

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE ALIMENTOS

Tema: “Comparación entre Compact Dry y espectroscopía Raman para determinar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal”

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del
título de Ingenieros en Alimentos

AUTORA: Chipud Pistala Lorena Stefania

TUTORA: Ing. Chamorro Hernández Liliana Margoth MSc.

Tulcán, 2025

CERTIFICADO DEL TUTOR

Certifico que la estudiante Chipud Pistala Lorena Stefania con el número de cédula 0401770318 ha desarrollado el Trabajo de Integración Curricular: "Comparación entre Compact Dry y espectroscopía Raman para determinar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal".

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de la Unidad de Integración Curricular, Titulación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizo la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.

Ing. Chamorro Hernández Liliana Margoth MSc.

TUTORA

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente Trabajo de Integración Curricular constituye un requisito previo para la obtención del título de Ingenieros en la Carrera de alimentos de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales.

Yo, Chipud Pistala Lorena Stefania con cédula de identidad número 0401770318 declaro que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que hemos llegado son de nuestra absoluta responsabilidad.



Chipud Pistala Lorena Stefania

AUTORA

Tulcán, febrero de 2025

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Yo, Chipud Pistala Lorena Stefania declaro ser autora de los criterios emitidos en el Trabajo de Integración Curricular: "Comparación entre Compact Dry y espectroscopía Raman para determinar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal" y se exime expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes de posibles reclamos o acciones legales.



Chipud Pistala Lorena Stefania

AUTORA

Tulcán, febrero de 2025

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios y a la Virgen de Las Lajas por regalarme la vida y acompañarme siempre en cada una de mis decisiones, cómo no agradecerles, también a la vida por brindarme la oportunidad de cumplir mis anhelos y aunque no será fácil, tengo una familia amorosa en quién apoyarme.

A mi padre Miguel Ángel Chipud Jaramillo y mi madre Lucía del Conzuelo Pistala, por apoyarme siempre y motivarme a cumplir mis metas y sueños, por cuidarme, aconsejarme, ser mi guía y mi refugio. Gracias, papá y mamá por siempre tenerme en sus peticiones y ser mi soporte a lo largo de mi vida.

A mi hogar por casi 5 años de preparación para la vida profesional, la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, que me abrió sus puertas, brindándome todas las facilidades para desarrollar mis habilidades para mi futuro laboral.

A la universidad Yachay Tech por permitirme elaborar mi trabajo de integración curricular en sus instalaciones y compartirme los conocimientos de nuevas técnicas aplicadas a la Industria alimentaria.

A la MSc. Liliana por brindarme su apoyo y conocimientos para llegar al fin de este trabajo de titulación, a los docentes de mi carrera por impartirme enseñanzas, conocimientos y sabiduría a lo largo de todo el trayecto universitario para ser una profesional del área de alimentos.

Finalmente, a Edwin Alexander Cabascango Cacuango, por sus ánimos y palabras de aliento durante los semestres que compartimos juntos, a mi amigo Stalin Aldair de la Cruz Sarchi quien, con su temple, sus conocimientos y sus consejos logramos llegar al final de la meta. Gracias, amigo por estar siempre y apoyarme.

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen de las Lajas, por brindarme su sabiduría, fuerza y resiliencia en todos los logros que tengo hasta hoy y los que se vienen, son mi norte y nunca hubiese sido posible llegar hasta aquí sin ustedes.

A mi mami Lucy que siempre me ha apoyado y creído en mí, ha estado conmigo en buenas y malas. ¡Mamita, LO LOGRAMOS!

A mis hermanas Angela y Vivian Chipud, a mi tía Magaly y a mi ángel de cielo Arthur por siempre mostrarme su apoyo incondicional y brindarme ánimos para lograr todas mis metas.

A los docentes de mi carrera que confiaron en mí e hicieron que mi sueño se hiciera realidad.

ÍNDICE

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	16
I. EL PROBLEMA	17
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	19
1.3. JUSTIFICACIÓN	19
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	21
1.4.1. Objetivo General	21
1.4.2. Objetivos Específicos	21
1.4.3. Preguntas de Investigación	21
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	23
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	23
2.2. MARCO TEÓRICO	25
2.2.1. Queso.....	25
2.2.1.1. Definición.....	25
2.2.1.2. Tipos de quesos	25
2.2.1.3. Propiedades Físicoquímicas del queso fresco.....	28
2.2.1.4. Propiedades sensoriales del queso fresco	28
2.2.1.5. Diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco	28
2.2.1.6. Defectos del queso fresco	29
2.2.1.7. Defectos del queso fresco por presencia de microorganismos	30
2.2.2. Enfermedades causadas por microorganismos	31
2.2.3. Metodología para determinación de microorganismos	32
2.2.3.1. Métodos de detección	32

2.2.4. Espectroscopía.....	35
2.2.4.1. Definición.....	35
2.2.4.2. XPS.....	35
2.2.4.3. Raman.....	35
2.2.4.4. FTIR.....	38
2.2.5. Tiempo del desarrollo metodológico.....	39
2.2.6. Costo del método.....	39
2.2.6.1. Estructura de costos.....	39
2.2.6.2. Costos directos.....	40
2.2.6.3. Costos Indirectos.....	40
III. METODOLOGÍA.....	41
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO.....	41
3.1.1. Enfoque.....	41
3.1.2. Tipo de Investigación.....	41
3.2. HIPÓTESIS.....	42
3.2.1. Hipótesis Nula.....	42
3.2.2. Hipótesis alternativa.....	42
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	42
3.3.1. Definición de las variables.....	42
3.3.1.1. Variables Dependientes.....	42
3.3.1.2. Variables Independientes.....	42
3.3.2. Operacionalización de las variables.....	42
3.4. MÉTODOS A UTILIZAR.....	44
3.4.1. Análisis microbiológico.....	44
3.4.1.1. Obtención de muestras.....	44
3.4.1.2. Transporte de las muestras.....	44
3.4.1.3. Análisis microbiológico.....	44
3.4.1.4. Recuento microbiológico.....	45

3.4.2.	Metodología de espectroscopía.....	45
3.4.2.1.	Elaboración del queso testigo	45
3.4.2.2.	Clasificación del queso testigo	45
3.4.2.3.	Esterilización de las muestras.....	46
3.4.2.4.	Preparación del inóculo	46
3.4.2.5.	Inoculación del queso testigo.....	47
3.4.2.6.	Incubación de las bacterias inoculadas en el queso testigo	47
3.4.2.7.	Ultracongelación de las muestras del queso testigo	47
3.4.2.8.	Liofilización	47
3.4.2.9.	Análisis en el espectrofotómetro Raman	48
3.4.2.10.	Interpretación de los espectros del queso testigo y muestra.....	50
3.4.3.	Metodología de tiempo y costos	50
3.4.3.1.	Tiempo.....	50
3.4.3.2.	Costos.....	50
3.4.4.	Técnicas	51
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
3.5.1.	Diseño experimental	51
3.5.2.	Muestreo y tabulación de datos	52
3.5.3.	Tratamientos	52
3.6.	RECURSOS.....	53
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1.	RESULTADOS	54
4.1.1.	Análisis de supuestos.....	54
4.1.1.1.	Normalidad.....	54
4.1.1.2.	Homocedasticidad.....	55
4.1.1.3.	Independencia	56
4.1.1.4.	Linealidad	56
4.1.2.	Análisis microbiológico	57

4.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	58
4.1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	58
4.1.3. Análisis de espectroscopía de Raman	59
4.1.3.1. Espectro del queso control	59
4.1.3.2. Espectro de los quesos inoculados y el queso control	60
4.1.3.3. Espectros de <i>Staphylococcus aureus</i>	61
4.1.3.4. Espectros de <i>Escherichia coli</i>	63
4.1.4. Análisis de viabilidad	64
4.1.4.1. Tiempo de desarrollo metodológico.....	64
4.1.4.2. Costo del método.....	65
4.2. DISCUSIÓN	68
4.2.1. Análisis microbiológico	68
4.2.2. Análisis de espectroscopía de Raman	69
4.2.3. Análisis de viabilidad	70
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
5.1. CONCLUSIONES	73
5.2. RECOMENDACIONES	74
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
VII. ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables.....	43
Tabla 2. Cantidad de muestras por cada mercado	52
Tabla 3. Tabla de tratamientos por muestra.....	52
Tabla 4. Recursos	53
Tabla 5. Conteo microbiológico de <i>Staphylococcus aureus</i> en 3 mercados de la ciudad de Tulcán (n=90)	58
Tabla 6. Conteo microbiológico de <i>Escherichia coli</i> de 3 mercados de la ciudad de Tulcán (n=90)	58
Tabla 7. Tiempo de operación en el análisis microbiológico	64
Tabla 8. Tiempo de operación en la espectroscopía de Raman.....	65
Tabla 9. Análisis económico en el análisis microbiológico	66
Tabla 10. Análisis económico de la espectroscopía de Raman.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del queso fresco.....	29
Figura 2. Espectro Raman.....	36
Figura 3. Stokes scattering, Rayleigh scattering and Anti-Stokes scattering.	37
Figura 4. Enfoque del queso en microscopio Raman y sus condiciones.	49
Figura 5. Shapiro Wilk para <i>S. aureus</i>	54
Figura 6. Shapiro Wilk para <i>E. coli</i>	55
Figura 7. Prueba de Levene para <i>S. aureus</i>	55
Figura 8. Prueba de Levene para <i>E. coli</i>	55
Figura 9. Prueba Durbin Watson para <i>S. aureus</i>	56
Figura 10. Prueba Durbin Watson para <i>E. coli</i>	56
Figura 11. Prueba Rainbow para <i>S. aureus</i>	57
Figura 12. Prueba Rainbow para <i>E. coli</i>	57
Figura 13. Composición química del queso control.....	60
Figura 14. Espectros de los quesos inoculados con <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> y el queso control.....	61
Figura 15. Espectros del queso inoculado con <i>Staphylococcus aureus</i> y los quesos de los 3 mercados evaluados.....	62

Figura 16. Espectro del queso inoculado con <i>Escherichia coli</i> y los quesos de los 3 mercados evaluados.....	63
Figura 17. Toma de muestras y etiquetado	84
Figura 18. Transporte a Yachay Tech	84
Figura 19. Refrigeración por 24 h	84
Figura 20. Medición de agua peptonada	84
Figura 21. Pesar 25 g de queso muestreado.....	84
Figura 22. Homogenizar el queso muestra y agua peptonada.....	84
Figura 23. Preparación de los tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada para hacer las disoluciones hasta 10^{-4}	84
Figura 24. Disoluciones	84
Figura 25. Cultivo en Compact Dry	84
Figura 26. Incubación por 24 h a 32 °C	85
Figura 27. Conteo de colonias en <i>S. aureus</i>	85
Figura 28. Conteo de colonias en <i>E. coli</i>	85
Figura 29. Cuajado de la leche para realizar el queso control	86
Figura 30. Desuerado del queso control	86
Figura 31. Prensado del queso control.....	86
Figura 32. Empacado y refrigeración del queso control.....	86
Figura 33. Pesar 25 g de queso control para inocular	86
Figura 34. Etiquetado de los tubos falcón que contienen el queso control.....	86
Figura 35. Aplicación de rayos UV para la eliminación de todos los microorganismos presentes.....	86
Figura 36. Preparar el caldo de cultivo con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> con una absorbancia de 0.12	86
Figura 37. Poner una gota del caldo preparado para realizar tinción de Gram y verificar Cepas puras	86
Figura 38. Poner los reactivos para la tinción de Gram.....	87
Figura 39. Vista al microscopio de las bacterias puras	87
Figura 40. Inoculación al queso control por 15 min en inmersión	87
Figura 41. Muestras de queso control listas para ultracongelar y liofilizar	87
Figura 42. Muestras del queso control muestreado liofilizadas	87
Figura 43. Preparación de las muestras sobre un portaobjetos para llevar a espectrofotómetro de Raman.....	87

Figura 44. Muestras listas para procesar debidamente etiquetadas	87
Figura 45. Muestras ingresadas al microscopio Raman	87
Figura 46. Enfoque de la muestra a analizar	87
Figura 47. Lectura del espectro Raman con el láser 532 al 5 %.....	88
Figura 48. Interpretación y eliminación de ruido usando el Software Origin	88

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Acta de la sustentación de Predefensa del TIC	81
Anexo 2. Certificado del abstract por parte de idiomas	82
Anexo 3. Análisis microbiológico.....	84
Anexo 4. Análisis Raman	86
Anexo 5. Manual Compact Dry	89
Anexo 6. Normativa NTE INEN 1528: 2012 Queso fresco	99
Anexo 7. Normativa NTE INEN 2687: 2013 Mercados saludables	108

RESUMEN

El principal objetivo de esta investigación fue la comparación entre Compact Dry y espectroscopía Raman para determinar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de los mercados "Cepia", "Central" y "San Miguel" de la ciudad de Tulcán. De cada mercado se adquirieron 10 quesos frescos, cada uno de los quesos se dividieron en dos partes, una parte para realizar la determinación de *E. coli* y *S. aureus* utilizando Compact Dry. Y la otra parte se ultracongeló y liofilizó para realizar la espectroscopía Raman con láser de 532 nm con una potencia de 16 mW al 5 %, el espectro se evaluó en una longitud de onda de 0 a 4500 cm^{-1} . En los análisis microbiológicos para Compact dry XSA y EC en la determinación de *S. aureus* y *E. coli* en Log UFC/g se obtuvo para el mercado "Cepia" 4.41 y 4.21, para el "Central" 4.84 y 4.17 y para "San Miguel" 5.48 y 5.39, respectivamente; su metodología se completó en 23.3 h, con un costo de 8.11 dólares por muestra. Respecto a Espectroscopía de Raman se aplicó en un queso testigo en iguales condiciones a los obtenidos en los mercados, se lo inoculó con bacterias puras de *S. aureus* y *E. coli* para obtener sus espectros, en la longitud de onda 1100 cm^{-1} y 1150 cm^{-1} para *S. aureus*, y en la longitud de onda de 1000 a 1030 cm^{-1} para *E. coli*. Raman tiene un costo de 6.16 dólares por muestra y demora 22.67 h en completarse. El método más eficiente es la espectroscopía de Raman en función a costo y tiempo para realizar análisis microbiológico.

Palabras Claves: Queso fresco, Compact Dry, Espectroscopía de Raman, costo, tiempo.

ABSTRACT

The primary objective of this research was to compare Compact Dry and Raman spectroscopy for detecting *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheeses from the "Cepia", "Central", and "San Miguel" markets in the city of Tulcán. From each market, 10 fresh cheeses were acquired; each cheese was divided into two parts. One part was used to determine *E. coli* and *S. aureus* using Compact Dry, while the other part was ultrafrozen and lyophilized for Raman spectroscopy analysis using a 532 nm laser with a power of 16 mW at 5%. The spectrum was evaluated over a wavenumber range from 0 to 4500 cm^{-1} . In microbiological analyses using Compact Dry XSA and EC for determining *S. aureus* and *E. coli*, results were as follows: For the "Cepia" market, log UFC/g values were 4.41 and 4.21; for the "Central" market, they were 4.84 and 4.17; and for "San Miguel," they were 5.48 and 5.39, respectively; this methodology took approximately 23 hours to complete at a cost of \$8 per sample. Regarding Raman spectroscopy, it was applied to a control cheese under conditions similar to those obtained from market samples by inoculating it with pure cultures of *S. aureus* and *E. coli* spectra were obtained at wavenumbers around 1100 cm^{-1} and 1150 cm^{-1} for *S. aureus*, and between 1000-1030 cm^{-1} for *E. coli*. The cost per sample using Raman spectroscopy is \$6 per sample with an analysis time of approximately 22 hours. Raman spectroscopy proved more efficient in terms of both cost and time required compared to traditional microbiological methods.

Keywords: Fresh cheese, Compact Dry, Raman spectroscopy, cost, time.

INTRODUCCIÓN

Un producto que tiene gran aceptación por los tulcanesños es la cuajada o queso fresco que se expende en mercados de la capital del Carchi. El queso fresco sin sal se define como “un producto que se obtuvo por la separación del suero y las proteínas y no necesita maduración. Es un queso muy húmedo, con un porcentaje en agua de entre el 60 y 80 %, de un sabor suave y textura blanda” (Mundo lácteo, 2022).

La Norma NTE INEN 1528 (2012) menciona que el queso es un alimento que puede variar de texturas entre duro, semiduro, blando, extraduro, maduro o verde. En algunos casos, necesitan de un recubrimiento. Un queso debe cumplir con características microbiológicas, físicas y químicas asegurando que el producto que llegue al consumidor sea de calidad.

En la determinación de microorganismos patógenos en productos listos para el consumo humano, las industrias utilizan Compact Dry que son “placas miniaturizadas para el cultivo microbiológico que tiene como objetivo disponer de un procedimiento sencillo y seguro para determinar y cuantificar microorganismos en productos alimenticios” (Micro Planet, 2019).

Durante la última década están surgiendo nuevas metodologías para la determinación, cuantificación y caracterización de los microorganismos y una de ellas es la espectroscopía Raman, según Gutierrez & Otero (2014) La espectroscopía Raman es una técnica particularmente efectiva para caracterizar materiales orgánicos debido a su alta sensibilidad hacia enlaces covalentes simétricos con un momento dipolar pequeño. Los enlaces C-C presentes en los alótropos del carbono cumplen con este criterio, lo que permite que la espectroscopía Raman proporcione información detallada sobre sus estructuras.

I. EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria alimentaria, particularmente la producción de lácteos enfrenta desafíos significativos en la determinación temprana y detallada de microorganismos patógenos en quesos frescos. La existencia de agentes patógenos en estos productos puede plantear serios riesgos para la salud pública (Aguilera et al., 2014).

Las enfermedades ocasionadas por la ingesta de alimentos contaminados, conocidas como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), son el origen de muchos padecimientos a nivel global debido a la presencia de componentes químicos y microbiológicos en alimentos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 1.8 millones de personas fallecen anualmente debido a enfermedades diarreicas, con un 70 % de los casos vinculados a la transmisión de enfermedades a través del consumo de alimentos. Los riesgos asociados con las ETA pueden surgir en diversas etapas a lo largo de la cadena productiva, desde el origen de la materia prima, su procesamiento, almacenamiento y consumo (Organización Panamericana de la Salud, 2023).

La calidad e inocuidad son características primordiales dentro del área de los alimentos, su cumplimiento debe ser estrictamente controlado por entidades gubernamentales con la finalidad de prevenir las ETA, debido a ser las causantes de alergias, intoxicaciones y hasta la muerte de las personas por negligencia de las industrias productoras de alimentos (Organización Panamericana de la Salud, 2023).

Los microorganismos indicadores de calidad en el queso fresco son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriáceas*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. La presencia de estas bacterias en el queso representa un mal manejo de la materia prima, mal procesamiento y mala manipulación del alimento, evidenciando que existe una contaminación microbiológica importante presentando un incumplimiento de la norma NTE INEN 1528: 2012.

Los quesos frescos que son elaborados de forma artesanal a base leche no pasteurizada y cuajo comercial representan un foco infeccioso debido a que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos patógenos que afectan la salud pública y su presencia en los productos se debe a la poca o nula realización de estudios y análisis previos de calidad a la materia prima como pH, acidez y sólidos totales, los cuales son importantes para determinación del estado de la materia prima con la cual se realizaron los quesos. Cabe recalcar que las políticas ecuatorianas exigen que todos los productos alimenticios vendidos en establecimientos autorizados deben cumplir normas de higiene estrictas y estar sometidos a controles rigurosos por parte de las autoridades competentes (Martínez et al., 2014).

Los mercados ecuatorianos, principalmente los de la provincia del Carchi, son centros en los que se expenden alimentos que por "cultura general" su elaboración es artesanal como la del queso fresco o cuajada que carecen de un registro sanitario, análisis microbiológicos y sensoriales. Por lo tanto, se considera un punto crítico que debe controlarse y realizarse una estricta inspección a las personas que expenden estos alimentos (Vaca et al., 2016).

Es crucial identificar con rapidez los microorganismos percederos y los microorganismos indicadores de calidad ya que, por las condiciones ambientales de la región y la composición del producto, existen altas probabilidades de que haya una contaminación microbiológica, para ello existen metodologías rápidas de detección de microorganismos que implican métodos de enriquecimiento selectivos y no selectivos que cuantifican la cantidad de microorganismos presentes en el alimento. El tiempo de detección de un patógeno es clave al examinar productos alimenticios, en particular aquellos de breve duración, como la carne, pescado, productos lácteos (Ferone et al., 2020).

En la actualidad, los métodos convencionales de detección de microorganismos patógenos en quesos frescos sin sal presentan limitaciones considerables en términos de sensibilidad y especificidad además de una variación en cuanto a tiempo y costo. Esto no solo compromete la capacidad de las industrias lácteas para garantizar la seguridad de sus productos, sino que también dificulta el cumplimiento de las normativas y regulaciones sanitarias establecidas por las autoridades competentes (Martínez y Rivera, 2020).

Las metodologías rápidas de detección microbiológica presentan varias limitaciones, una de estas es que son laboriosas ya que requieren de experticia a la hora de realizar los cultivos además de que demandan mucho trabajo debido a que los procedimientos son largos y los periodos de incubación van desde días hasta semanas contando desde el procesamiento de la muestra, cultivo, y la detección del microorganismos, en ocasiones, cuando las muestras tienen cultivos mixtos se deben realizar aislamientos para la diferenciación entre varias especies de patógenos y los resultados se obtienen entre 3 a 7 días para la confirmación, estos métodos demoran mucho en dar un resultado preciso, además de que los costos a largo plazo incrementan por el uso permanente de insumos y materiales (Martínez y Rivera, 2020).

La microbiología tradicional, hace uso de diferentes métodos para el diagnóstico de detección de diferentes microorganismos indicadores y patógenos usando métodos selectivos y de identificación bioquímica, sin embargo, carecen de especificidad y existe la falta de discriminación entre cepas de patógenos y no patógenos, en algunas ocasiones las pruebas no identifican entre células viables o no viables, inclusive si los microorganismos están vivos o no. (Huertas et al., 2019).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es la espectroscopia Raman una metodología más rápida, precisa y económica para la detección de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal con respecto a Compact Dry?

1.3. JUSTIFICACIÓN

En muchos países de América Latina, la producción artesanal de quesos frescos es una fuente clave de ingresos de las comunidades campesinas que comercializan los productos en los mercados de la localidad con la finalidad de adquirir un valor monetario. En Ecuador gran parte de la producción del queso fresco es realizado de forma artesanal, se producen aproximadamente 10 907 947 kilogramos de queso fresco anualmente, de las cuales el 35 %, se estima, que es artesanal. En la última década la demanda del queso aumentó 126 % significando una per cápita de 1.7 Kg y se prevé un crecimiento del 5.6 % en los próximos años (Padillos, 2020).

El sector lácteo produce anualmente 1.833 millones de litros de leche y el Producto Interno Bruto de este sector asciende a los 700 millones de dólares y representan el 8% del PBI agropecuario y el 0.6 % del PBI total. La producción diaria de leche estimada es de 5 MM de las cuales el 27 % está destinado al autoconsumo donde se elabora

queso fresco de manera artesanal, el 73 % es vendido a la industria y el 6 % se destina a la elaboración de quesos. El queso es el tercer producto lácteo que registra mayor consumo en el país para el año 2019 (Vega y Salgado, 2019).

La determinación microbiológica de los indicadores de la calidad como: *E. coli* y *S. aureus* en los alimentos debe ser rápida y eficaz, y más aún en alimentos que se consumen directamente, como algunos de los derivados lácteos, específicamente en quesos frescos sin sal. La seguridad alimentaria y la salud pública son los principales objetivos que se deben cumplir para fabricar y expender productos al público. Los quesos frescos sin sal, debido a su naturaleza no curada y su alto contenido de humedad, representan un entorno propicio para el crecimiento bacteriano, incluyendo aquellos con potencial patógeno. La existencia de patógenos en los lácteos puede resultar en serios riesgos para la salud pública, causando ETA y dañando la reputación de la industria láctea (Granados y Pérez, 2020).

Entre las metodologías emergentes para la detección microbiológica está la espectroscopía que ofrece una serie de ventajas potenciales para abordar estos desafíos al ser una técnica de análisis superficial no destructiva y altamente sensible, la espectroscopía Raman tiene el potencial de identificar y caracterizar la ausencia/presencia de microorganismos de importancia médica en la superficie e interior de los quesos frescos sin sal de una manera rápida y precisa siendo un método de detección más confiable y eficiente para mejorar la calidad de los productos lácteos (Edinburg, 2021).

La espectroscopia Raman es una metodología de alta precisión porque proporciona información química, detectando componentes que están presentes en pequeñas cantidades en la muestra analizada, brinda los resultados de manera rápida (en minutos), aunque el costo inicial por unidad de producción puede ser alto al inicio debido a la adquisición del equipo Raman, la capacidad para realizar múltiples análisis, además de la detección microbiológica, reduce los costes a largo plazo (Valera et al., 2018).

La espectroscopia Raman es un método fisicoquímico de gran utilidad para la identificación rápida de microorganismos, ya que puede obtener una huella espectral de una muestra microbiana, proporcionando información tanto cuantitativa como cualitativa que puede utilizarse para identificar y caracterizar microorganismos tanto en mezclas bacterianas como a nivel de célula individual. La

tecnología ha avanzado significativamente en los últimos años, gracias a las mejoras en la calidad de la señal y la aparición de instrumentos y software fáciles de usar, haciendo que este método de ciencia física sea accesible a los no especialistas para aplicaciones biológicas como la identificación microbiana (Fariñas, 2022).

Es imperativo investigar y desarrollar un enfoque integral que utilice la espectroscopía para la detección precisa y sensible de microorganismos patógenos, también es necesario realizar un análisis microbiológico en quesos frescos sin sal, con el fin de garantizar la calidad de los productos lácteos que se van a ofertar en los puntos de distribución al consumidor.

Por lo tanto, la implementación de la espectroscopía de Raman en la detección de patógenos en quesos frescos contribuye a la protección del consumidor final, además de que fortalece la competitividad de la industria láctea al garantizar la conformidad con los estándares regulatorios y la confianza del consumidor. Esta investigación es esencial para fomentar avances significativos en la tecnología de detección de patógenos y en la seguridad alimentaria.

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Evaluar los métodos Compact Dry y Espectroscopía Raman para la determinación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal que se expenden en los mercados de la ciudad de Tulcán.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en quesos frescos sin sal de los Mercados Cepia, Central y San Miguel de la ciudad de Tulcán usando placas de Compact Dry.
- Determinar los espectros que identifican la presencia de los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentes en quesos frescos sin sal.
- Comparar los métodos establecidos en función a costo y tiempo acorde a las necesidades de la industria alimentaria.

1.4.3. Preguntas de Investigación

- ¿Qué cantidad de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* están presentes en los quesos frescos sin sal usando placas Compact Dry XSA y EC en los

mercados de Tulcán?

- ¿Se identifica la presencia/ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en las muestras de queso de los mercados de la ciudad de Tulcán mediante Espectroscopia Raman?
- ¿Cuál metodología será la más adecuada para aplicar en las industrias en base a costo y tiempo para la detección microbiológica?

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Vásquez et al., (2018) "Evaluación de la calidad bacteriológica en quesos frescos en Cajamarca, Perú" en su estudio llevaron a cabo una investigación donde se evaluó la calidad microbiológica de quesos frescos industriales en la ciudad de Cajamarca, Perú. Tuvo como objetivo determinar la carga microbiana del queso fresco, siguiendo las normativas establecidas por el Ministerio de Salud. Se evaluaron 6 empresas productoras de queso y se analizaron *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella spp* mediante placas PCR y Compact Dry, Los resultados mostraron valores significativos: 1.6×10^5 UFC/g para mesófilos viables; 6.32×10^3 NMP/g para coliformes totales; 4.75×10^3 NMP/g para coliformes fecales; una prevalencia del 33.3 % para *E. coli*; y una concentración promedio de *S. aureus* de 4.02×10^3 UFC/g sin presencia detectable de *Salmonella spp*. De este estudio se tomaron los resultados de *E. coli* y *S. aureus* y la metodología para la detección de estos microorganismos.

Escobar et al., (2023) "Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en un mercado, de la ciudad de Riobamba" evaluaron la inocuidad y calidad del queso fresco comercializado en un mercado de Riobamba, Ecuador. A través del análisis microbiológico exhaustivo, da como resultado la presencia de patógenos como Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En este estudio se utilizaron métodos tradicionales como Placas Petrifilm 3M y pruebas confirmatorias en Placas Petri junto con antibiogramas mediante el método Kirby Bawer. Los resultados mostraron altas concentraciones bacterianas: 1.3×10^6 UFC/g de *S. aureus*, 7×10^5 UFC/g de *E. coli* y 8.5×10^5 UFC/g de coliformes totales. Estos valores superan significativamente los límites permitidos para consumo humano según normativas nacionales e internacionales. Estos resultados se compararán con los UFC/g de *E. coli* y *S. aureus* de este estudio.

Dewantier et al., (2023) "Identifying Chemical Differences in Cheddar Cheese Based on Maturity Level and Manufacturer Using Vibrational Spectroscopy and Chemometrics" se centraron en la caracterización química del queso cheddar, analizando el nivel de madurez mediante la espectroscopía infrarroja (FTIR) y la

espectroscopía Raman. Se recopilaron los espectros Raman utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Raman Station 400 con el detector enfriado a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo de exposición de 5 s (12 acumulaciones) y láser de excitación a 532nm con 250 mW de potencia. Los hallazgos del estudio revelaron que las variaciones en la composición química, particularmente en los perfiles de lípidos y proteínas, son significativas entre los quesos de diferentes edades y productores. Se tomó como referencia la Figura 1, donde se nombran los picos en las longitudes de onda de 500 a 3500 cm^{-1} , para comparar con los espectros encontrados.

Nakar et al., (2022) "Detection of multi-resistant clinical strains of *E. coli* with Raman spectroscopy" se centraron en la detección de cepas clínicas de *Escherichia coli* multiresistentes mediante la espectroscopía Raman para diferenciar entre cepas resistentes y sensibles. Se recopilaron los espectros Raman utilizando un espectrofotómetro (HR800, Horiba/Jobin-Yvon) 800 con el detector enfriado a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo de exposición de 15 s (12 acumulaciones) y láser de excitación a 532nm con 18 mW de potencia. Los investigadores recolectaron espectros en masa y micro espectroscopía Raman de una sola célula. Se identificó la longitud de onda en 1000 a 1030 cm^{-1} , donde se encuentra un anillo de L-fenilalanina propio de *E. coli*.

Rebrošová et al., (2017) "Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy" se enfocaron en la identificación rápida de 16 especies de estafilococos utilizando espectroscopía Raman, una técnica que ha demostrado ser eficaz en la caracterización de microorganismos, se analizaron las muestras directamente desde colonias bacterianas cultivadas en placas de agar Mueller-Hinton. Se recopilaron los espectros Raman utilizando un espectrofotómetro Renishaw inVia Raman Spectrometer, Renishaw plc., Wotton-under-Edge, Reino Unido 500 con el detector enfriado a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo de exposición de 15 s (10 acumulaciones) y láser de excitación a 532nm con 15 mW de potencia y se identificó la presencia de carotenoide estafiloxatina propio de *S. aureus* en una longitud de onda de 1100 a 1150 cm^{-1} .

Ortega et al., (2015) "Posible uso de espectroscopía Raman como herramienta de análisis en la producción y control de calidad de bacanora" examinaron la factibilidad de utilizar la espectroscopía Raman como instrumento analítico en la fabricación y supervisión de la calidad de la bacanora, una bebida alcohólica

tradicional de México. Este enfoque se basa en la capacidad de la espectroscopía Raman para identificar componentes químicos sin necesidad de preparar las muestras o tener contacto físico con ellas. Los resultados del estudio están enfocados en aplicabilidad, costo y legalidad.

Granados y Pérez (2020) "Metodologías microbiológicas como herramientas de verificación, control y calidad en la industria de alimentos y bebidas" abordan la importancia de las metodologías microbiológicas en el control y verificación de la calidad en las industrias de bebidas y alimentos, este trabajo destaca cómo las técnicas microbiológicas son fundamentales para detectar contaminantes microbiológicos con el objetivo de que se cumplan con los estándares establecidos. Comparando metodologías rápidas para la determinación microbiológica y sus costos. Se tomará como referencia la Tabla. N°1. "Cuadro comparativo entre métodos microbiológicos rápidos para la Industria de Alimentos y Bebidas" y el tiempo de respuesta por método.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Queso

2.2.1.1. Definición

El Instituto Ecuatoriano de Normalización en su norma NTE INEN 1528 (2012), establece que es "producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche" (pág. 1); que por acción de coagulantes específicos permite la separación del suero, obteniéndose la concentración de proteína láctea, donde por técnicas de elaboración deben brindar propiedades químicas, físicas y sensoriales.

Además, en el estudio realizado por López (2023) se indica que "el queso es resultado de una precipitación o coagulación de las caseínas de la leche, que representan un 80 % de la composición de las proteínas de la leche" esta leche es producida por las hembras de animales como vacas, cabras, ovejas, camellas, etc.

2.2.1.2. Tipos de quesos

La variedad de quesos actualmente se ve reflejada en las costumbres, cultura, hábitos alimentarios, etc.; sin embargo, entre los más comunes la NTE INEN 1528 (2012) menciona:

- **Queso madurado:** es aquel que luego de la elaboración no está listo para el consumo, debe conservarse en condiciones específicas y por un tiempo prolongado hasta conseguir cambios bioquímicos, físicos y característicos del queso.

Para obtener este tipo de queso es necesario almacenarlo en un ambiente natural o controlado como una bodega o cámaras que pueda mantener la temperatura entre 8 a 12 °C. Así mismo se pueden clasificar los quesos maduros por su tiempo de reposo, siendo los tiernos los que han sido madurados por mínimo 7 días, los semi maduros con un tiempo mínimo de 20 días y los maduros con un tiempo de 100 días.

- **Queso madurado por mohos:** se refiere a una maduración generada por el crecimiento de ciertos tipos de mohos en el exterior e interior del queso.

Estos tipos de hongos, como el *Penicillium*, contribuyen a potenciar características organolépticas como el gusto y la fragancia. Un claro ejemplo de estos quesos son el queso azul, también conocido como roquefort.

- **Queso no madurado:** es aquel que luego de su producción se puede consumir.

Se puede indicar que este tipo de quesos tienen como característica principal su alto contenido de humedad que oscilan entre 70 a 85 %. Es muy consumido debido a su bajo contenido de grasas, su textura blanda, alta concentración de proteínas y que posee nutrientes siendo el calcio el principal en su composición.

- **Queso fresco:** denominado también queso blanco, es aquel que no ha sido madurado, ni escaldado; sino el desarrollado con leche entera a la que se le agrega un coagulante para tener características propias y particulares de este producto.

- **Queso cottage:** se elabora con leche descremada, cultivos lácticos o enzimas para obtener una textura suave, cremosa, de alta humedad, y con un contenido de grasa menor al 2 % (m/m), se caracteriza por su textura granulada y grumosa, esto debido a que no pasa por un proceso de prensado que compacte su estructura.

- **Queso quark:** es un queso no madurado y sin escaldarse, posee una textura blanda al ser elaborado con leche descremada, cultivos lácticos y enzimas.

Es un queso europeo y característico por su parecido con el yogurt griego, esto por su alto contenido de humedad siendo mayor a 80 % dándole una textura cremosa.

- **Queso ricotta:** posee una textura granular suave, alto contenido de humedad y es conocido porque se obtiene del suero de la leche, donde su coagulación se desarrolla con el suministro de calor, cultivos lácticos y ácidos orgánicos.
- **Queso crema:** característico por su contenido alto en grasa, ser elaborado únicamente con crema y cultivos lácticos para una textura homogénea, cremosa y no granulada.
- **Queso duro:** es aquel que lleva una etapa de prensado, y tiene una textura dura desmenuzable, donde su contenido de grasa varía dependiendo del tipo de leche utilizada.
- **Queso mozzarella:** posee una textura elástica y suave denominada pasta filamentosa, dichas características son el resultado de aplicar un escaldado y moldeado. Este queso no tiene corteza por ello puede generar diversas formas siendo relativamente fácil su envase, esto también gracias a que no contienen un nivel alto de humedad.
- **Queso requesón:** se obtiene por la coagulación de las proteínas presentes del suero, siendo así que el requesón un queso que se produce sin necesidad que generar un tratamiento, este tipo es muy propenso a dañarse por lo que es recomendable que su consumo sea de manera rápida.
- **Queso de hoja:** es aquel que hace uso de una acidificación natural con bacterias mesófilas no patógenas, que anterior al hilado se somete a calor para finalmente envolver en una hoja de achira.
- **Queso manaba:** además de una acidificación con bacterias mesófilas originaras en Manabí, se usa sal de grano y se prensa.
- **Queso amasado lojano:** es aquel queso que además de su acidificación natural tiene etapas de secado, molido, prensado y se envuelve en hoja de achira.
- **Queso amasado carchense:** se define como aquel queso resultante de cuajada sin cortar, de acidificación natural y con etapas de molido, salado, amasado, moldeado y prensado.

2.2.1.3. Propiedades Fisicoquímicas del queso fresco

Las propiedades fisicoquímicas del queso fresco de acuerdo con la normativa NTE INEN 1528 (2012) establecen para: humedad, un máximo del 80 % y un rango óptimo de 40 a 55 %; proteína, de 2 a 7 % dependiendo de la metodología de elaboración; grasa, entre 15 a 25 %; acidez, entre 3 a 7; y el pH, de 4 a 7.

Respecto a los nutrientes, debe presentar valores no mayores al 2 % que compone a este tipo de quesos, entre los principales nutrientes se encuentra el sodio con un contenido de 500 mg, calcio con 400 mg y vitamina A con 200 µg, estos valores en base a 100 g de queso muestran.

2.2.1.4. Propiedades sensoriales del queso fresco

Las propiedades sensoriales del queso fresco varían según los ingredientes y procesos utilizados. En cuanto a textura, son suaves (por su contenido de agua) y firmes (por el uso de prensas para eliminar el suero interno); por parte del sabor, presenta un leve dulzor por efecto de la lactosa residual; respecto a su color, son blancos ya que no son sometidos a una maduración o la adición de colorantes; y su aroma, es característico a leche fresca (Andrade, 2023).

2.2.1.5. Diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco

A continuación, en la Figura 1 se presenta las etapas necesarias para la producción de queso fresco.

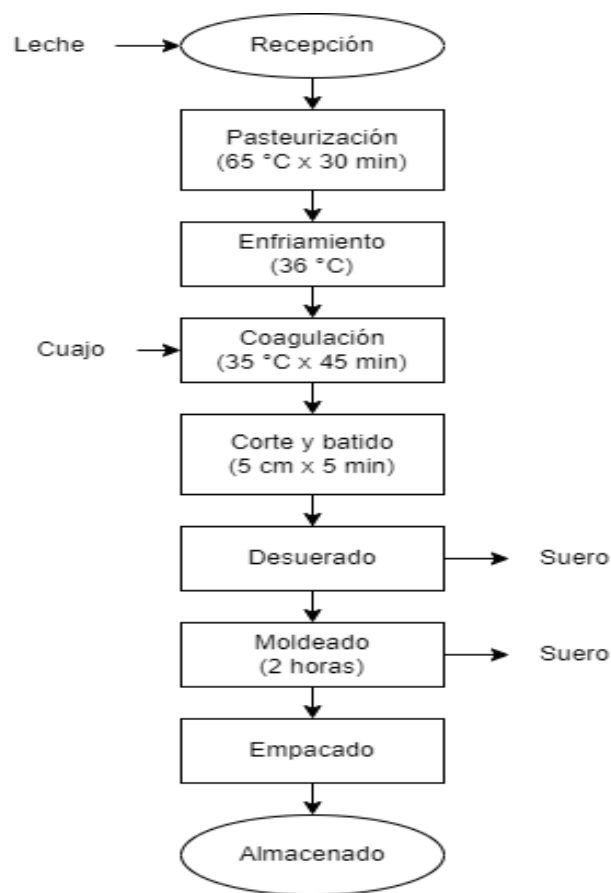


Figura 1. Diagrama de flujo del queso fresco.

2.2.1.6. Defectos del queso fresco

Los defectos que se generan en el queso fresco están presentes por malas prácticas durante la cadena de producción, estos defectos como lo indica Saito (2014) se presentan a continuación:

2.2.1.6.1. Defectos físicos

- **Grietas:** se pueden producir por una deficiente coagulación de las proteínas debido a una falla de la cuajada, también por motivo de un moldeo fallido al igual que la leche tenga un nivel de acidez alto. Otro posible motivo puede radiar en el procedimiento de desuerado excesivo, obteniéndose así un queso seco.

Por parte la parte de acusas pueden ser por acciones mecánicas como por golpes, esto por motivos de transporte o manipulación.

- **Deformaciones:** esto se genera principalmente en los procesos de moldeo, ya sea por un excesivo o insuficiente fuerza de la prensa para desuerar el queso, también por defectos en los moldes empleados.

- **Hinchazón:** Generando gas producido por la fermentación de la lactosa.

2.2.1.6.2. Defectos del sabor y olor

Los defectos del sabor y olor son principalmente producidos por una carencia y/o deficiencia en la fabricación del queso, entre las posibles causas están:

- Niveles elevados de acidez en la leche
- Cuajos de mala calidad
- Niveles bajos de grasa
- La temperatura de calentamiento de la cuajada se eleva con rapidez
- Coagulación ineficiente con presencia excesiva de humedad
- Desuerado insuficiente
- Presencia microorganismos (*Pseudomonas*)

2.2.1.7. Defectos del queso fresco por presencia de microorganismos

El queso fresco adquiere diversos defectos debido a la presencia de microorganismos, pues como lo explica Merchán et al., (2019) "Los microorganismos en ocasiones pueden provocar fermentaciones inesperadas o la aparición de mohos no deseados que ocasionan alteraciones sensoriales, como cambios en la textura, sabor y el aroma".

De acuerdo con Molleda (2016) "Entre los microorganismos que provocan defectos notables en el queso fresco se pueden encontrar a las *Enterobacteriáceas*, que es un grupo que abarca diversas especies bacterianas perjudiciales", entre ellas están:

- ***Escherichia coli*:** Ciertas cepas de *Escherichia Coli* como la O157:H7 pueden producir compuestos que alteran la calidad del queso, estas están relacionadas con sabores amargos y texturas inusuales en el producto. Tiene la capacidad de fermentar a glucosa y lactosa presentes en el producto, siendo el grupo de los lácteos el más afectado. Crece en pH de 4 a 7 y se proliferan en temperaturas de 20 a 40 °C.
- ***Staphylococcus aureus*:** El *Staphylococcus aureus enterotoxigénico* genera toxinas en el queso y estas si son consumidas pueden ocasionar intoxicaciones alimentarias. Se desarrollan en alimentos proteolíticos, en aW de 0,83 a 0,99 y en un pH de 4 a 10, siendo de 5 a 7 lo óptimo.
- ***Listeria monocytogenes*:** La *Listeria monocytogenes* ocasiona cambios físicos

generando áreas blandas y además formación de burbujas en el queso además de ocasionar un sabor amargo o rancio.

- **Salmonella:** su presencia puede causar producir fisuras y formación de agujeros en el queso debido a la producción gas (CO₂), esto ocasiona que se acelere el proceso de deterioro del queso.

2.2.2. Enfermedades causadas por microorganismos

- **Enterobacteriáceas**

Son microorganismos que se encuentran en cualquier medio, es por lo que estas bacterias son de importante interés en el área de la salud, dado que al ingresar en el cuerpo producen intoxicación, fiebre, tifoidea, peste, viruelas y demás enfermedades infecciosas capaz de llevar a la muerte a la persona (Molleda, 2016).

- **Escherichia coli**

La cepa más conocida por su alto grado de peligrosidad es *E. coli* O157:H7 que genera diarreas descontroladas con sangre, calambres abdominales, dolores de cabeza, deshidratación, daños renales que son causados en las personas que logran ingerir esta bacteria (Molleda, 2016).

E. coli es un bacilo, anaerobio facultativo, Gram negativo, termo tolerante, que se la puede encontrar en el tracto intestinal de los humanos, aunque algunas cepas no causan daños mayores, existen algunas que mutan y pueden causar gastroenteritis, infecciones del tracto intestinal y sepsis. Se identifica mediante su serotipificación y x-glucorónico que pinta de color azul (Doyle et al., 2019).

- **Staphylococcus aureus**

Este microorganismo es el responsable de producir la enterotoxina B estafilocócica (SEB) y esta genera la intoxicación alimentaria de las personas que lo consumen, infecciones en la piel, neumonía, osteomielitis, endocarditis, infección de los tejidos blandos en la persona portadora (Merchán et al., 2019).

Son cocos Gram positivos, aerobios mesófilos, productores de enterotoxinas estafilocócicas (SE), catalasa y coagulasa positivo, poseen proteínas que evaden el sistema inmunológico, se encuentran en la piel, mucosas de los humanos. A esta bacteria se le atribuyen diversas infecciones gastrointestinales además de endocarditis y neumonía, es por ello que algunas cepas de esta bacteria son

consideradas de importancia médica (Doyle et al., 2019).

- **Listeria monocytogenes**

La listeriosis es una de las enfermedades más representativas de este microorganismo, es un tipo de infección grave y su causa más frecuente es el consumo de alimentos que estén contaminados, produce la muerte del feto, cerebritis, meningitis, endocarditis afecciones más comunes de esta bacteria (Aguilera et al., 2014).

- **Salmonella**

La salmonella causa fiebre, cólicos, diarrea con presencia de sangrado (Molleda, 2016).

2.2.3. Metodología para determinación de microorganismos

Uno de los análisis fundamentales para establecer la calidad en los productos finales que llegan al consumidor son los análisis microbiológicos donde se identifican microorganismos indicadores, su presencia indicaría un desfaz y poco control a la hora de la elaboración del producto (Dávila y Hernández, 2006).

Existen varias metodologías para la determinación microbiológica que ayudan a la detección rápida de los microorganismos indicadores, y es responsabilidad de las empresas alimentarias cumplir las normativas vigentes con las cuales se rigen para garantizar la salud del consumidor.

Por ello es imperativo el uso de técnicas rápidas y eficaces que ayuden a la empresa/laboratorio de alimentos a una rápida detección para poder declarar que el producto final cumple con la calidad necesaria para llevar el producto al mercado.

2.2.3.1. Métodos de detección

Los métodos de detección microbiológica se clasifican en 3 y estos son:

- **Fenotípicos:** utilizan características morfológicas o de reacciones bioquímicas y son fáciles de observar, un ejemplo es las Tinción de Gram donde se observa la pared celular y se identifica su morfología para clasificar en Gram positivas y negativas.
- **Genotípicos:** este método usa el ADN de los microorganismos, y su identificación es genética.

- **Maldi - Tof:** se identifican los microorganismos a través de las proteínas de este, sus resultados son más rápidos y precisos.

Existen otras metodologías según Santiago (2024) que aunque no son muy usadas, son técnicas emergentes que tienen alta sensibilidad.

- **PCR:** también denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa, se usa para identificar el ADN de los microorganismos, estableciéndose la presencia/ausencia del microorganismo.
- **Luminiscencia:** usando un hisopo se toma una muestra, luego se ingresa en un equipo que detecta la luz que emiten los microorganismos.
- **Espectrometría de masas:** analiza los patrones de masas y la turbidez de la muestra.
- **Espectroscopia:** se ingresa la muestra y se compara la presencia de compuestos propios de las bacterias a longitudes de onda específicas.
- **Petrifilm:** se inocula la muestra en una de las placas para incubarla por 24 horas.
- **Compact Dry:** son unas placas cromogénicas específicas para cada microorganismo, fácil de cuantificar, so listas para usar, se incuban por 24 horas.

Para escoger las metodologías de detección de microorganismos, se deben tener en cuenta las necesidades que tiene la industria, varios criterios que son importantes a considerar son los costos, el tiempo que tarda en dar los resultados y el tiempo invertido para obtenerlos, la sensibilidad de la metodología y la efectividad del métodos sin falsos negativos ni positivos (Santiago, 2024).

En cuanto al análisis microbiológico en quesos frescos, debe tener la ausencia de microorganismos patógenos, las metodologías o ensayos se definen en las normas ecuatorianas donde se especifican los requisitos y los pasos a desarrollar para su detección, por ejemplo:

- **Enterobacteriáceas**

Para el estudio de Enterobacteriáceas, es crucial considerar su habilidad para generar ácidos a partir de glucosa. Por lo tanto, se utiliza un conteo en placa por cada siembra en profundidad en agar cristal VRBG (violeta-rojo neutro-bilis-glucosa) a una temperatura de incubación de 37 ± 1 °C. (NTE INEN 1529-13, 1998). Mediante Compact Dry se usa la placa específica de Compact Dry ETB (Compact Dry, 2020).

- ***Escherichia coli***

La metodología para identificar *E. coli* de manera oficial es la norma AOAC 991.14, la cual consiste en la siembra de diluciones en placas Petrifilm EC mediante el método de film seco rehidratable. El procedimiento consiste en preparar diluciones de la muestra en una solución salina estéril, luego sembrar las diluciones en las placas Petrifilm, incubar a 35 ± 1 °C durante 48 ± 2 h, y contar las colonias de color azul con o sin gas (3M Food Safety, 2017). Mediante Compact Dry se usa la placa específica de Compact Dry EC (Compact Dry, 2020).

- ***Staphylococcus aureus***

La metodología establecida en esta normativa para detectar *S. aureus* requiere la utilización del medio de cultivo agar Baird-Parker. Este procedimiento se basa en la cercana analogía entre la generación de coagulasa y su habilidad para emplear la lipoproteína presente en la yema de huevo y transformar el telurito en telurio. Las cepas que presenten una reacción negativa a la coagulasa o una respuesta levemente positiva a la coagulasa pueden ser distinguidas de otras bacterias a través de exámenes adicionales, como la identificación de termonucleasa (NTE INEN 1529-14, 1998). Mediante Compact Dry se usa la placa específica de Compact Dry XSA (Compact Dry, 2020).

- ***Listeria monocytogenes***

Según la norma ISO 11290-1 (2017) la determinación de este microorganismo consiste en preparar la muestra en un medio de cultivo selectivo y se incuba durante un tiempo determinado para permitir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, luego contabilizar las colonias y expresarlas en UFC/g o UFC/cm². Mediante Compact Dry se usa la placa específica de Compact Dry LS (Compact Dry, 2020).

- ***Salmonella***

La identificación de *Salmonella* requiere de cuatro fases: el pre - enriquecimiento, donde la muestra se cultiva a 37 °C; el enriquecimiento selectivo, donde se subcultiva a 37 °C y de 42 a 43 °C en medios líquidos selectivos para fomentar la proliferación de *Salmonella*; la coloración en placas en medios sólidos selectivos, donde los cultivos se inoculan en la superficie de placas de agar selectivo y diferencial para detectar colonias que indican la presencia de *Salmonella* (NTE INEN 1529-15, 2009). Mediante Compact Dry se usa la placa específica de Compact Dry SL (Compact Dry, 2020).

2.2.4. Espectroscopía

2.2.4.1. Definición

La espectroscopía se ocupa del análisis de la cantidad de luz que un material refleja, absorbe, libera y evalúa las distintas longitudes de onda de la luz visible y no visible. Esto le facilita su uso en investigaciones químicas, físicas y biológicas, entre otras.

El estudio de la espectroscopía se centra en 6 fenómenos ópticos: fluorescencia, quimioluminiscencia, emisión, fosforescencia, absorción y difusión. Este estudio espectral identifica la liberación y recepción de la radiación electromagnética a determinadas longitudes de onda. Considera los niveles energéticos vinculados a una transición cuántica (IEQFB, 2021).

La espectroscopia se centra en analizar la relación entre la materia y la radiación, generando una longitud de onda. En la actualidad, la espectroscopia implica el uso de materiales que absorben, liberan o dispersan radiación electromagnética para examinar un asunto de manera cualitativa o cuantitativa. La espectroscopia Raman es un método espectroscópico empleado para el estudio cuantitativo de prácticamente cualquier material, ya sea orgánico o inorgánico. Sus mayores beneficios radican en que no se requiere preparar muestras para su análisis y es un procedimiento no destructivo (Gutierrez y Otero, 2014).

2.2.4.2. XPS

Como indica el estudio de Hernández (2018) "es una técnica de análisis de superficies que se utiliza en investigaciones y aplicada en áreas de la física y química. Esta técnica permite estudiar la composición química y la estructura de la superficie de materiales al enviar rayos X de alta energía a su superficie con una energía típica de alrededor de 1 keV". Esta técnica se destaca por su capacidad de proporcionar información sobre los elementos presentes en la superficie de un material, cuantificarlos y bajo condiciones específicas puede determinar estados de oxidación.

2.2.4.3. Raman

Gutierrez y Otero (2014) mencionan que "La espectroscopía Raman es una técnica adecuada para caracterizar elementos químicos como Carbono, Oxígeno e Hidrógeno, que conforman las moléculas orgánicas, es muy sensible a enlaces

covalentes altamente simétricos con momento dipolar pequeño. Los enlaces C-C que componen los alótopos de carbono encajan perfectamente en este criterio, y es por eso que la espectroscopía Raman es capaz de proporcionar una gran cantidad de información sobre sus estructuras".

La espectroscopia Raman requiere cambiar la polarizabilidad para obtener información espectral adicional sobre moléculas homo nucleares usando un láser de alta densidad dispersando las moléculas y estas son captadas por el espectrofotómetro donde se diferencia la luz incidente y la luz dispersa y a este cambio se le denomina Raman. Se obtiene un espectro donde el eje vertical es la intensidad de la luz dispersada en unidades arbitrarias (u.a.) y el eje horizontal es el número de onda Raman (cm^{-1}), presentado en la Figura 2 (Nandi, 2021).

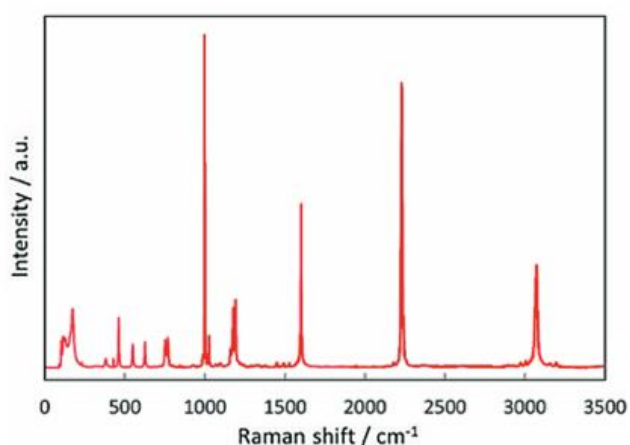


Figura 2. Espectro Raman.
Fuente. (Edinburg, 2021)

2.2.4.3.1 Fundamentos Raman

Un haz monocromático de ν_0 incide en la muestra y la mayoría de la luz se dispersa de manera elástica (dispersión de Rayleigh), sin embargo, una porción de la luz también se dispersa de manera inelástica y, por ende, su frecuencia varía. Las variaciones en estas frecuencias son propias de las propiedades químicas y del estado físico de la muestra, por lo tanto, son información que facilita la identificación de varios compuestos y características moleculares.

En términos microscópicos, este fenómeno se caracteriza por una nube de electrones que provoca la excitación de la molécula a través de la interacción con el fotón entrante. Esto provoca que la molécula se vuelva excitada a un estado virtual excitado, y después emita otro fotón con la intención de volver al estado

fundamental (Gutierrez y Otero, 2014).

Las dispersiones electrónicas pueden clasificarse de la siguiente manera:

- **Dispersión de Rayleigh:** es un fenómeno óptico fundamental que ocurre cuando la luz interactúa con partículas pequeñas, como moléculas de gas o partículas de polvo, cuyo tamaño es considerablemente menor que la longitud de onda de la luz incidente, estas partículas pueden dispersar la luz y hacer que se “desvíe” en diferentes direcciones.
- **Dispersión Raman-Stokes:** Puede suceder cuando el choque es inelástico, por ende, su frecuencia emitida es menor, transfiriendo la energía hacia la molécula transformando su estado de reposo en un estado vibracional.
- **Dispersión Raman Anti-Stokes:** Aunque se usa para choques inelásticos, se diferencia de la dispersión Raman-Stokes en que la frecuencia del fotón es mayor haciendo que la molécula decaiga a su estado mínimo de energía.

En la Figura 3 se indica la diferencia de las dispersiones.

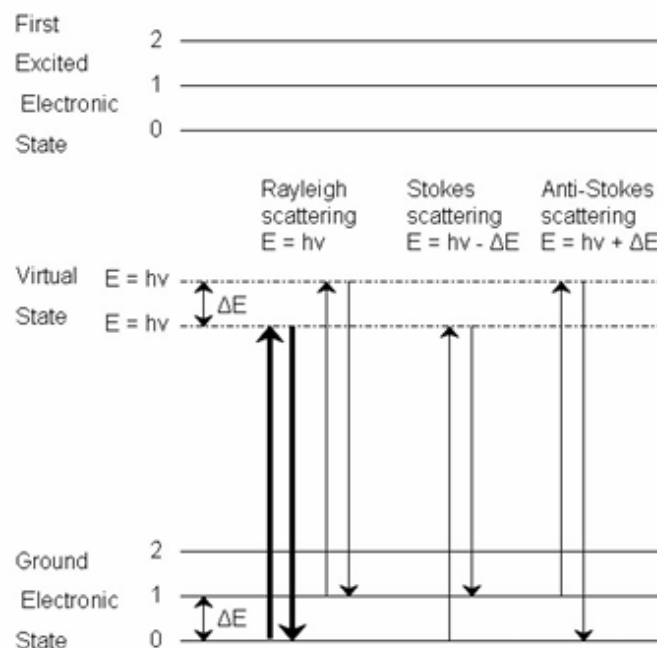


Figura 3. Stokes scattering, Rayleigh scattering and Anti-Stokes scattering.

Fuente. (Shih et al., 2021).

Una vez se ha ingresado la muestra al lector espectroscópico, este procede a examinar y se obtiene información molecular analizándose los niveles de energía vibracionales que son propios para cada átomo y elemento químico, sin importar si es orgánico e inorgánico (Nandi, 2021).

El espectrofotómetro de Raman consta de varios tipos de láser que se configuran y se usan acorde al tipo de muestra, la sensibilidad requerida y las propiedades ópticas de cada material y estos son:

- **Láser 488 nm (azul):** alta sensibilidad, se usa para análisis muy específicos.
- **Láser 532 nm (Verde):** alta sensibilidad, ideal para todo tipo de muestras.
- **Láser 633 nm (Rojo):** baja fluorescencia y calor en la muestra, apto para muestras sensibles al calor.
- **Láser 785 nm (Infrarrojo cercano):** se usa cuando se espera que la muestra tenga alta fluorescencia.
- **Láser 1064 nm (Infrarrojo):** Se usa con muestras que son sensibles al calor.

Acorde a la sensibilidad requerida, la longitud de onda estimada, las propiedades ópticas y el tipo de muestra es que se elige el láser para obtener los resultados esperados con un menor margen de error y sin interferencia de la fluorescencia y ruido en el espectro final (Gutierrez y Otero, 2014).

La espectroscopia de Raman posee varias ventajas dentro de las cuales se destacan que es una metodología ecológica ya que no genera ningún residuo ni emite gases hacia la atmósfera, no requiere una preparación muy elaborada de las muestras que se analizan, se obtiene la caracterización de los materiales presentes en la muestra en su estado puro, es altamente sensible a la detección de la molécula H₂O, no destruye la muestra, es rápida para dar los resultados y es una metodología con mucha versatilidad en el campo de la química orgánica e inorgánica (Gómez, 2023).

2.2.4.4. FTIR

Como se indica en el artículo de Aparicio et al., (2012) “La espectroscopía FTIR, basada en la absorción de rayos infrarrojos por moléculas en una muestra, permite analizar simultáneamente todas las longitudes de onda en el espectro infrarrojo, siendo la región media la más aplicada en la práctica. La capacidad de proporcionar huellas dactilares moleculares específicas la convierte en una herramienta fundamental para la identificación de cepas microbianas desconocidas, particularmente valiosa en bibliotecas de datos espectrales”. Además, la espectroscopía FTIR es un método eficiente en el análisis de compuestos orgánicos, así como en la caracterización de células y tejidos.

2.2.5. Tiempo del desarrollo metodológico

El tiempo que tarda en concretarse una metodología, así como también el tiempo que tienen las industrias alimenticias para la obtención de los datos para determinar la calidad microbiológica es fundamental para el diagnóstico efectivo de las infecciones presentes y así poder desechar el lote que esté contaminado con microorganismos de importancia médica y garantizar la seguridad alimentaria, previniendo los brotes de ETA. para ello se usan métodos rápidos de detección y altamente sensibles con los microorganismos indicadores de calidad según (NTE INEN 1528, 2012).

Una mejora en el tiempo usado para la determinación microbiológica presentes a lo largo de la cadena de producción contribuiría al ciclo de mejora continua en la industria (Basic Farm , 2021).

El tiempo por lo general está estimado en horas y se toma en cuenta desde la preparación de las muestras hasta el análisis de las UFC encontradas.

2.2.6. Costo del método

El costo va directamente relacionado con los intereses de la empresa que desee implementar cierta metodología para la detección de los microorganismos, por lo general la industria ecuatoriana opta por el uso de metodologías rápidas de detección de microorganismos como lo son Placas Petri film y Compact Dry que reaccionan con el ADN de las bacterias a analizar y son específicas para su detección, está dado por dólares estadounidenses (Granados y Pérez , 2020).

2.2.6.1. Estructura de costos

La estructura de costos es un proceso que organiza de forma eficaz los costos dentro de una empresa para tomar decisiones, teniendo en cuenta aspectos como porcentajes, productos a comercializar y los tipos de costos. Establecer una estructura de costos es fundamental por la viabilidad y el éxito a largo plazo.

Su importancia está enfocada en los siguientes aspectos:

- Toma de decisiones informadas
- Optimización de recursos
- Competitividad
- Rentabilidad sostenible

- Evaluación del rendimiento

La estructura de costos tiene como objetivos: la optimización de los recursos financieros, humanos o materiales, Proporciona información detallada y precisa que ayuda a la toma de decisiones y garantiza la rentabilidad de la empresa a largo plazo (Rodrigues, 2024).

2.2.6.2. Costos directos

Son aquellos gastos que se pueden atribuir de manera específica a la elaboración de un producto o la prestación de un servicio. Estos costos están directamente relacionados con el proceso productivo y son esenciales para calcular el costo total de los bienes o servicios ofrecidos por una empresa. Los costos directos están vinculados directamente con la producción y repercuten directamente en el precio final del producto. Los costos directos más comunes son materia prima, mano de obra directa, costos de transporte, envases, embalajes, comisiones, maquinaria, entre otros (Edenred, 2023).

2.2.6.3. Costos Indirectos

Estos son los gastos que afectan indirectamente al proceso de producción y por su naturaleza, no pueden medirse ni asignarse un valor cuantificable de manera exacta dentro del presupuesto dado para una etapa productiva, por lo tanto, se tiene que asumir un criterio general de asignación (SendPulse, 2024).

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

La presente investigación tuvo un enfoque cuantitativo, ya que no solo permitió obtener resultados cuantificables, sino que también facilitó la comparación objetiva entre los métodos analizados, contribuyendo a la validación o refutación de las hipótesis iniciales. Además, proporciona una base sólida para la investigación, permitiendo establecer conclusiones claras y fundamentadas sobre los fenómenos estudiados (Mata, 2019). Se estableció los conteos microbiológicos para *S. aureus* y *E. coli*, como los tiempos en que tardan en concretarse cada metodología y costo.

3.1.2. Tipo de Investigación

Investigación experimental: Esto permite la recopilación de datos mediante la manipulación de ciertas condiciones o circunstancias, además de controlar y medir las variables, y los resultados permiten obtener conocimientos basados en la relación dada entre causa/efecto de una situación o fenómeno en particular obteniendo resultados esenciales para el estudio (Educarplus, 2019). En la investigación se utilizó procedimientos metodológicos con la finalidad de aplicar técnicas de espectroscopía en el área de los alimentos, y cuantificación microbiológica en UFC/g y tinción de Gram para establecer el tipo de microorganismo.

Investigación aplicada: Este tipo de investigación se centra en la resolución de problemas prácticos, específicos en contextos reales usando conocimientos teóricos y científicos con el objetivo de implementar soluciones que mejoren procesos, productos y servicios (IBERO, 2020). La comparación metodológica para la determinación microbiológica permite seleccionar el método más preciso y adecuado a las necesidades de la industria alimentaria.

3.2. HIPÓTESIS

3.2.1. Hipótesis Nula

H0: La espectroscopía Raman no es más viable que Compact Dry en cuanto a fiabilidad, costo y tiempo para detectar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal

3.2.2. Hipótesis alternativa

H1: La espectroscopía Raman es más viable que Compact Dry en términos de fiabilidad, costo y tiempo para detectar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

3.3.1. Definición de las variables

3.3.1.1. Variables Dependientes

- Fiabilidad de los métodos
- Costo
- Tiempo

3.3.1.2. Variables Independientes

- Técnicas para la determinación microbiológica

3.3.2. Operacionalización de las variables

En la Tabla 1 se detalla la operacionalización de las variables utilizadas en la investigación.

Tabla 1. Operacionalización de las variables

	Variables	Dimensión	Indicadores	Técnica	Instrumento
Variables independientes	Técnicas para la determinación microbiológica	Espectros de los microorganismos	<i>S. aureus</i>	Espectroscopia de Raman	(Dewantier et al., 2023) (Nakar et al, 2022)
		Compact Dry	<i>E. coli</i>	Siembra por placas	NTE INEN 1528
Variables dependientes	Fiabilidad de los métodos	Calidad Microbiológica	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Compact Dry XSA Compact Dry EC	NTE INEN 1529-14 AOAC 081001 NTE INEN 1528:201 AOAC 110402
		Espectros Raman de los microorganismos	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Longitud e Intensidad de onda	(Dewantier et al., 2023) (Nakar et al, 2022)
	Tiempo		Horas	Estudio de tiempo	(Ortega et al., 2015)
	Costo	Análisis costo - beneficio	Dólares	Estructura de costos	(Granados y Pérez , 2020)

3.4. MÉTODOS A UTILIZAR

3.4.1. Análisis microbiológico

3.4.1.1. Obtención de muestras

Se recolectaron muestras de los 3 mercados más importantes de la ciudad de Tulcán el "Mercado Cepia", el "Mercado Central" y el "Mercado San Miguel", se procedió a comprar 100 g, se recolectaron 10 muestras por cada mercado y se obtuvo 30 muestras para evaluar, tener en cuenta que deben estar selladas, separadas y etiquetadas por mercado.

Para etiquetar las muestras es necesario realizar una codificación aleatoria en Excel para poder identificar de manera adecuada, la etiqueta de la muestra lleva información sobre fecha, lugar y los datos en la plantilla de toma de muestras.

3.4.1.2. Transporte de las muestras

Una vez se tienen las muestras se colocó en un cooler con gel pack refrigerante a una temperatura de 4 °C para facilitar el transporte y así lograr que todas las características se conserven hasta llegar a los laboratorios de la Universidad Yachay en un tiempo aproximado de 4 h, es necesario envasar las muestras en una bolsa de plástico ziploc (adicional a la bolsa en la que viene el queso) para garantizar la estabilidad química y biológica de las muestras a lo largo del tiempo, además de mantener las muestras aisladas evitando contaminación cruzada.

Cuando las muestras llegaron al destino, se procedió a la refrigeración en un rango de 0 a 4 °C para evitar la proliferación de los microorganismos presentes en los quesos hasta el siguiente día que se inició con el procesamiento microbiológico en los laboratorios de Yachay.

3.4.1.3. Análisis microbiológico

Previo a manipular las muestras, es necesario limpiar y despejar el espacio de trabajo, y de inmediato, desinfectar el espacio con etanol al 70 % (o cualquier otro desinfectante).

Se obtuvo 25 g de muestra de queso a partir de distintas partes de la muestra original (para asegurarse de estar tomando una muestra representativa del total). Se colocó en una funda ziploc y se añadió 250 ml de agua peptonada al 0.1 %, obteniendo una dilución final de 10^{-1} . Cerrada la funda, usando las manos se procedió a disgregar el

queso en el agua peptonada hasta conseguir una muestra homogénea.

A partir de la dilución anterior, se realizó diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (10 ml total por dilución), a partir de la disolución 10^{-1} tomar 1 ml de muestra y mezclar con 9 ml de agua peptonada. Se uso placas Compact Dry, específicas para el crecimiento y detección de *E. coli* y *S. aureus*, para el análisis microbiológico de las muestras de queso fresco sin sal.

Se procedió a la siembra directa de cada muestra en las placas Compact Dry siguiendo con las instrucciones del fabricante, se colocó 1ml de las diferentes diluciones en la superficie del Compact Dry para incubar a 35 ± 2 °C por 24 h (Compact Dry, 2020).

3.4.1.4. Recuento microbiológico

Después de la incubación, se contó y registró las colonias características de *E. coli* y *S. aureus* presentes en cada placa con ayuda de un marcador punta fina y un contador usando el método AOAC 010404.

3.4.2. Metodología de espectroscopía

La metodología para el tratamiento de las muestras es necesario extraer 10 g de 10 muestras que fueron seleccionadas debido a su alto contenido de UFC/g para cada microorganismo, se llevó a la ultracongelación y liofilización para tener muestras compactas sin pérdida de propiedades químicas del queso y de los microorganismos. Las muestras analizadas fueron 4 del queso control y 6 quesos de los mercados Tulcán.

3.4.2.1. Elaboración del queso testigo

Se procedió a elaborar queso con la finalidad de definirlo como “el testigo” que debe tener las mismas características que el queso obtenido en los mercados analizados, este debe ser sin sal, sin maduración y realizarlo con el más debido cuidado para evitar la contaminación. Este queso se lo hizo con la finalidad de extraer el espectro del queso y así descartarlo para poder observar exactamente el espectro de las bacterias.

3.4.2.2. Clasificación del queso testigo

Para esto se procedió a dividir el cuajo en 4 partes iguales de 250 g cada una, posteriormente de cada unidad etiquetar para saber qué queso va inoculado con cada microorganismo (*E. coli*, *S. aureus*) respectivamente.

- **Muestra 0:** Control (Se irradia en una cámara UV para eliminar cualquier contaminación superficial).
- **Muestra 1:** Inocular con *E. coli*.
- **Muestra 2:** Inocular con *S. aureus*.
- **Muestra 3:** Inocular con los dos microorganismos.

Cabe recalcar que esto se realizó por triplicado.

3.4.2.3. Esterilización de las muestras

Se cortó las muestras en un cubo de 1 cm³ posteriormente introducir en tubos falcon y pesar 10 g por cada uno, luego llevar a irradiar con UV con la finalidad de eliminar todos los microorganismos no deseados.

3.4.2.4. Preparación del inculo

Con anterioridad se debe tener preparado 8 g de caldo nutritivo por cada litro, se lleva al autoclave por 45 min, y se esteriliza 12 cajas Petri. Luego adicionar 10 ml de caldo nutritivo a las cajas Petri y dejar gelificar.

Los laboratorios de Yachay Tech poseen bacterias puras de *E. coli* y *S. aureus* y en un ambiente estéril y con una aza se toma una colonia aislada para sembrar en las cajas Petri, se incuba por 24 h a 35 °C, a su vez en una placa se esparce las bacterias, se coloca 1 gota de agua destilada, luego seca y se usa la técnica de tinción de Gram para saber si el cultivo es puro, se lleva a ver al microscopio y determinar si son Gram positivas o Gram negativas.

Al siguiente día se extraen las cajas Petri y también el caldo de cultivo, en 3 Erlenmeyer de 250 ml se adiciona 100 ml de caldo y con una aza se extrae una colonia de las bacterias para sembrarlas en líquido, luego llevar a incubar a 35 °C en intervalos hasta llegar a una absorbancia de 0.12 en el espectrofotómetro con la finalidad de estimar un conteo específico de bacterias.

Se preparó 200 ml de NaCl al 0.9 % y se colocó en tubos de muestra 9 ml con ayuda de una pipeta. Se utilizó 6 tubos por cada bacteria y la combinación de las dos. Para realizar diluciones de 10⁻⁴, 10⁻⁵, y 10⁻⁶ que fueron sembradas en cajas Petri con Agar agar para establecer el número exacto de colonias.

3.4.2.5. Inoculación del queso testigo

El queso control se llevó a congelación directamente, ya que es la que no posee ninguna bacteria. A los demás se les añade 1 ml del caldo con las bacterias que haya llegado al 0.12 de absorbancia y se le deja reposar por 5 min, posteriormente se le extrae totalmente el caldo y se pone inmediatamente a refrigeración.

3.4.2.6. Incubación de las bacterias inoculadas en el queso testigo

Los tubos se etiquetaron con los días 1, 3, 5, 7, se mantuvieron en refrigeración y fueron llevadas al ultra congelador en los días establecidos a la misma hora.

3.4.2.7. Ultracongelación de las muestras del queso testigo

Las muestras se sometieron a una temperatura de -80 °C y se mantuvo durante 10 h para asegurar que ningún material ni microorganismo que esté presente en el queso testigo desaparezca o muera. Se seleccionan 10 muestras de queso entre queso control y queso muestra de Tulcán y se etiquetaron de la siguiente manera:

Queso Control (Testigo)

- **1 A:** Queso fresco sin sal control (día 1)
- **2 A:** Queso fresco sin sal inoculado con *S. aureus* (día 7)
- **3 A:** Queso fresco sin sal inoculado con *E. coli* (día 7)
- **4 A:** Queso fresco sin sal inoculado con *S. aureus* y *E. coli* (día 7)

Queso Muestra

- **1 B:** Mercado Cepia muestra 10 (> conteo en *S. aureus*)
- **2 B:** Mercado Central muestra 1 (> conteo en *S. aureus*)
- **3 B:** Mercado San Miguel muestra 3 (> conteo en *S. aureus*)
- **1 C:** Mercado Cepia muestra 8 (> conteo en *E. coli*)
- **2 C:** Mercado Central muestra 6 (> conteo en *E. coli*)
- **3 C:** Mercado San Miguel muestra 5 (> conteo en *E. coli*)

Teniendo en cuenta las muestras que se van a procesar, se llevó a liofilizar.

3.4.2.8. Liofilización

Una vez el queso muestra y el queso testigo están ultracongelados, se los llevó al liofilizador donde se extrae totalmente el agua y el producto se transforma en un polvo uniforme, se realizó a temperaturas negativas de -40 a 0 °C por 30 min y 2.5 Pa

de vacío, se mantuvo a 0 °C y 2.5 Pa por 11 h, esto permite que se conserven todas las características propias del queso.

3.4.2.9. Análisis en el espectrofotómetro Raman

Se llevó las muestras previamente ultracongeladas y liofilizadas al laboratorio de química en Yachay Tech, se identificó las 10 muestras a analizar y se ubicó en el desecador para mantener el ambiente estéril; en un portaobjetos previamente desinfectado, se debe colocar 5 pedazos pequeños de cinta doble faz y enmarcar acorde a la nomenclatura mencionada anteriormente, se realiza nuevamente este procedimiento hasta tener el espacio para las 10 muestras, esto se lo guarda en una caja Petri desechable y se debe asegurar que el portaobjetos este fijo a la caja Petri.

Sacar las muestras de queso que están en las fundas ziploc, y con un escalpelo cortar un pedazo pequeño de queso y pulverizamos con una espátula y se lo pega sobre la cinta doble faz haciendo la suficiente presión para que quede una capa compacta y uniforme, añadir la muestra acorde a la nomenclatura correspondiente, repetir el procedimiento hasta completar las 10 muestras.

Sacar el portaobjetos con las muestras de la caja Petri para llevarlo al microscopio electrónico Raman (HR800, Horiba/Jobin-Yvon), encender la luz del microscopio y poner el portaobjetos sobre la platina y asegurar con las pinzas e ir moviendo el revolver para enfocar la imagen que aparece sobre la pantalla en el apartado "Video", ir enfocando acorde a los aumentos 5X, 10X, 50X y 100X una vez llegado al último nivel. Luego con el cursor se lo moviliza hacia un punto donde la muestra se observe compacta, se apaga la luz y se coloca las siguientes condiciones de lectura de los espectros:

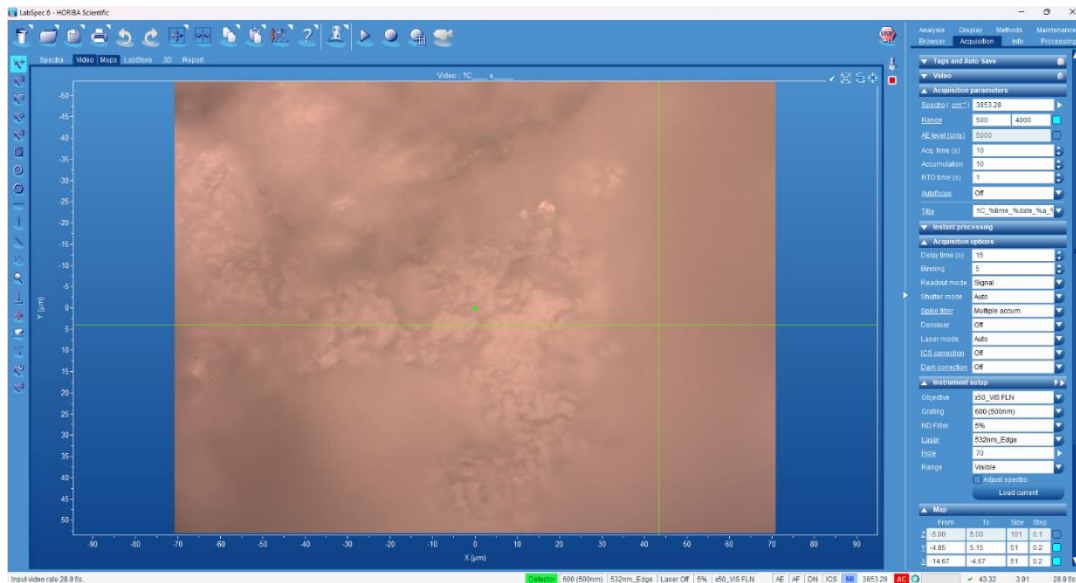


Figura 4. Enfoque del queso en microscopio Raman y sus condiciones.

- **Instrument setup:** Láser 532 nm_Edge. Potencia: 16 mW al 5%. Objetivo x50_VIS FLN. Range visible. Grating 600 (500 nm).
- **Acquisition parameters:** Espectro 3853,28 cm^{-1} . Rango 50 a 4000 cm^{-1} . Tiempo que captura espectros: 10 s. Acumulación 10. RDT time 1 s. Título acorde a la nomenclatura.
- **Acquisition options:** Delay time 15 s. Bining 5. Readout mode signal. Shutter mode auto.

Llenar estas condiciones en el apartado de la esquina superior derecha en el ítem "Acquisition" Una vez puestas las condiciones y enfocado el punto se someterse a la lectura, damos click en el ícono de cámara que significa "Leer". Y directamente nos lleva al apartado de "Spectra" donde estará indicando la lectura del espectro donde se muestran picos y ruido, véase en la figura 39 luego recolectamos las lecturas, que son 10 por punto de lectura y por triplicado para cada muestra.

Una vez haya terminado de analizar, con el cursor ubicamos en otro punto de la misma muestra, evitando que se quemar por demasiada exposición al láser 532 nm, obteniendo 30 lecturas por triplicado y en total < 1000 espectros.

Para medir células bacterianas individuales ubicadas en el queso control y el queso de la ciudad de Tulcán mediante microespectroscopía Raman, se utilizó un microscopio Raman BioParticleExplorer (MicrobioID 0.5, RapID). Para la excitación se utilizó un láser bombeado por diodo Nd:YAG de estado sólido con frecuencia duplicada de 532 nm (LCM-S-111, Laser-Export Company Ltd.). El rayo láser se enfocó

con un objetivo de aumento de $\times 100$ (MPLFLN $\times 100$, NA: 0.9, Olympus Corporation) en la muestra con una potencia de láser de aproximadamente 16 mW, lo que generó aproximadamente 3.5 mW en las células. La luz Raman retrodispersada se enfocó en un monocromador de una sola etapa (HE 532, Horiba Jobin Yvon) equipado con una rejilla de 920 líneas/mm y se recogió con una cámara CCD enfriada termoeléctricamente (DV401A-BV, Andor Technology). La resolución espectral fue de aproximadamente 10 cm^{-1} . Para cada bacteria analizada, se midieron dos espectros Raman consecutivos en la misma posición, que luego se combinaron. El tiempo de integración fue de 15 s para cada microorganismo. Para cada réplica, se recogieron 60 espectros. Se analizaron un total de < 2000 espectros para cada grupo de bacterias *E. coli* y *S. aureus*.

3.4.2.10. Interpretación de los espectros del queso testigo y muestra

Con ayuda del Software Origin 2024b se ingresaron los 3000 espectros y se sobreponen con la finalidad de eliminar los picos de ruido y se obtiene un solo espectro compuesto y limpio, como base se toma el queso control "1A" obtenido el día 1 libre de microorganismos y comparamos con el espectro de las bacterias y el de los mercados, con ello podemos establecer diferencias en la longitud e intensidad de onda. Y poder identificar alguna variabilidad en la composición y desplazamiento de los picos.

3.4.3. Metodología de tiempo y costos

3.4.3.1. Tiempo

Se midió el tiempo exacto que tarda en completarse cada etapa, desde la preparación de las muestras hasta la interpretación de los resultados de las metodologías Compact Dry y Espectroscopía de RAMAN, para esto se utilizó un cronómetro con el que se midió en minutos para posteriormente transformar al sistema internacional de medida (S.I.), luego se comparó los resultados de cada metodología entre sí y con los antecedentes bibliográficos.

3.4.3.2. Costos

Para establecer el costo final por metodología (Compact Dry y Espectroscopía de RAMAN) se realizó una enumeración de todos los materiales, equipos, softwares, utensilios, servicios básicos y mano de obra que se usó para cada método, luego se hizo una estructura de costos donde se clasificaron por "Costos directos" "Costos

indirectos" y "mano de obra" haciendo el cálculo por unidad productiva y por las 90 muestras analizadas. Se obtuvo un costo total expresado en dólares estadounidenses. Para el cálculo de la mano de obra se dividió el sueldo que gana cada especialista para los 30 días laborables y este total para las 8 horas diarias para obtener el costo por hora, y luego se multiplicó por el número de horas que trabajó el experto. Los resultados se compararon entre metodologías y con los antecedentes bibliográficos.

3.4.4. Técnicas

Para este estudio se utilizaron técnicas propias para realizar un análisis microbiológico como: siembra, incubación, tinción de Gram, autoclavado, espectroscopía Raman, liofilización, ultracongelación, refrigeración, diluciones las cuales son usadas durante el estudio.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1. Diseño experimental

En este estudio, se lleva a cabo una comparación entre la evaluación microbiológica utilizando Compact Dry y la evaluación a través de la espectroscopia Raman. Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorio con un nivel de significancia del 95 %, para establecer si hay diferencias relevantes. Se llevó a cabo un estudio de hipótesis y supuestos para determinar si la información es o no paramétrica.

Los supuestos con los que cumplen los datos de este estudio son: Normalidad, homocedasticidad, independencia y modelo lineal, estableciendo que son datos paramétricos y así se aplican las pruebas estadísticas apropiadas para estos tipos de datos.

El diseño que compara estas dos metodologías es simple aplicando 2 tratamientos por cada muestra y por triplicado, teniendo 60 unidades experimentales. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para tabular los datos obtenidos por el tratamiento 1 (Análisis microbiológico), posteriormente se aplicó Tukey para establecer diferencia significativa entre mercados. Para el tratamiento 2 (Análisis mediante espectroscopia de Raman) se usa Origin para la interpretación de datos.

Software para emplear: R studio y Origin.

3.5.2. Muestreo y tabulación de datos

En la Tabla 2 se indica la cantidad de muestras que se obtuvo por cada mercado, basándose en la normativa NTE INEN 004:

Tabla 2. Cantidad de muestras por cada mercado

Quesos frescos sin sal	
Mercado Cepia	10 muestras
Mercado Central	10 muestras
Mercado San Miguel	10 muestras

3.5.3. Tratamientos

Los tratamientos previamente definidos, se realizan en dos etapas de investigación debido a que se lo ejecuta por separado. A continuación, en la Tabla 3 se detalla la distribución de tratamientos para cada muestra.

Tabla 3. Tabla de tratamientos por muestra

Mercados	Muestra	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Variable dependiente
Cepia	1	A	B	Valor 1
	2	A	B	Valor 2
	3	A	B	Valor 3
	4	A	B	Valor 4
	5	A	B	Valor 5
	6	A	B	Valor 6
	7	A	B	Valor 7
	8	A	B	Valor 8
	9	A	B	Valor 9
	10	A	B	Valor 10
Central	11	A	B	Valor 11
	12	A	B	Valor 12
	13	A	B	Valor 13
	14	A	B	Valor 14
	15	A	B	Valor 15
	16	A	B	Valor 16
	17	A	B	Valor 17
	18	A	B	Valor 18
	19	A	B	Valor 19
	20	A	B	Valor 20
San Miguel	21	A	B	Valor 21
	22	A	B	Valor 22
	23	A	B	Valor 23
	24	A	B	Valor 24
	25	A	B	Valor 25
	26	A	B	Valor 26
	27	A	B	Valor 27
	28	A	B	Valor 28
	29	A	B	Valor 29
	30	A	B	Valor 30

Nota. Muestra: Identificador de muestra, **Tratamiento 1:** Análisis microbiológico "A", **Tratamiento 2:** análisis mediante espectroscopia Raman "B", **Variable dependiente:** Valores medidos.

En cuanto a los tiempo y costos se toman los valores de forma experimental.

3.6. RECURSOS

Tabla 4. Recursos

Recursos		Detalle
Tangibles	Físicos	<ul style="list-style-type: none"> • Materiales: esferos, hojas, cajas Petri, pipetas, pipeteadores, Erlenmeyer, tubos de muestra, tubos de ensayo, puntas de micropipetas, mecheros, probetas, mandil, cofia, guantes, mascarilla, gafas de seguridad, calzado adecuado. • Insumos: agar agar, caldo nutritivo, alcohol, reactivos para la tinción de gran, cajas Compact Dry. • Transporte: financiación propia.
	Financieros	<ul style="list-style-type: none"> • Adquisición de material de laboratorio: cajas Petri, tubos Falcon, papel aluminio, fundas ziploc. • Lugar: todos los análisis se realizarán en la Universidad Yachay Tech.
Intangibles	Tecnológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Equipos: pH metro, espectrofotómetro, incubadora, mecheros, autoclave, refrigerador, Ultra congelador, Liofilizador, torque, micropipetas, cabina de flujo laminar, computador, calculadora, celular. • Programas: Word, Excel, Power Point. • Servicios: internet.
Humanos	Comunicación y conocimiento	<ul style="list-style-type: none"> • Vendedoras de los distintos mercados de la ciudad de Tulcán.
	Técnicos	<ul style="list-style-type: none"> • Expertos en el manejo del espectrofotómetro y demás análisis microbiológicos. • Laboratorios de la Universidad YACHAY TECH.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio se presentan a continuación:

4.1.1. Análisis de supuestos

Para establecer si los datos son o no paramétricos se procedió a realizar un análisis de supuestos con un p valor de 0.05, los resultados se muestran a continuación:

4.1.1.1. Normalidad

Para este supuesto se realizó mediante la comprobación de la prueba estadística de Shapiro Wilk en base a cada microorganismo. Esta prueba es una herramienta estadística evalúa si un conjunto de datos se distribuye de forma normal. Se trata de una prueba paramétrica que compara los datos con las puntuaciones normales correspondientes.

- ***Staphylococcus aureus***

A continuación, se indican los resultados de la prueba Shapiro Wilk para *S. aureus*:

```
Shapiro-wilk normality test
data: residuals(anova_saureus)
W = 0.95507, p-value = 0.2306
```

Figura 5. Shapiro Wilk para *S. aureus*.

Se concluye que los datos obtenidos para *S. aureus* cumplen con el supuesto de normalidad que es p-valor= 0.2306 es mayor a 0.05 por lo tanto los datos siguen una distribución normal. Donde "W" indica cuan cerca están los datos de una distribución normal, un valor cercano a 1 indica que los datos son aproximadamente normales. "P-valor" si el $p > 0.05$ indica que los datos tienen una distribución normal y si es $p < 0.05$ indican que los datos no tienen una distribución normal.

- ***Escherichia coli***

En la Figura 6 se indican los resultados de la prueba Shapiro Wilk para *E. coli*:

Shapiro-wilk normality test

```
data: residuals(anova_ecoli)
W = 0.97881, p-value = 0.793
```

Figura 6. Shapiro Wilk para *E. coli*.

Se concluye que los datos obtenidos para *E. coli* cumplen con el supuesto de normalidad que es p-valor= 0.793 es mayor a 0.05 por lo tanto los datos siguen una distribución normal.

4.1.1.2. Homocedasticidad

Es una propiedad de una variable aleatoria que se refiere a que su varianza es constante y se utiliza para describir un modelo en el que la dispersión de los datos es uniforme a lo largo de la línea de regresión. Para ello se usa la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas

- ***Staphylococcus aureus***

En la Figura 7 se muestra el resultado de la prueba de Levene en *S. aureus*:

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 9  0.0219    1
      20
```

Figura 7. Prueba de Levene para *S. aureus*.

Se obtuvo como resultado p de 1, esto indica que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, lo que sugiere que las varianzas entre los grupos son iguales. Por lo tanto, se concluye que los datos cumplen con el supuesto de homocedasticidad, lo que indica que las varianzas son homogéneas.

- ***Escherichia coli***

A continuación, se muestra el resultado de la prueba de Levene que se aplicó a los datos de *E. coli*:

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 9  0.1179 0.9988
      20
```

Figura 8. Prueba de Levene para *E. coli*.

Se obtuvo como resultado p de 0.9988 esto indica que no hay evidencia suficiente

para rechazar la hipótesis nula, lo que sugiere que las varianzas entre los grupos son iguales. Por lo tanto, se concluye que los datos cumplen con el supuesto de homocedasticidad, lo que indica que las varianzas son homogéneas.

4.1.1.3. Independencia

El supuesto de independencia en estadística establece que los datos de un conjunto no están correlacionados entre sí. Es decir que el valor de una observación no influye en el valor de otra. Para ello aplicamos una prueba de Durbin Watson.

- ***Staphylococcus aureus***

A continuación, se indican los resultados de la prueba Durbin Watson para los datos de *S. aureus*:

```
Durbin-Watson test  
  
data: anova_saureus  
DW = 1.7962, p-value = 0.2194  
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

Figura 9. Prueba Durbin Watson para *S. aureus*.

Con un valor p de 0.2194, se puede concluir que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de que no existe autocorrelación en los residuos del modelo de regresión. Esto indica que los residuos son independientes entre sí.

- ***Escherichia coli***

A continuación, se indican los resultados de Durbin Watson para los datos de *E. coli*:

```
Durbin-Watson test  
  
data: anova_ecoli  
DW = 1.5864, p-value = 0.1019  
alternative hypothesis: true autocorrelation is greater than 0
```

Figura 10. Prueba Durbin Watson para *E. coli*.

Con un valor p de 0.1019, se puede concluir que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de que no existe autocorrelación en los residuos del modelo de regresión. Esto sugiere que los residuos son independientes entre sí.

4.1.1.4. Linealidad

Este supuesto implica que la relación entre las variables independientes y la variable

dependiente debe ser lineal. Para ello se aplica una prueba de Rainbow test.

- ***Staphylococcus aureus***

A continuación, se indican los resultados de la prueba Rainbow test que se aplicaron a los datos *S. aureus*:

```
Rainbow test  
  
data: anova_saureus  
Rain = 4.2539, df1 = 15, df2 = 3, p-value = 0.1295
```

Figura 11. Prueba Rainbow para *S. aureus*.

Con un valor p de 0.1295, no se rechaza la hipótesis nula de que el modelo es lineal en el rango analizado. Esto indica que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una relación no lineal entre las variables en el modelo, se puede concluir que el modelo cumple con el supuesto de linealidad.

- ***Escherichia coli***

A continuación, se indican los resultados de la prueba Rainbow test que se aplicaron a los datos *E. coli*:

```
Rainbow test  
  
data: anova_ecoli  
Rain = 0.36144, df1 = 15, df2 = 3, p-value = 0.9219
```

Figura 12. Prueba Rainbow para *E. coli*.

Con un valor p de 0.9219, no se rechaza la hipótesis nula de que el modelo es lineal en el rango analizado. Esto indica que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una relación no lineal entre las variables en el modelo, se puede concluir que el modelo cumple con el supuesto de linealidad.

Una vez los supuestos se cumplen, se procede a analizar los datos obtenidos.

4.1.2. Análisis microbiológico

En este apartado se pueden observar los resultados microbiológicos realizados a los quesos frescos sin sal expandidos en los mercados de la ciudad de Tulcán. Se presentan los conteos representados en Log UFC/ g.

4.1.2.1. *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 5 se evidencian los resultados de *Staphylococcus aureus* en 30 muestras de queso sin sal, que se obtuvieron mediante el uso de placas Compact Dry XSA en los mercados de "Cepia", "Central" y "San Miguel" de la ciudad de Tulcán.

Tabla 5. Conteo microbiológico de *Staphylococcus aureus* en 3 mercados de la ciudad de Tulcán (n=90)

<i>Staphylococcus aureus</i> en Log UFC/g			
	(Promedio ± DS)	Valor mayor	Valor menor
Mercado Cepia	4.41 ± 0.09 ^a	4.57	4.30
Mercado Central	4.84 ± 0.12 ^b	5.04	4.67
Mercado San Miguel	5.48 ± 0.00 ^c	5.48	5.48
Valor p	<0.0001		

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas entre mercados, de acuerdo con la prueba Tukey ($p < 0.05$). DS: desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 5 los conteos de *S. aureus* exceden a la cantidad del indicador (100 UFC/g) o (2 Log UFC/g) establecido en la norma INTE INEN 15:28. El mercado que posee mayor presencia de UFC es el "San Miguel" con conteos de 5.48 Log UFC/g. El mercado "Cepia" tiene conteos de 4.41 Log UFC/g, y "Central" presenta conteos de 4.84 Log UFC/g. El mercado "San Miguel" presenta mayor contaminación microbiológica evidenciando un claro incumplimiento con los estándares de calidad establecidos en esta normativa.

Estadísticamente existen diferencias significativas entre los tres mercados de la ciudad de Tulcán. El mercado "San Miguel" es el que reporta el valor medio más alto (5.48 ± 0.00) contrastado con el mercado "Cepia" que tiene menor valor medio (4.41 ± 0.09).

4.1.2.2. *Escherichia coli*

En la Tabla 6 se indican los resultados de *Escherichia coli* en 30 muestras de queso sin sal, que se obtuvieron mediante el uso de placas Compact Dry EC en los mercados de "Cepia", "Central" y "San Miguel" de la ciudad de Tulcán.

Tabla 6. Conteo microbiológico de *Escherichia coli* de 3 mercados de la ciudad de Tulcán (n=90)

<i>Escherichia coli</i> en Log UFC/g			
	(Promedio ± DS)	Valor mayor	Valor menor
Mercado Cepia	4.21 ± 0.11 ^a	4.47	4.09
Mercado Central	4.17 ± 0.57 ^a	4.92	3.32
Mercado San Miguel	5.39 ± 0.06 ^b	5.51	5.32
Valor p	<0.0001		

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas entre mercados, de acuerdo con la prueba Tukey ($p < 0.05$). DS: desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 6 los conteos para *E. coli* sobrepasan la cantidad de el indicador (10 UFC/g) o (1 Log UFC/g) establecido en la norma INTE INEN 15:28. El mercado que posee mayor presencia de UFC es el "San Miguel" con conteos de 5.39 Log UFC/g. El mercado "Cepia" tiene conteos de 4.21 Log UFC/g y "Central" presenta conteos de 4.17 Log UFC/g. El mercado "San Miguel" presenta mayor contaminación microbiológica evidenciando un incumplimiento a los estándares de inocuidad alimentaria establecidos por la normativa ecuatoriana.

Estadísticamente existen diferencias significativas entre los tres mercados de la ciudad de Tulcán. El mercado "San Miguel" es el que reporta el valor medio más alto (5.39 ± 0.06) contrastado con el mercado "Central" que tiene menor valor medio (4.17 ± 0.57). En la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 % establece que los mercados "Cepia" y "Central" son estadísticamente iguales.

4.1.3. Análisis de espectroscopía de Raman

Las lecturas dadas por el espectrómetro RAMAN son plasmadas en el programa ORIGIN que brinda calidad y claridad de las lecturas obtenidas con el láser de 532 al 5 %, en un rango de 0 cm^{-1} a 4500 cm^{-1} , las muestras procesadas son aquellas que muestran mayor Log UFC/g en el conteo microbiológico de *E. coli* y *S. aureus*, primero se muestran los espectros del queso control donde se identificó la composición química de la muestra, luego el espectro del queso inoculado con los patógenos y el control, y al final, el espectro del queso inoculado con los microorganismos de los 3 mercados evaluados. En el eje de las ordenadas está la longitud de onda en cm^{-1} y en el de las abscisas va la intensidad en unidades arbitrarias (u.a.).

4.1.3.1. Espectro del queso control

En la Figura 13 se visualiza el espectro de una muestra de queso fresco elaborado en laboratorio, sin presencia de microorganismos, para tomar las referencias espectrales de los compuestos químicos propios del queso, su cantidad estará definida por la intensidad espectral en unidades arbitrarias (u.a.).

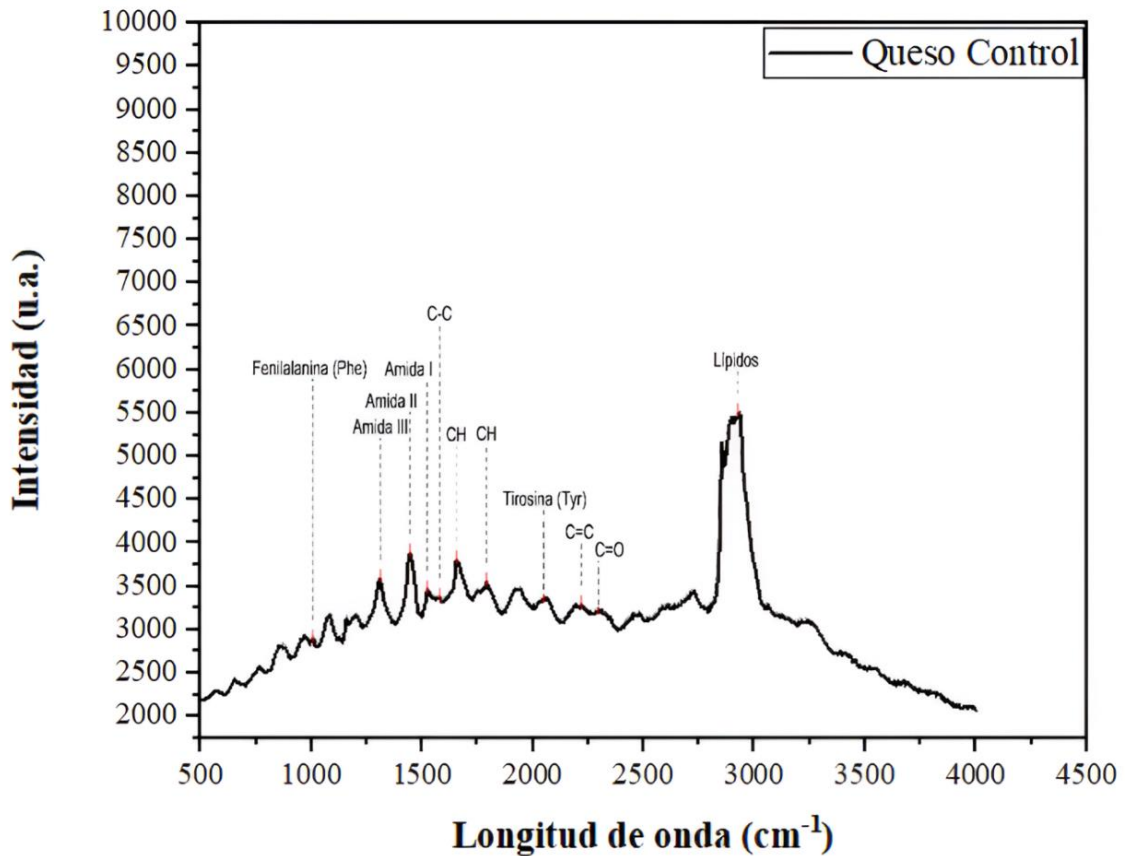


Figura 13. Composición química del queso control.

Los compuestos químicos más comunes en el queso evaluado son los lípidos (CH_2 , CH , $C=O$, $C=C$, $C-C$), proteínas (Amida I, Amida II, Amida III, Tirosina, Fenilalanina) que están presentes desde 1000 cm^{-1} hasta los 3000 cm^{-1} .

Esta caracterización es importante para diferenciar los picos de la composición química del queso y los que indican la presencia/ausencia de los microorganismos indicadores de calidad (*S. aureus* y *E. coli*).

4.1.3.2. Espectro de los quesos inoculados y el queso control

Después de identificar las moléculas químicas presentes en el queso, se evaluó si había un cambio en la estructura química por la presencia de microorganismos en los quesos inoculados. Para ello, se presenta en la misma gráfica el espectro del queso control junto con el de los quesos inoculados

En la Figura 14 se observa el espectro del queso control (color negro), el espectro del queso inoculado con *Staphylococcus aureus* (color rojo) y el espectro del queso inoculado con *Escherichia coli* (color azul).

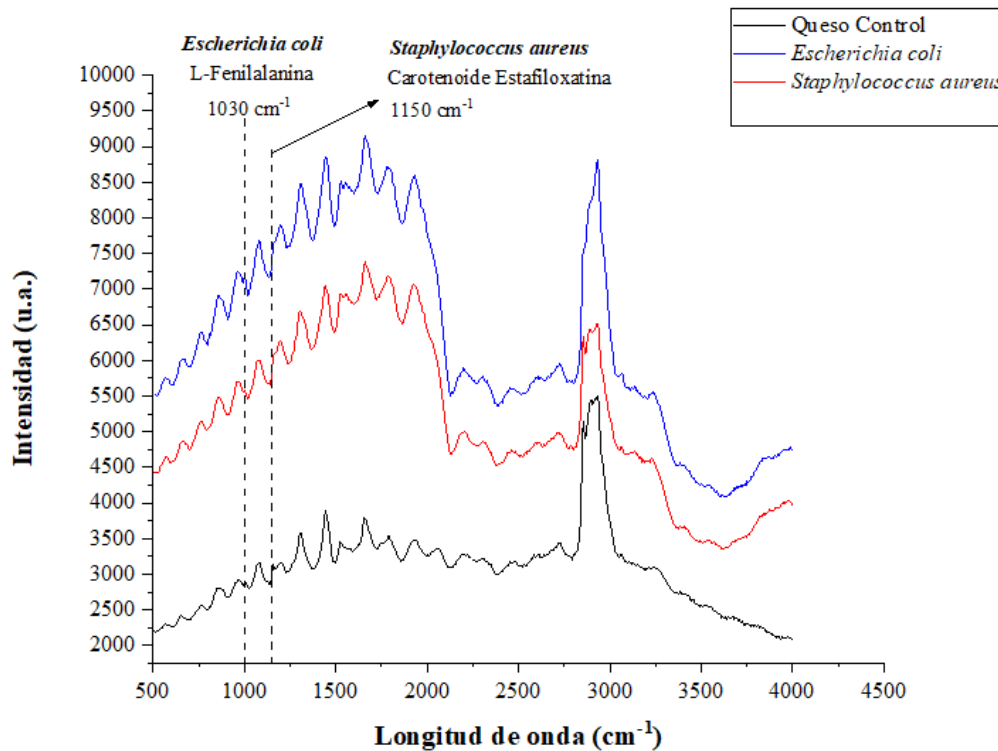


Figura 14. Espectros de los quesos inoculados con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y el queso control.

Como se ilustra en la Figura 14, al comparar el espectro del queso control con el de *Staphylococcus aureus*, se observa un nuevo pico en la longitud de onda de 1150 cm^{-1} , correspondiente al carotenoide estafloxatina, característico de este microorganismo. Esto indica la presencia de dicho compuesto en la muestra de queso analizada. Por otro lado, en el caso de *Escherichia coli*, se identifica un nuevo pico en 1030 cm^{-1} , asociado a la L-fenilalanina, una proteína específica de *Escherichia coli*. Este pico se encuentra adyacente al de la proteína fenilalanina (Phe) del queso, como se muestra en la Figura 13, donde se observa una longitud de onda en 1000 cm^{-1} . Además, la intensidad espectral varía entre el queso control y los quesos inoculados, lo que refleja las diferencias en la concentración de las moléculas químicas presentadas en la Figura 13.

4.1.3.3. Espectros de *Staphylococcus aureus*

Para establecer la presencia de *S. aureus* mediante espectroscopia Raman se realizó una comparación entre el control inoculado con esta bacteria más los 3 mercados de la ciudad de Tulcán.

En la Figura 15 se muestran los espectros de los mercados Cepia (rojo), Central (azul) y San Miguel (verde), además del espectro del queso control inoculado con *Staphylococcus aureus* (negro).

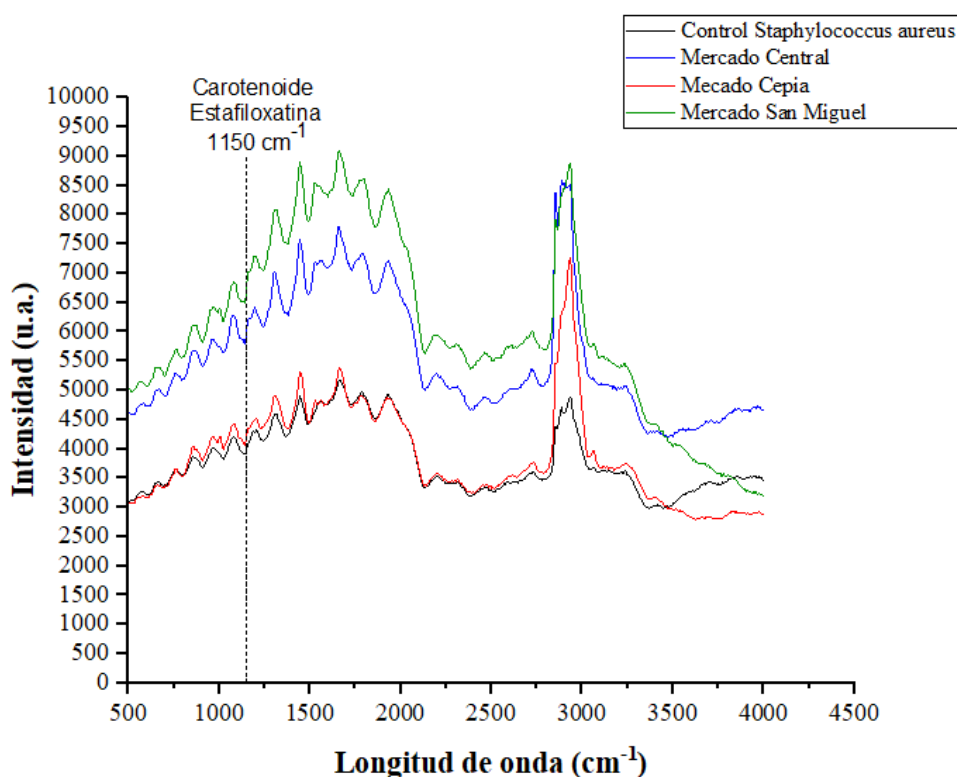


Figura 15. Espectros del queso inoculado con *Staphylococcus aureus* y los quesos de los 3 mercados evaluados.

Como se observa en la Figura 15 existe alto contenido de lípidos y proteínas en los quesos provenientes de los mercados Central y San Miguel, en comparación con el queso control inoculado con *Staphylococcus aureus*. El mercado Cepia presenta un bajo contenido de proteínas en relación con el de lípidos. Los 4 espectros muestran un pico en longitud de onda 1150 cm^{-1} indicando la presencia de *S. aureus* en las muestras evaluadas. La intensidad espectral varía entre mercados debido a que la cantidad de componentes químicos, Figura 13, de la muestra evaluada, ya que, esto depende de la calidad de la materia prima con la cual se realizaron los quesos.

Al indicar presencia de *S. aureus*, se establece que existe contaminación microbiológica y el queso no es apto para el consumo humano, concordando con los resultados mostrados en la Tabla 5.

También se evidencia que los mercados que tienen mayor cantidad de este microorganismo son Central y San Miguel, al igual que los resultados dados por Compact Dry.

4.1.3.4. Espectros de *Escherichia coli*

De igual forma, para establecer la presencia de *E. coli* mediante espectroscopia Raman se realizó una comparación entre el control inoculado con esta bacteria y los 3 mercados de la ciudad de Tulcán.

En la Figura 16 se muestran los espectros Raman del queso control inoculado con *Escherichia coli* (negro) y los mercados Cepia (azul), Central (rojo) y San Miguel (Verde).

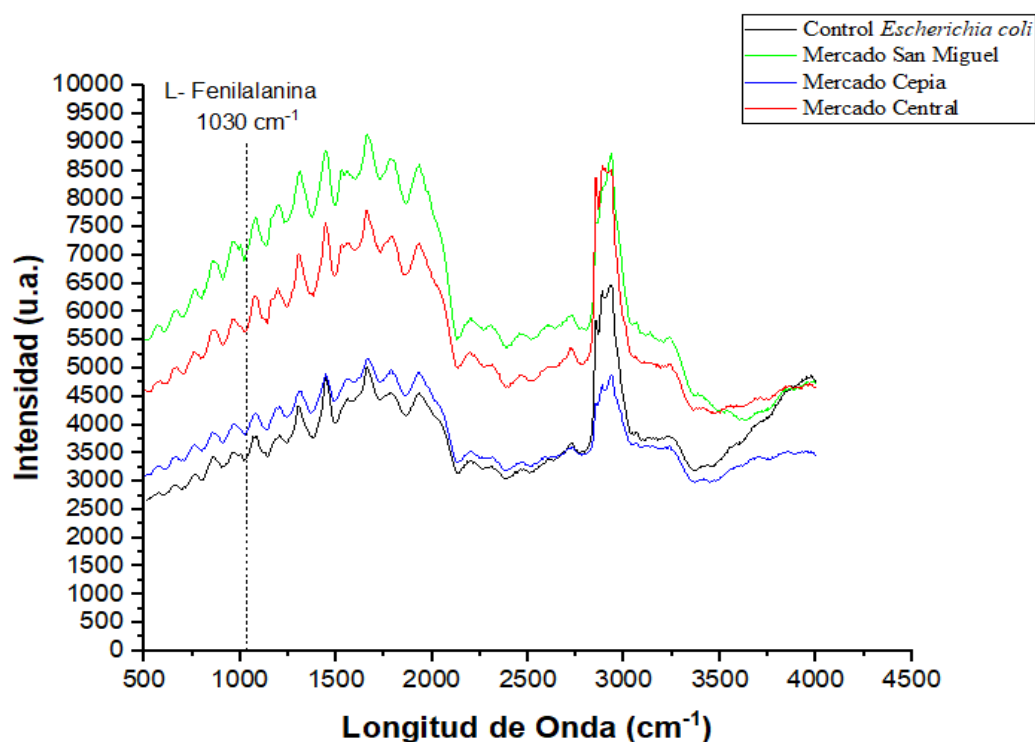


Figura 16. Espectro del queso inoculado con *Escherichia coli* y los quesos de los 3 mercados evaluados.

Como se observa en la Figura 16, el mercado que tiene menor cantidad de proteínas y lípidos, Figura 13, es el mercado Cepia, y la cantidad de lípidos es inferior a la del control, evidenciando que el queso fue elaborado con una leche baja en grasas. Los mercados Central y San Miguel son los que poseen mayor cantidad de proteínas y en lípidos. En los 4 espectros se encuentra la presencia de un pico que no está en la Figura 13, en la longitud de onda de 1030 cm^{-1} , lo que indicaría la presencia de *E. coli* en las muestras de los mercados, concordando con los resultados de la Tabla 6.

También se evidencia que los mercados que tienen mayor cantidad de este microorganismo son Central y San Miguel, al igual que los resultados dados por Compact Dry.

4.1.4. Análisis de viabilidad

En el análisis que se presenta a continuación se compara la metodología de determinación microbiológica mediante Compact Dry EC y XSA para la determinación de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, y la metodología de espectroscopía de Raman.

Para que se realicen estas comparaciones se toman en cuenta las variables fundamentales en la producción industrial (tiempo y costo), específicamente en el área de calidad a la hora de aplicar una nueva metodología de determinación microbiológica. Para ello, se deben de tener en cuenta que los análisis son básicos y los resultados son abordados desde el punto de vista industrial.

4.1.4.1. Tiempo de desarrollo metodológico

En este apartado se indica el tiempo que tarda en realizar el análisis de determinación microbiológica, tanto para el análisis microbiológico usando Compact Dry EC y XSA, como para la espectroscopía de Raman. Se evaluó el tiempo que tarda en realizar toda la operación para una sola muestra. Los resultados están dados en horas.

- **Análisis microbiológico**

En la siguiente Tabla 7 se muestran los tiempos que se tarda en realizar cada operación del análisis microbiológico, en función a una muestra, también está indicado el tiempo total que tarda en obtener el proceso completo.

Tabla 7. Tiempo de operación en el análisis microbiológico

Análisis microbiológico	
Operación	Tiempo
Muestreo	10 min
Preparación de la muestra	30 min
Diluciones hasta 10^{-4}	3 min
Siembra	2 min
Incubación	24 h
Conteo	30 min
Transformar en UFC/g	3 min
Total	25.3 h

Como se muestra en la Tabla 7, se está indicando el tiempo que tarda cada operación para realizar el análisis microbiológico. La operación que más tarda en ser completada es la de Incubación debido a que se debe realizar por 24 horas para el crecimiento y desarrollo de las colonias. La preparación de muestras y el conteo son las operaciones que duran 30 min. El tiempo total en ejercer el análisis es de 25.3 horas.

- **Espectroscopía de Raman**

En la Tabla 8 se muestra los tiempos que se tarda en realizar cada operación del método espectroscopía de Raman, en función a una muestra, también está indicado el tiempo total que tarda en tener el proceso completo.

Tabla 8. Tiempo de operación en la espectroscopía de Raman

Espectroscopía de Raman	
Operación	Tiempo
Muestreo	15 min
Preparación de muestras	15 min
Ultracongelación	10 h
Liofilización	11 h
Preparación de muestras	15 min
Análisis	15 min
Interpretación	40 min
Total	22.67 h

Como se indica en la Tabla 8, las operaciones que más tardan en completarse son la ultracongelación con 10 horas y la liofilización con 11 horas en condiciones específicas. Estas operaciones son pretratamientos al análisis de espectroscopía de Raman. El tiempo total es de 22,67 horas.

4.1.4.2. Costo del método

A continuación, se toma en cuenta la inversión que se tuvo para cada metodología (Microbiológico y Espectro de Raman) en la determinación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal. Los datos están dados en dólares estadounidenses.

Se realizó un análisis de costos tomando en cuenta la mano de obra directa, la materia prima directa y los costos de fabricación de cada material en función al costo por hora y costo por muestra.

- **Análisis microbiológico**

En la Tabla 9 está establecido todos los costos que se necesitaron para realizar el análisis microbiológico de *S. aureus* y *E. coli* usando Compact Dry. Se indican los equipos, materiales, mano de obra con la finalidad de establecer el costo total unitario necesario para procesar una muestra.

Tabla 9. Análisis económico en el análisis microbiológico

Análisis Microbiológico				
	Materiales	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
Costos directos	Fundas Ziploc medianas	1	2	\$ 2.00
	Marcador	1	1	\$ 1.00
	Pack gel refrigerantes	30	2	\$ 60.00
	Agua peptonada	8	1.5	\$ 12.00
	Compact dry XSA	90	1.5	\$ 135.00
	Compact dry EC	90	1.5	\$ 135.00
	Cinta Parafilm	1	4	\$ 4.00
	Asa de digraslky	1	20	\$ 20.00
	Gas	1	3.5	\$ 3.50
	Papel Aluminio	1	2.5	\$ 2.50
	Tubos de ensayo		2	-
	Micropipeta	1	100	\$ 100.00
	Puntas de micropipeta de 1000 UL		12	-
	Refrigeración	20	4	\$ 80.00
	Coler	1	10	\$ 10.00
	Fundas ziploc medianas	1	2	\$ 2.00
	Mechero	1	5	\$ 5
		Total costos directos		\$ 572
Costos indirectos	Transporte Tulcán Ibarra	6	4.5	\$ 27.00
	Transporte Ibarra Yachay Tech	6	1	\$ 6.00
	Refrigeradora	24 h	0.01	\$ 0.16
	Cámara de flujo laminar 4000	30 min	0.27	\$ 0.14
	Balanza	30 min		-
	Guantes		0.25	-
	Cofia		0.25	\$ 6.00
	Rodillo	1	1	\$ 1.00
Incubadora	24 h	0.02	\$ 0.55	
		Total costos indirectos		\$ 40.85
Mano de obra	Microbiólogo	26 h	3.6	\$ 92.63
	Servicios Básicos			\$ 25.00
		Costos totales		\$ 730.47

En la tabla mostrada anteriormente, se observa que los costos directos que influyen en el procesamiento de muestras son de \$ 572. Los costos indirectos son de \$ 40.85 dólares, la mano de obra es de \$ 117.63 teniendo un total de \$ 730.47 para el procesamiento.

Por unidad de producción el costo estimado para realizar el análisis microbiológico usando placas Compact Dry es de 8.11 dólares.

- **Espectroscopía de Raman**

En la Tabla 10 está determinado los gastos que conlleva realizar esta metodología para la determinación microbiológica de *S. aureus* y *E. coli*.

Tabla 10. Análisis económico de la espectroscopía de Raman

Análisis de Raman				
	Materiales	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
Costos directos	Fundas Ziploc pequeñas	1	2	\$ 2.00
	Espátula	1	3	\$ 3.00
	Cuchillo	1	2	\$ 2.00
	Marcador	1	1	\$ 1.00
	Ultracongelar la muestra	10	10	\$ 100.00
	Tubos Eppendorf	10	1	\$ 10.00
	Celdas		6	-
	Liofilizar muestras	10	10	\$ 100.00
	Portaobjetos	1	2	\$ 2.00
	Cinta doble faz	1	2	\$ 2.00
	Guantes		0.25	-
	Cofia		0.25	-
	Mascarilla		0.25	-
	Espátula	1	2	\$ 2.00
	Total costos directos			
Costos Indirectos	Transporte Tulcán Ibarra	6	4.5	\$ 27.00
	Transporte Ibarra-Yachay	6	1	\$ 6.00
	Ultracongelador	10	0.35	\$ 3.50
	Liofilizador	10	0.20	\$ 2.20
	Espectrofotómetro	10	16.67	\$ 166.67
	Software Origin	10	0.06	\$ 0.79
	Balanza	1	5	\$ 5.00
Total costos Indirectos				\$ 206.16
Mano de obra	Encargado del ultracongelador	10 h	4.38	\$ 43.75
	Encargado de liofilizar	11 h	3.13	\$ 34.38
	Encargado del espectrofotómetro	15 h	3.13	\$ 46.88
Total de mano de obra				\$ 125.00
Costos Totales				\$ 555.16

En la tabla que se indicó con anterioridad, se observa que los costos directos que influyen en el procesamiento de muestras son de \$ 224. Los costos indirectos son de \$ 289.49, la mano de obra es de \$ 125 teniendo un total de \$ 555.16 para el procesamiento y el costo por unidad de producción es de \$ 6.16.

Se debe tener en cuenta la inversión inicial dentro de los costos por unidad de producción, debido a que se deben cubrir los gastos de la compra del equipo Raman, el liofilizador y el ultra congelador, siendo así los costos totales son de \$ 955.16 y \$ 10.61 por muestra.

4.2. DISCUSIÓN

4.2.1. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico para la determinación de presencia y ausencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en los quesos frescos sin sal que se expenden en los principales mercados de la ciudad de Tulcán dio como resultado una cantidad alta de UFC/g como se muestra en la Tabla 5 y Tabla 6. Estos valores son superiores al límite admisible de los indicadores como establece la norma NTE INEN 15:28. El Mercado "San Miguel" es el que posee conteos muy elevados en estos dos indicadores, mostrando un bajo nivel de inocuidad, mientras el Mercado "Cepia y Central" tienen niveles más bajos, pero en comparación con lo que establece la normativa, para *Escherichia coli* el índice máximo permisible es 10 UFC/g o 1 Log UFC/g y para *Staphylococcus aureus* es 10^2 UFC/g o 2 Log UFC/g, las colonias reportadas superan los límites. Esto tiene relación en gran medida con los resultados obtenidos por Escobar et al., (2023) en su estudio donde se evidenció alto contenido de estos patógenos en los quesos analizados en ese mercado, concluyendo así que los productos lácteos no son aptos para el consumo humano.

Otro estudio que se realizó en Cajamarca por Vásquez et al., (2018) establece que la carga microbiana de los quesos evaluados de 6 industrias es superior al límite admisible en la norma de ese país, evidenciando un mayor porcentaje en *E. coli* y *S. aureus*, y de igual forma en la ciudad de Tulcán el mercado que reporta una mayor contaminación es el "San Miguel" siendo este debido a sus condiciones de venta, manipulación y almacenamiento las más deplorables de entre estos 3 mercados, cabe recalcar que este queso no estaba en refrigeración, tal y como lo establece la norma que rige a los mercados del Ecuador (NTE INEN 2687, 2013).

Los altos recuentos de UFC, especialmente cuando superan los límites establecidos por las normas de seguridad alimentaria, sugieren que las condiciones higiénicas durante la producción y manipulación del queso pueden ser inadecuadas. Esto puede incluir prácticas de manufactura que no cumplen con los estándares sanitarios, lo que aumenta el riesgo de contaminación microbiana.

Los altos conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) en quesos frescos que son elaborados de forma artesanal indican un riesgo microbiológico significativo, ya que pueden reflejar la presencia de patógenos y cepas peligrosas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, lo que aumenta la probabilidad de enfermedades

transmitidas por alimentos. Además, estos recuentos elevados pueden afectar negativamente la calidad sensorial del queso, provocando fermentaciones no deseadas que alteran su sabor, textura y aroma.

Desde el punto de vista regulatorio, los niveles altos de UFC/g pueden resultar en incumplimientos con las normativas sanitarias, lo que limita la comercialización del producto. Por último, esta situación destaca la necesidad urgente de mejorar las prácticas de producción y manipulación entre los productores artesanales, incluyendo capacitación en higiene y control de calidad para garantizar la seguridad alimentaria.

4.2.2. Análisis de espectroscopía de Raman

La espectroscopía de Raman es una metodología ampliamente utilizada en el ámbito de la química inorgánica; sin embargo, investigaciones recientes han ampliado su aplicación a la detección microbiana en campos como la salud y la industria alimentaria. Un ejemplo de esto se observa en la Figura 13, donde en el rango de longitud de onda de 1000 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} se identifican enlaces como CH_2 , CH , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}-\text{C}$, así como proteínas como Amida I, Amida II, Amida III, tirosina y fenilalanina. Estos hallazgos son consistentes con los resultados del estudio realizado por Dewantier et al. (2023), que identifican los componentes del queso y contribuyen a su correcta caracterización. Estos resultados demuestran el futuro potencial de la espectroscopía de Raman en el análisis microbiológico y la caracterización de quesos.

En la Figura 14 se evidencia la presencia de *Staphylococcus aureus* en el queso inoculado, identificada por la aparición del carotenoide estafiloxatina en las longitudes de onda de 1100 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} , un pico que no se observa en el espectro del queso control. Estos hallazgos son coherentes con el estudio realizado por Rebrošová et al. (2017) que utilizó el mismo laser y potencia para analizar cepas puras de estreptococos, encontrando un carotenoide estafiloxatina representativo y específico en las longitudes de onda de 1100 a 1150 cm^{-1} . Al comparar estos resultados con el espectro presentado en la Figura 15, que confronta el queso inoculado con esta bacteria y los espectros de tres mercados, se confirma la existencia de este pico en la misma posición mencionada en el estudio, corroborando así la presencia de *Staphylococcus aureus* en la muestra de queso analizada.

Para la Figura 16 donde el microorganismo predominante es *Escherichia coli*, se

observa un pequeño pico en la longitud de onda en 1030 cm^{-1} , el cual no está presente en la Figura 13, que corresponde al control. Este hallazgo es consistente con el estudio de Nakar et al. (2022), quienes identificaron la presencia de *Escherichia coli* mediante un anillo de L-fenilalanina, una proteína característica de esta bacteria, en la longitud de onda de 1020 cm^{-1} hasta 1030 cm^{-1} . Por lo tanto, se puede concluir que *Escherichia coli* está presente en las muestras de queso analizadas.

La espectroscopía de Raman se ha consolidado como una herramienta efectiva para la detección de bacterias en muestras alimentarias, destacándose por su capacidad para identificar compuestos específicos asociados con microorganismos patógenos lo que subraya la sensibilidad y especificidad de esta técnica. Asimismo, el análisis comparativo con otros quesos inoculados y muestras del mercado demuestra que la espectroscopía de Raman no solo permite identificar la presencia de bacterias, sino también caracterizar sus perfiles bioquímicos. Estos resultados resaltan el potencial de la espectroscopía de Raman como una metodología rápida y no destructiva para el monitoreo microbiológico en la industria alimentaria, contribuyendo así a mejorar la seguridad alimentaria y la calidad del producto y brindando los mismos resultados (presencia) de forma cualitativa que Compact Dry.

La detección rápida y precisa de estos patógenos puede ayudar a los productores a implementar medidas preventivas más efectivas y a cumplir con las normativas sanitarias. Además, el uso de esta técnica podría facilitar el desarrollo de protocolos más eficientes para el control de calidad, asegurando que los productos lácteos sean seguros para el consumo. A medida que la tecnología avanza, es fundamental que las industrias adopten métodos innovadores como la espectroscopía de Raman para mejorar su capacidad de respuesta ante riesgos microbiológicos.

A pesar del éxito demostrado en la identificación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, es importante considerar las limitaciones del estudio. La variabilidad en las condiciones ambientales y las características específicas del queso pueden influir en los resultados obtenidos mediante espectroscopía de Raman. Por lo tanto, futuras investigaciones deberían centrarse en estandarizar los métodos y explorar cómo diferentes factores afectan la detección microbiana.

4.2.3. Análisis de viabilidad

En cuanto al análisis microbiológico usando Compact Dry, el tiempo que tarda en realizarse el análisis es de 25.3 horas y tiene un costo de \$ 730.47 por las 90 muestras,

y el costo unitario es de \$ 8.11 y esto concuerda con la tabla comparativa de métodos microbiológicos rápidos de Granados y Pérez (2020) donde indica que el método Compact Dry tarda de 24 a 48 horas y tiene un costo promedio 10 dólares por análisis/muestra, estableciendo que tiene relación con los resultados obtenidos.

Para el análisis mediante espectroscopía de Raman, tomando en cuenta todas las pre- operaciones para realizar este proceso, es de 22.67 horas, y 15 min para analizar cada muestra. El costo total de realizar este proceso es de \$ 555.16 por las 90 muestras y \$ 6.16 por unidad, concordando con el estudio de Ortega et al., (2015) donde se trabajó con espectroscopía de Raman para la caracterización de bacanora, estipula que el tiempo que tarda en realizar los análisis de muestra es de 15 min por cada muestra y en cuanto a costo por muestra es de 8 dólares.

La metodología más rápida en base a los resultados obtenidos es la espectroscopía de Raman, ya que tarda 15 min en dar el resultado (presencia/ausencia) de los microorganismos por muestra, mientras que para Compact Dry tarda 24 h y 30 min en dar el resultado (UFC/g). La metodología más viable desde el punto de vista financiero es la espectroscopía de Raman ya que, por muestra, el costo es de \$ 6.16, siendo más económica que Compact Dry con \$ 8.11 por muestra, aunque la diferencia es mínima, a gran escala existe una diferencia financiera notable entre metodologías.

Es importante considerar que el costo inicial por muestra analizada es de \$ 10.61, hasta alcanzar el punto de equilibrio, momento en el cual se habrá cubierto el endeudamiento asociado a la adquisición de equipos, como el espectrómetro Raman, el ultra congelador y el liofilizador. A largo plazo, se prevé que los costos se reduzcan a \$ 6.16 por muestra, lo que hará que esta metodología sea más económica en comparación con las técnicas tradicionales. Además, se anticipa la realización de estudios más amplios y la estandarización de los procesos para la detección microbiológica. Esto facilitará la entrada de la espectroscopia Raman en el mercado, permitiéndole competir efectivamente con las metodologías convencionales.

Basándose en los resultados obtenidos y el análisis realizado sobre los tres objetivos propuestos, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Por lo tanto, hay evidencia suficiente para afirmar que la espectroscopía Raman representa un método prometedor dentro del sector alimentario debido a su capacidad para ofrecer ventajas

significativas en cuanto a fiabilidad, costo y tiempo respecto a Compact Dry en el contexto específico de detección microbiana.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- La cuantificación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en quesos frescos de los mercados Cepia, Central y San Miguel ha revelado información crítica sobre la calidad microbiológica de estos productos, los resultados obtenidos indican niveles preocupantes de estos microorganismos indicadores de calidad, lo que sugiere deficiencias en las prácticas de higiene durante la producción y manipulación del queso e incumplimiento de los parámetros establecidos en la norma NTE INEN 1528.
- La determinación de los espectros de los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos sin sal ha proporcionado información valiosa sobre las características espectroscópicas de estos microorganismos. Los resultados obtenidos indican que las longitudes de onda específicas, como 1100 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} para *S. aureus*, y el rango de 1000 a 1030 cm^{-1} para *E. coli*, son indicadores clave que permiten la identificación (presencia/ausencia) de estos microorganismos en los quesos frescos sin sal.
- Los resultados obtenidos mediante espectroscopia Raman son de naturaleza cualitativa y se alinean con los hallazgos cuantitativos proporcionados por el método Compact Dry. Ambas metodologías coinciden en la detección de microorganismos indicadores de calidad, específicamente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en las muestras analizadas. Esto sugiere que los análisis realizados para determinar la carga microbiológica son consistentes y confiables, lo que refuerza la validez de los métodos empleados en esta investigación. La concordancia entre ambas técnicas no solo valida los resultados, sino que también resalta la importancia de utilizar enfoques complementarios en el estudio de la calidad microbiológica.

- Desde una perspectiva industrial, la espectroscopía Raman se presenta como la metodología más adecuada para el análisis microbiológico, ya que proporciona resultados en tan solo 15 min a un costo de \$ 6.16 por muestra, cabe recalcar que el costo está dado después de que se canceló con la inversión inicial y se llegó a un punto de equilibrio. Esta técnica permite la identificación de microorganismos en cantidades mínimas, lo que la convierte en un complemento ideal a los métodos microbiológicos tradicionales, optimizando así el proceso de detección y control de patógenos.
- La implementación de la espectroscopia Raman como metodología para la detección microbiológica presenta un costo inicial de \$ 10.61 por muestra, lo que refleja la inversión necesaria para cubrir el endeudamiento asociado a la adquisición de equipos especializados. Sin embargo, a medida que se avanza hacia el punto de equilibrio, se proyecta una reducción significativa en los costos, alcanzando los \$ 6.16 por muestra a largo plazo. Esta disminución no solo hará que la técnica sea más competitiva en términos económicos, sino que también permitirá un mayor desarrollo de estudios y la estandarización de procesos en el ámbito microbiológico.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un estudio en cada etapa de la elaboración de queso fresco, para identificar en cuál se produce mayor contaminación para que puedan controlar y minimizar la carga microbiana del producto terminado.
- Establecer estudios donde se use la metodología de espectroscopía de Raman para la determinación de contaminantes químicos que pudiesen estar presentes en las muestras analizadas.
- Desarrollar nuevas investigaciones acerca de la espectroscopía de Raman en alimentos de cualquier tipo.
- Investigar otras cepas bacterianas y su interacción con componentes del queso para ampliar el alcance del análisis microbiológico utilizando esta técnica.
- Tener en cuenta la humedad del alimento a la hora hacer un análisis Raman, ya que la presencia de agua genera fluorescencia/ruido en el espectro resultante y limita el correcto análisis.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3M Food Safety. (2017). *Guía de interpretación de Placas Petrifilm™ de Alta Sensibilidad para recuento de Coliformes*. 3M Ciencia aplicada a la Vida: <file:///C:/Users/Steff/Downloads/multimedia.pdf>
- Aguilera, A., Urbano, E., y Jaimes, C. (02 de Mayo de 2014). Pathogenic bacteria in raw milk: A public health and food safety problem. *Redalyc*, 83-93.
- Andrade, M. P. (20 de Junio de 2023). *Evaluación de las características organolépticas y fisicoquímicas de los quesos frescos de mesa que se comercializan en la Sierra Norte del Ecuador [Tesis de ingeniería]*. repositorio.utn.edu.ec: <https://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/14128>
- Aparicio, D., Ariza, J., Calvo, M., Daza, J., y Echávez, E. (2012). Espectroscopia infrarroja. Una técnica alternativa para la identificación de microorganismos. *Revista Ciencia y Salud Virtual*, 123-131.
- Basic Farm . (1 de Junio de 2021). *¿Qué son los análisis microbiológicos y qué tipos existen?* Basic Farm : <https://basicfarm.com/blog/definicion-tipos-analisis-microbiologicos/>
- Compact Dry. (2020). *Manual de Usuario final*. Compact-dry.com: <http://compact-dry.com/wp-content/uploads/2020/10/CompactDryTM-End-User-Manual.pdf>
- Dávila, N., y Hernández, J. (Julio de 2006). *Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612753003.pdf>
- Dewantier, G., Torley, P., y Blanch, E. (2023). Identifying Chemical Differences in Cheddar Cheese Based on Maturity Level and Manufacturer Using Vibrational Spectroscopy and Chemometrics. *Molecules*.
- Doyle, M., Diez, F., y Hill, C. (2019). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC.: Address editorial.

Edenred. (11 de Enero de 2023). *Costos directos: qué son y cómo efficientarlos en tu empresa*. Edenred: <https://www.edenred.mx/blog/costos-directos-que-son-y-como-eficientarlos-en-tu-empresa>

Edinburg. (2021). *Raman Spectroscopy*. https://www.edinst.com/wp-content/uploads/2019/07/Ultra-high-resolution-spectra_RED.jpg

Educarplus. (2019). *Modelos de investigación científica*.

Escobar, S., Albuja, A., Tene, K., Jara, H., y Ramírez, J. (2023). Análisis Microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en un mercado, de la ciudad de Riobamba. *Perfiles*, 13-23.

Fariñas, M. D. (2022). *Utilidad de la Espectroscopia Raman para el diagnóstico rápido y la tipificación de microorganismos de interés clínico*. Valdecilla: Instituto de Investigación Sanitaria.: <https://portalinvestigacion.idival.org/proyectos/111336>

Ferone, M., Gowen, A., Fanning, S., y Scannell, A. (2020). Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Reviews in Food Science and Food Safety*, 3106-3129.

Gómez, A. (19 de Abril de 2023). *¿Qué es y para qué sirve la espectroscopia de Raman*. Laboratorios de análisis y certificación ICE: <https://ige.org/2023/04/19/que-es-y-para-que-sirve-la-espectroscopia-raman/>

Granados, L., y Pérez, V. (27 de Enero de 2020). *Metodologías microbiológicas como herramientas de verificación, control y calidad en la industria de alimentos y bebidas*. Basic Farm: <https://basicfarm.com/blog/metodologias-microbiologicas-control-calidad-industria-alimentos-bebidas/>

Gutierrez, V., y Otero, J. (Diciembre de 2014). *Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones*. Caracterización de nuevos materiales: https://www.researchgate.net/profile/Javier-Otero/publication/280720782_Espectroscopia_Raman_Fundamento_y_aplicaciones/links/55c28a6108aeb975673e460b/Espectroscopia-Raman-Fundamento-y-aplicaciones.pdf

Hernández, E. (Agosto de 2018). *Elaboración y pruebas de desempeño de mezclas asfálticas modificadas con desechos de llantas tratados químicamente*. Guanajuato, Mexico. http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/5313/1/EDGAR%20FABIÁN%20VÁZQUEZ%20HERNÁNDEZ_Tesis24.pdf

- Huertas, C., Urbano, E., y Torres, M. (28 de Enero de 2019). Molecular diagnosis: an alternative for the detection of pathogens in food. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 513-528. Revista de ciencias médicas: <https://www.redalyc.org/journal/1804/180460597013/html/>
- IBERO. (10 de Agosto de 2020). *¿Qué es la investigación aplicada y cuáles son sus principales características?* Universidad Iberoamericana : <https://blogposgrados.tijuana.iberomx.com/investigacion-aplicada/>
- IEQFB. (17 de Noviembre de 2021). *¿Qué es la espectroscopia?: Tipos y técnicas.* Instituto Europeo de Química, Física y Biología: <https://ieqfb.com/que-es-la-espectroscopia-tipos-y-tecnicas/>
- ISO 11290-1. (2017). *Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. Part 1: Detection method.* International Organization for Standardization: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/60313/bdb4d787c42f45668ea454bbad1dbdbc/ISO-11290-1-2017.pdf>
- López, J. O., Manzo, G. M., y Vega, R. Z. (27 de abril de 2023). EL QUESO Y SUS VARIETADES. *Milenaria, Ciencia y Arte UMICH.mx*, 19-20. https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj_oYzl3qGKAxVJSTABHXUMNy4QFnoECBsQAQ&url=https%3A%2F%2Fdiagonalnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F9147150.pdf&usg=AOvVaw1Kq914uYIHW-WpDbPD_8_7&opi=89978449
- Martínez, A., Villoch, A., Ribot, A., y Ponce, P. (2014). Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba. *Revista De Salud Animal*, 35.
- Martínez, Y., y Rivera, A. (3 de Noviembre de 2020). *Aplicaciones de las técnicas moleculares en inocuidad alimentaria.* CienciaUANL: <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=10575>
- Mata, L. (21 de Mayo de 2019). *El enfoque cuantitativo de investigación.* Investigalia: <https://investigaliacr.com/investigacion/el-enfoque-cuantitativo-de-investigacion/>
- Merchán, N., Pineda, L., Cárdenas, A., Gonzáles, N., Otálora, M., y Sánchez, Y. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*.

Micro Planet. (12 de Diciembre de 2019). *Compact Dry®*, placas miniaturizadas para el cultivo microbiológico. MicroPlanet. Biociencias: <https://www.microplanet-psl.com/es/blog/compact-dry-placas-miniaturizadas/#:~:text=Compact-Dry%2C%20placas%20miniaturizadas,%2C%20cosméticos%2C%20farmacéuticos%20y%20aguas.>

Molleda, M. (2016). *Frecuencia de enterobacterias en queso fresco, carne molida y fresa en el mercado mayorista "La Parada"*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: <https://www.semanticscholar.org/paper/Frecuencia-de-enterobacterias-en-queso-fresco%2C-y-en-Román-Magaly/051519f314f485f4157d038c1ff7fa0ff794b9a6>

Mundo lácteo. (14 de Febrero de 2022). *¿Engorda menos el queso fresco? Propiedades nutricionales y beneficios*. Mundo lácteo: <https://mundolacteo.es/queso/queso-fresco>

Nakar et al. (2022). Detección de cepas clínicas multirresistentes de *E. coli* con espectroscopía Raman. *Química Analítica y Bioanalítica*, 1481-1492.

Nandi, S. (September de 2021). *Raman Spectroscopy*. Indian Association for the Cultivation of Science: https://www.researchgate.net/publication/354508318_RAMAN_SPECTROSCOPY

NTE INEN 1528. (2012). *Normativa del queso fresco sin madurar*. Instituto Ecuatoriano de Normalización: <https://ia903209.us.archive.org/0/items/ec.nte.1528.2012/ec.nte.1528.2012.pdf>

NTE INEN 1529-13. (1998). Control microbiológico de los alimentos Enterobacteriaceae: <https://archive.org/details/ec.nte.1529.13.1998/page/n2/mode/1up?view=theater>

NTE INEN 1529-14. (1998). Control microbiológico de alimentos. *Staphylococcus aureus*.: <https://archive.org/details/ec.nte.1529.14.1998/page/n1/mode/1up?view=theater>

NTE INEN 1529-15. (2009). *Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección*. Instituto Ecuatoriano de Normalización: <https://ia902908.us.archive.org/8/items/ec.nte.1529.15.1996/ec.nte.1529.15.1996.pdf>

- NTE INEN 2687. (2013). *Mercados Saludables*. Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Organización Panamericana de la Salud. (12 de Mayo de 2023). *Manual para Manipuladores de Alimentos*. Organización Panamericana de la Salud: <https://campus.paho.org/es/cursos/manipuladores-alimentos>
- Ortega, V., Salazar, V., Weber, A., Schröder, W., Javahiraly, N., Meyrueis, P., y Moreno, M. (12 de Enero de 2015). *Possible use of Raman spectroscopy as a tool for analysis in production and quality control of bacanora*. Scielo: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802015000200004&script=sci_arttext
- Padillos, M. (2020). El mercado del queso en Ecuador. En *Exportaciones e Inversiones* (Vol. 1, págs. 1-6). España.
- Rebrošová et al. (2017). Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy. *Scientific Reports nature research*.
- Rodriguez, N. (3 de Mayo de 2024). *Estructura de costos: qué es y cómo crearla*. HubSpot: <https://blog.hubspot.es/sales/estructura-costos>
- Saito, M. (07 de abril de 2014). *Defectos mas comunes en los quesos*. www.tecnolacteoscarnicos.com: <https://www.tecnolacteoscarnicos.com/resumen/2014/p3.pdf>
- Santiago, J. (15 de Octubre de 2024). *Métodos rápidos de detección de microorganismos: clave para la seguridad alimentaria*. The Food Tech: Seguridad Alimentaria: <https://thefoodtech.com/seguridad-alimentaria/metodos-rapidos-de-deteccion-de-microorganismos-clave-para-la-seguridad-alimentaria/>
- SendPulse. (14 de Mayo de 2024). *Costos indirectos*. SendPulse: <https://sendpulse.com/latam/support/glossary/indirect-costs>
- Shih, W.-C., Bechtel, K., y Feld, M. (2021). *Non-invasive glucose sensing with raman spectroscopy*. University of Houston .
- Universidad de la República. (14 de Diciembre de 2020). *Etapas de la Investigación Bibliográfica*. Universidad de la República Uruguay: <https://www.fenf.edu.uy/wp-content/uploads/2020/12/14dediciembrede2020Etapasde-la-investigacionbibliografica-1.pdf>

Vaca, C., Guevara, M., Avecilla, D., y Tambini, G. (Enero de 2016). *Mercados Saludables en Ecuador*. Ministerio de Salud Pública: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/03/Manual_Mercados_Saludables_final-25.04.2016.pdf

Valera, S., Montero, E., Rojas, L., Valera, A., y Gutiérrez, D. (28 de Diciembre de 2018). *Raman spectroscopy analysis of DNA using the SERS method*. file:///C:/Users/Steff/AppData/Local/Temp/MicrosoftEdgeDownloads/3c140903-5b47-44d0-a85a-abba472d3fed/Dialnet-AnalisisDeADNMedianteEspectroscopiaRamanUtilizando-7448589.pdf

Vásquez, V., Salhuana, J., Jiménez, L., y Abanto, L. (2018). Evaluación de la calidad Bacteriológica de los quesos frescos en Cajamarca. *Ecología Aplicada*, 45-51.

Vega, E., y Salgado, V. (Diciembre de 2019). *Proyecto de integración y fortalecimiento de la cadena de producción de queserías artesanales de Manabí y Esmelandas con calidad e inocuidad*. Proyecto financiado por la Unión Europea: <https://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/2022/06/PRODUCTO4PROYECTOSENPLADESFORTALECIMIENTOQUESERIASRURALES.pdf>

VII. ANEXOS

Anexo 1. Acta de la sustentación de Predefensa del TIC

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI

FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE ALIMENTOS

ACTA

DE LA SUSTENTACIÓN ORAL DE LA PREDENSA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR


ESTUDIANTE:	Chipud Pistala Lorena Stefania	CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401770318
PERIODO ACADÉMICO:	2024B	DOCENTE TUTOR:	MSC. Liliana Margoth Chamorro Hernández
PRESIDENTE TRIBUNAL	PhD. Francisco Javier Domínguez Rodríguez		
DOCENTE:	PhD. Marco Rubén Burbano Pulles		
TEMA DEL TIC:	"Comparación de análisis microbiológicos con espectroscopía Raman para determinar Escherichia coli y Staphylococcus aureus en quesos frescos sin sal"		


No.	CATEGORÍA	Evaluación cuantitativa	OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES
1	PROBLEMA - OBJETIVOS	7,67	Se sugiere cambiar el título del trabajo para reflejar de mejor manera lo realizado en el trabajo. Modificar el segundo objetivo específico
2	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	7,00	Explicar de mejor manera la diferencia entre los choques elásticos e inelásticos
3	METODOLOGÍA	7,33	Debe haber concordancia entre el título y los objetivos, la hipótesis debe redactarse nuevamente. Toda la sección debe redactarse en pasado evitando personalizar
4	RESULTADOS	7,00	La comparación de resultados debe hacerse en la misma escala.
5	DISCUSIÓN	6,67	Debe ampliarse la discusión
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	7,00	Deben redactarse de mejor manera para mostrar claramente los hallazgos de la investigación. Revisar la conclusión sobre la eficiencia
7	DEFENSA, ARGUMENTACIÓN Y VOCABULARIO PROFESIONAL	7,33	
8	FORMATO, ORGANIZACIÓN Y CALIDAD DE LA INFORMACIÓN	6,67	Debe cumplir con el formato establecido, presenta faltas ortográficas y de redacción


Obteniendo una nota de: **7.00** Por lo tanto, **APRUEBA** ; debiendo el o los investigadores acatar el siguiente artículo:

Art. 36.- De los estudiantes que aprueban el informe final del TIC con observaciones.- Los estudiantes tendrán el plazo de 10 días para proceder a corregir su informe final del TIC de conformidad a las observaciones y recomendaciones realizadas por los miembros del Tribunal de sustentación de la pre-defensa.

Para constancia del presente, firman en la ciudad de Tulcán el **Jueves, 16 de enero de 2025**


 PhD. Francisco Javier Domínguez Rodríguez
PRESIDENTE TRIBUNAL


 MSC. Liliana Margoth Chamorro Hernández
DOCENTE TUTOR


 PhD. Marco Rubén Burbano Pulles
DOCENTE

Anexo 2. Certificado del abstract por parte de idiomas



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI FOREIGN AND
NATIVE LANGUAGE CENTER

ABSTRACT- EVALUATION SHEET				
NAME: Chipud Pistala Lorena Stefania				
DATE: 16 de enero de 2025				
Topic: “Comparación entre análisis microbiológicos y espectroscopía Raman para determinar Escherichia coli y Staphylococcus aureus en quesos frescos sin sal”				
MARKS AWARDED Q U A N T I T A T I V E A N D Q U A L I T A T I V E				
VOCABULARY AND WORD USE	Use new learnt vocabulary and precise words related to the topic	Use a little new vocabulary and some appropriate words related to the topic	Use basic vocabulary and simplistic words related to the topic	Limited vocabulary and inadequate words related to the topic
	EXCELLENT: 2 <input type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input checked="" type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
WRITING COHESION	Clear and logical progression of ideas and supporting paragraphs.	Adequate progression of ideas and supporting paragraphs.	Some progression of ideas and supporting paragraphs.	Inadequate ideas and supporting paragraphs.
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
ARGUMENT	The message has been communicated very well and identify the type of text	The message has been communicated appropriately and identify the type of text	Some of the message has been communicated and the type of text is little confusing	The message hasn't been communicated and the type of text is inadequate
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
CREATIVITY	Outstanding flow of ideas and events	Good flow of ideas and events	Average flow of ideas and events	Poor flow of ideas and events
	EXCELLENT: 2 <input type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
SCIENTIFIC SUSTAINABILITY	Reasonable, specific and supportable opinion or thesis statement	Minor errors when supporting the thesis statement	Some errors when supporting the thesis statement	Lots of errors when supporting the thesis statement
	EXCELLENT: 2 <input checked="" type="checkbox"/>	GOOD: 1,5 <input type="checkbox"/>	AVERAGE: 1 <input type="checkbox"/>	LIMITED: 0,5 <input type="checkbox"/>
TOTAL/AVERAGE	9 - 10: EXCELLENT 7 - 8,9: GOOD 5 - 6,9: AVERAGE 0 - 4,9: LIMITED		TOTAL 9	



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL
CARCHI FOREIGN AND NATIVE LANGUAGE
CENTER**

**Informe sobre el Abstract de Artículo Científico o
Investigación.**

Autor: Chipud Pistala Lorena Stefanía

Fecha de recepción del abstract: 16 de enero de 2025

Fecha de entrega del informe: 16 de enero de 2025

El presente informe validará la traducción del idioma español al inglés si alcanza un porcentaje de: 9 – 10 Excelente.

Si la traducción no está dentro de los parámetros de 9 – 10, el autor deberá realizar las observaciones presentadas en el ABSTRACT, para su posterior presentación y aprobación.

Observaciones:

Después de realizar la revisión del presente abstract, éste presenta una apropiada traducción sobre el tema planteado en el idioma Inglés. Según la rúbrica de evaluación de la traducción en Inglés, ésta alcanza un valor de 9; por lo cual se valida dicho trabajo.

Atentamente



Firma electrónicamente por:
MARTHA ARACELLY
VIVEROS ALMEIDA

MA. Martha Viveros

Docente responsable del

CIDEN

Anexo 3. Análisis microbiológico

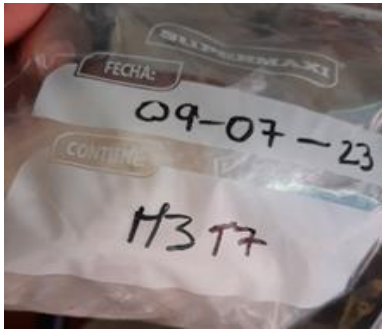


Figura 17. Toma de muestras y etiquetado



Figura 18. Transporte a Yachay Tech



Figura 19. Refrigeración por 24 h

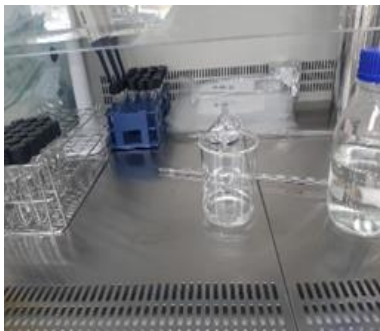


Figura 20. Medición de agua peptonada



Figura 21. Pesar 25 g de queso muestreado



Figura 22. Homogenizar el queso muestra y agua peptonada



Figura 23. Preparación de los tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada para hacer las disoluciones hasta 10^{-4}



Figura 24. Disoluciones



Figura 25. Cultivo en Compact Dry

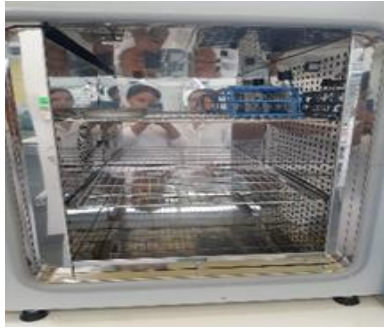


Figura 26. Incubación por 24 h a 32 °C



Figura 27. Conteo de colonias en *S. aureus*

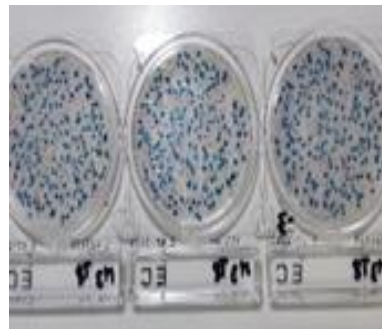


Figura 28. Conteo de colonias en *E. coli*

Anexo 4. Análisis Raman



Figura 29. Cuajado de la leche para realizar el queso control



Figura 30. Desuerado del queso control



Figura 31. Prensado del queso control



Figura 32. Empacado y refrigeración del queso control



Figura 33. Pesar 25 g de queso control para inocular



Figura 34. Etiquetado de los tubos falcón que contienen el queso control



Figura 35. Aplicación de rayos UV para la eliminación de todos los microorganismos presentes



Figura 36. Preparar el caldo de cultivo con *E. coli* y *S. aureus* con una absorbancia de 0.12



Figura 37. Poner una gota del caldo preparado para realizar tinción de Gram y verificar Cepas puras



Figura 38. Poner los reactivos para la tinción de Gram



Figura 39. Vista al microscopio de las bacterias puras



Figura 40. Inoculación al queso control por 15 min en inmersión



Figura 41. Muestras de queso control listas para ultracongelar y liofilizar



Figura 42. Muestras del queso control muestreado liofilizadas



Figura 43. Preparación de las muestras sobre un portaobjetos para llevar a espectrofotómetro de Raman



Figura 44. Muestras listas para procesar debidamente etiquetadas



Figura 45. Muestras ingresadas al microscopio Raman

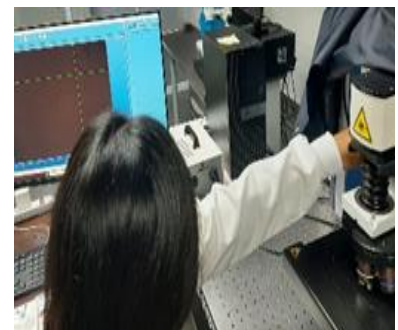


Figura 46. Enfoque de la muestra a analizar

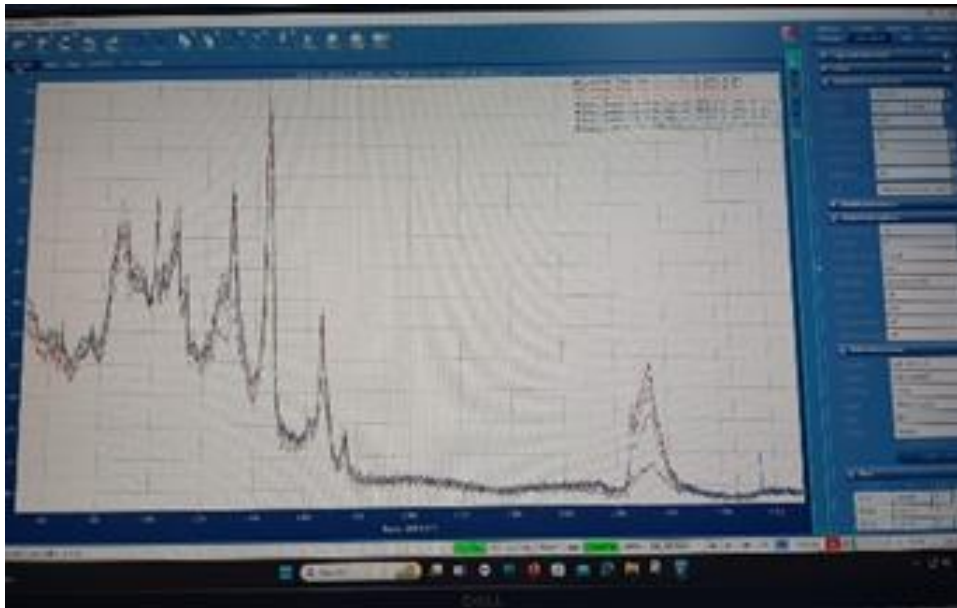


Figura 47. Lectura del espectro Raman con el láser 532 al 5 %

OriginLab Data Analysis and Graphing Software

HOME | PRODUCTS | NEWS & EVENTS | DOWNLOADS | SERVICES | SUPPORT | CONTACT | WE LINK

OriginLab Stock Prices - COMMERCIAL

Products in this category are for users currently working in the commercial sector or for personal use.
 Please select an option below (All Origin products listed below include first year **free** maintenance)
 For more information about multi-seat software packages, please visit our [Corporate Pricing Page](#).
 Note: Origin Lab Corporation reserves the right to adjust prices and/or alter that as deemed to have the most favorable relation.

OriginPro 2025 Individual Node-locked - download	\$2,250.00	OriginPro 2025 Individual Node-locked - download Includes first year of maintenance
Origin 2025 Individual Node-locked - download	\$1,850.00	Origin 2025 Individual Node-locked - download Includes first year of maintenance
OriginPro 2025 Annual Subscription	\$675.00	OriginPro 2025 Individual Node-locked Annual Subscription- Download
OriginPro 2025 3-Year Subscription	\$1,800.00	OriginPro 2025 Individual Node-locked 3-Year Subscription- Download
Origin 2025 Annual Subscription	\$490.00	Origin 2025 Individual Node-locked Annual Subscription- Download

Figura 48. Interpretación y eliminación de ruido usando el Software Origin

Anexo 5. Manual Compact Dry

CompactDry™

MANUAL DE USUARIO FINAL

Siempre hay una mejor manera.



NISSUI PHARMACEUTICAL CO.,LTD.

TABLA DE CONTENIDO



Introducción	3
Características	4-6
Protocolos	7-24
Recuento total	7
De tipo Coliforme	8
<i>E. Coli</i> / Coliforme	9
Levadura y Moho	10
Levadura y Moho Rápido	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Salmonella</i>	13
Enterobacteriaceae	14
<i>Enterococcus</i>	15
<i>Bacillus cereus</i>	16
<i>Listeria</i>	17
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Bacterias heterótrofas en agua	20
Recuento total en Té	21
Muestreo ambiental	22-24
Muestreo por filtración de membrana	24
Aplicaciones industriales	25-36
Industria Panadera	25
Industria de Bebidas	26
Industria Láctea	27
Industria Cárnica	28
Industria de "Snacks"	29
Industria de Frutas y Hortalizas	30
Industria de Pescado y Mariscos	31
Industria del Agua	32
Industria Azucarera	33
Industria de Alimentación animal	34
Nutracéuticos	35
Industria Cosmética	36
Tiempo de Incubación y Temperatura	37
Protocolo de Dilución	38
Pautas de Conteo	39-41
Eliminación de residuos	42
Requisitos mínimos de Laboratorio	43-45
Preguntas Frecuentes	46-47

La población mundial está en continuo crecimiento, al igual que la necesidad de productos seguros y de calidad. Las personas consumen alimentos para sobrevivir, toman suplementos dietéticos y se aplican cosméticos para mejorar su aspecto. En general, los alimentos están disponibles en el mercado como congelados, refrigerados, precocidos y/o procesados, mientras que los nutracéuticos y cosméticos están listos para consumir y listos para aplicar, respectivamente. El común denominador para todos estos productos es la necesidad de ser procesados adecuadamente como productos terminados.

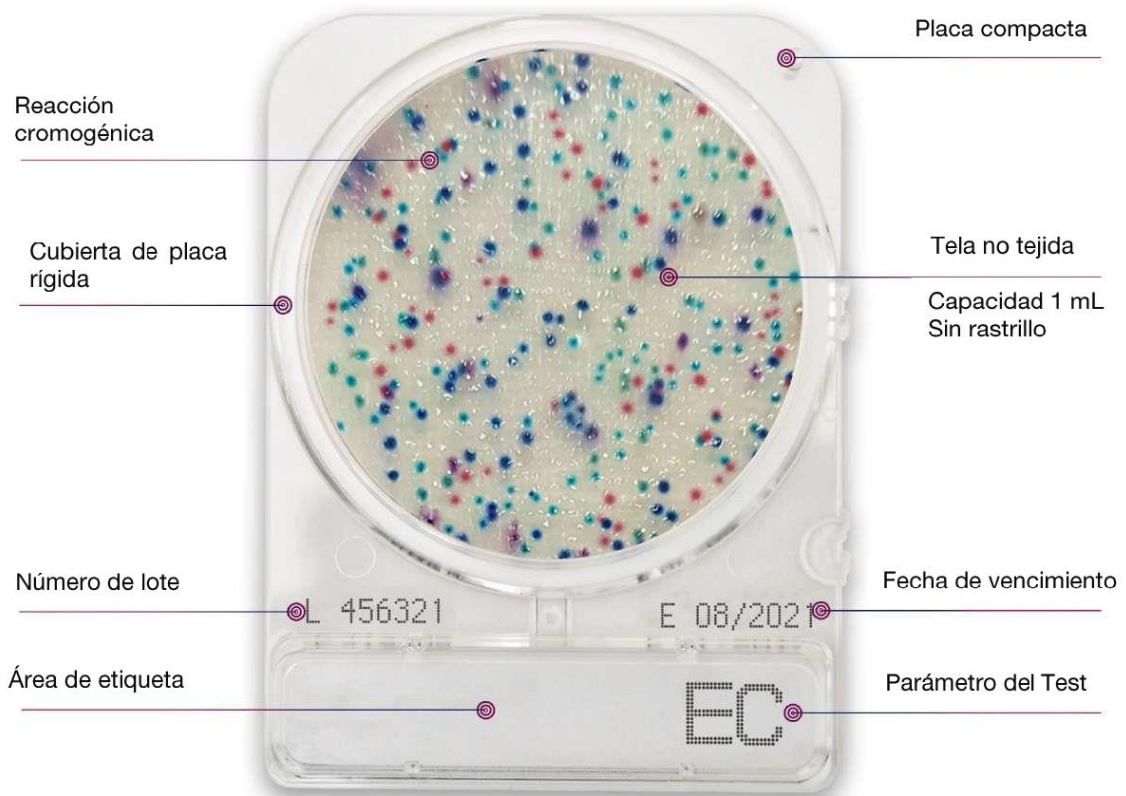
El procesamiento adecuado de alimentos, suplementos dietéticos, aditivos y cosméticos debe estar alineado con los estándares establecidos por el gobierno o cualquier organización reconocida interesada en dichos productos. Para poder lograr esto, los fabricantes deben comenzar a invertir en diferentes métodos de prueba de seguridad alimentaria que garanticen la calidad y seguridad de sus productos. Uno de los más importantes es someter los productos a análisis microbiológicos para verificar si estos se encuentran dentro de los estándares establecidos por los comités reguladores de seguridad de productos específicos. La forma tradicional de hacer el ensayo es a través del método convencional de enchapado, que puede tomar de dos (2) a siete (7) días dependiendo del microorganismo de interés. A esto se suman los métodos de identificación, especialmente para los patógenos, que necesitan confirmación adicional, como pruebas bioquímicas o incluso pruebas de identificación molecular. Con estos métodos tradicionales, los alimentos procesados no pueden ser fácilmente declarados como "aptos para entrega" o "aprobados" por el Control de Calidad. Esto conduce a un flujo más lento, costos de almacenamiento adicionales e inventario de mercancías con una vida útil más corta.

Para abordar este problema, los fabricantes recurren a herramientas alternativas que pueden hacer la misma función pero con resultados más rápidos sin sacrificar la sensibilidad y la especificidad. Una de esas herramientas es CompactDry™, un producto de Nissui Pharmaceuticals Co., Ltd. con sede en Japón, una innovación del método de placa convencional y el futuro de las pruebas microbiológicas. CompactDry™ es una placa de medios cromogénicos lista para usar que se puede usar como sustituto directo del método convencional. Elimina el laborioso trabajo de preparación de medios y esterilización. En las grandes empresas fabricantes, se puede ahorrar un total de cuatro (4) a seis (6) horas diarias en las pruebas microbianas generales, que se pueden utilizar para otras tareas de laboratorio. Además, para la creación de micro, pequeñas y medianas empresas con instalaciones limitadas, el uso de kits de prueba rápida también es una ventaja porque solo necesita un espacio pequeño debido a los requisitos mínimos de laboratorio.

CompactDry™ es muy fácil de usar y requiere un entrenamiento mínimo. Este kit de prueba rápida está disponible en 15 parámetros que incluyen organismos de descomposición, patógenos y otros parámetros especiales. En comparación con otras tecnologías similares, CompactDry™ es el único sistema con pruebas disponibles para *Enterococcus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y Recuento Total en infusión. También ofrece un tiempo de prueba reducido para *E. coli* / coliformes, y Levadura y Moho con solo 24-72 horas de tiempo de incubación, respectivamente, otro desarrollo de productos que es parte del compromiso de Nissui Corporation con la innovación continua y proporcionar las mejores soluciones para diversas industrias.

CARACTERÍSTICAS

CompactDry™
Siempre hay una mejor manera.



CARACTERÍSTICAS

CompactDry™
Siempre hay una mejor manera.

LISTO PARA USAR

- No requiere esterilización
 - Ahorra tiempo, agua y energía
 - Evita series de contaminación
- medios cromogénicos lista

MEDIOS AUTODIFUSORES

- Permite un tiempo de manipulación de 10 segundos
- Elimina el uso de otros accesorios, tales como rastrillo
- Sin "tiempo de gelificación"; el medio infundido en la almohadilla de tela se solidifica rápidamente tras la inoculación
- No es necesario presionar, extender e inclinar las placas



DISEÑO INNOVADOR

- Placa compacta con cubierta de placa robusta para evitar la contaminación y los derrames
- Con área de escritura que no se borra fácilmente debido al acabado mate
- Diseñado con una manija fácil de levantar y espacio de aire para una distribución uniforme de oxígeno
- Con capacidad de apilamiento ilimitado dependiendo de la capacidad de la incubadora sin comprometer el crecimiento del microorganismo objetivo

PRESENTACIÓN ESTRATÉGICA

- Estable a temperatura ambiente durante 18-36 meses.
- Placas con cluster para agrupar un tipo de muestra con múltiples diluciones
- Las placas también se pueden romper para un solo uso
- Empaquetado con 4 placas por lámina para evitar el efecto de la vida útil secundaria (30 días) al abrir la lámina

CARACTERÍSTICAS

CompactDry™
Siempre hay una mejor manera.

CONVENIENTE

- Flujo de trabajo más optimizado
- Temperatura de incubación uniforme de 35 °C para la mayoría de los parámetros, excepto para Levadura y Moho (25 °C) y *Salmonella* (41 °C)
- Pruebas microbiológicas en 3 sencillos pasos: inocular, incubar e interpretar



MAYOR GAMA DE PARÁMETROS DISPONIBLE & MAYORES APLICACIONES

- Actualmente con un total de 15 parámetros que incluyen patógenos, comúnmente probados y otros parámetros especiales
- Aplicable para la mayoría de las muestras sólidas y líquidas, filtración por membrana, muestreo de aire, toma de muestras manuales y superficiales

RESULTADO RÁPIDO & PRECISO

- Resultados en tan solo 24-48 horas para la mayoría de los parámetros
- No se necesitan discos ni procedimientos de confirmación adicionales
- Contraste de color distintivo para una mejor identificación de colonias
- Diferenciación más fácil entre levadura y moho debido al espacio de aire que permite el crecimiento 3D
- Fácil recolección de colonias aisladas para su posterior análisis
- Aprobaciones internacionales: AOAC International, European Microval, Nordval y HPFB Health Canada





Recuento total

AOAC #010404 NordVal #033 MicroVal #20007LR01

Se refiere a todos los microorganismos presentes en una muestra que puede tolerar la presencia de oxígeno y no tiene requisitos de crecimiento específicos típicamente no incluidos en la formulación de medios de propósito general. De acuerdo con la regulación de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), el recuento total se considera uno de los parámetros de liberación para muestras de alimentos (congelados, refrigerados, precocidos y preparados), farmacéuticas y nutracéuticas.

Interpretación de resultados

Colonias rojas y de otro color

PROCEDIMIENTO

Pese asépticamente 10,0 g o pipetee 10,0 ml de muestra en un recipiente estéril apropiado (ej: bolsa Stomacher, botella de dilución, bolsa Whirl-Pak)

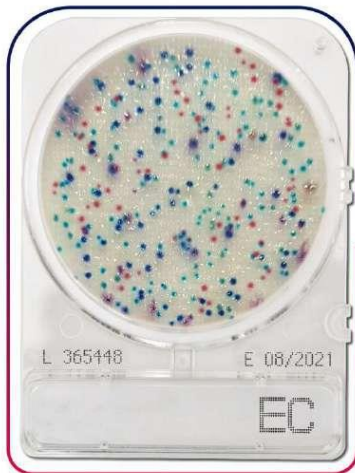
Agregue 90,0 ml de diluyente para lograr la dilución 1:10 y homogeneice. Ajuste el pH si es necesario. Los diluyentes sugeridos para los parámetros de rutina son el "buffer" de fosfato de Butterfield, Diluyente de Recuperación máxima y otros diluyentes apropiados según el BAM.

Si es necesario, diluya más la muestra (consulte la página 38).

Abra la tapa. Dispense 1,0 ml de muestra diluida en el medio de la placa CompactDry™. Vuelva a tapar la placa.

Invierta e incube las placas en condiciones específicas de incubación.
AOAC International: 35 ± 2 °C durante 48 ± 3 horas
MicroVal y NordVal: 30 ± 1 °C durante 48 ± 3 horas

Lea resultados



E. Coli / Coliforme

AOAC #110402 NordVal #036 MicroVal #MV0806-005 LR (*E. coli*)
MicroVal #MV0806-004 LR (Coliform)

Escherichia coli es un coliforme que se encuentra en el intestino de los animales de sangre caliente, lo que lo convierte en un excelente indicador de contaminación fecal. No todas las *E. coli* son patógenas, pero existen cepas que pueden considerarse bacterias oportunistas que infectan a un huésped inmunocomprometido. La prueba de la presencia de coliformes y *E. coli* es importante en la industria alimentaria, especialmente en el monitoreo de la calidad del agua.

Interpretación de resultados

E. coli - colonias azules

Coliformes totales - colonias rojas, azules y moradas

PROCEDIMIENTO

Pese asépticamente 10,0 g o pipetee 10,0 ml de muestra en un recipiente estéril apropiado (ej: bolsa Stomacher, botella de dilución, bolsa Whirl-Pak)

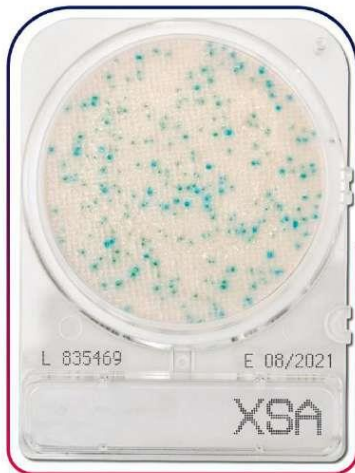
Agregue 90,0 ml de diluyente para lograr la dilución 1:10 y homogeneice. Ajuste el pH si es necesario. Los diluyentes sugeridos para los parámetros de rutina son el "buffer" de fosfato de Butterfield, Diluyente de Recuperación máxima y otros diluyentes apropiados según el BAM.

Si es necesario, diluya más la muestra (consulte la página 38).

Abra la tapa. Dispense 1,0 ml de muestra diluida en el medio de la placa CompactDry™. Vuelva a tapar la placa.

Invierta e incube las placas en condiciones específicas de incubación.
AOAC International: 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas
MicroVal, y NordVal: 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 horas

Lea resultados



Staphylococcus aureus

AOAC #081001 NordVal #042 MicroVal #2008LR14

Staphylococcus aureus es una microflora humana común, se puede encontrar naturalmente en la piel, la nariz y el cabello. Debido a esto, se usa comúnmente como índice de higiene personal de los manipuladores de alimentos. Por lo tanto, la alta población de estafilococos en el sistema alimentario indica falta de higiene y saneamiento. Normalmente son inofensivos, pero a una alta población, pueden comenzar a formar endotoxinas que causan intoxicación alimentaria por "estafilococos". También pueden tolerar baja actividad de agua y son oportunistas en alimentos con alto contenido de azúcar.

Interpretación de resultados

Colonias azules o celestes

PROCEDIMIENTO

Pese asépticamente 10,0 g o pipetee 10,0 ml de muestra en un recipiente estéril apropiado (ej: bolsa Stomacher, botella de dilución, bolsa Whirl-Pak)

Agregue 90,0 ml de diluyente para lograr la dilución 1:10 y homogeneice. Ajuste el pH si es necesario. Los diluyentes sugeridos para los parámetros de rutina son el "buffer" de fosfato de Butterfield, Diluyente de Recuperación máxima y otros diluyentes apropiados según el BAM.

Si es necesario, diluya más la muestra (consulte la página 38).

Abra la tapa. Dispense 1,0 ml de muestra diluida en el medio de la placa CompactDry™. Vuelva a tapar la placa.

Invierta e incube las placas en condiciones específicas de incubación.
AOAC International: 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas
MicroVal, y NordVal: 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 horas

Lea resultados



Industria Láctea

PARÁMETROS COMUNES DE PRUEBA

Recuento total (TC), *E. Coli* y Coliformes (EC), Enterobacteriaceae (ETB), Levadura y Moho (YM), *Staphylococcus aureus* (XSA), *Bacillus cereus* (XBC), *Salmonella* (SL), y *Listeria* (LS)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para organismos indicadores (TC, EC, ETB, YM, XSA y XBC*):

- **Muestras sólidas y líquidas** - corte o pese el tamaño de muestra estandarizado (por ejemplo, 10 g o 25 g) con un cuchillo o tijeras estériles. Coloque en un recipiente estéril, luego agregue el volumen apropiado de diluyente estéril (por ejemplo, 90 ml o 225 ml de "buffer" de agua peptonada o BPW, Diluyente de Recuperación máxima o MRD, o agua de peptona al 0,1%). Homogeneizar y diluir como corresponda.
- **Mantequilla** - según la norma ISO 6887-5:2010, pese 10 g o 25 g de muestra en un matraz estéril y caliente hasta que se derrita en un baño de agua a 45 °C. Agregue 90 ml o 225 ml de diluyente estéril precalentado a 45 °C y mezcle bien. El uso de Stomacher es muy recomendable.

* Se establece que *Bacillus Cereus* (XBC) sea probado solo para productos en polvo

LÍMITES REGLAMENTARIOS

Consulte el Codex Alimentarius, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la Agencia de Normas Alimentarias (FSA) u otros organismos reguladores locales.

NOTAS DE PROCESAMIENTO

Para la CompactDry™ EC, se puede observar interferencia para los productos lácteos fermentados (por ejemplo, yogur y queso blando) debido a su contenido natural de β-galactosidasa. Diluya como corresponda
Muestra: Yogur

Dilución: 10¹
Observación: luce Demasiado Numerosas para Contar (TNTC).



Figura 1

Dilución: 10²
Observación: <100 CFU/g



Figura 2

Al igual que otras pruebas que dependen de la actividad de la β-glucuronidasa para detectar *E. coli*, CompactDry™ EC no puede detectar *E. coli* 0157:H7 como *E. coli*.

E. coli 0157:H7 aparece como colonias moradas
E. coli: colonias azules
Coliformes: Colonias azules + rojas/moradas

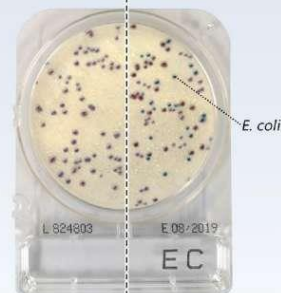
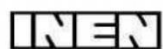


Figura 3



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

**NTE INEN 1528:2012
Primera revisión**

NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO MADURADOS. REQUISITOS.

Primera Edición

GENERAL STANDARD FOR UNRIPENED FRESH CHEESE. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, queso fresco no madurado, requisitos.
AL 03.01-420
CDU: 637.352
CIU: 3112
ICS: 67.100.30

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria</p>	<p>NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO MADURADOS. REQUISITOS</p>	<p>NTE INEN 1528:2012 Primera revisión 2012-03</p>
<p>1. OBJETO</p> <p>1.1 La presente Norma establece los requisitos para el queso fresco no madurado, incluido el queso fresco, destinado al consumo directo o a posterior elaboración.</p> <p>1.2 En caso que exista norma específica para una variedad de queso fresco, en particular se considerará esta.</p> <p style="text-align: center;">2. DEFINICIONES</p> <p>2.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>2.1.1 Queso. Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:</p> <p>a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o leche, de mantequilla o de cualquier combinación de estos ingredientes, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los ingredientes lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o</p> <p>b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a).</p> <p>2.1.1.1 Queso madurado. Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión.</p> <p>2.1.1.2 Queso madurado por mohos. Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.</p> <p>2.1.1.3 Queso no madurado. Se entiende por queso no madurado el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.</p> <p>2.1.2 Queso fresco. Es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos. También se designa como queso blanco.</p> <p>2.1.3 Queso condimentado. Es el queso al cual se han agregado condimentos y/o saborizantes naturales o artificiales autorizados.</p> <p>2.1.4 Queso cottage. Es el queso no madurado, escaldado o no, de alta humedad, de textura blanda o suave, granular o cremosa, preparado con leche descremada, coagulada con enzimas y/o cultivos lácteos, cuyo contenido de grasa láctea es inferior a 2% (m/m).</p> <p>2.1.5 Queso cottage crema. Es el queso cottage al que se le ha agregado crema, de manera que su contenido de grasa láctea es igual o mayor de 4% (m/m).</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, queso fresco no madurado, requisitos.</p>		

2.1.6 Queso quark (quarg). Es el queso no madurado ni escaldado, alto en humedad, de textura blanda o suave, preparado con leche descremada y concentrada, cuajada con enzimas y/o cultivos lácticos y separados mecánicamente del suero, cuyo contenido de grasa láctea es variable, dependiendo si se agrega crema o no durante su elaboración.

2.1.7 Queso ricotta. Es el queso de proteínas de suero no madurado, escaldado, alto en humedad, de textura granular blanda o suave, preparado con suero de leche o suero de queso con leche, cuajada por la acción del calor y la adición de cultivos lácticos y ácidos orgánicos.

2.1.8 Queso crema. Es el queso no madurado ni escaldado, con un contenido relativamente alto de grasa, de textura homogénea, cremosa, no granulada, preparado solamente con crema o mezclada con leche, cuajada con cultivos lácticos y opcionales se permite el uso de enzimas adicionales en los cultivos lácticos.

2.1.9 Queso de capas. Es el queso moldeado de textura relativamente firme, no granular, levemente elástica preparado con leche entera, cuajada con enzimas y/o ácidos orgánicos generalmente sin cultivos lácticos.

2.1.10 Queso duro. Es el queso no madurado, escaldado o no, prensado, de textura dura desmenuzable, preparado con leche entera, semidescremada o descremada, cuajada con cultivos lácticos y enzimas, cuyo contenido de grasa es variable dependiendo de la leche empleada en su elaboración y tiene un contenido relativamente bajo de humedad.

2.1.11 Queso mozzarella. Es el queso no madurado, escaldado, moldeado, de textura suave elástica (pasta filamentososa), cuya cuajada puede o no ser blanqueada y estirada, preparado de leche entera, cuajada con cultivos lácticos, enzimas y/o ácidos orgánicos o inorgánicos.

2.1.12 Quesillo criollo. Es el queso no madurado, escaldado, alto en humedad con textura blanda suave y elástica fabricado con leche, acidificada con ácido láctico, cuajado generalmente con cuajo líquido.

2.1.13 Queso criollo o queso de comida. Es el queso no madurado, preparado con leche, adicionado de cuajo y de textura homogénea, con desuerado natural.

2.1.14 Queso requesón. Es el producto obtenido por la concentración de suero y el moldeo del suero concentrado, con o sin la adición de leche y grasa de leche, cuyo contenido de grasa es variable.

2.1.15 Queso Descremado. Es el queso no madurado, con un contenido relativamente bajo en grasa de textura homogénea preparado con leche descremada.

2.1.16 Queso Cuartirolo. Es un queso fresco tradicional, de corteza lisa y suave con aroma y sabor característico

2.1.17 Queso de Hoja. Es el queso no madurado obtenido a partir de queso criollo acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de Ecuador no patógenas; sometido a calentamiento previo al hilado, la característica es su envoltura en hoja de achira.

2.1.18 Queso Manaba. Es el queso no madurado obtenido a partir de leche, acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de la zona manabita, salado con sal en grano y colocado en moldes sin fondo para su prensado.

2.1.19 Queso amasado Lojano. Es el queso no madurado elaborado a partir de queso criollo salado y acidificado naturalmente, secado, molido y nuevamente prensado; la característica es su envoltura en hoja de achira.

2.1.20 Queso amasado Carchense. Es el queso no madurado obtenido de cuajada no cortada, de acidificación natural, molido, amasado, moldeado en moldes perforados y espolvoreado sal de consumo humano; desmenuzado manualmente, moldeado y prensado.

2.1.21 Queso Andino fresco. Es un queso no madurado, el cuerpo presenta un color que varía de blanco a crema y tiene una textura blanda (al presionarse con el dedo pulgar) que se puede cortar.

(Continua)

3. CLASIFICACIÓN

3.1 De acuerdo a su composición y características físicas el producto, se clasifica en:

3.1.1 *Según el contenido de humedad,*

- a) Duro
- b) Semiduro
- c) Semiblando
- d) Blando

3.1.2 *Según el contenido de grasa láctea,*

- a) Rico en grasa
- b) Entero ó Graso
- c) Semidescremado ó bajo en grasa
- d) Descremado ó Magro

4. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

4.1 La leche utilizada para la fabricación del queso fresco, debe cumplir con los requisitos de la Norma NTE INEN 10, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

4.2 Los límites máximos de plaguicidas no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MLR 1 en su última edición.

4.3 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentario CAC/MLR 2 en su última edición.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius:

5.1.1.1 Leche y/o productos obtenidos de la leche.

5.1.1.2 Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos;
- b) Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas;
- c) Cloruro de sodio;
- d) Vinagre;

(Continua)

5.1.2 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la tabla 1.

Tipo o clase	Humedad % max NTE INEN 63	Contenido de grasa en extracto seco , % m/m Mínimo NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero ó graso	-	45
Semidescremado o bajo en grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0,1

5.1.3 Requisitos microbiológicos. Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

5.1.3.1 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2x10 ²	10 ³	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	10 ²	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Donde:

- n = Número de muestras a examinar.
 m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.
 M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.
 c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

5.1.4 Aditivos. Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2074 y además:

- Gelatina y almidones modificados (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los estabilizadores, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)
- Harinas y almidones de arroz, maíz y papa (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los antiaglutinantes para el tratamiento de la superficie de productos cortados, rebanados y desmenuzados únicamente, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)

5.1.5 Contaminantes. El límite máximo permitido debe ser el que establece el Codex alimentarius de contaminantes CODEX STAN 193-1995, en su última edición

(Continua)

5.2 Requisitos complementarios

5.2.1 Los quesos frescos no madurados deben mantenerse en cadena de frío durante el almacenamiento, distribución y comercialización a una temperatura de $4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y su transporte debe ser realizado en condiciones idóneas que garanticen el mantenimiento del producto.

5.5.2 Las unidades de comercialización de este producto debe cumplir con lo dispuesto en la Ley 2007-76 del Sistema Ecuatoriano de la Calidad.

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo

6.1.1 El muestreo debe realizarse de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 04.

6.2 Aceptación o rechazo

6.2.1 Se acepta el producto si cumple con los requisitos establecidos en esta norma; caso contrario se rechaza.

7. ENVASADO Y EMBALADO

7.1 Los quesos frescos no madurados deben expenderse en envases asépticos, y herméticamente cerrados, que aseguren la adecuada conservación y calidad del producto.

7.2 Los quesos frescos no madurados deben acondicionarse en envases cuyo material, en contacto con el producto, sea resistente a su acción y no altere las características organolépticas del mismo.

7.3 El embalaje debe hacerse en condiciones que mantenga las características del producto y aseguren su inocuidad durante el almacenamiento, transporte y expendio.

8. ROTULADO

8.1 El Rotulado debe cumplir con los requisitos establecidos en el RTE INEN 022

8.2 Designación. El queso se designa por su nombre, seguido de la indicación del contenido de humedad, contenido de grasa láctea en extracto seco y características del proceso. Adicionalmente puede designarse por un nombre regional reconocido o por un nombre comercial específico.

(Continua)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 4	<i>Leche y productos lácteos. Muestreo</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 10	<i>Leche pasteurizada. Requisitos.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 63	<i>Quesos. Determinación del contenido de humedad</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 64	<i>Quesos. Determinación del contenido de grasas</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 65	<i>Quesos. Ensayo de la fosfatasa</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-13	<i>Control microbiológico de los alimentos. Enterobacteriaceae. Recuento en placa por siembra en profundidad</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-14	<i>Control microbiológico de los alimentos. Staphylococcus aureus. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-15	<i>Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 074	<i>Aditivos alimentarios permitidos para consumo humano. Listas positivas. Requisitos.</i>
Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 022	<i>Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empaquetados</i>
<i>Ley 2007-76</i>	<i>del Sistema Ecuatoriano de la Calidad Publicado en el Registro Oficial No. 26 de 2007-02-22.</i>
<i>Codex Alimentarius CAC/MRL 1</i>	<i>Lista de límites máximos para residuos de plaguicidas en los alimentos.</i>
<i>Codex Alimentarius CAC/MRL 2</i>	<i>Lista de límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios.</i>
<i>Codex Stan 193-1995</i>	<i>Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y pientos</i>
Decreto Ejecutivo 3253	<i>Reglamento de buenas prácticas de manufactura para alimentos procesados</i>
AOAC 991.14	<i>Coliform and Escherichia coli Counts in foods Dry Rehydratable Film Methods.</i>
ISO 11290-1	<i>Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes -- Part 2: Enumeration method</i>

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Codex Stan 221-2001 *Norma de grupo del Codex para el queso no madurado, incluido el queso fresco* Adoptado 2001. Enmienda 2008. Revisión 2010

Codex Stan 283-1978 *Norma general del Codex para el queso* Adoptado en 1973. Revisión 1999. Enmienda 2006, 2008. Revisión 2010

Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense. *Norma de quesos frescos no madurados.* NTON 03 022-99. Comisión Nacional de Normalización Técnica y Calidad, Ministerio de Fomento, Industria y Comercio. 28 abril 1999.

Reglamento Sanitario de los Alimentos DTO N°977/96. República de Chile. Pags. 73. Actualizado a 2010

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1528 **TÍTULO:** NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO **Código:** AL 03.01-420
Primera revisión MADURADOS. REQUISITOS

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo 1987-07-09 Oficialización con el Carácter de OBLIGATORIA por Acuerdo No 531 de 1987-08-03 publicado en el Registro Oficial No. 755 de 1987-08-24 Fecha de iniciación del estudio: 2011-01
--	--

Fechas de consulta pública: de _____ a _____

Subcomité Técnico: LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Fecha de iniciación: 2011-02-09

Fecha de aprobación: 2011-08-03

Integrantes del Subcomité Técnico:

NOMBRES:

Dr. Rafael Vizcarra (Presidente)
 Dra. Teresa Rodríguez
 Dra. Mónica Sosa
 Dr. Christian Muñoz
 Ing. Ernesto Toalombo
 Dr. Galo Izurieta
 Ing. Tatiana Benavides
 Ing. Alberto Nieto
 Dra. Jenny Yambay
 Ing. Fernando Párraga
 Ing. Daniel Tenorio
 Ing. Jorge Chávez
 Ing. Linda Nuñez
 Sr. Rodrigo Gómez de la Torre
 Dra. Johanna Choéz
 Dr. Marlon Revelo
 Ing. Leonardo Baño
 Dr. Antonio Camacho
 Ing. Lourdes Reinoso
 Tlga. Tatiana Gallegos
 Ing. Paola Simbaña
 Ing. Rocío Contero
 Dr. Alfonso Álvarez
 Ing. Franklin Hernández
 Ing. Galo Sandoval
 Dra. Mónica Quinatoa
 Dr. Alexander Salazar
 Dr. Rodrigo Dueñas
 Ing. César Guzmán
 Dr. David Villegas
 Dra. Katya Yépez
 Ing. Noela Bautista
 Dra. Indira Delgado
 Dr. Orlando Caba
 Dra. Ana María Hidalgo
 Dr. Renato Torres
 Ing. Talía Palacios
 Ing. Guillermo Gómez
 Sra. Laura Pilataxi
 Ing. Julio Vera
 Dr. Viviana Salas
 Ing. Pablo Herrera
 Dr. Hernán Cortes
 Dr. Hernán Riofrio
 Ing. Diego Escudero
 Ing. Marco Cevallos
 Dra. María Eufemia Ramón
 Dra. Rocío Cobos
 Ing. María E. Dávalos (Secretaría técnica)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

CENTRO DE LA INDUSTRIA LÁCTEA
 INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, Guayaquil
 INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, Quito
 PFIZER
 EL SALINERITO
 PASTEURIZADORA QUITO
 REYBANPAC
 CENTRO DE LA INDUSTRIA LÁCTEA
 INDUSTRIA LÁCTEA CARCHI S.A.
 PROLAC
 AILACCEP
 MIPRO
 PARMALAT
 PRODUCTORES DE LECHE
 INDUSTRIAS LACTEAS TONI S.A.
 PASTEURIZADORA QUITO
 ASO SIERRA NEVADA
 ACA FOOD SAFETY
 SFG/MAGAP
 MINISTERIO DE SALUD – SISTEMA ALIMENTOS
 UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
 UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
 ALPINA ECUADOR S.A.
 UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
 UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
 DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DE PICHINCHA
 REYBANPAC - LACTEOS
 REYBANPAC
 ASAMBLEA NACIONAL
 MIPRO
 NESTLÉ ECUADOR
 UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA- ECOLAC
 ALPINA ECUADOR
 ALIMEC S.A.
 LABORATORIO OSP - UCE
 MIPRO – DIRECCIÓN CONSUMIDOR
 MIPRO – DIRECCIÓN CONSUMIDOR
 ASOGAN
 S-PU - COINNA
 NESTLÉ – DPA
 DESCALZI
 PARMALAT
 PARMALAT
 SECRETARÍA DE SALUD – MUNICIPIO, Quito
 DEL CAMPO CIA. LTDA
 DEL CAMPO CIA. LTDA
 INDUSTRIAS LACTEAS TONI S.A.
 QUIMIEN CIA. LTDA.
 INEN

Otros trámites: Esta NTE INEN 1528:2012 (Primera Revisión), reemplaza a la NTE INEN 1528:1987

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

Oficializada como: Obligatoria
 Registro Oficial No. 652 de 2012-03-02

Por Resolución No. 11 379 de 2011-12-26

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inenlaboratorios@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
URL: www.inen.gov.ec**

Anexo 7. Normativa NTE INEN 2687: 2013 Mercados saludables



Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2687:2013

MERCADOS SALUDABLES. REQUISITOS

Primera edición

HEALTHY FOOD MARKET. REQUIREMENTS

First edition

DESCRIPTORES: Mercado, alimentos, inocuidad, requisitos, comercialización, elaboración de alimentos.
ICS: 67.020

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	MERCADOS SALUDABLES REQUISITOS	NTE INEN 2687:2013 2013-04
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos y prácticas que deben cumplir los mercados para la comercialización y/o elaboración de alimentos inocuos aptos para el consumo humano.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma aplica a todos los mercados mayoristas y mercados minoristas que realizan actividades de adquisición, recepción, manipulación, preparación, comercialización, almacenamiento, y transporte de alimentos a nivel nacional. Se excluyen las ferias libres, plataformas de comercialización, supermercados y micromercados.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para los efectos de esta norma se aplican las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Aguas residuales.</i> Aguas de desecho resultantes de las actividades realizadas en el mercado.</p> <p>3.1.2 <i>Agua potable.</i> Agua tratada y exenta de contaminantes, apta para el consumo humano según lo establecido en la NTE INEN 1108.</p> <p>3.1.3 <i>Alimento.</i> Todo producto natural o artificial que ingerido aporta al organismo de los seres humanos los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de los procesos biológicos. Comprenden también sustancias y mezclas de las mismas que se ingieren por hábito o costumbre, tengan o no valor nutritivo.</p> <p>3.1.4 <i>Alimento adulterado.</i> Todo alimento al que se haya adicionado o sustraído cualquier sustancia para variar su composición, peso o volumen, con fines fraudulentos o para encubrir o corregir cualquier defecto, debido a su inferior calidad.</p> <p>3.1.5 <i>Alimento de consumo directo.</i> Cualquier tipo de alimento o bebida, que para ser consumido no requiere algún tipo de preparación adicional.</p> <p>3.1.6 <i>Alimentos altamente perecederos.</i> Alimentos perecederos que por su composición o manipulación pueden favorecer el crecimiento de microorganismos y/o la formación de toxinas, por lo que representan un riesgo para la salud y requieren condiciones especiales de conservación, almacenamiento, transporte, manipulación y comercialización, como productos frescos de la pesca, leche, carnes, aves y sus derivados, alimentos preparados, entre otros.</p> <p>3.1.7 <i>Alimentos perecederos.</i> Alimentos que requieren condiciones especiales de conservación.</p> <p>3.1.8 <i>Alimentos preparados.</i> Cualquier tipo de alimento o bebida, que para ser consumido requiere algún tipo de elaboración culinaria, resultado de la preparación en crudo, cocido o precocido, de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal, con o sin la adición de otras sustancias autorizadas.</p> <p>3.1.9 <i>Alimentos procesados.</i> Es toda materia alimenticia que para el consumo humano ha sido sometida a operaciones tecnológicas necesarias para su transformación, modificación y conservación, que se distribuye y comercializa en envases rotulados bajo una marca de fábrica determinada y con registro sanitario otorgado por la Autoridad Sanitaria Nacional.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Mercado, alimentos, inocuidad, requisitos, comercialización, elaboración de alimentos.</p>		

3.1.10 Animales de abasto. Son las especies de animales para el consumo humano, entre las básicas están el ganado ovino, bovino, porcino y las aves de corral, mientras que las complementarias son el ganado caprino, equino, animales de caza y pesca.

3.1.11 Buenas Prácticas de Manufactura – BPM. Principios básicos y prácticas generales de higiene en la manipulación, preparación, elaboración, envasado, almacenamiento y servicio de alimentos para consumo humano, con el objeto de garantizar que los alimentos en todas las etapas, hasta el consumo se manipulen en condiciones sanitarias adecuadas y se disminuyan los riesgos para la salud de las consumidoras y consumidores.

3.1.12 Buenas Prácticas de Higiene – BPH. Conjunto de medidas preventivas y principios básicos necesarias para garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos en cualquier etapa de su manejo, incluida su distribución, transporte y comercialización.

3.1.13 Buenas prácticas de almacenamiento. Principios básicos de almacenamiento de alimentos destinados a garantizar el mantenimiento de las características y propiedades de los productos.

3.1.14 Calidad. Grado en el que un conjunto de características inherentes al alimento cumple con los requisitos de inocuidad.

3.1.15 Características organolépticas. Características físicas que se perciben a través de los sentidos, como sabor, textura, olor y color.

3.1.16 Centro de faenamiento. Establecimiento donde se procesa las especies pecuarias comestibles (bovinos, ovinos, porcinos, aves entre otras), que consiste en la separación progresiva de un animal vivo hasta la obtención de una canal, despojos comestibles y no comestibles.

3.1.17 Contaminación. Introducción o presencia de un riesgo biológico, químico y/o físico en los alimentos o en el ambiente alimentario.

3.1.18 Contaminación cruzada. Transferencia de potenciales riesgos en forma directa o indirecta desde una fuente de contaminación a un alimento, mediante equipos, utensilios, superficies de trabajo, materiales de limpieza, corrientes de aire, manos o vestimentas de personas, traslado de materiales o alimentos, de una zona sucia a una zona limpia, posibilitando la contaminación de los alimentos.

3.1.19 Contaminante. Cualquier agente físico, químico y/o biológico, no añadido intencionalmente a los alimentos y que puedan comprometer la inocuidad y la calidad de los mismos

3.1.20 Control de plagas. Medidas preventivas y correctivas, naturales o artificiales, que dan como resultado la prevención, represión, contención, destrucción o exclusión de una plaga aplicadas de manera responsable para con el ambiente y la salud humana.

3.1.21 Consumidor. Persona natural o jurídica, que adquiere, utiliza o disfruta de productos o servicios como destinatario final de los mismos.

3.1.22 Desechos sólidos. Material en estado sólido generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control, preparación o tratamiento, cuya calidad no permite usarlos nuevamente en el proceso que los generó.

3.1.23 Desechos líquidos. Material en estado líquido generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control, preparación o tratamiento, cuya calidad no permite usarlos nuevamente en el proceso que los generó.

3.1.24 Desinfección. Reducción y/o eliminación del número de microorganismos presentes en el ambiente, por medio de agentes químicos, posterior al proceso de limpieza, a un nivel que no comprometa la inocuidad del alimento.

3.1.25 Despojos comestibles. Subproductos de origen animal que han sido aprobados como aptos para la alimentación humana, por ejemplo: cabeza, corazón, hígado, pulmones, mollejas, rabo, lengua, grasas, intestinos, patas etc.

3.1.26 Drenaje. Estructura, natural o artificial, que facilitan el escurrimiento y evita el almacenamiento del agua en una zona particular.

3.1.27 Efluente. Líquido no apto para consumo humano proveniente de un proceso de tratamiento, actividad o proceso productivo.

3.1.28 Enfermedad transmitida por alimentos ETAs. Enfermedad que se produce por el consumo de alimentos, agua o bebidas contaminadas, produciendo infecciones, intoxicación o toxi-infecciones.

3.1.29 Escaldado. Técnica culinaria consistente en la cocción de los alimentos en agua o líquido hirviendo durante un periodo breve de tiempo (entre 10 y 30 segundos).

3.1.30 Giros. Parte de una sección del mercado que representa a un grupo específico de productos (ejemplo: cárnicos, lácteos, frutas, etc.)

3.1.31 Higiene. Es el proceso de limpieza y desinfección.

3.1.32 Higiene de los alimentos. Condiciones y medidas necesarias para la manipulación de los alimentos destinadas a garantizar la inocuidad de los mismos.

3.1.33 Higiene personal. Los hábitos de buena higiene que incluyen limpieza del cuerpo, cabellos y dientes, vestir ropa limpia y lavarse las manos con agua y jabón con regularidad, especialmente cuando se manejan comidas y bebidas.

3.1.34 Impermeable. Que no permite el paso de líquidos.

3.1.35 Infraestructura. Conjunto de locales e instalaciones físicas donde se desarrolla una actividad comercial.

3.1.36 Ingredientes. Componentes de una mezcla de alimentos.

3.1.37 Inspección post-mortem. Inspección visual de las canales y demás partes relevantes incluyendo los despojos no comestibles con el objeto de asegurar que la carne es sana, libre de enfermedades, y que no plantea riesgo alguno a la salud pública

3.1.38 Inocuidad de los alimentos. Garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan.

3.1.39 Limpieza. Eliminación, con el uso de detergente y agua por acción física y/o mecánica, de residuos de tierra, alimentos, suciedad, grasa y otras materias que puedan constituir una fuente de contaminación.

3.1.40 Materias extrañas. Cuerpos de origen mineral, animal o vegetal que no proviene del alimento.

3.1.41 Manipulador de alimentos. Toda persona que tenga contacto directo con alimentos envasados o no envasados.

3.1.42 Mercado. Centro de comercialización de alimentos que cuenta con infraestructura fija y cerrada, en la cual los comerciantes compran y venden sus productos al público en sus puestos individuales distribuidos por giros.

3.1.43 Mercado saludable. Centro de comercialización de alimentos que ha cumplido los requisitos y prácticas para la comercialización y/o elaboración de alimentos inocuos especificados en esta norma técnica ecuatoriana.

3.1.44 Microorganismo patógeno. Cualquier organismo microscópico vivo que pueda ser causa de enfermedad.

3.1.45 Peligro alimentario. Cualquier agente biológico, químico o físico presente en el alimento, que puede causar un efecto adverso para la salud.

3.1.46 Plaga. Organismos vivos que producen alteraciones fisiológicas y daños económicos.

3.1.47 Programa de limpieza y desinfección. Conjunto de actividades que contribuyen a la inocuidad de los alimentos, mediante el mantenimiento de las instalaciones físicas del establecimiento en buenas condiciones higiénico sanitarias.

3.1.48 Puesto de comercialización. Espacio destinado a la elaboración y comercialización de productos autorizados, situado en el interior de los mercados.

3.1.49 Riesgo. Función de la probabilidad de un efecto nocivo para la salud y de la gravedad de dicho efecto, como consecuencia de un peligro o peligros en los alimentos.

3.1.50 Temperaturas de seguridad. Temperaturas que inhiben el crecimiento microbiano o eliminan la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos. Su rango debe ser inferior a 5 °C (refrigeración y congelación) y mayor a 60 °C (hervido, cocción, horneado, etc.).

3.1.51 Trampa de grasa. Dispositivo que funciona como separador y recolector de grasas, jabones, detergentes, desperdicios de comida y elementos sólidos de las aguas residuales de cocina.

3.1.52 Utensilios. Todo artefacto, recipiente o equipo utilizado en la preparación, almacenamiento y venta de alimentos.

4. REQUISITOS

4.1 Requisitos relativos a la infraestructura

4.1.1 Localización, diseño y construcción

4.1.1.1 El mercado debe estar alejado de fuentes de contaminación que representen riesgo para la inocuidad de los alimentos, en particular de zonas propensas a inundaciones y zonas industriales,

4.1.1.2 El mercado debe contar con infraestructura física, que impida el ingreso de animales y facilite el control de plagas, así como otros elementos del ambiente exterior como polvo y materias extrañas, con la finalidad de mantener las condiciones sanitarias.

4.1.1.3 La construcción debe ser sólida y disponer de espacio suficiente para la instalación, operación y mantenimiento de los equipos y puestos de comercialización, así como para el movimiento del personal, usuarios y el traslado de materiales y alimentos,

4.1.1.4 El mercado debe brindar facilidades para la higiene personal.

4.1.1.5 El diseño y la distribución del mercado debe permitir un mantenimiento, limpieza y desinfección de la infraestructura que minimice el riesgo de contaminaciones.

4.1.1.6 El diseño y construcción de la edificación debe facilitar el control de plagas y evitar el refugio de las mismas.

4.1.1.7 El mercado debe contar con una guardería para el cuidado de los hijos de los trabajadores/as de los mercados.

4.1.1.8 El mercado debe contar con un sistema de drenaje para las aguas lluvias y las aguas residuales.

4.1.2 Área y estructuras internas

4.1.2.1 El mercado debe ser distribuido y señalizado de manera que facilite el flujo de trabajo siguiendo de preferencia el principio de flujo hacia delante. La señalización debe realizarse de acuerdo a la NTE INEN 439.

4.1.2.2 Las áreas internas del mercado deben estar divididas en zonas o giros según el nivel de higiene dependiendo de los riesgos de contaminación y de los alimentos.

4.1.2.3 Los pisos, paredes y techos deben ser contruidos de materiales impermeables, no porosos que permitan la limpieza y mantenimiento.

4.1.2.4 Las paredes de los puestos de comercialización deben tener una superficie lisa de baldosa o pintura lavable hasta una altura mínima de 2 m.

4.1.2.5 En las áreas donde se manipulan y preparan los alimentos, las uniones entre las paredes y los pisos, deben ser cóncavas (redondeadas) para facilitar su limpieza y desinfección.

4.1.2.6 Las superficies y materiales, particularmente aquellos que están en contacto con los alimentos, deben ser de materiales que no contengan sustancias tóxicas y deben estar diseñados para el uso previsto, fáciles de mantener, limpiar y desinfectar.

4.1.2.7 Los pisos deben ser de material antideslizante y liso, resistente a los golpes, libres de roturas y grietas.

4.1.2.8 Los pisos deben tener una pendiente mínima de 2 % que permita el drenaje de efluentes líquidos provenientes de la limpieza.

4.1.2.9 Los drenajes del piso deben tener la protección adecuada, ser conducidos por cañerías y estar diseñados de forma tal que se permita su limpieza y mantenimiento. Donde sea requerido deben tener instalados el sello hidráulico, trampas de grasa y sólidos, con fácil acceso para la limpieza.

4.1.2.10 Los techos, falsos techos e instalaciones suspendidas deben estar contruidos de manera que eviten la acumulación de suciedad, condensación, formación de mohos, desprendimiento de partículas y además faciliten su limpieza y mantenimiento.

4.1.2.11 Las ventanas y aberturas deben ser contruidas de manera que eviten la acumulación de polvo o suciedad y en caso de comunicación con el exterior estar provistas de malla contra insectos.

4.1.2.12 Las puertas deben tener una superficie lisa y no absorbente de fácil limpieza y cuando sea necesario desinfección.

4.1.2.13 Debe repararse inmediatamente toda superficie estropeada o irregular, así como cualquier rotura o desperfecto, tales como grietas, golpes u otra irregularidad, que facilitan la acumulación de restos de alimentos y suciedades.

4.1.2.14 Los pasillos no deben ser utilizados como áreas de almacenamiento.

4.1.3 Iluminación y ventilación

4.1.3.1 La iluminación puede ser natural y/o artificial, debe ser adecuada para permitir la realización de las tareas para que no comprometa la higiene de los alimentos y no alterar la visión de los colores de los alimentos que se venden.

4.1.3.2 El sistema eléctrico debe estar en buen estado y contar con un generador alterno de energía eléctrica de encendido automático de acuerdo a los requerimientos energéticos del mercado.

4.1.3.3 La ventilación puede ser natural o artificial, directa o indirecta para reducir al mínimo la contaminación de los alimentos transmitida por el aire.

4.1.4 Instalaciones sanitarias

4.1.4.1 El mercado debe contar con instalaciones sanitarias como servicios higiénicos, duchas y vestidores dotados de facilidades higiénicas, en cantidad suficiente e independiente para hombres y mujeres de acuerdo a lo detallado en el Anexo A y con accesibilidad para personas con discapacidad según la NTE INEN 2293.

4.1.4.2 Las instalaciones sanitarias deben mantenerse permanentemente limpias, ventiladas y con una provisión suficiente de agua e insumos de higiene personal (papel higiénico, jabón líquido, gel desinfectante, toallas desechables o secadores eléctricos).

4.2 Requisitos relativos a los servicios

4.2.1 Suministro de agua

4.2.1.1 El mercado debe disponer de un sistema de abastecimiento continuo de agua potable, en caso de no contar con el abastecimiento continuo se debe disponer de instalaciones para el almacenamiento, distribución y asegurar la calidad del agua.

4.2.1.2 El agua potable debe cumplir con lo establecido en la NTE INEN 1108, se debe realizar análisis de la calidad microbiológica y composición físico-química del agua al menos dos veces al año en laboratorios acreditados para verificar su cumplimiento.

4.2.1.3 En caso de existir un sistema de abastecimiento de agua no potable debe ser independiente y estar identificado, el agua no potable se podrá utilizar para el sistema contra incendios, generación de vapor, refrigeración y otras aplicaciones similares que no contaminen los alimentos.

4.2.2 Desechos líquidos y drenaje

4.2.2.1 El mercado debe tener un sistema de eliminación de desechos líquidos, que cuente con dispositivos de separación de grasa instalados individual o colectivamente, previo a la descarga de efluentes, de acuerdo a la normativa vigente.

4.2.2.2 Los drenajes y sistemas de disposición de efluentes deben ser diseñados y construidos para evitar la contaminación de los alimentos, del agua potable o de las fuentes de agua potable almacenadas en el mercado.

4.2.3 Desechos sólidos

4.2.3.1 El mercado debe contar con un sistema de recolección diferenciada interna de desechos (orgánicos e inorgánicos), almacenamiento provisional en un área específica cubierta, con piso impermeable, con ventilación y señalización, accesible para su recolección y su posterior disposición final.

4.2.3.2 Los desechos sólidos se deben retirar frecuentemente de los recipientes destinados para este fin ubicados en los puestos y demás áreas del mercado. Los desechos deben disponerse de manera que se elimine la generación de malos olores para que no sean fuente de contaminación o refugio de plagas.

4.2.3.3 Los recipientes para desechos sólidos en los puestos deben estar en buen estado higiénico cubiertos con una tapa, y con una funda plástica en su interior que facilite el retiro de los residuos.

4.3 Requisitos relativos a los equipos y utensilios

4.3.1 Los equipos y utensilios para manipulación de los alimentos deben estar en buen estado, ser de materiales que no contengan sustancias tóxicas, ni emanen olores, sabores, ni que reaccionen con los ingredientes o materiales con los que entren en contacto.

4.3.2 No se debe utilizar materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse.

4.3.3 Las tablas de cortar deben ser de madera, plástico u otro material, fácil de limpiar y desinfectar. Las tablas de cortar deben ser reemplazadas cuando se evidencie su deterioro.

4.3.4 Las tablas de cortar de madera deben ser duras y no astillables, se recomienda el uso del pino, caoba, teca, roble, aliso, nogal.

4.3.5 Las características de los equipos deben ofrecer facilidades de limpieza, desinfección e inspección y deben contar con dispositivos que impidan la contaminación del alimento por lubricantes, refrigerantes, sellantes u otras sustancias que se requieran para su funcionamiento.

4.3.6 Los equipos deben lavarse y desinfectarse al final de la jornada, desmontando las partes removibles y utilizando agua potable en cantidad necesaria.

4.3.7 Los utensilios deben lavarse con detergente y agua potable, no se permite el uso de baldes o recipientes con agua reutilizada sin renovar. Una vez limpios deben desinfectarse y almacenarse limpios, secos y protegidos.

4.4 Requisitos relativos a la adquisición, comercialización, transporte, recepción y almacenamiento de alimentos

4.4.1 Adquisición y comercialización

4.4.1.1 La adquisición y comercialización de alimentos deben efectuarse en áreas limpias y protegidas, deben conservarse según el giro del producto sobre estantes, cajones, canastas, entre otros, que impidan su contaminación. No deben adquirirse nunca insumos e ingredientes colocados directamente sobre el suelo.

4.4.1.2 Las carnes que se adquieran deben contar con el sello del centro de faenamiento como garantía de haber realizado la inspección post-mortem. Las carnes y productos cárnicos de procedencia clandestina deben ser rechazados.

4.4.1.3 Deben adquirirse y comercializarse alimentos cuyas propiedades organolépticas (olor, sabor, color y textura) correspondan a alimentos frescos.

4.4.1.4 Deben adquirirse y comercializarse alimentos procesados que presenten una garantía o marca de fabricación con registro sanitario y excluirse los de origen informal, sin etiquetado, ni rotulado.

4.4.1.5 Los alimentos procesados no deben superar su fecha de vencimiento y cumplir con los requisitos de etiquetado estipulados en la NTE INEN 1334-1, 1334-2 y 1334-3

4.4.2 Transporte, recepción y almacenamiento

4.4.2.1 Los vehículos que transportan alimentos para proveer al mercado deben ser exclusivos para este fin, estar limpios, libres de contaminantes (sustancias o productos indeseables), contar con condiciones de refrigeración según el tipo de alimento, contar con espacio suficiente para asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos. Los mismos no deben estar en contacto con el piso del vehículo, al ser transportados.

4.4.2.2 El área del vehículo que transporta alimentos debe ser de material de fácil limpieza, que proteja al alimento de contaminaciones, alteraciones y efectos del cambio de temperaturas

4.4.2.3 Los vehículos transportadores para proveer al mercado de carne de animales de abasto, deben contar con una guía de movilización del centro de faenamiento de origen

4.4.2.4 La recepción de alimentos deben efectuarse en áreas limpias y protegidas; las carnes, los despojos comestibles y el pescado se colocarán en bandejas, y los productos a granel en envases limpios.

4.4.2.5 Los productos y alimentos procesados deben almacenarse en condiciones que impidan el deterioro, eviten la contaminación y reduzcan al mínimo su daño o alteración.

4.4.2.6 Los alimentos perecederos y altamente perecederos deben conservarse refrigerados, de acuerdo a las temperaturas recomendadas para cada alimento, como es el caso de cárnicos, lácteos y derivados, productos pesqueros y acuícolas, ver anexo B.

4.4.2.7 Los productos y alimentos procesados deben ser almacenados sobre tarimas o estanterías ubicadas a por lo menos 20 cm del piso y la pared, para permitir la circulación de aire y evitar que la humedad los deteriore y facilitar la limpieza. Los distintos tipos de alimentos deben ser almacenados por clase, especie u origen.

4.4.2.8 Los alimentos de origen animal y vegetal deben almacenarse por separado para evitar la contaminación cruzada.

4.4.2.9 Los alimentos crudos y cocidos deben almacenarse en recipientes individuales y por separado para evitar la contaminación cruzada, ver anexo B.

4.5 Requisitos relativos al puesto de comercialización

4.5.1 El puesto de comercialización y sus alrededores deben mantenerse limpios y ordenados.

4.5.2 El puesto de comercialización del mercado debe ser utilizado solamente para el uso y en el giro autorizado y bajo ningún motivo podrá ser empleado como dormitorio o vivienda.

4.5.3 Los puestos de comercialización deben agruparse por zonas o giros de acuerdo a la naturaleza de los productos que expenden, con secciones específicas para la comercialización de carne, aves, pescado, mariscos, frutas, hortalizas, cereales, productos lácteos, embutidos y otros.

4.5.4 Las mesas y los mostradores dentro de los mercados deben conservar uniformidad en su alineación, evitando dificultar el tránsito.

4.5.5 Las estanterías deben ser de material anticorrosivo o plástico que no contamine los alimentos, en cantidad suficiente y con una estructura que facilite la limpieza y desinfección.

4.5.6 Los alimentos no perecederos deben ser exhibidos y protegidos en vitrinas, los alimentos altamente perecederos (lácteos, cárnicos, pescados, mariscos y derivados) deben ser exhibidos en vitrinas frigoríficas y colocados en recipientes individuales.

4.5.7 Los puestos de comercialización y manipulación de alimentos altamente perecederos y perecederos deben disponer de agua potable, de instalaciones para la evacuación de las aguas residuales, así como de recipientes diferenciados para los desechos sólidos.

4.5.8 Para mantener los productos del puesto de comercialización de alimentos, libres de contaminación, se deben:

- Separar los alimentos de otros productos.
- Eliminar y separar todo alimento en mal estado
- Proteger los alimentos y los ingredientes de la contaminación de plagas o de contaminantes químicos, físicos o microbiológicos, durante la manipulación y el almacenamiento.

4.5.9 *Higiene del puesto de comercialización*

4.5.9.1 Los pasos que se deben seguir para la limpieza deben ser:

- a) Eliminar los desechos de las superficies
- b) Aplicar una solución detergente para desprender la capa de suciedad y de microorganismos y mantenerla por un periodo de 5 min.
- c) Enjuagar con agua, para eliminar la suciedad suspendida y los residuos de detergente.
- d) Aplicar otros métodos apropiados para quitar y recoger desechos o desinfectar, en caso necesario.

4.5.9.2 Los implementos de limpieza deben ser de uso exclusivo y ser limpiados y desinfectados frecuentemente.

4.6 Requisitos relativos a la preparación de los alimentos

4.6.1 *Preparación preliminar*

4.6.1.1 Las superficies que entren en contacto con los alimentos, previo al inicio y al final de la jornada, deben lavarse y desinfectarse de acuerdo al programa de limpieza y desinfección de acuerdo al subcapítulo 4.8.

4.6.1.2 Los utensilios a utilizarse deben lavarse con agua y detergente.

4.6.1.3 La mezcla de ingredientes, deben hacerse en recipientes destinados específicamente para tal fin y que no constituyan un riesgo para la salud.

4.6.1.4 No deben utilizarse, bajo ninguna circunstancia, recipientes o utensilios que hayan contenido anteriormente algún producto tóxico o hayan quedado impregnados por éste (ejemplo: envases de insecticida, envases de pintura, aceite de motor, detergentes y otras sustancias químicas).

4.6.1.5 Los manipuladores de alimentos deben lavarse las manos con agua y jabón líquido, desinfectarse las manos con gel antibacterial o alcohol antes de comenzar a preparar cualquier alimento, o cuando cambie de actividad.

4.6.1.6 Las hortalizas y verduras deben lavarse con abundante agua potable corriente, teniendo especial cuidado con las que se consumen crudas. Se puede añadir soluciones desinfectantes con notificación sanitaria obligatoria.

4.6.1.7 Todo alimento que se vaya a preparar debe ser lavado previamente, incluido las carnes y productos cárnicos.

4.6.1.8 El agua que se utilice para lavar debe ser potable y corriente, para que su efecto de arrastre disminuya la presencia de contaminantes de los alimentos.

4.6.2 Preparación de alimentos

4.6.2.1 Los alimentos deben estar cocidos completamente, en especial carnes, pollos, huevos y pescados.

4.6.2.2 Si los alimentos no se sirven de inmediato, deben mantenerse en un lugar fresco, ventilado o, refrigerado.

4.6.2.3 Los alimentos deben mantenerse a temperaturas de seguridad, refrigerados por debajo de los 5 °C o hervidos, cocinados, horneados y calentados por sobre los 60 °C. Los alimentos que requieren ser congelados deben mantenerse al menos a -18 °C, ver anexo C.

4.6.2.4 Un alimento congelado debe descongelarse bajo condiciones controladas y no puede ser congelado nuevamente como se indica en el anexo D.

4.6.2.5 Cuando haya que recalentar un alimento, se debe calentar solamente la porción a servirse, y no más de una vez.

4.6.2.6 Las mezcla de los ingredientes de las ensaladas deben prepararse empleando utensilios y nunca directamente con las manos.

4.6.2.7 Para probar los alimentos que se preparen debe utilizarse utensilios destinados para este fin y no deben ser introducidos en el alimento en preparación bajo ninguna circunstancia. Cada vez que se vaya a probar el alimento se debe disponer de un utensilio limpio y desinfectado para que en él se deposite el alimento a probar.

4.6.3 Protección y servicio de alimentos

4.6.3.1 Los alimentos preparados que se exhiben para la comercialización deben estar protegidos en vitrinas y/o cubiertos con campanas de malla metálica o material plástico a una altura no inferior a 60 cm - 70 cm. Las bebidas preparadas deben estar protegidas con material plástico o tapas.

4.6.3.2 Los alimentos y bebidas preparadas deben servirse en platos, cubiertos y vasos en buen estado de conservación y limpieza.

4.6.3.3 Los alimentos preparados que no se hayan vendido durante el día no se deben expender ni utilizar al día siguiente.

4.6.3.4 Los alimentos preparados que se expendan para llevar a casa, se deben empacar de manera higiénica con materiales de primer uso. No se debe usar papel impreso en contacto directo con los alimentos.

4.6.3.5 Los alimentos preparados deben manipularse con utensilios (pinzas, tenazas, etc.), evitando el contacto directo de las manos con el alimento o la superficie que entre en contacto con él.

4.6.3.6 Los alimentos y bebidas preparadas de consumo directo, deben ser sometidos periódicamente a análisis físicos, químicos y microbiológicos de acuerdo a un plan de muestreo técnicamente establecido, para verificar la inocuidad de los mismos.

4.6.3.7 No debe manipularse simultáneamente dinero y alimentos preparados. La persona que manipula alimentos no debe tocar dinero, pero si ello fuera inevitable, debe lavarse y desinfectarse las manos antes de volver a manipular alimentos.

4.6.4 *Higiene de los manipuladores de alimentos preparados*

4.6.4.1 El manipulador de alimentos preparados debe contar con el certificado salud ocupacional

4.6.4.2 El manipulador de alimentos preparados debe usar vestimenta de protección acorde a la actividad que realice según el giro, la cual debe mantenerse limpia, y en buenas condiciones; la vestimenta debe ser de color blanco o colores claros.

4.6.4.3 El manipulador de alimentos preparados debe lavarse las manos y desinfectarlas, antes y después de actividades laborales, manipuleo de alimentos, luego de usar el baño, toser, luego de manipular envases, desechos, basura y otras actividades que representen riesgo de contaminación. En el caso de uso de guantes de látex es obligatorio cumplir con el lavado de manos y deben ser reemplazados frecuentemente.

4.6.4.4 El manipulador de alimentos preparados debe mantener el cabello cubierto totalmente con malla, gorro u otro medio, debe usar una mascarilla, uñas cortas y sin esmalte, sin joyas, libre de maquillaje, sin barba y bigotes al descubierto.

4.6.4.5 El manipulador de alimentos no debe fumar, comer o masticar chicle, estornudar o toser sobre los alimentos.

4.6.4.6 El manipulador de alimentos no debe manipular alimentos cuando se sospeche que padece una posible enfermedad transmisible a los alimentos (ETAs), con síntomas como vómito, diarrea, dolor abdominal, fiebre y escalofríos o cuando tenga heridas o irritaciones cutáneas.

4.7 **Requisitos de higiene del comerciante de alimentos**

4.7.1 El comerciante de alimentos debe contar con el certificado salud ocupacional

4.7.2 El comerciante de alimentos debe usar vestimenta de protección acorde a la actividad que realice según el giro, la cual debe mantenerse limpia, y en buenas condiciones; los comerciantes de alimentos altamente perecederos (carnes, lácteos, pescados y mariscos) deben utilizar vestimenta de color blanco o colores claros.

4.7.3 El comerciante de alimentos debe lavarse las manos y desinfectarlas, antes y después de actividades laborales, luego de usar el baño, luego de manipular envases, desechos, basura y otras actividades que representen riesgo de contaminación.

4.7.4 El comerciante de alimentos altamente perecederos debe mantener el cabello cubierto totalmente con malla, gorro u otro medio, debe usar mascarilla, uñas cortas y sin esmalte, sin joyas, libre de maquillaje, sin barba y bigotes al descubierto.

4.7.5 El comerciante de alimentos no deben fumar, comer o masticar chicle, estornudar o toser sobre los alimentos.

4.8 **Requisitos relativos a la limpieza y desinfección**

4.8.1 *Limpieza y desinfección de las instalaciones*

4.8.1.1 El mercado debe contar con un programa de limpieza y desinfección, que garantice que el mercado esté limpio en todas las áreas.

4.8.1.2 Se debe verificar el cumplimiento del programa de limpieza y desinfección.

4.8.1.3 Los programas de limpieza y desinfección, deben especificar lo siguiente:

- superficies, elementos del equipo y utensilios que han de limpiarse y desinfectarse;
- responsabilidad de tareas particulares;

- método y frecuencia de la limpieza y desinfección; y
- medidas de verificación de cumplimiento

4.8.1.4 Los productos químicos de limpieza y desinfección deben estar registrados y autorizados, deben manipularse y utilizarse con cuidado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.8.1.5 Se deben almacenar los productos químicos, separados de los alimentos, en contenedores claramente identificados, a fin de evitar el riesgo de contaminación de los alimentos.

4.9 Requisitos relativos al control de plagas y roedores

4.9.1 Se debe disponer de un programa de control de plagas y roedores.

4.9.2 Los plaguicidas utilizados deben ser los aprobados y registrados; y deben ser usados según las instrucciones de la ficha técnica.

4.9.3 Todo vendedor debe adoptar las medidas apropiadas para mantener su puesto libre de animales y plagas, en particular de roedores, moscas, insectos o infestación por gusanos, con el fin de impedir la contaminación de los alimentos.

4.9.4 Todo alimento que haya sido contaminados por plagas debe ser retirado, destruido o eliminado.

4.10 Requisitos relativos a capacitación

4.10.1 Todos los vendedores y manipuladores de alimentos de los mercados deben estar capacitados en Buenas Prácticas de Higiene BPH, Buenas Prácticas de Manufactura BPM, Buenas Prácticas de Almacenamiento BPA, gestión integral de desechos, mercado saludable y productivo con un enfoque de inocuidad de alimentos.

4.10.2 Los administradores de los mercados, inspectores y demás personal que labore en el mercado, deben contar con los mismos cursos de capacitación de acuerdo a las funciones y responsabilidades de los mismos.

4.10.3 Deben existir programas de entrenamiento específicos que incluyan normas, procedimientos y precauciones a tomar.

4.11 Requisitos relativos al control y aseguramiento de la inocuidad

4.11.1 El mercado debe contar con un programa de control y aseguramiento de la inocuidad, el cual debe ser esencialmente preventivo y cubrir todas las etapas de manipulación y elaboración del alimento, desde la recepción hasta la comercialización.

4.11.2 El mercado debe contar con un responsable o responsables de la supervisión del programa de control y aseguramiento de la inocuidad.

4.11.3 Los responsables de la supervisión del programa deben realizar inspecciones frecuentes en todo el mercado, presentar un informe escrito y ponerlo a conocimiento de los involucrados.

4.11.4 El programa de control y aseguramiento de la inocuidad debe contener como mínimo:

- Criterios técnicos para la recepción de productos frescos alimentos procesados y alimentos preparados, que incluyan parámetros para su aceptación o rechazo.
- Documentos técnicos del mercado como manuales, procedimientos, instructivos, registros, documentación de equipos de uso común que incluyan planes de mantenimiento, programas, planes de muestreo entre otros.
- El programa debe contener programas de promoción y divulgación de mensajes sobre la inocuidad de los alimentos a los vendedores, manipuladores y consumidores.

- El programa de control y aseguramiento de la inocuidad debe incluir muestreos frecuentes de alimentos para garantizar su inocuidad. Los resultados de los análisis deben ser realizados por laboratorios acreditados y ser comunicados a los vendedores/manipuladores y autoridades competentes.

4.11.5 El programa de control y aseguramiento de la inocuidad debe incluir controles diarios de temperaturas en equipos, en alimentos y áreas de almacenamiento, los cuales deben ser registrados.

ANEXO A**A.1 Baterías sanitarias en comercios y oficinas**

A.1.1 Para la dotación de servicios sanitarios en comercios se considerará las siguientes relaciones:

- Para comercios con área de hasta 100 m² de área utilizable: media batería de uso privado.
- Para comercios agrupados o no en general, mayores a 100 m² y hasta 1 000 m² de área utilizable: media batería de uso y acceso público por cada 250 m² de área utilizable, distribuidos para hombre y mujeres.
- Para comercios agrupados o no en general, mayores a 1 000 m² y menores a 5 000 m² de área utilizable, con excepción de las áreas de bodegas y parqueos, serán resueltos con baterías sanitarias de uso y acceso público distribuidas para hombres y mujeres, a través de la siguiente norma:
 - 1 inodoro por cada 500 m² de área utilizable o fracción mayor al 50 %.
 - 2 lavabos por cada cinco inodoros.
 - 2 urinarios por cada cinco inodoros de hombres, al que se añadirá un urinario de niños por cada dos de adultos.
 - Una estación de cambio de pañales de 0,60 metros x 0,60 metros, que estará incorporada en el área de lavabos de las baterías sanitarias de mujeres.
 - Serán ubicados en cada piso, de tener varios niveles.
 - Se incluirá una batería sanitaria adicional para personas con movilidad reducida, según lo especificado en la NTE INEN 2293

ANEXO B**REFRIGERACIÓN DE LOS ALIMENTOS**

B.1 La temperatura ideal de refrigeración oscila entre 0 °C y 5 °C.

B.2 Dentro del frigorífico, debemos procurar disponer los alimentos separados unos de otros, para que circule correctamente el aire. Dentro del frigorífico es importante que coloquemos cada alimento fresco en una zona específica:

- *En la rejilla inferior:* alimentos crudos: carne, ave y pescado (separados correctamente), productos de origen animal en descongelación.
- *En la rejilla del centro:* alimentos cocinados (sobras de comida, etc.), embutidos, mayonesa, productos en descongelación (de origen vegetal).
- *En la rejilla superior:* productos lácteos (yogur, queso, natillas) y huevos.
- *En la puerta:* bebidas o alimentos que se consumirán en menos de 3 o 4 días, como leche o zumos de frutas.
- *En el verdulero:* verduras, hortalizas y frutas.

B.3 La conservación es limitada, y cada alimento tiene una duración límite en el frigorífico:

- *1 día:* pescado fresco y carne picada.
- *2 a 3 días:* carne cocida, pescado cocido y carne cruda.
- *3 a 4 días:* leche pasteurizada o leche esterilizada previamente abierta, verduras cocidas y postres caseros.
- *4 a 5 días:* verdura cruda y conservas abiertas.
- *Hasta 5 días:* platos cocinados.
- *2-3 semanas:* huevos.

B.4 También debemos limpiar con frecuencia el interior y tratar de no dejar mucho tiempo abierta la puerta del frigorífico.

ANEXO C**CONGELACIÓN DE LOS ALIMENTOS**

C.1 Para conservar por más tiempo los alimentos crudos y cocidos, debemos almacenarlos a temperaturas inferiores a la de refrigeración, mediante la congelación.

C.2 Por lo general, cuanto más baja es la temperatura de congelación, menor es la velocidad a la que se reproducen las bacterias de los alimentos. La temperatura ideal para conservar alimentos congelados es -18 °C o menos.

C.3 Para una correcta congelación de carnes y aves, debemos sacar el producto del envase inicial, eliminar la grasa visible y los huesos. Con el pescado, se procede a descamar, destripar, separar la cabeza, lavar y secar.

C.4 Es conveniente envolver los productos en porciones más pequeñas (las justas para una comida). De esta forma, no tendremos que descongelar la pieza entera si deseamos consumir una menor cantidad. Cuantas más pequeñas sean las porciones a congelar, mejor y más rápida será la congelación.

C.5 Para envolver los productos a congelar, podemos utilizar bolsas de plástico herméticas, tratando siempre de quitar la mayor cantidad de aire posible. También es conveniente anotar la fecha de congelación en la bolsa de plástico. Así, sabremos qué productos deberemos consumir primero.

C.6 Antes de congelar verduras y hortalizas (con excepción de la cebolla y el ajo) debemos cocinarlas o blanquearlas. El "blanqueado" o "escaldado" consiste en sumergir la verdura durante 2 minutos en agua hirviendo.

C.7 Así, logramos detener el proceso de deterioro de las verduras y eliminar bacterias. Habiendo escurrido la verdura debemos secarla y colocarla en las bolsas herméticas, tratando de extraer todo el aire posible antes de cerrar el envase.

C.8 Es importante tener en cuenta que no es correcto congelar los huevos enteros debido a que se rompería la cáscara. La mejor opción es congelar el huevo batido, la yema batida o la clara en frascos de cristal etiquetados con la fecha de inicio de congelación.

C.9 Para envasar platos preparados, podemos utilizar recipientes de plástico rígido, sin grietas ni fisuras, y aptos para congelador y microondas. Estos permiten la descongelación y el calentamiento posterior en el propio envase.

C.10 Es conveniente no congelar patatas ni pastas, ya que las patatas se endurecen y las pastas se ablandan en el congelador.

C.11 Los tiempos de conservación de los distintos alimentos son aproximadamente los siguientes:

- *Pescado azul y mariscos*: hasta 2 meses.
- *Pescados magros o blancos*: hasta 5 meses.
- *Aves*: 6 a 9 meses.
- *Hortalizas y verduras*: de una temporada a la otra (12 meses).
- *Carnes rojas*: entre 8 y 12 meses.
- *Visceras de cualquier animal*: hasta 6 meses.
- *Huevo batido*: hasta 6 meses.
- *Cordero*: hasta 8 meses.
- *Cerdo*: hasta 6 meses.
- *Pan y bollos*: hasta 3 meses.

C.12 Es mejor dejar un espacio de aproximadamente 2,5 cm entre la tapa y los alimentos, debido a que éstos se expanden cuando se congelan.

C.13 No olvides dejar enfriar los alimentos antes de introducirlos en el congelador, ya que al introducirlos calientes, puedes afectar negativamente a la temperatura de otros.

C.14 No debemos re congelar los alimentos, ya que sucesivas congelaciones, restan calidad a los alimentos y facilitan su contaminación.

ANEXO D**CÓMO DESCONGELAR CORRECTAMENTE LOS ALIMENTOS**

D.1 Podemos descongelar los alimentos en el horno microondas o en el frigorífico, nunca a temperatura ambiente.

D.2 En el microondas: usando la opción "defrost" o "descongelar". No es adecuado para descongelar trozos grandes de carne.

D.3 En el frigorífico: la descongelación también puede comenzar la noche anterior a la preparación. Los alimentos congelados se deben colocar en la rejilla inferior unas horas previas a la cocción, para que el exudado que desprenden las carnes o pescados no caiga encima de otros alimentos y los contamine.

D.4 No es necesario descongelar las hortalizas. Podemos introducirlas congeladas al agua hirviendo, o al aceite de fritura, siempre en pequeñas porciones para no disminuir la temperatura del mismo.

D.5 Una vez descongelados, los alimentos deben cocinarse rápidamente. Si es un plato cocinado, debe llevarse a ebullición por unos minutos, así, nos aseguraremos de que desaparezca cualquier bacteria que haya podido contaminar el producto.

D.6 Importante: nunca se debe congelar de nuevo un alimento que se ha descongelado; no es seguro colocar los alimentos en una superficie de cocina o en el fregadero para descongelarlos a temperatura ambiente porque así se permite el desarrollo rápido de bacterias.

APÉNDICE Z

Z.1. DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 439	<i>Colores, señales y símbolos de seguridad</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1108	<i>Agua potable. Requisitos</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1134-1	<i>Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 1. Requisitos</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1134-2	<i>Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 1. Requisitos</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1134-3	<i>Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 3. Requisitos para declaraciones nutricionales y declaraciones saludables.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2293	<i>Accesibilidad de las personas con discapacidad y movilidad reducida al medio físico. Área higiénica sanitaria</i>

Z.2. BASES DE ESTUDIO

Norma Boliviana NB 329033:2009. *Mercado Saludable. Requisitos.*

Codex Alimentarius, *Código internacional de prácticas recomendado - Principios generales de higiene de los alimentos CAC/RCP 1-1969, Rev. 4 (2003).*

Codex Alimentarius, *directrices regionales para la formulación de medidas de control de los alimentos que se venden en la vía pública en África, CAC/GL 22R-1997.*

Codex Alimentarius, *Código de prácticas de higiene para la elaboración y expendio de alimentos en la vía pública (Norma regional - América Latina y el Caribe) CAC/RCP 43-1995.*

Registro Oficial 696 (4 noviembre, 2002) *Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura No. 3253.*

Ministerio de Salud Pública, Asociación de Municipalidades del Ecuador y Organización Panamericana de la Salud, *Guía para el establecimiento y certificación de mercados saludables en el Ecuador, versión por validar localmente, Mayo 2011.*

MINTUR, *Manual de Buenas Prácticas de Manipulación de Alimentos para Restaurantes y Servicios afines, Lima-Perú 2008.*

Sociedad Española de Nutrición Comunitaria SENC, *Guía de alimentación saludable, Madrid 2004.*

Distrito Metropolitano de Quito, *Ordenanza Metropolitana N° 0172 que establece el Régimen Administrativo del Suelo en el distrito metropolitano de Quito: Derogatoria de las Ordenanzas Metropolitanas Nos 3746, 0031 y 255, Quito 30 de diciembre de 2011.*

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 2687	TÍTULO: MERCADOS SALUDABLES REQUISITOS	Código: ICS 67.020
ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio: 2011-06-06	REVISIÓN: La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma Oficialización con el Carácter de Obligatoria por Resolución No. publicado en el Registro Oficial No. Fecha de iniciación del estudio:	
Fechas de consulta pública: 2012-04-25 a 2012-05-10		

Subcomité Técnico de: Mercados saludables
Fecha de iniciación: 2012-05-17
Integrantes del Subcomité:

Fecha de aprobación: 2012-08-30

NOMBRES:

Milton Logroño (Presidente)
Mary Casa

Luis Melo Gómez
Maribel Quelal
Mayra Chamba
Rocío Trejos
María José Cabrera
Andrea Novoa

Milton Tapia

Alex Van Hildebrand
Evelyn Andrade (Secretaría Técnica)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA-MSP
ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL-EPN
AGROCALIDAD
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA-MSP
SECRETARÍA DEL AMBIENTE
INSTITUTO NACIONAL DE PESCA-INP
MINISTERIO DE AMBIENTE ECUADOR-MAE
MINISTERIO DE AMBIENTE ECUADOR-MAE
ASOCIACIÓN DE MUNICIPALIDADES DEL
ECUADOR-AME
ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA
SALUD-OPS
INSTITUTO ECUATORIANO DE
NORMALIZACIÓN-INEN

Otros trámites:

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

Oficializada como: Voluntaria
Registro Oficial No. 934 de 2013-04-16

Por Resolución No. 13035 de 2013-03-13

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inenlaboratorios@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
URL: www.inen.gov.ec