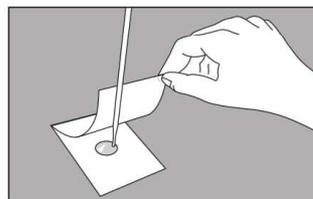


6 Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales. Si se requiere una sensibilidad mayor con productos lácteos o zumos consultar el folleto para Petrifilm en productos lácteos y zumos.

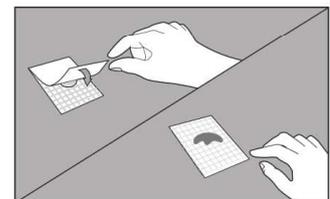
## Inoculación



7 Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.



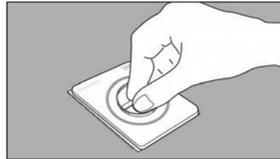
8 Con una pipeta perpendicular a la placa Petrifilm colocar 1 ml. de muestra en el centro del film inferior.



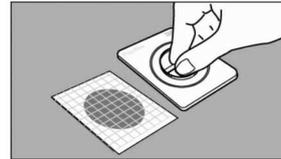
9 Dejar caer el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire.



10 Sujetando el aplicador por la barra soporte, colocar el aplicador para Petrifilm levaduras y mohos sobre la placa Petrifilm.

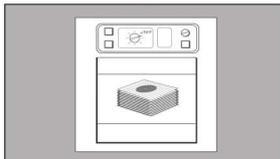


11 Ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.



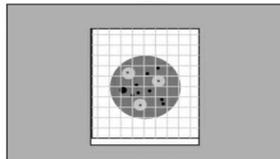
12 Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que solidifique el gel.

### Incubación



13 Incubar las placas Petrifilm cara arriba en pilas de hasta 20 placas a temperatura de 25°C ± 1°C durante 3-5 días.

### Interpretación



14 Leer las placas Petrifilm en un contador de colonias standard tipo Quebec o una fuente de luz con aumento. Para leer los resultados consultar la Guía de Interpretación.

### Comentarios adicionales

- los pasos 9 y 10 son únicos para las placas Petrifilm levaduras y Mohos.
- Nota: recordar inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente placa.

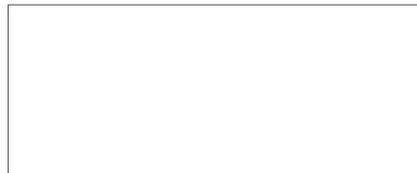
Date	Version
Février 2004	1.0

**3M**

Microbiology Products  
Laboratoires 3M Santé

Boulevard de l'Oise  
F - 95029 Cergy Pontoise Cedex  
Tél. 01 30 31 85 77

For Europe, please contact :  
Laboratoires 3M Santé  
Tél. : (33) 1 30 31 85 71  
Fax : (33) 1 30 31 85 78



Fuente: (3M , 2010)

## Anexo 8: Recuento de coliformes placa Petrifilm

**3M**

**Petrifilm™**

### Placas para Recuento de Coliformes

Guía  
de Interpretación

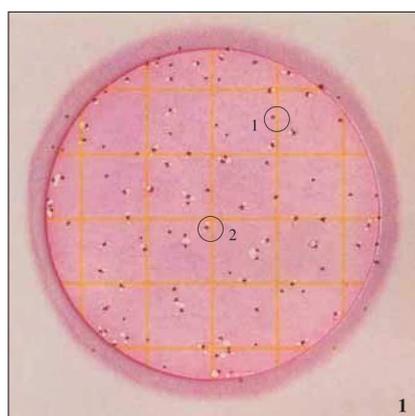


Esta guía sirve para familiarizarse con los resultados obtenidos en las placas 3M™ Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC). Para más información, contactar con el distribuidor oficial de Productos 3M Microbiology.

Las placas Petrifilm CC contienen los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB) modificado, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por los coliformes.

- La **ISO** define los coliformes por su capacidad de crecer en medios específicos y selectivos. El **método ISO 4832**, que enumera los coliformes por la técnica del recuento de colonias, define los coliformes por el tamaño de las colonias y la producción de ácido en el Agar VRB con lactosa (VRBL). En las placas Petrifilm CC, estos coliformes productores de ácido se muestran como colonias rojas con o sin gas (ver Círculo 1). El **método ISO 4831**, que enumera los coliformes por el método del Número Más Probable (NMP), define los coliformes por su capacidad de crecer y producir gas a partir de la lactosa en un caldo selectivo. En las placas Petrifilm CC, estos coliformes se muestran como colonias rojas asociadas a gas (ver Círculo 2).

- La **AOAC INTERNATIONAL** y la FDA (Food and Drug Administration) / BAM definen los coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas a partir de la lactosa durante la fermentación metabólica. Las colonias de coliformes que crecen en las placas Petrifilm CC producen ácido que provoca que el indicador de pH oscurezca el color del gel; el gas atrapado alrededor de las colonias indica coliformes (ver Círculo 2).

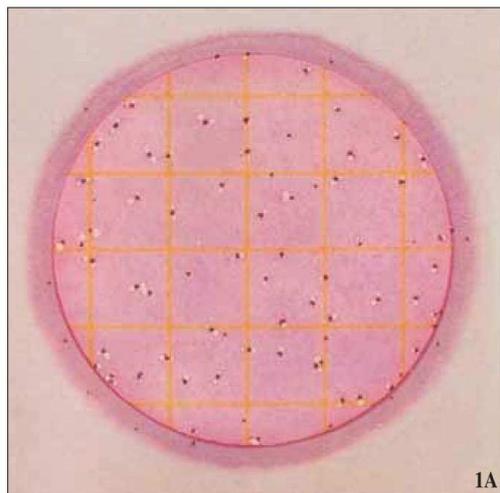


Recuento de colonias productoras de gas : 75  
Recuento de colonias no productoras de gas : 24  
Recuento total : 99

El tiempo y temperatura de incubación, así como la interpretación de las placas Petrifilm CC puede variar con el método.

La AOAC®, la AFNOR y la NMKL han validado el uso de las placas Petrifilm CC bajo condiciones específicas. Ver páginas 2 y 3 de esta Guía de Interpretación.

Interpretación de las Placas 3M Petrifilm CC según los protocolos descritos por las siguientes organizaciones:  
AOAC®, NMKL y AFNOR



65 coliformes, AOAC® Official Methods

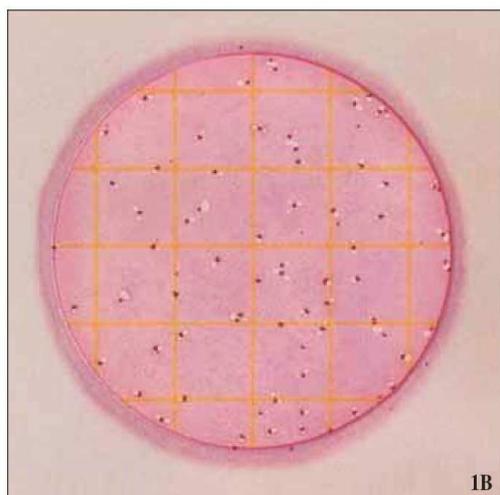
**Lectura según los AOAC®, Official Methods<sup>SM</sup>**  
**(986.33, 989.10 y 991.14)**

Incubación :

- *Enumeración de coliformes en leche, leche cruda y productos lácteos (Métodos Oficiales 986.33 y 989.10) :* incubar 24h +/- 2h a 32°C +/- 1°C.
- *Enumeración de coliformes en todos los productos, excepto los arriba mencionados (Método Oficial 991.14) :* incubar 24h +/- 2h a 35°C +/- 1°C.

Interpretación :

- Coliformes : Contar todas las colonias rojas con gas.



67 coliformes, método validado NMKL.

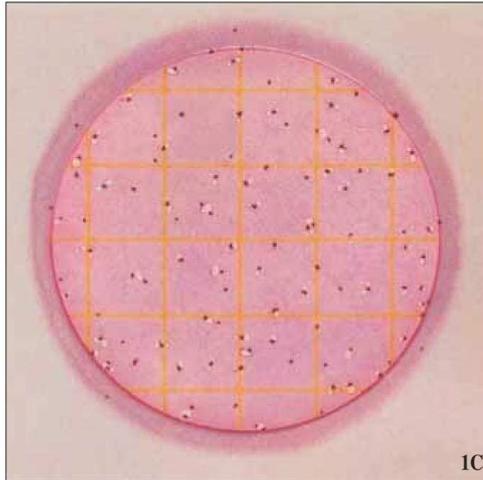
**Lectura según el método validado por la NMKL**  
**(147.1993)**

Incubación :

24h +/- 2h a 37°C +/- 1°C

Interpretación :

- Coliformes : Contar todas las colonias rojas con gas.



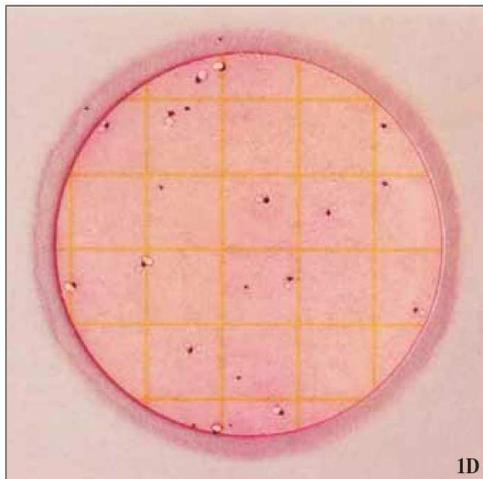
**97 coliformes**, método aprobado **AFNOR** comparado con el método ISO 4832  
**72 coliformes productores de gas**, método aprobado **AFNOR** comparado con el método ISO 4831.

**Lectura según la aprobación AFNOR para coliformes totales**  
(certificados número 3M 01/2-09/89A y 3M 01/2-09/89B)

Incubación :  
24h +/- 2h a 30°C +/- 1°C

Interpretación :

- *Comparación con el método ISO 4832 (certificado 3M 01/2-09/89A) :*  
Contar todas las colonias rojas con o sin gas
- *Comparación con el método ISO 4831 (certificado 3M 01/2-09/89B) :*  
Contar sólo las colonias rojas con gas.



**21 coliformes**, método aprobado **AFNOR** comparado con el método NF V08-017.

**Lectura según la aprobación AFNOR para coliformes termotolerantes**  
(certificados número 3M 01/2-09/89C)

Incubación :  
24h +/- 2 a 44°C +/- 1°C

Interpretación :

- *Comparación con el método NF V08-017 :*  
Contar todas las colonias rojas con o sin gas.

# 3M™ Petrifilm™

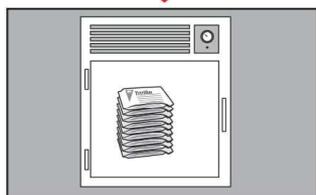
## Placas para Recuento de Coliformes

Para Advertencias, Precauciones, Responsabilidad del Usuario, Garantía Limitada, Almacenamiento y Eliminación, e Instrucciones de Uso, ver el folleto del producto.

Instrucciones  
de uso



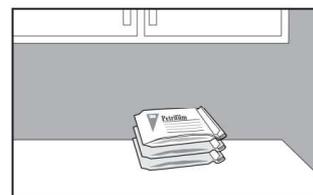
### Almacenamiento



**1** Conservar las bolsas cerradas a  $\leq 8^{\circ}\text{C}$ . Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. En zonas con alta humedad donde puede haber condensación, es mejor dejar que las bolsas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas.



**2** Para cerrar las bolsas que se están utilizando, doblar los extremos y cerrarlos con celo.



**3** Mantener las bolsas una vez cerradas a  $\leq 25^{\circ}\text{C}$ , a HR  $< 50\%$ . **No refrigerar las bolsas abiertas.** Usar las placas Petrifilm en un mes desde su apertura.

### Preparación de la muestra

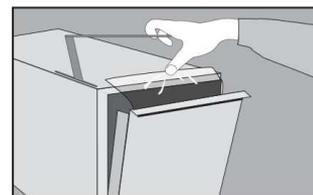


**4** Pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak®, o cualquier otro contenedor estéril.



**5** Si es necesario, utilizar diluyentes estériles apropiados: agua peptona sal (método ISO 6887) (Diluyente de Máxima Recuperación), tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDF,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $0.0425\text{g/l}$ , ajustar pH a 7.2), agua peptonada al 0.1%, agua peptonada tamponada (método ISO 6579), solución salina (0.85 - 0.90%), caldo letheen sin bisulfito, o agua destilada.

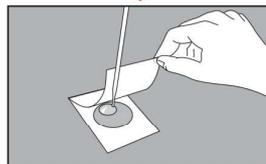
No usar tampones que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato, ya que pueden inhibir el crecimiento.



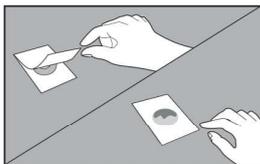
**6** Mezclar u homogeneizar la muestra según el procedimiento habitual.

Ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:  
• para productos ácidos, usar NaOH 1N,  
• para productos alcalinos, usar HCl 1N.

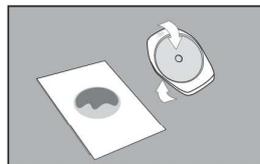
## Inoculación



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

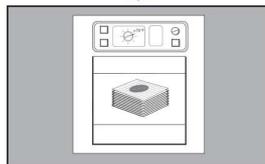


8 Bajar el film superior **con cuidado** evitando introducir burbujas de aire. **No** dejarlo caer.



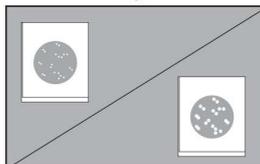
9 Con la cara **lisa** hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo. **Con cuidado**, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel. No girar ni deslizar el aplicador. Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.

## Incubación

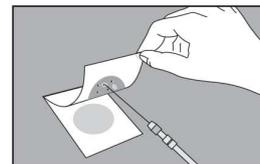


10 Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas. El tiempo e incubación varía según el método.

## Interpretación



11 Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento iluminada. Para leer los resultados, consultar la Guía de Interpretación.



12 Las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel.

Métodos aprobados más usuales :

### Coliformes totales

- Métodos Oficiales 986.33 y 989.10 (leche, leche cruda, otros productos lácteos) :

- Incubar 24h ± 2h a 32°C ± 1°C.

- Método Oficial AOAC 991.14 (todos los alimentos) : Incubar 24h ± 2h a 35°C ± 1°C.

- Método NMKL 147.1993 :

- Incubar 24h ± 2h a 37°C ± 1°C.

- Métodos validados AFNOR 3M 01/2-09/89A y B :

- Incubar 24h ± 2h a 30°C ± 1°C.

### Coliformes termotolerantes (fecales)

- Método validado AFNOR

- 3M 01/2-09/89C :

- Incubar 24h ± 2h a 44°C ± 1°C.

Para esta alta temperatura, es necesario una humidificación del incubador.

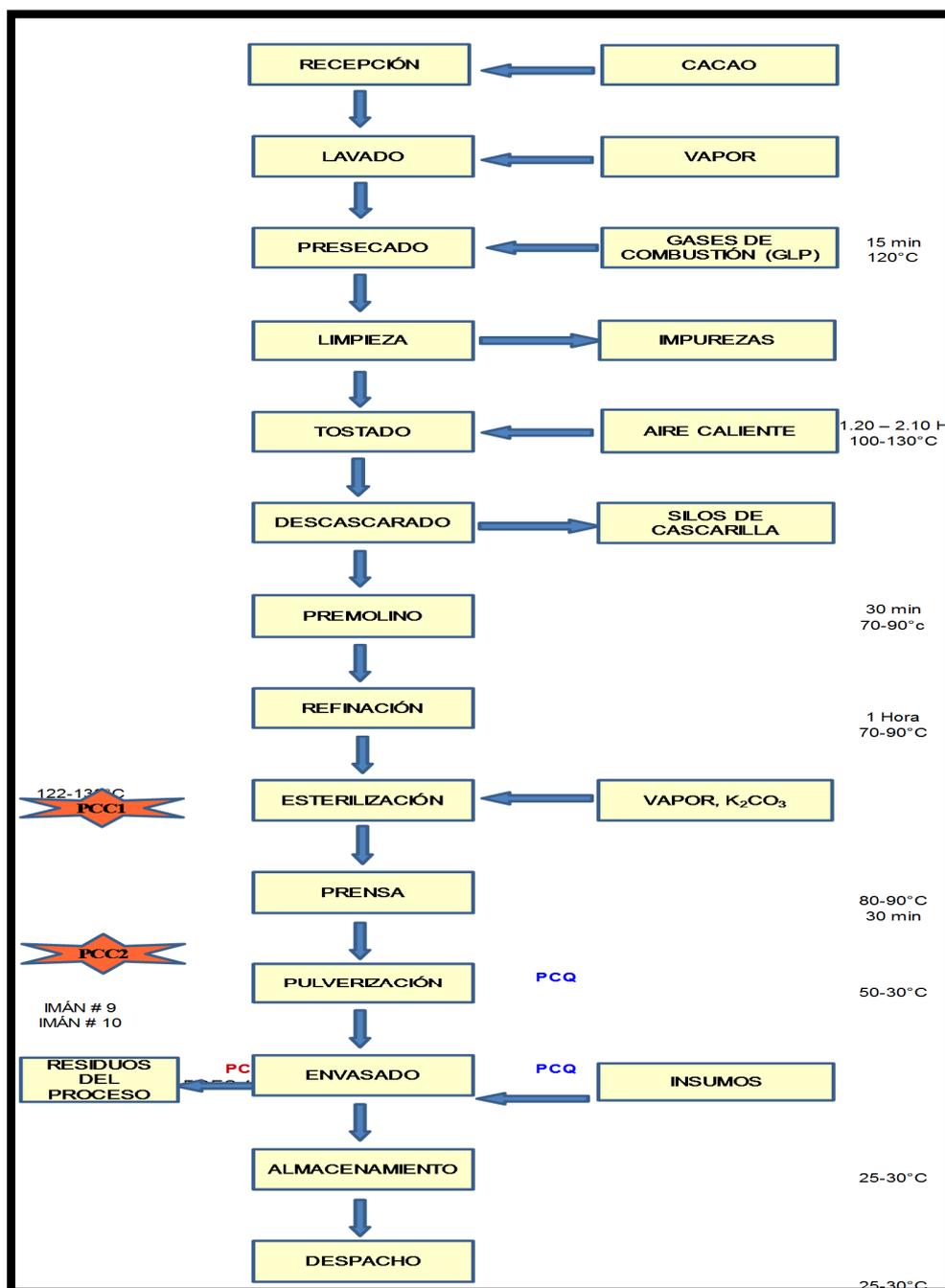
Fuente: (3M , 2010)

## Anexo 9. Ubicación de instalaciones de CAFIESA



**Fuente:** Google Maps, (2016)

### Anexo 10. Diagrama de flujo Polvo de cacao



Fuente: CAFIESA, (2014)

### Anexo 11. Toma y rotulado de hisopos



Fuente: El Autor

### Anexo 12. Rotura de bulbo y caída de líquido lethen



Fuente: El Autor

### Anexo13. Colocación de Petrifilm en superficie plana



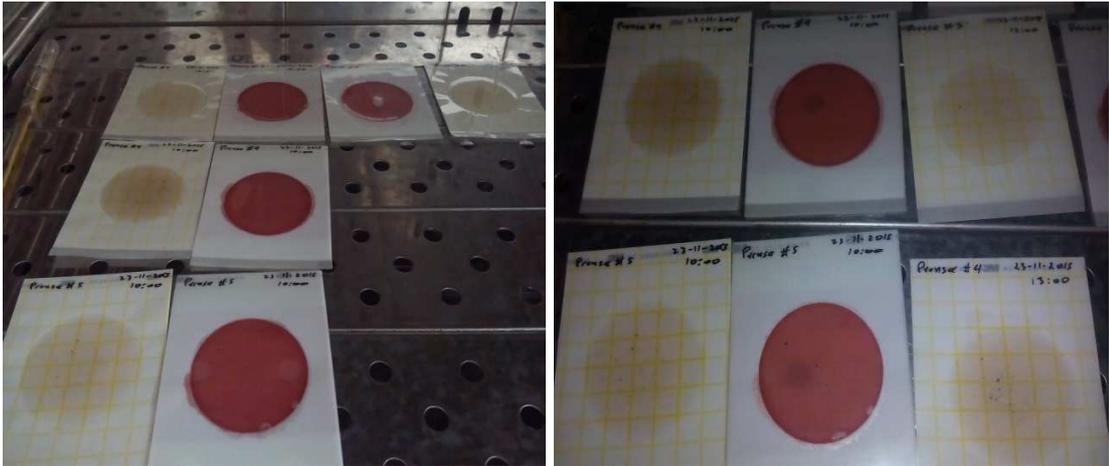
Fuente: El Autor

### Anexo 14. Siembra y dispersión en placa



Fuente: El Autor

## Anexo 15. Incubación de placas



Fuente: El Autor

## Anexo 16. Area de Prensas



Fuente: El Autor

### Anexo 17. Siembra en placa Petrifilm



Fuente: El Autor

### Anexo 17. Elaboración Agua de peptona



Fuente: El Autor

### Anexo 18. Fijación y dispersión del medio



Fuente: El Autor

### Anexo. 20 Cronograma de trabajo

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES DEL TRABAJO DE TITULACION																				
Actividades / Semana					Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero			
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
1 Eleccion del tema	■	■																		
2 Estructura del tema		■																		
3 Realizar anteproyecto			■																	
4 Diseno experimental previo				■																
5 Toma y analisis de muestras 1 era repeticion						■														
6 Toma y analisis de muestras 2 da repeticion							■													
7 Toma y analisis de muestras 3 era repeticion								■												
8 Toma y analisis de muestras 4 repeticion									■											
9 Toma y analisis de muestras 5 repeticion										■										
10 Toma y analisis de muestras 6 repeticion											■									
11 Procesamiento de Datos												■	■							
12 Elavoracion del diseno experimental													■	■						
13 Elaboracion del borrador del documento												■	■	■	■					
14 Elaboracion de informe final.															■	■				
15 Presentacion de tesis.																			■	

Elaborado por El Autor

**Anexo 21.** Tabla Interacción prensas, microorganismos y puntos muestreo

Tratamiento	Prensas			Microorg						Lugar muestra	
	A	B	C	I	II	III	IV	V	VI	ER	x
1	A1	B1	C1	2,00	2,00	2,00	1,95	2,00	2,00	11,95	1,99
2	A1	B1	C2	2,00	1,85	2,00	1,90	2,00	2,00	11,75	1,96
3	A1	B2	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
4	A1	B2	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
5	A1	B3	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
6	A1	B3	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
7	A2	B1	C1	2,48	2,48	2,30	2,48	2,30	2,30	14,33	2,40
8	A2	B1	C2	2,60	2,48	2,30	2,30	2,30	2,30	14,28	2,40
9	A2	B2	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
10	A2	B2	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
11	A2	B3	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
12	A2	B3	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
13	A3	B1	C1	2	2	2	2	2	2	12,00	2,00
14	A3	B1	C2	2	2	2	2	2	2	12,00	2,00
15	A3	B2	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
16	A3	B2	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
17	A3	B3	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
18	A3	B3	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
19	A4	B1	C1	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	12,00	2,00
20	A4	B1	C2	2,00	2,30	2,30	2,00	2,30	1,78	12,68	2,11
21	A4	B2	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
22	A4	B2	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
23	A4	B3	C1	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
24	A4	B3	C2	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
										101,00	0,70

**Elaborado por el Autor**



Presidencia  
de la República  
del Ecuador



Plan Nacional  
de Ciencia, Tecnología,  
Innovación y Saberes



SENESCYT  
Secretaría Nacional de Educación Superior,  
Ciencia, Tecnología e Innovación

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Madrid Navia Leonel David, con C.C: # 0803162825 autor del trabajo de titulación: Validación del método de muestreo microbiológico en la elaboración de polvo de cacao alcalino, previo a la obtención del título de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL con Concentración en Agronegocios** en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las instituciones de educación superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Guayaquil, 15 de Marzo de 2016

f. \_\_\_\_\_  
Nombre: Madrid Navia Leonel David  
C.C: 0803162825

## **REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

### **FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE TITULACIÓN**

<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b>	Validación del método de muestreo microbiológico en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino.		
<b>AUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	Madrid Navia, Leonel David		
<b>REVISOR(ES)/TUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	Ing. Chero Alvarado, Víctor Egbert M. Sc.		
<b>INSTITUCIÓN:</b>	Universidad Católica de Santiago de Guayaquil		
<b>FACULTAD:</b>	Facultad de Educación Técnica Para el Desarrollo		
<b>CARRERA:</b>	Ingeniería Agroindustrial		
<b>TÍTULO OBTENIDO:</b>	Ingeniero Agroindustrial con Concentración en Agronegocios		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b>	15 de Marzo de 2016	<b>No. DE PÁGINAS:</b>	106
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b>	Seguridad y calidad alimentaria		
<b>PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:</b>	Mesófilos, coliformes, mohos-levaduras, limpieza, validar		

#### **RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras):**

Con la intención de validar el método de muestreo microbiológico en el procesamiento de polvo de cacao alcalino, de la empresa Cacaos Finos Ecuatorianos S.A. (CAFIESA), se consideró plantearse los siguientes objetivos: aplicar la metodología actual de plan de muestreo microbiológico empleada para el análisis de superficies de contacto en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino; determinar las herramientas estadísticas óptimas que pueden ser aplicadas para validar la metodología del plan de muestreo microbiológico empleada en el proceso de elaboración de polvo de cacao; e identificar los puntos críticos microbiológicos en el proceso de elaboración de polvo de cacao alcalino. Lo que conllevó en el presente estudio a determinar la calidad microbiológica de las superficies de los equipos de CAFIESA, específicamente en un equipo de procesamiento denominado prensas. Para el estudio se consideró realizar un *Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial del 4x3x2*, para lo cual se efectuaron 6 repeticiones. En donde los tratamientos fueron las cuatro prensas, y cada tratamiento tiene dos niveles en los que se analizaron tres factores: aerobios mesófilos, mohos-levaduras y coliformes totales. Por consiguiente se tomó los factores microorganismos, prensa y punto de muestreo, dada la interacción que tienen éstos en cada una de las muestras

<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
<b>CONTACTO CON AUTOR/ES:</b>	<b>Teléfono:</b> +593-6-2450001 / 0979463993	E-mail: <a href="mailto:leo_madrid66@hotmail.com">leo_madrid66@hotmail.com</a> ; <a href="mailto:leonel.madrid@cu.ucsg.edu.ec">leonel.madrid@cu.ucsg.edu.ec</a>
<b>CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre:</b> Ing. Donoso Bruque Manuel Enrique	
	<b>Teléfono:</b> 0991070554	
	<b>E-mail:</b> <a href="mailto:manuel.donoso@cu.ucsg.edu.ec">manuel.donoso@cu.ucsg.edu.ec</a>	

#### **SECCIÓN PARA USO DE BIBLIOTECA**

<b>Nº. DE REGISTRO (en base a datos):</b>	
<b>Nº. DE CLASIFICACIÓN:</b>	
<b>DIRECCIÓN URL (tesis en la web):</b>	