



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO FORTIFICADO CON  
HIERRO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO DESHIDRATADA POR EL MÉTODO DE  
LIOFILIZACIÓN Y SECADOR DE BANDEJAS”**

**TESIS DE GRADO**

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**FLOR GABRIELA SOLIZ POVEDA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2014**

## **DEDICATORIA.**

*A mi hijo Francisco José Carpio Soliz, quien es la luz e inspiración de mis días.*

*A mi querida abuelita Olguita Granja (+), quien desde el cielo me guía, respalda y me da fortaleza para seguir siempre adelante, la misma que siempre me dio ejemplo de honradez, amor y solidaridad.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por darme la vida*

*A mis adorados padres por permitirme que se cumplan mis aspiraciones, por su apoyo incondicional, sus sabios consejos, los cuales nunca me hicieron desmayar.*

*A mi amado esposo, Nicolás Carpio por su cariño, comprensión y apoyo, los cuales me permitieron culminar esta etapa de mi vida.*

*A mi querida cuñada Natalia Carpio, quien velo por el bienestar de mi pequeño, mientras yo alcanzaba una de las metas, en esta larga carrera.*

*A mis padres políticos José Carpio y Carolina Arias, que siempre estuvieron presentes en todo momento.*

*Vaya para el excelente cuerpo de facilitadores en especial el Dr. Carlos Pilamunga y el Dr. Carlos Espinoza, mí sentido agradecimiento, ya que sin sus orientaciones y conocimientos no estuviera culminando esta importante etapa de mi vida.*

*Sin su apoyo incondicional no hubiera alcanzado una de las metas en esta larga carrera que la vida nos impone, y también por el éxito y la felicidad que nos espera, si tomamos sabias decisiones. Pues mi éxito será el éxito de este establecimiento de nuestros maestros y de la Patria.*

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

El tribunal de tesis certifica que: el trabajo de investigación “**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN PRODUCTO ALIMENTICIO FORTIFICADO CON HIERRO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO DESHIDRATADA POR EL MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN Y SECADOR DE BANDEJAS**” de responsabilidad de la egresada Flor Gabriela Soliz Poveda, ha sido prolijamente revisado por los miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. César Ávalos <b>DECANO FACULTAD DE CIENCIAS</b>	-----	-----
Dra. Ana Albuja <b>DIRECTOR DE ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA</b>	-----	-----
Dr. Carlos Pilamunga <b>DIRECTOR DE TESIS</b>	-----	-----
Dr. Carlos Espinoza <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	-----	-----
<b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	-----	-----
<b>DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN</b>	-----	-----

**NOTA DE TESIS ESCRITA: -----**

Yo, Flor Gabriela Soliz Poveda, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados  
expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado; pertenece a la  
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

-----  
**FLOR GABRIELA SOLIZ POVEDA**

## INDICE DE ABREVIATURAS

AOAC	Association of Oficial Analytical chemist
Ab	absorbancia
cm	centímetros
FAO	Organización americana de alimentos
g	gramos
h	hora
INEN	instituto ecuatoriano de normalización
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Metro
ms	masa seca
min	minutos
mg	miligramos
mL	mililitros
mm	milímetro
nm	nanómetro
NTE	Norma técnica Ecuatoriana
%	porcentaje
pH	potencial de hidrogeno
p	promedio
t	tiempo
ufc	unidades formadoras de colonias

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

### 1.- MARCO TEÓRICO

1.1.- Anemia----- 1

1.2.-Definición de Rendimiento escolar ----- 1

1.3.- Anemia y Rendimiento escolar

**1.4.- IMPORTANCIA DEL HIERRO EN LA NUTRICIÓN HUMANA----- 2**

1.4.1.- Absorción de Hierro----- 2

1.4.1.1.- Absorción de Hierro Hemo----- 3

**1.5.- CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA DEFICIENCIA DE  
HIERRO----- 3**

1.5.1.- Consecuencia de la Deficiencia de Hierro en el Embarazo----- 4

1.6.- Fuentes Alimentarias de Hierro----- 5

**1.7.- UTILIZACIÓN DE LA SANGRE EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA--- 6**

1.7.1.- La Sangre como Alimento Humano.----- 6

1.8.- Alimentos Fortificados con Hierro----- 7

**1.9.- PRINCIPALES MATERIAS PRIMAS E INSUMOS.----- 8**

1.9.1.- Harina de Trigo----- 8

1.9.1.1.- Clasificación de la harina de trigo----- 12

1.9.2.- Azúcar----- 13

1.9.3.- Grasa----- 14

1.9.4.- Cacao en polvo-----	15
1.9.5.- Huevos.-----	16
1.9.6.- Zumo de fruta (maracuyá) -----	17
1.10.- Elaboración de mini cupcakes-----	19
<b>1.11.- DATOS ESTADÍSTICOS-----</b>	<b>20</b>
1.11.1.-Deficiencia de Hierro a nivel mundial, regional, y nacional-----	20
1.11.2.- Anemia en Mujeres en Edad Reproductiva (12-49 años) -----	21
1.11.3.- Consumo Inadecuado de Hierro a Nivel Nacional-----	21
<b>1.12.- ANÁLISIS PROXIMAL Y/O BROMATOLÓGICO-----</b>	<b>22</b>
1.12.1.- Determinación de Humedad-----	22
1.12.2.- Determinación de Cenizas-----	23
1.12.3.- Determinación de Fibra-----	24
1.12.4.- Determinación de Proteína-----	24
1.12.5.-Extracto Etéreo-----	24
1.12.6.- Extracto Libre no Nitrogenado-----	25
1.12.7.-pH-----	25
1.12.8.- Método Espetométrico-----	26
<b>1.13.- TEST DE ACEPTABILIDAD-----</b>	<b>26</b>
1.13.1.- Pruebas Afectivas.-----	27
1.13.1.1.- Prueba de Preferencia.-----	27
1.13.1.2.- Pruebas de Medición del Grado de Satisfacción.-----	28
1.13.1.3.- Prueba de Aceptación.-----	30
<b>1.14.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO-----</b>	<b>30</b>

1.14.1.- Mohos y Levaduras-----	31
1.14.2.- Coliformes Totales-----	31
1.14.3.- Aerobios Mesófilos-----	32
1.14.4.- <i>Salmonella</i> -----	32
<b>2.- PARTE EXPERIMENTAL-----</b>	<b>33</b>
2.1.-Lugar de realización-----	33
<b>2.2.- MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS-----</b>	<b>33</b>
2.2.1.-Materia prima-----	33
2.2.2.- Equipos-----	34
2.2.3.- Materiales-----	34
2.2.4.- Reactivos-----	35
2.2.5.-Medios de cultivo-----	36
<b>2.3.- TÉCNICAS-----</b>	<b>36</b>
2.3.1.-Elaboración de harina de sangre de origen bovino.-----	36
2.3.2.- Elaboración de mini cupcakes a base de sangre de origen bovino.-----	36
2.3.2.1.- Ingredientes-----	36
2.3.2.2- Preparación-----	37
2.4.- Datos importantes de la formulación-----	37
2.5.- Cálculo de la concentración de la cantidad de hierro presente en la muestra-----	38
<b>2.6.- TEST DE ACEPTABILIDAD-----</b>	<b>38</b>
2.6.1.- Prueba de medición del grado de satisfacción, a escala hedónica verbal, para la elección del mini cupcake hecho a base de sangre de origen bovino.-----	<b>38</b>
<b>2.7.- ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LOS MINI CUPCAKES-----</b>	<b>40</b>

2.7.1.- Determinación de Humedad y Materia Seca.-----	40
2.7.2.- Determinación de Cenizas-----	40
2.7.3.- Determinación de Fibra-----	40
2.7.4.- Determinación de Proteína -----	40
2.7.5.- Determinación de Extracto Etéreo-----	41
2.7.6.- Cálculo de Extracto Libre no Nitrogenado-----	41
2.7.7.- Determinación de pH-----	41
<b>2.7.8.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL MINI CUPCAKE TESTIGO Y MINI CUPCAKE MÁS ACEPTABLE.-----</b>	<b>41</b>
2.7.8.1.- Determinación de Hongos.-----	41
2.7.8.2.- Determinación de Aerobios Mesófilos.-----	43
2.7.8.3.- Determinación de Coliformes-----	43
2.7.8.4.- Determinación de <i>Salmonella</i> .-----	44
2.7.9.- Determinación de Cantidad de Hierro.-----	44
2.7.9.1.- Cuantificación de Hierro en las muestras-----	45
2.7.10.- Análisis Estadístico-----	46
<b>3.- RESULTADOS.-----</b>	<b>47</b>
3.1.- Prueba de degustación.-----	47
3.1.2.- Tabulación del test de degustación.-----	47
3.1.2.1.- Prueba de medición del grado de satisfacción, a escala hedónica verbal, para la elección del mini cupcake hecho a base de sangre de origen bovino.-----	<b>47</b>
3.1.2.1.1.- Resultados y Gráficos de la prueba para la elección del mini cupcakes hecho a base de sangre de origen bovino.-----	49
3.2.- Comparación de resultados del análisis bromatológico de mini cupcakes hechos	

a base de sangre de origen bovino, por el método de liofilización y secador de bandejas, con Galarza, R., Cayro, Y., de Perú.-----	51
3.2.1.- Análisis de Cenizas.-----	51
3.2.2.- Análisis de Fibra.-----	53
3.2.3.- Análisis de Grasa.-----	55
3.2.4.- Análisis de Humedad.-----	57
3.2.5.- Análisis de Proteína.-----	59
3.2.6.- Análisis de Carbohidratos Totales.-----	61
3.2.7.- Análisis de Extracto Etéreo.-----	63
<b>3.3.- ANÁLISIS DE CANTIDAD DE HIERRO PRESENTE EN CADA MUESTRA.-----</b>	<b>65</b>
<b>3.4.- ANÁLISIS MICRIBIOLÓGICO DE MINI CUPCAKES.-----</b>	<b>69</b>
<b>4.- CONCLUSIONES.-----</b>	<b>70</b>
<b>5.- RECOMENDACIONES-----</b>	<b>72</b>
<b>6.- RESÚMEN. SUMMARY.-----</b>	<b>74</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.-----</b>	<b>77</b>
<b>8.- ANEXOS.-----</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO No 1.</b>	Prueba para la elección del mini cupcakes hecho a base de sangre de origen bovino-----	49
<b>CUADRO No 2.</b>	Composición proximal y contenido de hierro de la harina de sangre bovina secada por el método de liofilización y secador de bandejas.-----	68
<b>CUADRO No 3.</b>	Análisis microbiológico de mini cupcakes 0%, 10%, hecho a base de sangre de origen bovino por el método de liofilización y secador de bandejas, y el de referencia propuesto por Galarza r, Cayro Y. Perú (2013).-----	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA No1</b>	Fuentes alimentarias de hierro.-----	6
<b>TABLA No 2</b>	Sustancias para fortificación de harina de trigo.-----	10
<b>TABLA No 3</b>	Requisitos físicos y químicos de harina de trigo-----	10
<b>TABLA No 4</b>	Composición de harina de trigo por cada 100g.-----	11
<b>TABLA No 5</b>	Especificaciones de azúcar blanco cristalizado.-----	14
<b>TABLA N°6</b>	Valor nutricional de aceite de girasol. (100g) -----	15
<b>TABLA N° 7</b>	Estado nutricional de cocoa.-----	16
<b>TABLA N° 8</b>	Composición nutritiva del huevo (62g) -----	17
<b>TABLA N° 9</b>	Valor nutricional jugo de maracuyá. (100ml)-----	18

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO No 1.</b>	Para la elección del mini cupcakes hecho a base de sangre de los resultados de materia seca, de mini cupcakes blanco, 10%, y comparación con blanco y 10% de Perú-----	50
<b>GRÁFICO No 3.</b>	Comparación de los resultados de materia seca, de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre.---	52
<b>GRÁFICO No 4.</b>	Resultado de fibra de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	53
<b>GRÁFICO No 5.</b>	Resultado de fibra de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre.-----	54
<b>GRÁFICO No 6.</b>	Resultado de grasa de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	55
<b>GRÁFICO No 7.</b>	Resultado de grasa de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre -----	56
<b>GRÁFICO No 8</b>	Resultado de humedad % de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	57
<b>GRÁFICO No 9.</b>	Resultado de humedad de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre-----	58
<b>GRÁFICO No 10.</b>	Resultado de proteína % de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	59
<b>GRÁFICO No 11.</b>	Resultado de proteína de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre-----	60
<b>GRÁFICO No 12.</b>	Resultado de carbohidratos totales g/100g de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	61
<b>GRÁFICO No 13.</b>	Resultado de carbohidratos totales de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre-----	62
<b>GRÁFICO No 14.</b>	Resultado de extracto etéreo kcal/100g de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	63

<b>GRÁFICO No 15.</b>	Resultado de extracto etéreo de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre-----	64
<b>GRÁFICO No 16.</b>	Resultado de cantidad de hierro mg/kg de mini cupcakes blanco y 10% de harina de sangre, con respecto a los valores obtenidos en Perú.-----	65
<b>GRÁFICO No 17.</b>	Análisis del resultado de cantidad de hierro mg/kg, presente en blanco y 10% de harina de sangre o experimental -----	67

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA No 1.</b>	Escala hedónica de tres puntos.-----	29
<b>FIGURA No 2.</b>	Escala hedónica gráfica “escala de caritas”. -----	29

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO No 1.</b>	Modelo de ficha para prueba de degustación  escala hedónica, cinco puntos.-----	83
<b>ANEXO No 2.</b>	Elaboración de Harina de Sangre de Origen Bovino-----	86
<b>ANEXO No 3.</b>	Determinación de Humedad y Materia Seca-----	89
<b>ANEXO No 4.</b>	Determinación de Cenizas-----	91
<b>ANEXO No 5.</b>	Determinación de Fibra-----	93
<b>ANEXO No 6.</b>	Determinación de Proteína Cruda-----	97
<b>ANEXO No 7.</b>	Determinación de Extracto Etéreo-----	101
<b>ANEXO No 8.</b>	Determinación de pH-----	104
<b>ANEXO No 9.</b>	Determinación de <i>Salmonella</i> .-----	106
<b>ANEXO No 10.</b>	Análisis Bromatológico, Cuantificación de Hierro----	120
<b>ANEXO No 11.</b>	Análisis Microbiológico, Mini cupcake 0% o Blanco.-----	121
<b>ANEXO No. 12.</b>	Análisis Microbiológico, Mini cupcake 10% de Harina de Sangre en la Formulación-----	122

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de salud pública asociados a la mala nutrición en nuestro país es la anemia por deficiencia de hierro que afecta según ENSANUT (2013) al 25.7% de la población, esto se agrava en la población indígena llegando al 41.6%, según la misma fuente a nivel nacional la prevalencia de anemia en mujeres en edad reproductiva a partir de los 15 años llegan a un 14.8%, en tanto al consumo inadecuado de hierro es del 70.5% siendo mayor en la población indígena.( **FREIRE, W. y col.** 2013)

Dentro de las afecciones que se puede obtener por deficiencia de hierro esta que podría estar causalmente concernida al retraso en la maduración motora y probablemente alteraciones conductuales en humanos jóvenes. (**MORETA, V. CARDENA, E.** 2013), así como las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) y un cierto número de funciones motoras y la termorregulación. Investigaciones recientes indican que la deficiencia de hierro también causa anormalidad en la actividad endocrina e inmunitaria. (**BELLO, A.** 2004). Según Zhou y colaboradores, en su investigación manifestaron que existe una relación entre la severidad de la anemia en el primer trimestre y el riesgo de bajo peso de nacimiento y de parto prematuro. Walter y colaboradores de Chile y Lozoff y colaboradores en Costa Rica, ambos grupos documentaron que los lactantes con anemia ferropénica mostraban retrasos reveladores en el desarrollo psicomotor (**OLIVARES, M. WALTER, T.** 2003)

Sabiendo que varios alimentos de origen animal como son los distintos tipos de carne ya sea este carnes rojas y vísceras tienen alto contenido de hierro y una mayor biodisponibilidad por contener hierro hemo, utilizar la sangre de origen bovino sería útil para la alimentación en nuestro país la que serviría para combatir este problema de salud pública en cuanto a nutrición, y sabiendo que en nuestro país su consumo es regular ya que lo degustan a manera

de comida típica como en el caso del yaguar loco, y que en su composición nutricional tiene excelentes concentraciones sobretodo de porcentaje de proteína del 81.6% y cantidad de hierro 206,96 mg/Kg haciéndola óptima para su consumo, además sería de gran utilidad ya que esta es desechada en los camales ocasionando problemas de contaminación ambiental.

El método de liofilización se dio como una alternativa para la obtención de la harina de sangre en el Laboratorio de Procesos Industriales de la ESPOCH, ya que en la misma no se cuenta con un atomizador para el proceso, obteniendo resultados idóneos de la misma luego de ser sometida a la misma después del proceso a un secado mediante secador por bandejas, lo negativo en cuanto a este método es el tiempo que se requiere para que la muestra (harina de sangre) esté lista para su uso, que en comparación con el método propuesto por Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), y Lucas-ao (2005), es mucho menor.

El objetivo de esta investigación fue elaborar y evaluar un producto alimenticio con alto contenido de hierro a base de sangre de origen bovino, por el método de liofilización y secador de bandejas, su evaluación nutricional incluyo dentro de sus determinaciones la cantidad proximal, calidad microbiológica y su contenido de hierro en distintas concentraciones siendo estas del 0, 5, 10, y 15% , mediante estas determinaciones se puede decir que se puede utilizar harina de sangre para contrarrestar anemia por deficiencia de hierro sobre todo en la población infantil y mujeres en edad reproductiva, en sectores indígenas que son quienes más conllevan la enfermedad, y la población en general.

Se elaboró mini cupcakes sabor a chocolate con alto contenido de hierro proveniente de la harina de sangre de origen bovino, con la finalidad de dar a conocer a la población un producto novedoso nutritivo y económico, sobre todo para la población infantil que son quienes más consumen productos con contenido de chocolate y azúcar, siendo estos ideales para enmascarar posibles colores y sabores indeseables para el consumidor.

## **CAPÍTULO I**

### **1. MARCO TEÓRICO.**

#### **1.1.- ANEMIA.**

Se puede definir anemia como el estado en el cual el volumen de la masa de eritrocitos circulantes es falto para hacer frente a las demandas de oxígeno de los tejidos. (**MORETA, V. CARDENA, E.** 2013)

Por otra parte la OMS define a la anemia como el trastorno en el cual el número de eritrocitos es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo, de la misma manera puede afirmarse que “la anemia es un estado en el cual hay una correspondencia mayor o igual del 10% en la concentración de hemoglobina en la sangre periférica por debajo de lo normal de acuerdo a la edad, sexo y altura relativo al nivel del mar. (**CONTRERAS, F. BLANCO, M.** Fisiopatología)

#### **1.2.- DEFINICIÓN DE RENDIMIENTO ESCOLAR.**

Se entiende como rendimiento escolar al nivel de apreciación indicado en una calificación que el alumno como resultado de una evaluación, en la que se mide el proceso de aprendizaje en la que es partícipe (**MORETA, V. CARDENA, E.** 2013.)

### **1.3.- Anemia y Rendimiento Escolar**

En los seres humanos la atracción del mineral se da durante toda la vida, y es prolongada hacia los ganglios basales, la glucoproteína transferrina es la encargada del transporte del hierro en todo el organismo en especial en el cerebro el cual es proveniente de los alimentos para ser almacenado como ferritina. Su captación se ve disminuida por el estado del mineral. (MORETA, V. CARDENA, E. 2013.)

El oligodendrocito es el tipo de célula que tiene hierro en el cerebro, las cuales son responsables de la producción de colesterol y ácidos grasos para la producción de mielina, y su alteración produce hipomielinación, como deficiencias del mineral posnatal. La carencia del mineral produce que los oligodendrocitos sean “inmaduros”. Cuando existe falta de distribución de hierro a las nombradas células sobretodo en períodos prematuros puede ser la el motivo de retardo en el desarrollo de la motricidad y puede desarrollar variaciones en la conducta de los adolescentes. (MORETA, V. CARDENA, E. 2013.)

### **1.4.- IMPORTANCIA DEL HIERRO EN LA NUTRICIÓN HUMANA**

#### **1.4.1- Absorción de Hierro**

En un sujeto normal, las necesidades diarias de hierro son muy bajas en balance con el hierro circulante, por lo que sólo se absorbe una pequeña proporción del total ingerido. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad y el tipo de hierro presente en los alimentos, el estado de los depósitos corporales del mineral, las necesidades, la actividad eritropoyética y una serie de factores lumbales e intralumbales que facilitan la absorción.( FORRELLAT, M. GAUTIER, H. FERNANDEZ, N. 2000)

La absorción obedece en primer lugar del tipo de compuesto de hierro presente en la dieta, en dependencia de lo cual van a existir dos formas diferentes de absorción: la del hierro hemo y la del hierro inorgánico. (FORRELLAT, M. GAUTIER, H. FERNANDEZ, N. 2000)

#### **1.4.1.1.- Absorción de Hierro hemo**

La absorción de el hierro hemítico es mayor aunque este representa una mínima porción del total de la dieta, por la presencia de aminoácidos y péptidos que son liberados en la digestión al consumir carne los mantiene solubles y por consiguiente poseen mayor absorción. La presencia de calcio interfiere en la transferencia del metal disminuyendo su absorción. Por consiguiente el calcio disminuye la absorción de ambos tipos de hierro por interferir en la transferencia del metal a partir de la célula mucosa, no así en su entrada a esta. (FORRELLAT, M. GAUTIER, H. FERNANDEZ, N. 2000)

#### **1.5.- CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO**

El hierro es un nutriente esencial para la equilibrio de la estructura y las funciones del sistema nervioso central; el descenso en la biodisponibilidad de hierro en el cerebro perjudica los mecanismos bioquímicos, la elaboración de neurotransmisores y algunas funciones encefálicas, prioritariamente las vinculadas con el sistema de la dopamina, así como las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) y un cierto número de funciones motoras y la termorregulación. Investigaciones recientes indican que la deficiencia de hierro también causa anormalidad en la actividad endocrina e inmunitaria. (BELLO, A. 2004)

En cuanto a la demostración del incremento neuroconductual de los lactantes es obstruido por la deficiencia de hierro se ha multiplicado desde los primeros trabajos aparecidos en la década de los años 80; esto se debe no solo a que las actividades encefálicas son críticas en el ser humano, sino también a la aumentada prevalencia de esta deficiencia nutricional en todo el mundo, y conforme se amplía el conocimiento de los mismos se hace indiscutible que puede afectar funciones orgánicas esenciales tales como la síntesis de neurotransmisores. Por otra parte trabajos recientes han mostrado evidencia de que el daño encefálico resultante no es reversible, sino que deja secuelas que pueden ser comprobadas hasta una década luego de que la deficiencia ha sido rectificada. (**BELLO, A.** 2004)

#### **1.6.1.- Consecuencia de la Deficiencia de Hierro en el Embarazo**

Desde hace mucho tiempo se ha estudiado la concordancia entre los niveles maternos de hemoglobina o hematocrito y el transcurso del embarazo. (**OLIVARES, M. WALTER, T.** 2003).

Se halla una asociación entre la relación hematocrito/hemoglobina materna, el parto prematuro (<37 semanas de gestación), el bajo peso del nacimiento (<2.500 g) y la morbi-mortalidad perinatal. Existen evidencias que la agrupación entre hemoglobina baja y parto prematuro se da en los dos primeros trimestres de gestación. (**OLIVARES, M. WALTER, T.** 2003).

Según Zhou y colaboradores, en su investigación manifestaron que existe una relación entre la severidad de la anemia en el primer trimestre y el riesgo de bajo peso de nacimiento y de

parto prematuro en 829 embarazadas, que fueron investigadas. (**OLIVARES, M. WALTER, T.** 2003).

El riesgo de sufrir parto prematuro se incrementa 1,6 veces con hemoglobina de 10,9 h/dl, y este riesgo sigue en aumento cuando la hemoglobina desciende más llegando a un promedio de 3,7 veces por debajo de 8g/dl. Dentro de la investigación también se evidencia un aumento de parto prematuro, de muerte fetal y bajo peso de nacimiento con valores altos de hematocrito/ hemoglobina (>13g/dl). (**OLIVARES, M. WALTER, T.** 2003).

Por otra parte en diversos estudios se ha apreciado el efecto de anemia ferropénica que ocurre tempranamente en el embarazo está ligado a un riesgo de 2,66 veces mayor de parto prematuro y de 3,1 veces de bajo peso de nacimiento, de la misma manera al controlar a estas embarazadas no se observa un mayor aumento de riesgo luego de la semana 38. Por otro lado los hijos de madres con anemia ferropénica al tiempo del parto tienen una mayor prevalencia de anemia ferropénica durante el primer año de vida". (**OLIVARES, M. WALTER, T.** 2003)

## **1.7.- FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO**

La fuente alimentaria de hierro influye en gran medida sobre la eficiencia de su absorción, que oscila entre <1 % y >20 %. (**ZIEGLER, E. FILER, R.** 1996).

Contenido de hierro (mg) en 100 g de parte comestible. (**CARDERO Y.** y col. 2009)

**TABLA No1- FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO.**

Alimento	Valor	Alimento	Valor
Hígado de cerdo	29,1	Molleja de pollo	3,0
Riñon de res	13,0	Lengua de cerdo	3,0
Ajonjolí	10,0	Tamarindo	2,7
Hígado de pollo	8,5	Pato	2,7
Hígado de res	7,5	Pan corteza dura	2,5
Riñon de cerdo	6,6	Sesos de res	2,4
Chorizos	6,5	Jamon pierna	2,4
Perejil	6,2	Frijol(promedio)	2,4
Corazón de res	5,9	Frijol negro	2,2
Huevo de gallina(yema)	5,5	Hamburguesa de carne	2,2
Corazón de cerdo	4,9	Lengua de res	2,2
Picadillo de res con soya	3,6	Maní	2,2
Hamburguesa de soya	3,6	Lenteja	2,0
Carne de res magra	3,5	Huevo de gallina	2,0
Perro caliente	3,5	Mortadela Atabey	2,0

Fuente: CARDERO Y. y col. (2009)

## **1.9.- UTILIZACIÓN DE LA SANGRE EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA**

### **1.9.1. La sangre como alimento humano**

A lo largo de la historia la utilización de sangre en diversas culturas culinarias a nivel mundial no es nueva, esta se ha venido preparando con una total normalidad, como en el caso de países sudamericanos como Chile, Brasil, Ecuador, así como también en países como China, el Tíbet, Portugal, etc. (**SANGRE GASTRONOMÍA**)

La elaboración de distintos platos como sopas, pasteles, morcillas, o incluso sola, hace de esta un alimento nutritivo y saludable para el consumo humano.

Por otra parte Algunas culturas consideran que la sangre es un alimento tabú. Por ejemplo, los judíos y musulmanes prohíben el consume de sangre en sus leyes religiosas. En la Biblia, la sangre fue prohibida por el Concilio de Jerusalén y sigue estándolo entre los ortodoxos griegos. **(SANGRE GASTRONOMÍA)**

### **1.10.- ALIMENTOS FORTIFICADOS CON HIERRO**

Los alimentos fortificados son productos suplementados en forma significativa en su contenido natural de nutrientes esenciales para la alimentación de un ser humano (proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales). Estos alimentos deben hacer su aporte entre el 20% y el 100% de los requerimientos diarios recomendados para adultos y niños mayores de 4 años y los mismos deben estar indicados en el rótulo del envase. **(CONSEJO ARGENTINO PARA LA INFORMACIÓN Y EL DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA)**

Entre los alimentos más común en fortificación están los panificados, cereales para desayunos, lácteos, galletitas y pastas

La fortificación de alimentos es una de las estrategias más efectivas para asegurar un consumo permanente de nutrientes, es fácil de poner en pié y de administrar a niveles que no son riesgosos, la supervisión y vigilancia no son difíciles y finalmente la tecnología está disponible. **(II CONGRESO ECUATORIANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS)**

En el año 2008 la fortificación de la harina de trigo, siendo este de consumo masivo a nivel nacional en distintos derivados. **(RODRÍGUEZ, A. Programa de Integración de Micronutrientes; Fortificación de la harina de trigo con hierro)**

## **1.11.- PRINCIPALES MATERIAS PRIMA E INSUMOS.**

### **1.11.1.- Harina de Trigo**

La norma INEN Ecuatoriana en su NTE 616, especifica que la harina de trigo es un producto que se obtiene de la molienda y tamizado del endospermo del grano de trigo (*triticum vulgare*, *triticum durum*), considerando al restante de la molienda y tamización como un subproducto en los cuales están de endospermo germen y salvado, debe ser suave al tacto, de color natural, sin sabores extraños, sin presentar puntos negros y olores anormales. La harina de trigo a su vez se es el nombre genérico de los productos que se obtienen al moler el grano de trigo libre de sus envolturas celulósicas. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006).

Los requisitos que especifica en la norma NTE INEN 616 son:

Generalidades:

- Debe presentar un color uniforme, variando del blanco a blanco amarillento, ésta a su vez se determinara según la norma NTE INEN 528.
- Debe presentar un olor y sabor característico al grano de trigo molido, sin que éste presente indicios de rancidez o enmohecimiento.
- La harina deberá presentar ausencia total de otro tipo de harina.
- La harina de trigo no deberá contener insectos vivos ni sus formas intermedias de desarrollo.
- Libre de excretas animales

- Cuando sea sometido a ensayo normalizado de tamizado mínimo el 95% deberá pasar por un tamiz INEN 2010 UIm (No. 70). (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006).

Aditivos:

#### 1.- Agentes leudantes.

- Las harinas pueden contener agentes leudantes tales como: fosfato monocalcico, bicarbonato de sodio o pirofosfato ácido de sodio o tartrato ácido de potasio o fosfato ácido de sodio y aluminio.
- Pueden contener a más de un agente leudante como grasa, sal, azúcar emulsificantes, saborizantes, sustancias de enriquecimiento y otras que puedan estar autorizadas.
- Los leudantes artificiales más usados como el bicarbonato de sodio y fosfato monocalcico pueden ser combinados hasta un límite máximo 4,5%(m/m). (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006).

#### 2.- Mejoradores y blanqueadores.

- Dióxido de cloro.- se usa como blanqueador y madurador de harina máximo 30mg/Kg.
- Ácido ascórbico.-mejorador de harina máximo 200mg/Kg.
- Cloro.- es un blanqueador de harina para repostería, máximo 100mg/Kg.
- Peróxido de benzoilo.- blanqueador de harina, máximo 30mg/Kg.
- Azodicarbonamida.- mejorador de harina, máximo 45mg/kg.” (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006)

### 3.- SUSTANCIAS DE FORTIFICACIÓN

Todas las harinas deberán ser fortificadas con las siguientes sustancias micronutrientes de acuerdo a lo especificado en la siguiente tabla.

**TABLA No 2. SUSTANCIAS PARA FORTIFICACION DE HARINA DE TRIGO.**

SUSTANCIA	UNIDAD	REQUISITO MÍNIMO
Hierro reducido micronizado	mg/Kg	55.0
Tiamina (vit B1)	mg/Kg	4.0
Riboflamina(vit B2)	mg/Kg	7.0
Ácido fólico	mg/Kg	0.6
Niacina	mg/Kg	40

FUENTE: REQUISITOS HARINA DE TRIGO. NTE INEN 616.

**TABLA No 3. REQUISITOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE HARINA DE TRIGO.**

REQUISITOS	Unid	Harina panificable		Harina integral	Harinas especiales			Harinas para todo uso		Método de ensayo
		Extra		Min. Máx.	Pastificios	Galletas	Autoleud.	Min. Máx.	Min. Máx.	
		Min.	Máx.		Min. Máx.	Min. Máx.	Min. Máx.			
Humedad	%	14.5		15	- 14.5	- 14.5	- 14.5	14.5		NTE INEN 518
Proteína (base seca)	%	10		11	10	9 -	9	9		NTE INEN 519
Cenizas (base seca)	%	*0.75		- 2.0	- 0.8	- 0.75	- 3.5	0.85		NTE INEN 520
Acidez (Exp. en ácido sulfúrico)	%	0.1		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		NTE INEN 521
Gluten húmedo	%	25	-		23	23	23	25	-	NTE INEN 529

\*Para el caso de harina panificable enriquecida extra, el porcentaje de cenizas será máximo de 1.6 %

❖ FUENTE: REQUISITOS HARINA DE TRIGO. NTE INEN 616.

La composición de la harina de trigo se indica en al siguiente tabla.

**TABLA No 4. COMPOSICIÓN DE HARINA DE TRIGO POR CADA 100g.**

Tipo	Integral	Refinada	Reforzada.
Agua	10,27g	11,92g	11,92g.
Energía	339Kcal	364Kcal	364Kcal
Grasa	1,87g	0,98g	0,98g
Proteína	13,70g	15,40g	15,0g
Hidratos de carbono	72,57g	76,31g	76,31g
Fibra	12,2g	2,7g	2,7g
Hierro	4,64mg	3,88mg	4,64mg
Calcio	34mg	15mg	15mg
Vitamina C	0mg	0mg	0mg
Vitamina B1(Tiamina)	0,4mg	0,1mg	0,7mg
Vitamina B2(riboflavina)	0,215mg	0,04mg	0,494mg
Vitamina B3(niacina)	6,365mg	0mg	5,904mg
Vitamina B6(piridoxina)	0,341mg	0,044mg	0,2mg
Ácido fólico	44mcg	0mcg	128mcg

• FUENTE: ADMINISTRACIÓN DE DROGAS Y ALIMENTOS DE LOS E.U.A

Existen clasificaciones internacionales para la harina, que la clasifican de la siguiente manera.

Cero (0), dos ceros (00), tres ceros (000), cuatro ceros (0000).

La harina de tipo cuatro ceros (0000) es la más refinada y más blanca, al poseer esta escasa formación de gluten no es un buen contenedor de gas y con este tipo de harina los productos de panificación pierden su forma, por este motivo se utiliza este tipo de harina en pastelería en batido de torta, hojaldres, etc. (ESPIN, J. 2011).

La harina de tipo tres ceros (000) se utiliza siempre para productos de panificación, ya que al poseer alto contenido de proteína facilita la formación de gluten, por lo tanto un buen leudado sin que se pierda su forma. (**ESPIN, J.** 2011).

#### **1.11.1.1.- CLASIFICACIÓN DE LA HARINA DE TRIGO.**

Según la NTE INEN 616, de acuerdo a su uso se clasifica en:

##### **1.- Harina panificable.**

**1.1.- Extra.-** Este tipo de harina es elaborada hasta un grado de extracción determinado, la cual puede ser tratada con blanqueadores y fortificada con vitaminas y minerales. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 2006).

**2.- Harina Integral.-** Este tipo de harina es obtenida por la molienda de granos limpios de trigo y que contiene todas las partes de este, y que a su vez puede ser tratada con mejoradores y productos de fortificación como vitaminas y minerales. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 2006).

**3.- Harinas especiales-** Se caracterizan por tener un grado de extracción bajo, su destino es elaborar productos de pastificio, galletería y derivados de harinas autoleudantes, este tipo de harina puede ser tratada con productos leudantes, así como también fortificadas con vitaminas y minerales. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 2006).

**3.1.- Harina para pastificio.-** Es el producto definido como harina especial, elaborada a partir de trigos aptos para este fin, y de la misma forma que las demás puede ser tratada con mejoradores, productos málticos, fortificadas con vitaminas y minerales. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006).

**3.2.- Harina para galletas.-** Este tipo de harina tiene como característica que se elabora a partir de granos de trigo blandos y suaves y con otros trigos aptos para su elaboración, como las demás harinas puede ser tratada con mejoradores y fortificada con vitaminas y minerales. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006).

**4.- Harina para todo uso.-** Es el producto que se obtiene de la molienda y tamizado del endospermo del grano del trigo, hasta un grado de extracción determinado, considerando al restante como un subproducto (residuos de endospermo, salvado y germen), provenientes de granos de trigo Hard Red Spring o Norther Spring Hard Red Winter, trigos de otros orígenes u homólogos canadienses que sean aptos para la fabricación de pan, galletas, fideos, etc. Tratadas o no con blanqueadores y/o mejoradores, productos málticos, enzimas diastáticas, y fortificada con vitaminas y minerales. (**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**. 2006).

### **1.10.3.- AZÚCAR.**

El azúcar conocido químicamente como sacarosa es el elemento que se encuentra mucho en la naturaleza, especialmente en cereales, frutas, y en diversos elementos que constituye la alimentación humana. Para su consumo esta se obtiene en su mayoría de la caña de azúcar y de la remolacha, normalmente se adquiere en estado puro en forma de cristales blancos, pero se la puede adquirir en forma de azúcar limpio, que es una disolución acuosa.

**Tabla No 5.- ESPECIFICACIONES DE AZÚCAR BLANCO CRISTALIZADO.**

	Típico	Recomendación Códex	Directriz CCE
Perdida al secar (105grados C)	0,04% máx.	0,1% máx.	0,1%
Hierro	3 ppm máx.	--	--
Cobre	1,0 ppm máx.	2,0 ppm máx.	--
Plomo	5,0 ppm máx.	2,0 ppm máx.	--
Arsénico	1,0 ppm máx.	1,0 ppm máx.	--

• FUENTE: DUNCAN J. TECNOLOGIA DE LA INDUSTRIA GALLETERA.

#### **1.10.4.- GRASA.**

Para la investigación se utilizó aceite de girasol ya que presenta distintas propiedades como es ser gran fuente de ácido linoleico con lo cual tiene efecto preventivo de enfermedades coronarias y afecciones vasculares. **(BOTÁNICA DE LAS PLANTAS. BENEFICIOS DEL ACEITE DE GIRASOL. 2012)**

El aceite de girasol previene la aparición de arterioesclerosis, disminuye el colesterol LDL y aumenta el HDL, como tiene bajo contenido de grasa saturada se le atribuye otro efecto beneficioso más, ya que ayudará a disminuir los niveles de colesterol, por la acción conjunta de los ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados. **(BOTÁNICA DE LAS PLANTAS. BENEFICIOS DEL ACEITE DE GIRASOL. 2012)**

**TABLA No 9. VALOR NUTRICIONAL DE ACEITE DE GIRASOL.100g**

<b>Aporte por porción</b>	
Energía kcal	899.00
Proteína (g)	0.00
Grasa total (g)	99.90
Minerales	
Calcio (mg)	0.00
Hierro (mg)	0.03
Zinc (mg)	1.00
Yodo (mg)	1.00
Vitaminas	
Vit. B1 (mg)	1.00
Vit. B2 (mg)	1.00
Vit. A (ug)	4.30
Ácidos grasos	
Palmítico (g)	6.20
Esteárico (g)	4.30
Oleico (g)	20.20
Linoleico (g)	63.20

FUENTE: TABLAS DE COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS, ACEITES Y GRASAS. (2014)

### **1.10.5.- CACAO EN POLVO.**

El cacao en polvo (cocoa) es la porción del cacao que se encuentra desprovista de su manteca por medio de su reducción mediante el uso de prensas hidráulicas y disolventes alimentarios, hasta lograr una textura pulverizada. El cacao en polvo puede permanecer a una temperatura de conservación de 30 a 39 C. (BECKETT, S. 2008).

**TABLA NO 6. ESTADO NUTRICIONAL DE COCOA.**

<b>Información nutricional</b>	
Tamaño por porción <sup>3</sup> cucharaditas(15g)	
Energía (kcal(KJ) 55/230	
% Valor Diario	
Grasa total	0%
Grasa saturada	0%
Colesterol	0%
Sodio	0%
Carb. totales	4%
Proteína	2%
Vitamina A	10%
Vitamina C	10%
Calcio	10%
<b>Hierro</b>	<b>10%</b>
Vitamina D	10%

FUENTE: TABLA NUTRICIONAL COCOA LA UNIVERSAL.

## **6.- HUEVOS.**

Son aquellos que se presentan protegidos por una cáscara o porción no comestible, y dos partes aptas para el consumo humano que son la yema y clara, ricos en proteína que es considerada como un patrón de referencia para comparar nutricionalmente a las proteínas de los demás alimentos, ya que es la de más alto valor biológico, culturalmente constituyen un alimento habitual en la alimentación humana. Son de fácil digestión. Dentro de su aporte nutricional destaca la presencia de vitamina A, tiamina y hierro el cual se encuentra especialmente en la yema, haciéndolo apto para el consumo especialmente en niños y en mujeres embarazadas ya que otro de sus aportes nutricionales es la presencia de colina la

cual facilita el desarrollo del sistema nervioso central tanto del embrión como del feto.  
(INSTITUTO DE ESTUDIOS DEL HUEVO 2002)

**TABLA No 7. COMPOSICIÓN NUTRITIVA DEL HUEVO (62g)**

Composición genética		g
Sólidos		16.0
Proteína		7,75
Lípidos totales		7,13
Colesterol		0,27
Carbohidratos		0,43
Energía metabolizante		
Kcal		100
Kj		4,15
Aminoácidos		mg
Lisina		507
Treonina		394
Argina		520
Leucina		690
Tirosina		342
Minerales		mg.
Calcio		34
Fosforo		122.2
Sodio		85
Potasio		87
Cloro		113.5
Hierro		0.2
Cobre		0.25
Azufre		120
Vitaminas		
A		354
D		77.4
E		1.24
K		0.03
B1 mg.		0.06
B2 mg.		0.18
B6 mg		0.08
Ac. Fólico		0.024

### 1.10.7.- ZUMO DE FRUTA (MARACUYÁ)

El termino maracuyá se origina del vocablo indígena “mara-cuya” que quiere decir alimento servido en vaso, pertenece al género Passiflora las cuales habitan parte de América, Asia, y Australia. (MALAVOLTA, E. Nutrición y Fertilización de la Maracuyá.)

Este tipo de fruta es utilizado en la alimentación humana de dos formas como consumo directo del fruto y en jugos, se caracteriza por presentar su pulpa un color amarillo oro, sabor y aroma característicos y acidez neta. (MALAVOLTA, E. Nutrición y Fertilización de la Maracuyá.)

Su coloración se debe a que presenta carotenoides de color amarillo intenso y su aroma por la mezcla de 18 aceites volátiles. (MALAVOLTA, E. Nutrición y Fertilización de la Maracuyá.)

**TABLA No 8. VALOR NUTRICIONAL JUGO DE MARACUYÁ. (100mL)**

Componente	Amarilla
Calorías (cal)	53
Proteínas (g)	0.67
Grasa (g)	0.05
Carbohidratos (g)	13.72
Fibra (g)	0.17
Ceniza (g)	0.49
Calcio (mg)	3.80
Hierro (mg)	0.36
Vitamina A (mg)	2410
Ácido ascórbico	20

FUENTE: (SANTOS, 1980)

Presenta bajo contenido proteico, mientras que el ácido ascórbico, y la vitamina A son relativamente altos. (**MALAVOLTA, E.** Nutrición y Fertilización de la Maracuyá.)

El maracuyá crece durante todo el año, exige ciertas temperaturas particularmente con respecto a la temperatura que debe llegar hasta los 25 grados Centígrados. (**MALAVOLTA, E.** Nutrición y Fertilización de la Maracuyá.)

### **1.10.8.- ELABORACIÓN DE MINI CUPCAKES.**

El termino cupcake es literalmente español que quiere decir tarta en taza, los cual se caracterizan por ser una pequeña porción de pastel para una persona. (**CUPCAKE.**)

En la actualidad la elaboración de cupcakes ha crecido y evolucionado ya que existe en mercado distintos tipos de preparaciones, en la que destaca los sabores o rellenos de chocolate. Debido a su reducido tamaño se hornean mucho más rápido, el producto es muy llamativo y puede ser decorado.

Tradicionalmente se utiliza harina para biscocho o para pastelería que se caracteriza por tener menor cantidad de proteína y gluten ya que esto le da la consistencia ideal para obtener un cupcake de más suave y menos duro. (**EL MUNDO CUPCAKE SANTANDER**)

La fabricación se puede dividir en 4 cuatro fases.

- Se mezcla de manera homogénea los componentes para la formación de la masa.

- Se lleva cierta cantidad de masa a los moldes para cupcake (mini).
- Se hornea, dependiendo del tiempo, temperatura de 200 a 300°C (tiempo de cocción de 10 a 20 minutos).
- Como último paso se enfrían, y si se desea se puede empaquetarlos.

## **1.14.- DATOS ESTADÍSTICOS**

### **1.14.1.-Deficiencia de Hierro a nivel mundial, regional, y nacional**

La anemia por déficit de hierro forma el 90% de las anemias de la infancia, siendo en la mayoría de los casos moderada. El grupo más afectado por esta deficiencia son los escolares quienes se encuentran en un periodo de desarrollo y crecimiento. Si no se corrige dicha deficiencia esta produce anemia, la cual se asocia con alteraciones en el rendimiento escolar, antes mencionadas. (MORETA, V. CARDENA, E. 2013.)

La deficiencia de hierro constituye la carencia más común de todas las deficiencias nutricionales, tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo, es también la causa más frecuente de anemias. (MORETA, V. CARDENA, E. 2013.)

En todo el mundo se estima que casi 130 millones de personas sufren de anemia, cuyo origen principal es la deficiencia de hierro. Se ha estimado una prevalencia de anemia en escolares de 46% encontrándose la tasa más alta de anemia en escolares de África 52% y en el Sudoeste Asiático con un 63%. En España la prevalencia de anemia ferropénica se sitúa entre las más bajas llegando a ser inferior al 1%. (MORETA, V. CARDENA, E. 2013.)

En América Latina, el número estimado de niños con la enfermedad en la década de los ochenta del siglo pasado fue de 13.7 millones. En Venezuela los índices de anemia en escolares disminuyeron de 19 a 9.3 y en la república de Argentina se encontraron 47% casos en 1987. En Colombia se estima que la prevalencia en escolares y adolescentes de 5 a 14 años es de 21.8%, en los que los varones llevan un 34.3% y las niñas un 28.2% de este grupo de edad tienen anemia por deficiencia de hierro. Uno de los países sudamericanos según la OPS con mayor prevalencia de anemia es Perú con el 57%. Por otra parte en estudios realizados en el Altiplano Boliviano se encontró una prevalencia de anemia por déficit de hierro que varía entre el 22 al 70% en niños desde los 5 a 9 años de edad. (**MORETA, V. CARDENA, E.** 2013.) (**ZIEGLER, E. FILER, R.** 1996).

A escala nacional el 25.7% sufre de anemia por deficiencia de hierro, particularmente en menores de 1 año (62%), el problema se agrava en la población indígena (41.6%). (**FREIRE, W. y col.** 2013).

#### **1.14.2.- Anemia en Mujeres en Edad Reproductiva (12-49 años)**

A nivel nacional la prevalencia de anemia en edad reproductiva de mujeres entre 12 a 42 años es del 15%, existe una menor prevalencia de anemia en mujeres de 12 a 14 años del 4.8% a partir de los 15 años los niveles de anemia se triplican (14.8%) llegando al 18.9% en mujeres de 40 a 49 años. (**FREIRE, W. y col.** 2013)

#### **1.14.3.- Consumo Inadecuado de Hierro a Nivel Nacional**

La probabilidad de presentar un consumo inadecuado de hierro es de 70.5% a escala nacional, siendo este mayor en indígenas (74.7%). (**FREIRE, W. y col.** 2013)

## **1.12.- ANÁLISIS PROXIMAL Y/O BROMATOLÓGICO**

Se entiende por análisis proximal a la determinación conjunta de un grupo de sustancias que están estrechamente emparentadas. En la que comprende la determinación del contenido de proteína, agua, grasa (extracto eterio), fibra, cenizas, extracto libre no nitrogenado (ELN), el cual se determina por el cálculo restando la suma de estos cinco componentes de 100%, se suele usar los términos cruda y/o bruta detrás de proteína, fibra o grasa. (LUCERO, O. 2013)

Cualquier error en la determinación del analista puede arrojar un aumento a la cifra de las sustancias extraíbles no nitrogenadas. (LUCERO, O. 2013)

### **1.12.1.- DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

Determinar el contenido de humedad de los alimentos es de gran importancia, su determinación precisa es muy difícil. El agua presente en los alimentos se encuentra de dos formas como agua disponible o libre que es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y esta se puede perder con facilidad mediante evaporación o secado, mientras que el agua enlazada incluye moléculas de agua unidas en forma química a través de puentes de hidrógeno o grupos iónicos. (ESPIN, J. 2011.)

Existen varias razones para determinar el estado de humedad en los alimentos a diario en la industria alimentaria, los niveles máximos permitidos en distintos alimentos se suelen señalar en especificaciones comerciales, dentro de estas razones tenemos. (ESPIN, J. 2011.)

- El agua es considerado como el adulterante por excelencia para algunos alimentos como es el caso de la leche, la mantequilla, el queso, etc.
- El agua facilita la presencia de microorganismos, si está presente por encima de ciertos valores.
- La cantidad de agua puede afectar la textura del alimento por ejemplo en las carnes curadas.
- La determinación de humedad presente en el alimento es un vía sencilla para el control de la concentración en las distintas etapas de la fabricación de los alimentos. **(ESPIN, J. 2011.)**

### **1.12.2.- DETERMINACIÓN DE CENIZAS**

El concepto de cenizas o residuo de incineración se refiere al residuo que queda tras la incineración completa de los componentes orgánicos de un alimento en condiciones determinadas. **(ESPIN, J. 2011.)**

Determinar el contenido de cenizas de un alimento es importante ya que:

- Principalmente nos da el contenido de minerales presentes en el alimento.
- Permite dar a conocer adulteraciones en distintos alimentos en donde se pueden haber adicionado sal, talco, carbonatos alcalinos, etc, como conservadores auxiliares ilegales de la coagulación de la leche, quesos.
- Esta determinación establece el grado de limpieza de materias primas vegetales.
- Sirve para caracterizar y evaluar la calidad de alimentos. **(ESPIN, J. 2011.)**

### **1.12.3.- DETERMINACIÓN DE FIBRA**

La fibra cruda o también llamada bruta es la que representa la parte fibrosa e indigerible de los alimentos vegetales, constituida químicamente por compuestos poliméricos fibrosos carbohidratados. La fibra constituye a la textura dura, rígida y a la sensación de fibrosidad de los alimentos vegetales. (ESPIN, J. 2011.)

La AOAC define a la fibra bruta como la porción que se pierde tras la incineración del residuo seco obtenido después de la digestión ácido-alcalina de la muestra seca y desengrasada en condiciones específicas. (ESPIN, J. 2011.)

### **1.12.4.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA**

El contenido total de proteínas en los alimentos hasta hace poco se determinaba a partir del contenido de nitrógeno orgánico mediante el método de Kjeldahl. En la actualidad existen varios métodos tanto físicos y químicos, los cuales han sido automatizados. Pese a todo esto el método más confiable para la determinación de proteína en un alimento sigue siendo Kjeldahl. (ESPIN, J. 2011.)

### **1.12.5.-EXTRACTO ETÉREO**

Para la determinación de extracto eterio uno de los métodos más confiables es el método Soxhlet que utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en un alimento. (ESPIN, J. 2011.)

El extracto etéreo es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos, éstos proporcionan energía. Éstos influyen en la absorción de proteínas, de los productos grasos que se obtiene y de la cantidad de grasa que se deposita en el cuerpo. (ESPIN, J. 2011.)

#### **1.12.6.- EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO**

Es la cantidad presente en el alimento que eminentemente proporciona energía, son sustancias que producen calor y energía de movimiento. Esto lo componen los azúcares y en particular la fibra. (ESPIN, J. 2011.)

#### **1.12.7.-pH**

La determinación de pH junto con la humedad y acidez son las más frecuentes. El pH es el indicador fundamental para determinar el estado general del producto ya que este tiene influencia en múltiples procesos de alteración y estabilidad de los alimentos, y en la proliferación de microorganismos. (ESPIN, J. 2011.)

Su determinación puede ser colorimétrica mediante indicadores adecuados, para una mejor exactitud siempre se conduce a métodos eléctricos mediante el uso de pH-metros. (ESPIN, J. 2011)

### **1.12.8.- MÉTODO ESPETOMÉTRICO**

La determinación del contenido de iones metálicos totales, como calcio, hierro, cobre, magnesio y zinc se realiza mediante espectrofotometría de absorción atómica, tratado previamente a la muestra para reducir la materia orgánica y convertir el metal a su forma de metal más libre. (**SECCIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN. 2008**)

Este procedimiento se aplica a muestras de harinas o alimentos sólidos con bajo contenido graso. (**SECCIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN. 2008**)

### **1.13.- TEST DE ACEPTABILIDAD.**

La palabra sensorial se deriva del latín *sensus*, que quiere decir sentido El análisis sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales a través de los sentidos. Se usa para medir e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos que se perciben por los sentidos de la vista, el olfato, el oído, el gusto, el tacto. (**ANZALDÚA, A. 1982**)

El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo de acuerdo con diferentes pruebas. Existen tres tipos principales de pruebas:

- Prueba afectiva.
- Pruebas discriminativas
- Pruebas descriptivas. (**ANZALDÚA, A. 1982**)

### **1.13.1.- Pruebas afectivas.**

Son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si prefiere a otro, (Larmond, 1977). Estas pruebas son las más difíciles de interpretar a que se trata de apreciaciones completamente personales.

Para este tipo de prueba es necesario contar con un mínimo de 30 jueces no entrenados y deben ser potenciales compradores del tipo de alimento en cuestión. (ANZALDÚA, A. 1982)

Las pruebas afectivas a su vez se clasifican en tres tipos:

- Prueba de preferencia
- Prueba de medición del grado de satisfacción
- Prueba de aceptación. (ANZALDÚA, A. 1982)

#### **1.13.1.1.- Prueba de preferencia.**

En este tipo de prueba simplemente se desea conocer si los jueces prefieren una cierta muestra sobre otra. (ANZALDÚA, A. 1982)

La prueba consta de solicitarles a los jueces solo que decida cuál de los dos tipos de muestra prefiere. Es importante en este tipo de prueba incluir en el cuestionario una sección de comentarios por poder saber por qué escogió ese tipo de alimento en particular. (ANZALDÚA, A. 1982)

### **1.13.1.2.- Pruebas de medición del grado de satisfacción.**

Este tipo de prueba se realiza cuando se debe evaluar más de dos muestras a la vez. Estas son intentos para manejar más objetivamente datos tan subjetivos como son las respuestas de los jueces acerca de cuánto les gusta o les disgusta un alimento. (ANZALDÚA, A. 1982)

Para poder llevar a cabo estas pruebas se utiliza las escalas hedónicas. La palabra “hedónica” proviene del griego *egon* que significa placer. Por lo tanto las escalas hedónicas son instrumentos de medición de las sensaciones placenteras o pueden ser desagradables producidas por un alimento a quienes lo degustaran. (ANZALDÚA, A. 1982)

Las escalas hedónicas pueden ser verbales o gráficas y su elección depende de la edad de los jueces y del número de muestras a evaluar. (ANZALDÚA, A. 1982)

**a).- Escala hedónica verbales.-** son las que presenta a los jueces una descripción verbal de las sensaciones que produce la muestra y deben contener siempre un número impar de puntos y se debe incluir siempre un punto central “ni me gusta ni me disgusta”, a este punto se le asigna la calificación de cero. A los puntos de la escala por encima de este valor se le asigna valores numéricos positivos indicando que las muestras analizadas son agradables, en cambio a los puntos por debajo de este valor se les asigna valores negativos. Correspondiendo a calificaciones de disgusto. Este tipo de asignación tiene la ventaja de facilitar los cálculos y de reconocer al primer vistazo si una muestra es agradable o desagradable. (ANZALDÚA, A. 1982)

En la siguiente figura se muestra una escala hedónica de tres puntos que se puede usar cuando la prueba se aplique a la valuación de una o dos muestras. Es necesario utilizar escalas hedónicas de más puntos cuando se tiene más de dos muestras o cuando es muy probable que dos o más muestras sean agradables, así puede aplicarse escalas de cinco, siete, o nueve puntos. (ANZALDÚA, A. 1982)

ESCALA HEDÓNICA DE TRES PUNTOS	
Descripción	Valor
Me gusta	+1
Ni me gusta ni me disgusta	0
Me disgusta	-1

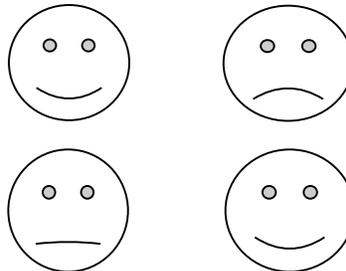
FUENTE: (Anzaldúa-Morales, 1984).

**FIGURA 1.- ESCALA HEDÓNICA DE TRES PUNTOS.**

**b).- Escala hedónica gráficas.-** esta prueba se da cuando hay dificultad para describir los puntos de una escala hedónica debido al tamaño de ésta, o cuando los jueces tienen limitaciones para comprender las diferencias entre los términos mencionados en la escala (En caso de que los jueces sean niños). (ANZALDÚA, A. 1982)

Un ejemplo de este tipo de escala es la denominada “escala de caritas” que puede aplicarse hasta trece puntos. (ANZALDÚA, A. 1982)

La desventaja de este tipo de escala es que en ocasiones no son tomadas en serio por los jueces, ya que les parece un tanto infantil. (ANZALDÚA, A. 1982)



**FIGURA N°2.- ESCALA HEDÓNICA GRÁFICA “ESCALA DE CARITAS”**

Al utilizar las escalas hedónicas, ya sea gráficas, o verbales, se logra objetivizar las respuestas de los jueces acerca de las sensaciones provocadas por un producto alimenticio (ANZALDÚA, A. 1982)

#### **1.13.1.3.- Prueba de aceptación.**

El deseo de una persona para adquirir un producto es lo que se llama aceptación, este depende de la impresión agradable o desagradable que el juez reciba al probar un alimento sino también de los aspectos culturales, hábitos, socioeconómicos, etc. (ANZALDÚA, A. 1982)

#### **1.14.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

El estudio microbiológico de acuerdo al número y tipo de microorganismos presentes en un alimento permite al investigador principalmente: (CANO, S. 2006.)

- Principalmente conocer a fuente de contaminación del producto mediante examen.
- Conocer y evaluar las condiciones higiénicas de trabajo en la que se preparan los alimentos.
- Detectar la posible presencia de flora patógena que causa problemas de salud en el consumidor.
- Delimita el periodo de conservación de un alimento. (CANO, S. 2006.)

### **1.14.1.- MOHOS Y LEVADURAS**

En los alimentos no ácidos que conservan humedad los Mohos y las levaduras crecen más lentamente que las bacterias, y por ello pocas veces determina problemas en dichos alimentos. (CANO, S. 2006.)

### **1.14.2.- ANÁLISIS DE COLIFORMES TOTALES**

Se encuentran en el intestino de hombre y de los animales, estos se usan como indicadores de contaminación fecal y su presencia podría indicar un estado sanitario poco satisfactorio. Los Coliformes son capaces de fermentar la lactosa como producción de gas su facilidad de cultivo y de determinación los hace casi ideales como identificador. (CANO, S. 2006)

Es recuento de Coliformes tiene sus limitaciones como indicador en ciertos alimentos como por ejemplo: (CANO, S. 2006.)

- En productos lácteos pueden reflejar el estado higiénico del establo y de la planta industrial, el mismo no es un indicador de contaminación fecal.
- En hortalizas congeladas y blanqueadas su presencia puede ser indicativo de que en el proceso puede existir algún problema.
- En derivados de aves de corral no son indicadores higiénicos apropiados. (CANO, S. 2006.)

### **1.14.3.- ANÁLISIS DE AEROBIOS MESOFILOS**

Este es el indicador más común de la calidad de los alimentos, su determinación sirve para:  
(CANO, S. 2006)

- Conocer las fuentes de contaminación del ambiente sea esta agua, aire, materia prima etc.
- Determinar el nivel de microorganismos presentes en el producto.
- Verificar la eficacia de los sistemas de limpieza y desinfección.
- Conocer si se inicia la alteración de los alimentos y su probable vida útil. (CANO, S. 2006)

### **1.14.4.- ANÁLISIS DE *SALMONELLA***

Su género pertenece a la familia de las enterobacterias y constituye un grupo muy complejo de microorganismos patógenos para el hombre los cuales pueden afectar también a diversos animales. (CANO, S. 2006)

Se puede determinar por características fenotípicas fáciles de ver (CANO, S. 2006)

## **CAPÍTULO II**

### **2.-PARTE EXPERIMENTAL.**

#### **2.1.- LUGAR DE REALIZACIÓN:**

La presente investigación se llevó a cabo en los siguientes lugares:

- Laboratorio de Procesos Industriales de la facultad de Ciencias de la ESPOCH.
- Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH.
- Servicios Analíticos Químicos y microbiológicos en Aguas y Alimentos “SAQMIC”.

#### **2.2.- MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.**

##### **2.2.1.- MATERIA PRIMA.**

- Harina de trigo fortificada.
- Harina de sangre de origen bovino.
- Huevos.
- Cocoa
- Azúcar.
- Aceite de girasol.

### **2.2.2- EQUIPOS.**

- Horno de cocina.
- Estufa(Memmert)
- Mufla (Memmert)
- Balanza analítica.(Scientech)
- Balanza de precisión(Shimadzu)
- pHmetro (Hanna)
- Autoclave
- Incubadora
- Cámara fotográfica (Samsung).
- Computador (Acer)
- Equipo Kjeldhal.
- Equipo Weende
- Espectrofotómetro (Helio)
- Digestor de fibra.
- Licuadora. (Ozter)
- Liofilizador
- Secador de bandejas.
- Batidora.
- Molino (corona).

### **2.2.3.- MATERIALES**

- Equipo de mini cupcakes: moldes para hornear, pirotines (papeles para hornear), recipientes varios.
- Fundas ziploc.
- Cernidor.

- Paletas.
- Crisoles de porcelana.
- Cápsula de porcelana.
- Cucharas.
- Buretas.
- Pipetas
- Probetas.
- Trípode.
- Embudo.
- Picetas.
- Varilla de agitación.
- Cuchara de dosificación.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.

#### **2.2.4- REACTIVOS.**

- Agua destilada.
- Ácido Sulfúrico.
- Hidróxido de Sodio.
- Ácido Bórico.
- Citrato de sodio.
- Indicador Macro Kjeldahl.
- Ácido Clorhídrico estandarizado 0.1N
- Sulfato de sodio.
- Acetona
- Ácido Bórico

### **2.2.5-MEDIOS DE CULTIVO.**

- Placas Petri flim para mohos y levaduras.
- Placas Petri flim para aerobios Mesófilos

### **2.3- TÉCNICAS.**

#### **2.3.1 ELABORACIÓN DE HARINA DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO (Anexo No 2.)**

- Sangre de origen bovino del centro de faenamiento “monterrey” Quero, Provincia de Tungurahua.
- Citrato de sodio 3g. por cada litro de sangre.
- Congelación de sangre.
- Liofilización. (cinco horas, 40-50 °C y 70 de presión.)
- Secar: secador de bandejas a gas (4 horas, 70°C).
- Moler, molino manual marca corona.

#### **2.3.2. ELABORACIÓN DE MINI CUPKAES A BASE SANGRE DE ORIGEN BOVINO.**

- Harina de trigo fortificada.175g
- Harina de sangre (5%, 10%,15%)
- Cocoa 50g

- Azúcar 70g.
- Aceite de girasol 15mL
- Huevos.2
- Zumo de fruta (maracuyá).30ml

### **2.3.2.2 PREPARACIÓN:**

- 1.- Alistar todos los ingredientes y el horno
- 2.- Mezclar los ingredientes en un bol.
- 3.- Colocar los pirotines en los moldes.
- 4.- Colocar la mezcla bien homogenizada en los pirotines.
- 5.- Hornear.
- 6.- Verificar su estado introduciendo un palillo seco en uno de los mini-cupcakes
- 7.- Sacarlos y dejarlos en reposo hasta que se enfríen.

### **2.4.- DATOS IMPORTANTES DE LA ELABORACIÓN.**

- Cocción de 10 a 20 minutos.
- Temperatura de horneado 220-230°C
- Rendimiento de la receta, 18 mini cupcakes de 9 g aproximadamente c/u.
- Variación de porcentaje:

175 g Harina trigo  $\longrightarrow$  100%

X g Harina sangre  $\longleftarrow$  5%

X g Harina de sangre = 8.75 g.

## 2.5.- CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA CONTIDAD DE HIERRO PRESENTE EN LA MUESTRA.

Para los cálculos de cantidad de hierro se utilizó la reacción de

$$C \times V$$

Hierro mg/Kg =  $\frac{\quad}{\quad}$

a

Dónde:

- C = concentración en g/mL obtenidos por la interpolación en la curva de calibración de la muestra.
- V = volumen de la muestra final.
- a = masa de la muestra en gramos.

## 2.6.- TEST DE ACEPTABILIDAD

### 2.6.1.- PRUEBA DE MEDICIÓN DEL GRADO DE SATISFACCIÓN, A ESCALA HEDÓNICA VERBAL, PARA LA ELECCIÓN DEL MINI CUPCAKE HECHO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO.

Se realizó el test de degustación (Anexo No. 1) en donde el Panel de degustación fueron 30 personas no entrenadas alumnos de la Escuela de Ingeniería Química de la ESPOCH, en

donde se les entrego a cada uno cuatro muestras de los mini cupcakes elaborados con las siguientes proporciones de harina de sangre, 0% o blanco, 5%, 10% y 15%, para verificar cuál era el más agradable para los jueces siendo los más aceptables el mini cupcake con grado de concentración del 0% y 10% de sangre de origen bovino en su formulación.

En donde se tuvo:

**Población:** 30 personas.

**Número de muestras por persona:** 4 (0%, 5%, 10%, 15%).

**Total de muestras:** 120 unidades de mini cupcake enriquecidas con hierro echo a base de sangre de origen bovino.

**Muestra 1:** 30 unidades de mini cupcakes sin contenido de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino. (0%).

**Muestra 2:** 30 unidades de mini cupcakes enriquecidas con 5% de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino.

**Muestra 3:** 30 unidades de mini cupcakes, enriquecidas con el 10% de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino.

**Muestra 4:** 30 unidades de mini cupcakes enriquecidos con el 16 % de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino.

## **2.7.- ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LOS MINI CUPCAKES**

### **2.7.1.- DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y MATERIA SECA.**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 265 (Anexo No. 3)

### **2.7.2.- DETERMINACIÓN DE CENIZAS**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 527 (Anexo No. 4)

### **2.7.3.- DETERMINACIÓN DE FIBRA**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 522 (Anexo No. 5)

### **2.7.4.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 519. (Anexo No. 6)

### **2.7.5.- DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 523. (Anexo No. 7)

### **2.7.6.- DETERMINACIÓN DE EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO (ELnN)**

Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrientes no evaluados en el análisis proximal, constituido principalmente por carbohidratos digeribles, debido a que se obtiene como resultante de restar de 100 los porcentajes calculado para cada nutriente.

$$\text{ELN} = 100 - \sum (\%H + \%C + \%F + \% \text{ExE} + \%P)$$

Donde:

%ELN = porcentaje de carbohidratos digeribles

%H = porcentaje de humedad.

%C = porcentaje de cenizas.

%F = porcentaje de fibra.

%ExE = porcentaje de extracto etéreo.

%P = porcentaje de proteína.

### **2.7.7.- DETERMINACIÓN DE pH.**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 389. (Anexo No. 8)

### **2.7.8.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL MINI CUPCAKE TESTIGO Y MINI CUPCAKE MÁS ACEPTABLE.**

#### **2.7.8.1.- DETERMINACIÓN DE HONGOS. (Mohos y levaduras).**

**MÉTODO DE RECuento: SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.**

- Añadir a cada placa 20 mL de Agar Sabouraud modificado fundido y enfriado a 45 – 50 °C al que le ha adicionado previamente el volumen necesario de la solución stock de cloranfenicol para obtener una concentración final de 40 ppm.
- Solución stock de cloranfenicol: disuelva 1 gramo de antibiótico en 100mL de agua destilada estéril, filtre a través de una membrana de 0.45 µm. Almacenar en la obscuridad a 4 – 8 °C. deseche luego de un mes.
- Secar la superficie de las placas en estufa a 50°C durante 30 minutos, sin tapa y con la superficie del agar hacia abajo.
- Preparar las muestras del alimento según lo indicado para la preparación y dilución de los homogenizados.
- Marcar 2 placas por dilución, tomar las correspondientes a las más altas y sembrar en cada una 1 mL de la disolución del respectivo tubo. Repetir esta operación con cada dilución hasta llegar a la más concentrada, usar siempre la misma pipeta, pero homogenizando 3 veces la dilución antes de sembrar cada placa. Sembrar mínimo 3 diluciones.
- Extender las alícuotas de 1 mL sobre la superficie del medio, tan pronto como sea posible. Dejar secar las superficies de las placas 15 minutos.
- Sellar las planas con parafilm, incubarlas en posición normal a 20 – 24 °C durante 3 – 5 días. O a temperatura ambiente durante 5 – 7 días. No mueva las placas.  
(GALLEGOS, J. 2003)

**Cálculos:**

$$C = n \times f$$

Dónde:

C = unidades propagadoras de colonias de hongos por g ó mL de producto.

n = número de colonias contadas en la placa

10 = factor para convertir el inóculo a 1 mL.

f = factor de dilución.

### **2.7.8.2.- DETERMINACIÓN DE AEROBIOS MESÓFILOS, Y COLIFORMES TOTALES.**

#### **MÉTODO DE RECUENTO: SIEMBRA POR VERTIDO EN PLACA.**

- Pesar la muestra y preparar las diluciones como lo establece la técnica de “Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico”.
- Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.
- Inocular por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Agregar de 18 a 20 mL del medio fundido y mantenido a 45 °C. Para homogenizar, mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.
- Incubar las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según el tipo de alimento. (GALLEGOS, J. 2003)

**Cálculos:**

$$C = n \times f$$

Dónde:

C = unidades propagadoras de colonias de hongos por g ó mL de producto.

n = número de colonias contadas en la placa

10 = factor para convertir el inóculo a 1 mL.

f = factor de dilución. (29)

**2.7.8.3.- DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA*.**

Se ha determinado mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15. (Anexo No. 9)

**2.7.9.- DETERMINACIÓN DE CANTIDAD DE HIERRO.**

**MÉTODO ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA/LLAMA**

- Homogeneizar la muestra y pesar + 3 g de la muestra en cápsula de porcelana.
- Tapar la cápsula con vidrio reloj.
- Colocar y precalcinar en la placa calefactora a una temperatura inicial de + 100°C
- Luego incrementar la T° a 250°C, hasta que la muestra se encuentre carbonizada.
- Llevar la cápsula con la muestra precalcinada a la mufla y someterla por 8 horas a T°550°C hasta cenizas blancas.

- Retirar de la mufla, enfriar y agregar 5 mL de ácido clorhídrico 1+1 a la cápsula con cenizas blancas y poner en baño María hasta casi sequedad.
- Luego redissolver el residuo con 5mL de ácido clorhídrico 1+1 y dejar 5 min., enseguida adicionar agua desionizada, enfriar y aforar a 50 mL.
- La solución de la muestra está lista para medir. (**SECCIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN. 2008**)

### 2.7.9.1- Cuantificación de Hierro en muestras

Ingresar al equipo de Absorción Atómica en método Hierro en harinas que contiene la curva de calibración obtenida de concentración (C) en ug/mL, calcular el coeficiente de correlación lineal e intercepto e interpolar la muestra para cuantificar el resultado de la absorbancia vs concentración. Valor C (ug/mL). (**SECCIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN. 2008**)

Leer en triplicado cada muestra y cada punto de los estándares y promediar las lecturas

#### Cálculo e informe de resultados

$$\text{Hierro mg /Kg} = \frac{\mathbf{c} \times \mathbf{v}}{\mathbf{a}}$$

Dónde:

**c** = concentración en ug/mL obtenidos por la interpolación en la curva de calibración de la muestra.

**v** = volumen de la muestra final

**a** = masa de la muestra en gramos. (27)

#### **2.7.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizaron gráficos y análisis estadísticos para los datos concernientes al análisis Bromatológico, Microbiológico, Concentración de hierro presente en los mini cupcakes escogidos por el test de Degustación. Mediante los cuales se lograron establecer los resultados de este proyecto.

## **CAPÍTULO III**

### **3.- RESULTADOS.**

#### **3.1.- PRUEBAS DE DEGUSTACIÓN.**

El ensayo de degustación (Anexo No. 1) se realizó para comprobar la aceptación de una de las concentraciones de los mini cupcakes pudiendo ser este el 0%, 5%, 10%, 15% de concentración de hierro proveniente de la harina de sangre de origen bovino. Para lo que se tuvo 30 jueces no entrenados, quienes se inclinaron por dos preferencias 0%, y 10%. Teniendo como base a las dos para todos los análisis de la investigación.

#### **3.1.2.- TABULACIÓN DEL TEST DE DEGUSTACIÓN.**

Se realizó la siguiente prueba para encontrar al mini cupcakes más aceptable escogido por el panel de degustación. (Anexo No. 1)

##### **3.1.2.1.- PRUEBA DE MEDICIÓN DEL GRADO DE SATISFACCIÓN, A ESCALA HEDÓNICA VERBAL, PARA LA ELECCIÓN DEL MINI CUPCAKE HECHO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO.**

En donde se tuvo:

**Población:** 30 personas.

**Número de muestras por persona:** 4 (0%, 5%, 10%, 15%).

**Total de muestras:** 120 unidades de mini cupcake enriquecidas con hierro hecho a base de sangre de origen bovino.

**Muestra 1:** 30 unidades de mini cupcakes sin contenido de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino. (0%).

**Muestra 2:** 30 unidades de mini cupcakes enriquecidas con 5% de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino.

**Muestra 3:** 30 unidades de mini cupcakes, enriquecidas con el 10% de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino.

**Muestra 4:** 30 unidades de mini cupcakes enriquecidos con el 16 % de hierro proveniente de harina de sangre de origen bovino.

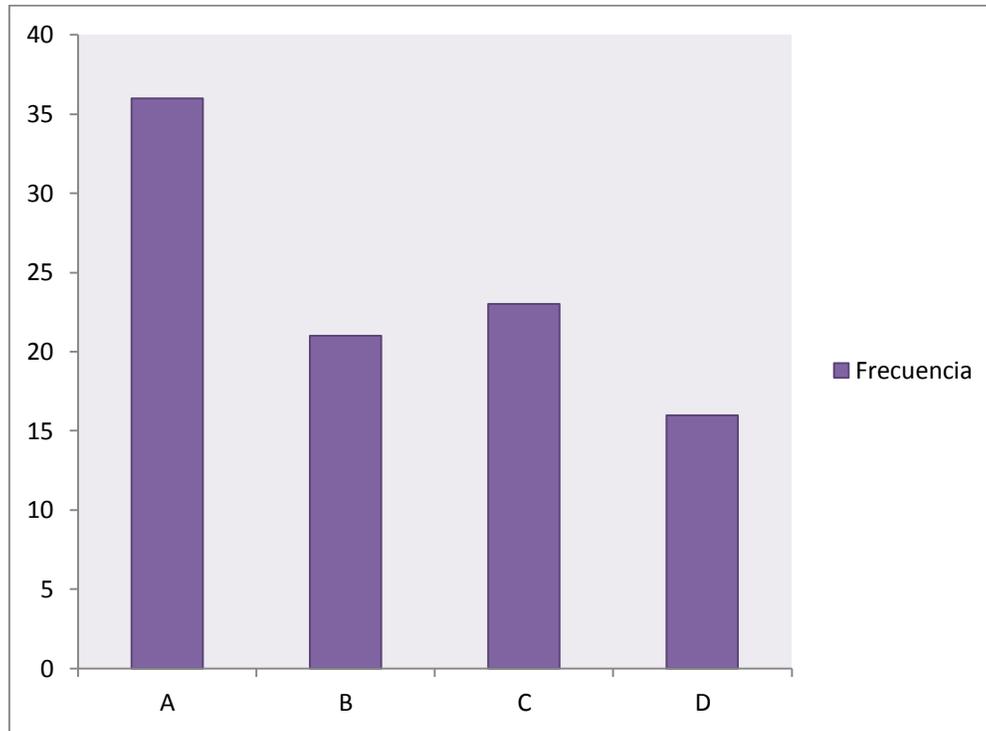
### 3.1.2.1.1 RESULTADOS Y GRÁFICOS DE LA PRUEBA PARA LA ELECCIÓN DEL MINI CUPCAKES HECHO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO.

Después de haber realizado la prueba de degustación, en la que se hace una descripción verbal de la sensación que produce las muestras, según los datos recopilados se aplicó un análisis estadístico chí cuadrado, en la que se determinó que el mini cupcake C con porcentaje de harina de sangre del 10% fue el más aceptable para los jueces.

**CUADRO No 1. PRUEBA PARA LA ELECCIÓN DEL MINI CUPCAKES HECHO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO**

Frecuencia		Chi cuadrado	
A	36	6,00	
B	21	0,38	
C	23	0,04	Acepta la Hipótesis nula
D	16	2,67	
PROMEDIO	24	9,08 *	Acepta la hipótesis Alternativa
Chi cuadrado 0,05		7,81	
Chi cuadrado 0,01		11,3	

**GRÁFICO N°1.- PARA LA ELECCIÓN DEL MINI CUPCAKES HECHO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO, SEGÚN LA FRECUENCIA.**

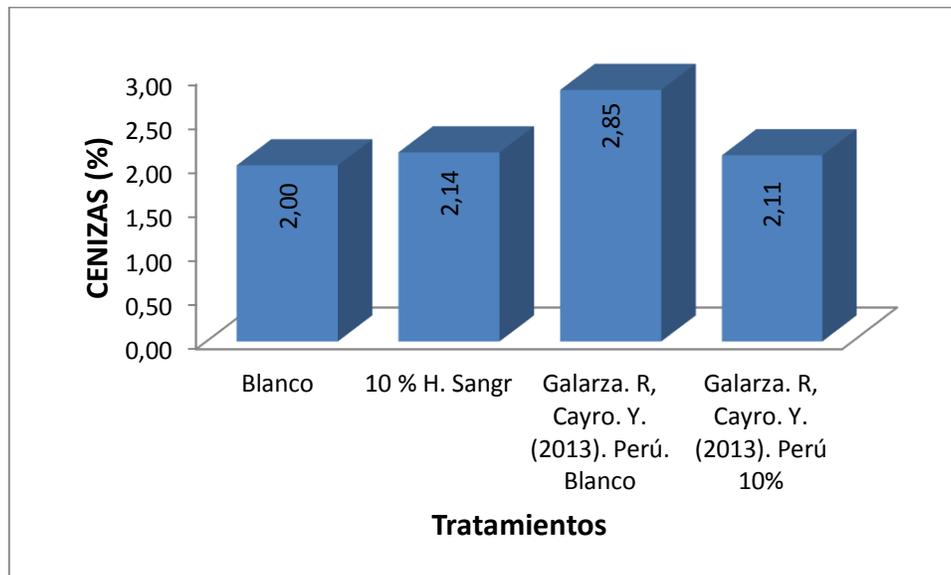


Se puede observar que en el gráfico correspondiente a la elección del alimento, el que tuvo mayor grado de satisfacción según el criterio de los jueces fue la opción A correspondiente al 0% o blanco de análisis, el segundo más aceptado fue la opción C que corresponde al 10% de harina de sangre añadida a la formulación de los mini cupcakes, el tercero más aceptable fue el mini cup cake B al que corresponde un 5% de harina de sangre, y el cuarto lugar la opción D, el cual tenía un 15% de harina de sangre en su formulación. Según esta determinación los análisis tanto, Bromatológico, Microbiológico, cantidad de hierro presente, se realizarán en el tratamiento A (0%), que servirá de blanco, y el tratamiento C (10%), que servirá para comparaciones.

### 3.2.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE MINI CUPCAKES HECHOS A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO, POR EL MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN Y SECADOR DE BANDEJAS, CON GALARZA.R., CAYRO. Y DE PERÚ.

#### 3.2.1.- ANÁLISIS DE CENIZAS.

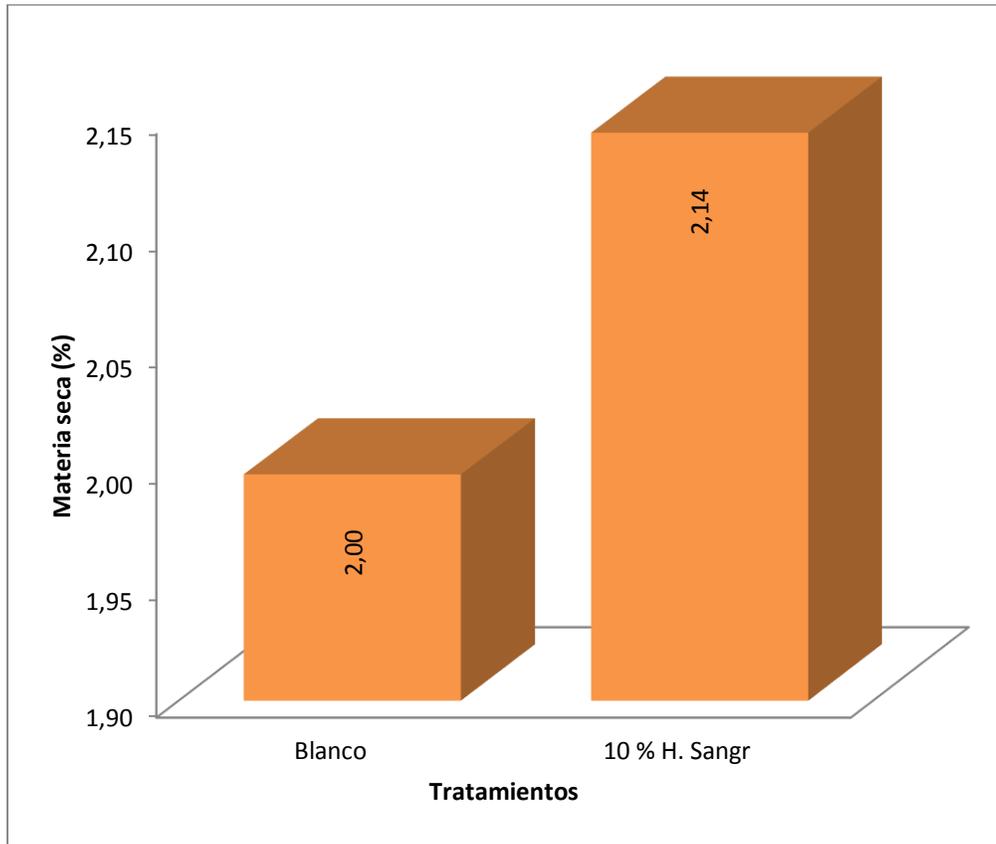
GRÁFICO No 2.- RESULTADO DE MATERIA SECA, DE MINI CUPCAKES BLANCO, 10%, Y COMPARACIÓN CON BLANCO Y 10% DE PERÚ



Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), quienes también realizaron un análisis de cenizas en un alimento (galletas) fortificadas con un % de harina de sangre secada por el método de atomización, del 0, y 10 % en el que se observa al hacer una comparación que la cantidad de cenizas del su alimento con respecto a los mini cupcakes es mayor, esto puede deberse a la composición del alimento (galletas), ya que en su formulación existen componentes que pueden aportar mayor porcentaje de minerales a su alimento, se puede decir que existe un

nivel de significancia entre los dos, y que los resultados del análisis de ceniza de los mini cupcakes son satisfactorios.

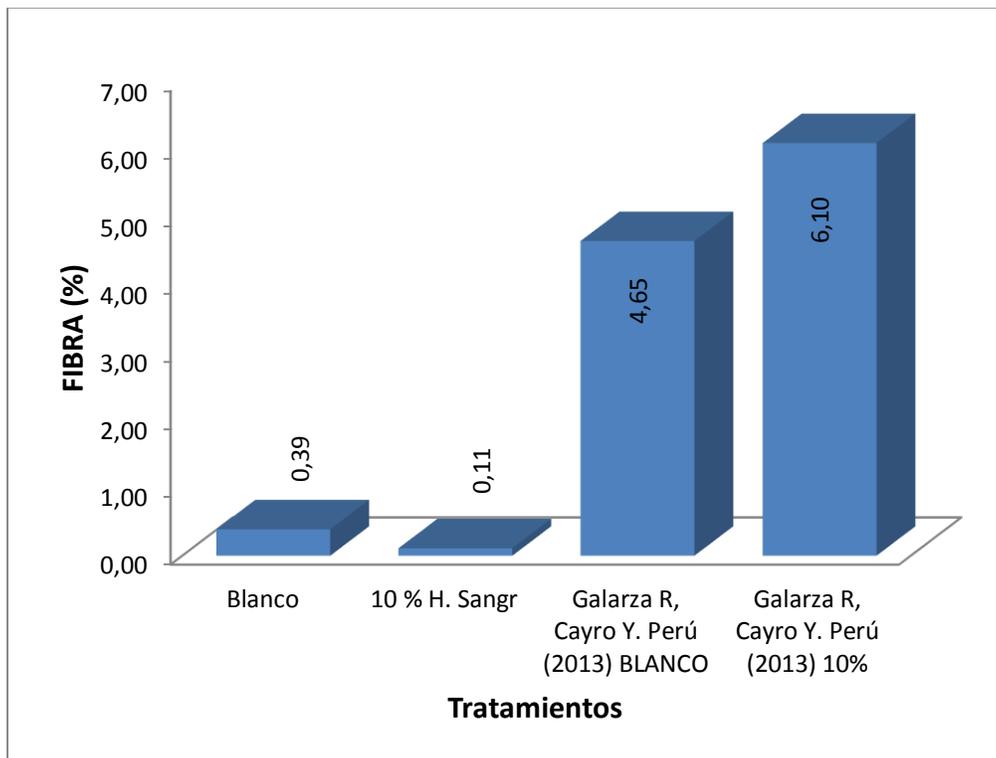
**GRÁFICO No 3.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MATERIA SECA, DE MINICUP CAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE.**



Estos valores están dentro del nivel de significancia del 95.5% con 2 grados de libertad, los cuales son estadísticamente semejantes, aplicando test de student, con los siguientes valores de blanco 2g/mg y 2,14g/mg para ensayo del mini cup cakes con el 10% de harina de sangre.

### 3.2.2.- ANÁLISIS DE FIBRA.

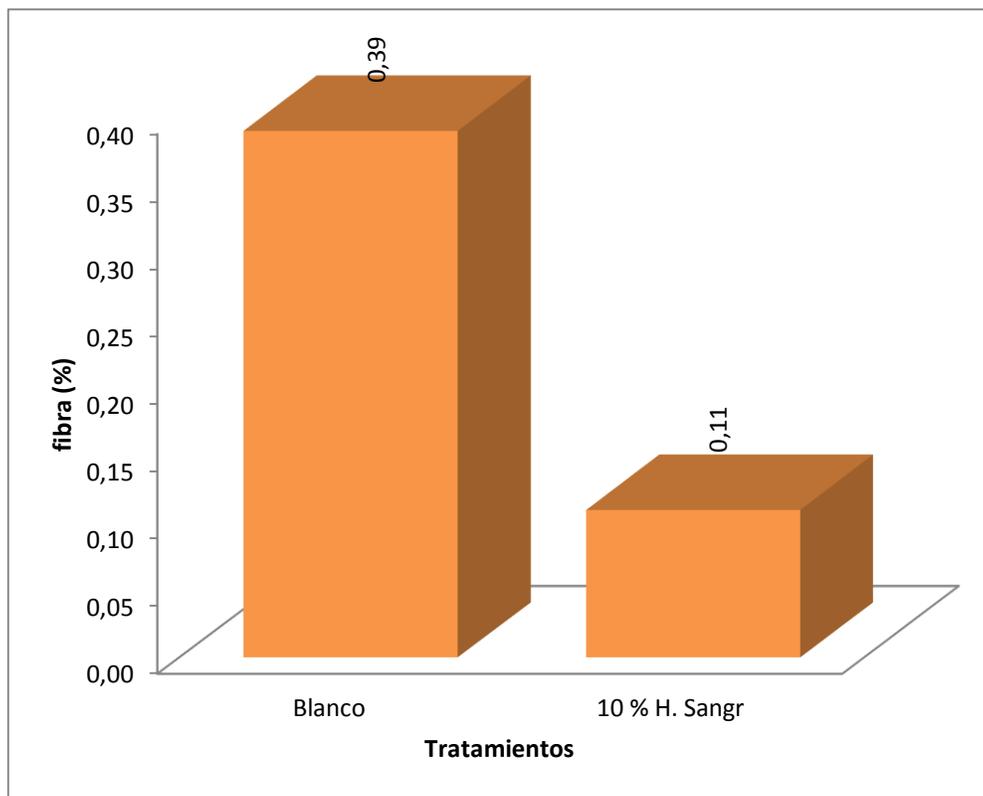
**GRÁFICO No 4.- RESULTADO DE FIBRA DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



Galarza. R, Cayro. Y. (2013), quienes también realizaron un análisis de Fibra, en su determinación, como se muestra en el gráfico número 3 obtuvieron porcentajes elevados con respecto a los mini cupcakes debido a que en la formulación de los mismos no existe gran cantidad de aporte de ingredientes que tengan en su composición alto contenido en fibra, como en la formulación de la galleta que en su composición tiene como materia prima granos de trigo, arroz partido, grits de maíz, entre otros que podrían estar elevando el contenido de fibra en su alimento. Se puede decir que de la misma manera, existe un nivel de significancia

entre los dos, y que los resultados del análisis de fibra de los mini cupcakes son satisfactorios, pese a tener valores bajos en su determinación.

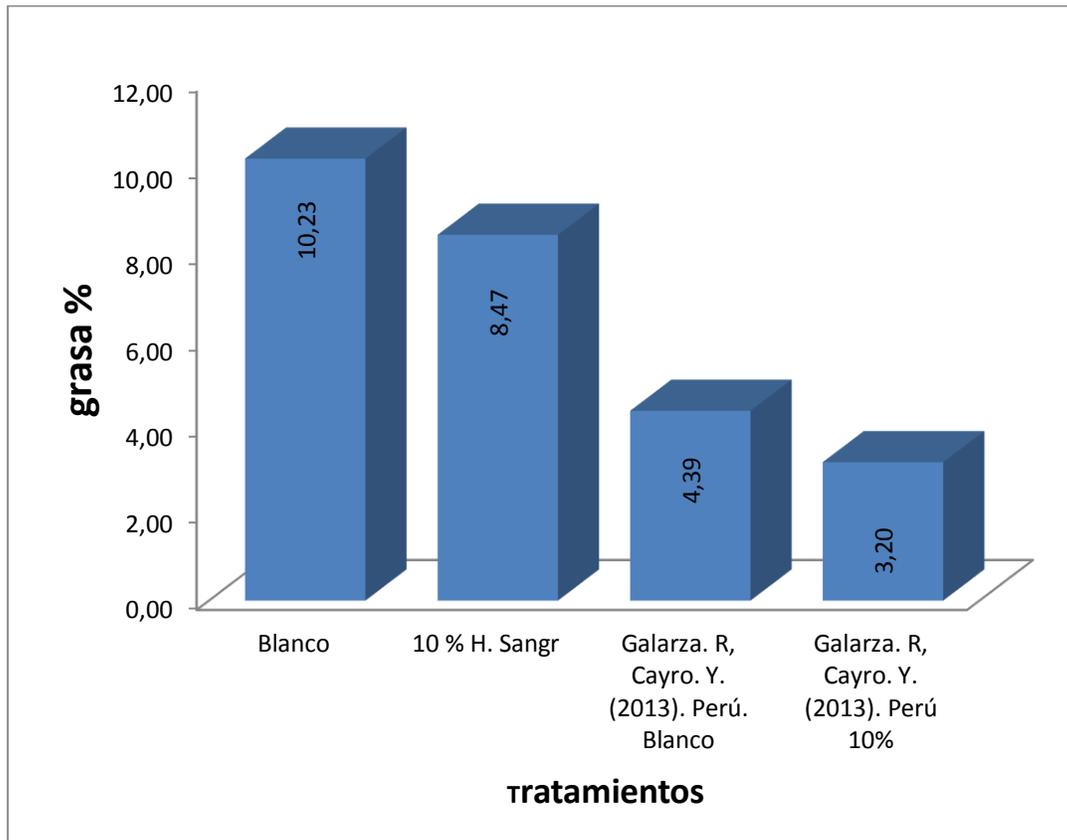
**GRÁFICO No 5.- RESULTADO DE FIBRA DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE.**



Tomando en consideración los datos de fibra de la muestra experimental y blanco se puede decir que con el análisis de test de student son estadísticamente diferentes a nivel de 95.5% de confiabilidad (blanco 0.39%, 10% harina de sangre 0.11%)

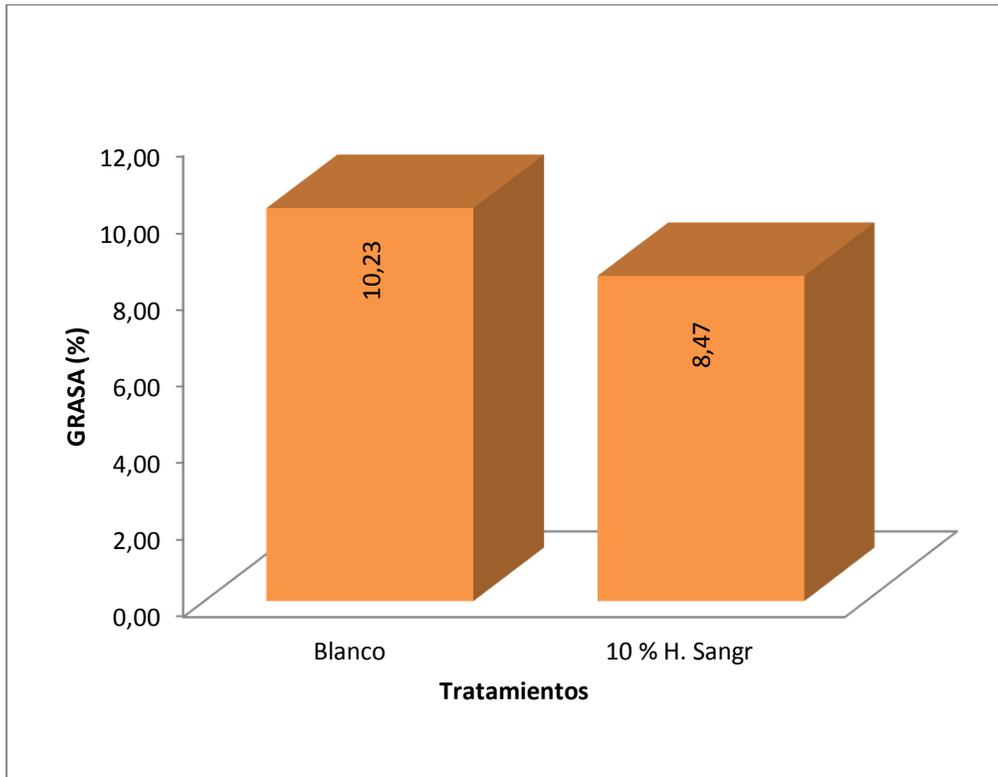
### 3.2.3.- ANÁLISIS DE GRASA.

**GRÁFICO No 6.- RESULTADO DE GRASA DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



Como muestra en el gráfico N°4 se puede ver que en la comparación de las mismas las muestras pertenecientes al blanco (0%) y 10% de los mini cupcakes muestra mayor porcentaje en cuanto a su contenido de grasa, con respecto a los análisis pertenecientes a Galarza. R, Cayro. Y. (2013), quienes en su formulación no especifican que tipo de grasa se usó en su formulación, para obtener sus resultados obtenidos. Pese a esto se puede decir que si existe un nivel de significancia entre los dos y que la cantidad de grasa obtenidos en la investigación son significativos por la calidad de la misma.

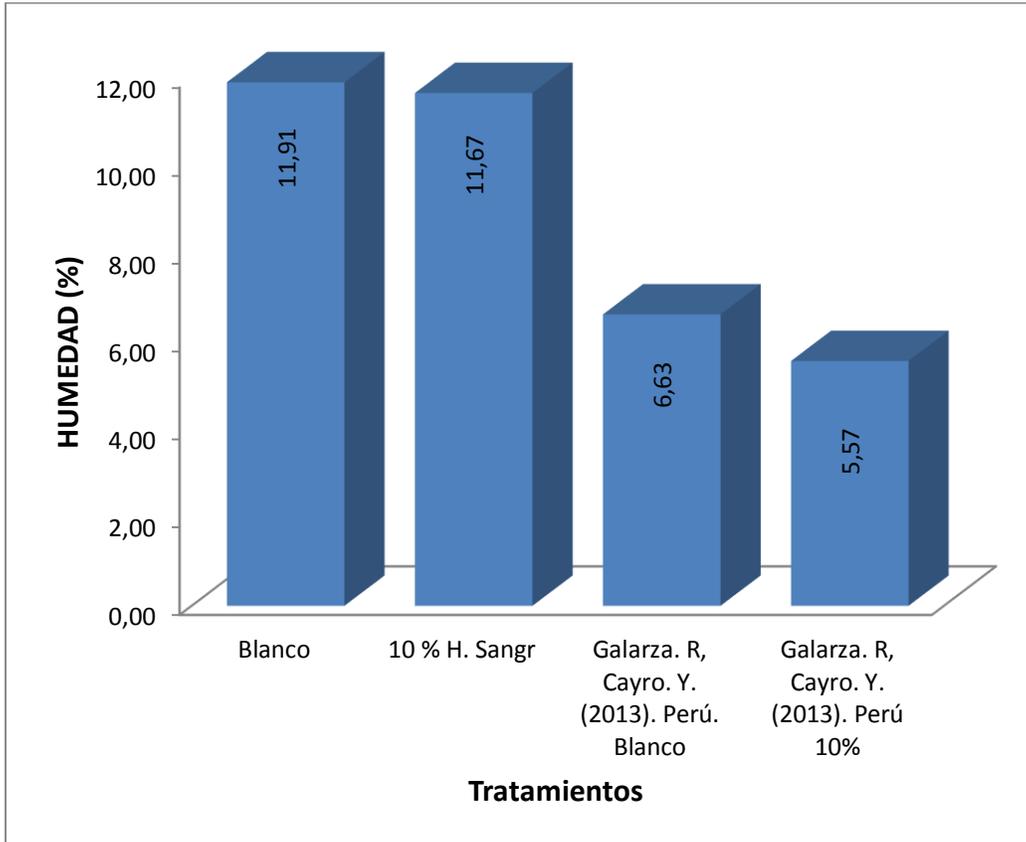
**GRÁFICO N°7.- RESULTADO DE GRASA DE MINI CUPCAKES COMPARANDO EL BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE**



Tomando en consideración los datos de proteína de la muestra experimental y blanco se puede decir que con el análisis de test de student son estadísticamente diferentes a nivel de 95.5% de confiabilidad.

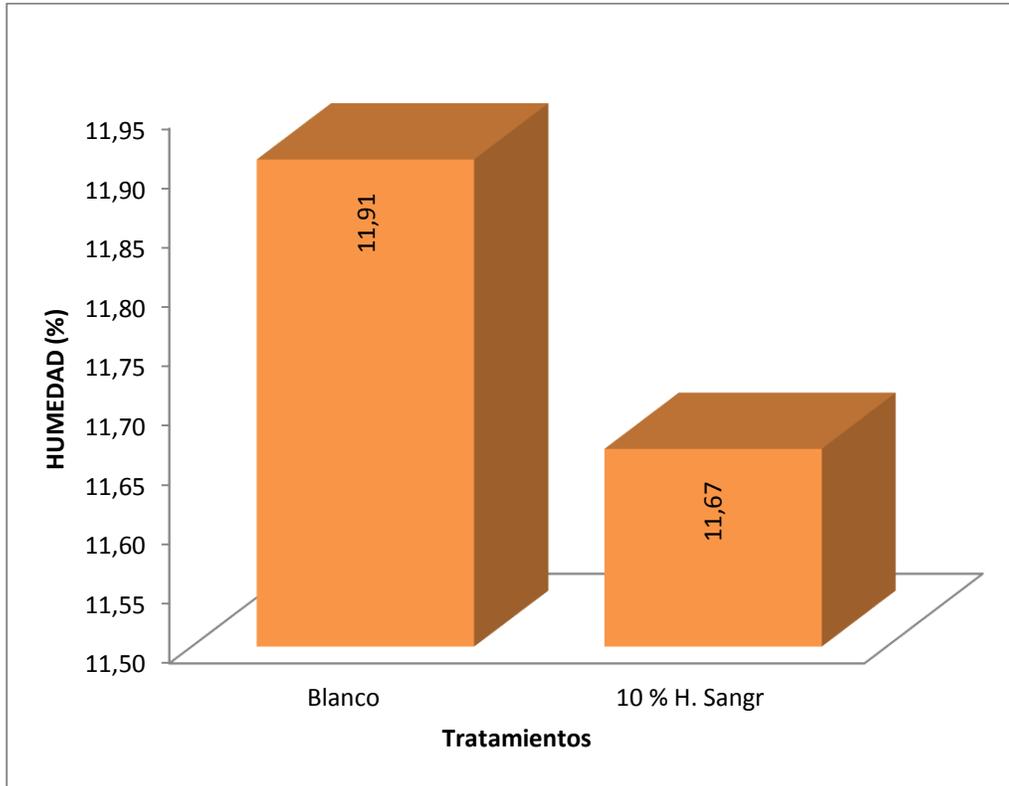
### 3.2.4.- ANÁLISIS DE HUMEDAD.

**GRÁFICO No 8.- RESULTADO DE HUMEDAD %. DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), quienes también realizaron análisis con respecto a la humedad de su alimento, muestran valores menores que los obtenidos en la investigación para el porcentaje del blanco (0%) se obtuvo un 11.91% y en el nivel de fortificación del 10% se obtuvo un 11.67%, puede deberse a la característica del alimento ya que el realizado por Galarza R, Cayro Y. (2013), del Perú es una galleta y en esta investigación se realizó con un mini cupcake el mismo que tiene como característica su esponjosidad, motivo por el que puede abarcar más contenido de humedad, al contrario de la galleta que tiene una textura más crujiente y dura.

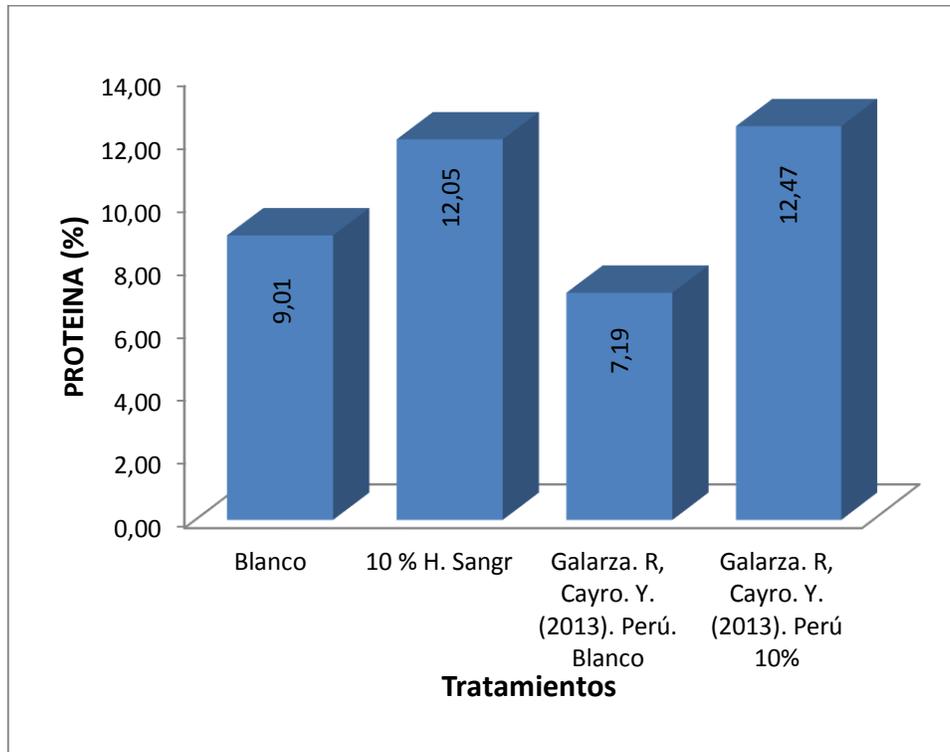
**GRÁFICO No 9.- RESULTADO DE HUMEDAD DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE**



Tomando en cuenta los valores de humedad con un nivel de significancia del 95,5% se puede decir que los valores de humedad tanto del blanco como de 10% de harina son estadísticamente iguales mediante el análisis de test de student

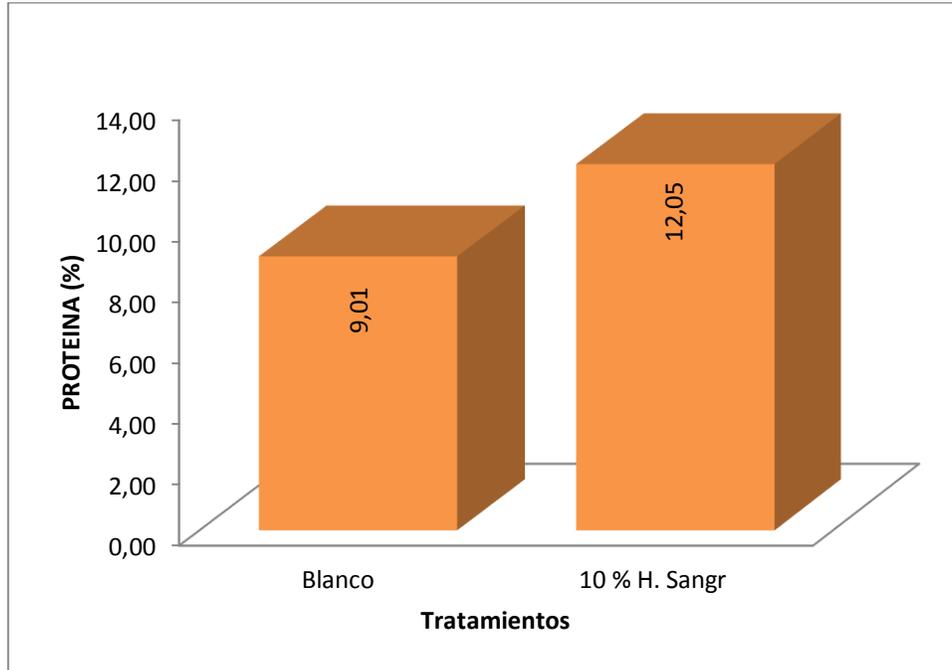
### 3.2.5.- ANÁLISIS DE PROTEÍNA.

**GRÁFICO N°10.- RESULTADO DE PROTEÍNA %. DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



De la misma forma Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), realizaron su análisis de contenido de proteína para su alimento en los que obtuvieron una concentración para su blanco o testigo del 7.19% y de la misma forma para su producto con el 10% de contenido de fortificación con un resultado del 12.47% , que en comparación con los recopilados en esta investigación arrojó valores casi semejantes, como para el blanco (0%) del 9.01% y 12.05% respectivamente, de la misma manera existe un nivel de significancia entre las dos comparaciones, y los resultados obtenidos van acorde a lo esperado para la investigación.

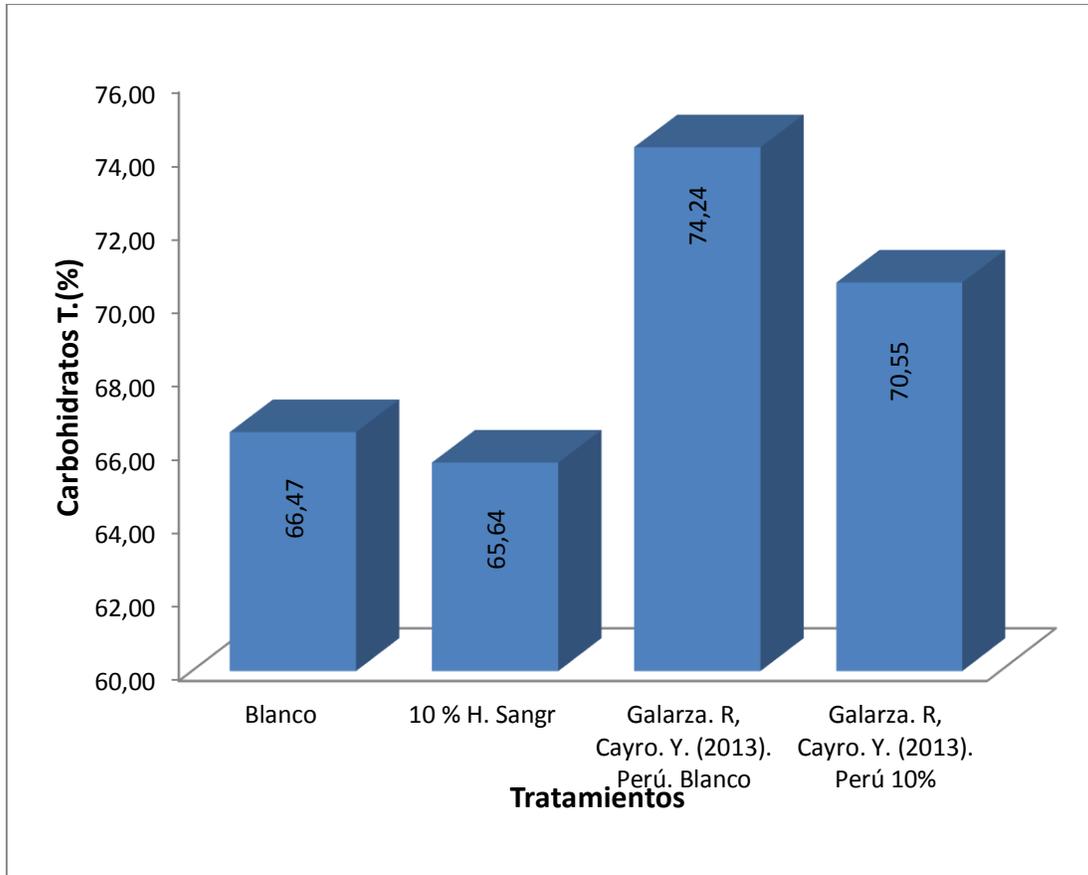
**GRÁFICO No 11.- RESULTADO DE PROTEÍNA DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE**



Tomando en cuenta los valores de proteína tanto del blanco como del 10% de harina sangre se puede decir que son estadísticamente diferentes, con nivel de confiabilidad del 95,5%, mediante el análisis de test de student. Se ve que el alimento experimental tiene un valor agregado que su valor es significativo.

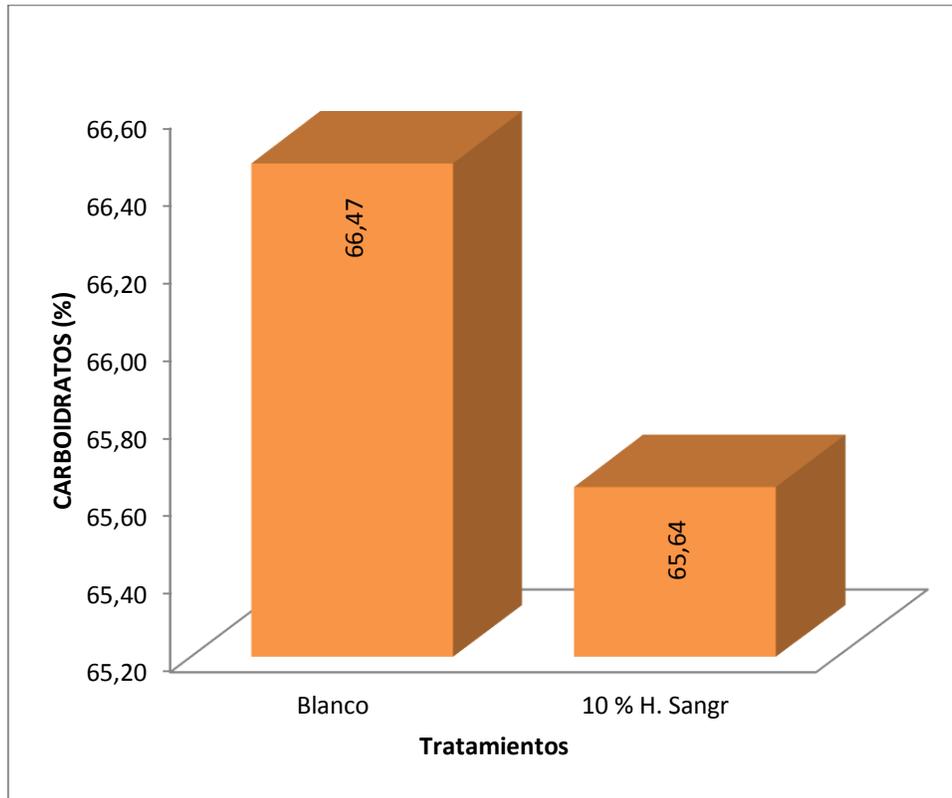
### 3.2.6.- ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS TOTALES.

**GRÁFICO N°12.- RESULTADO DE CARBOHIDRATOS TOTALES. g/100g . DE MINI CUP CAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



En el gráfico N° 7 perteneciente a los valores obtenidos en cuanto a carbohidratos se puede observar que los valores recopilados del alimento de esta investigación tienen menor porcentaje en comparación a los de Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), siendo estos del 66.47% para el blanco o testigo (0%), y 65,64% para el alimento fortificado con el 10% en su formulación.

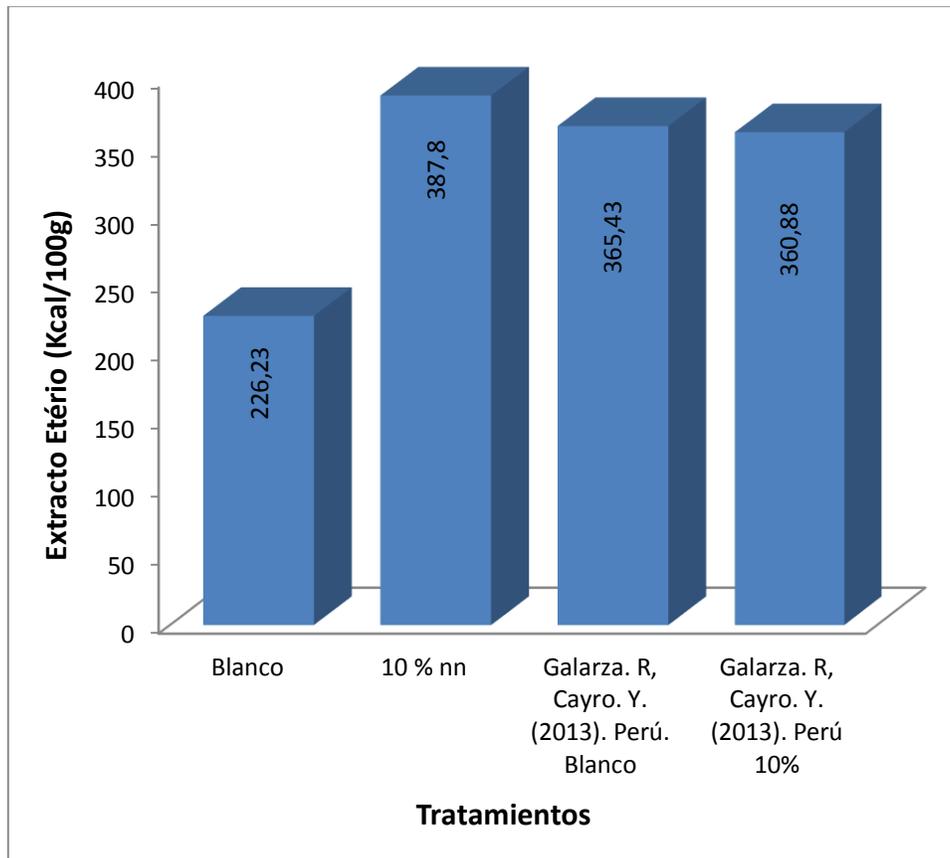
**GRÁFICO N°13.- RESULTADO DE EXTRACTO LIBRE NO NITROGENADO DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE**



En la comparación de Extracto Libre no Nitrogenado tanto del blanco como del experimental o 10% de harina de sangre se ve que disminuye en 1% con respecto al blanco, puede deberse a que el blanco su formulación tiene la totalidad de harina de trigo lo que le da mayor cantidad de extracto etéreo.

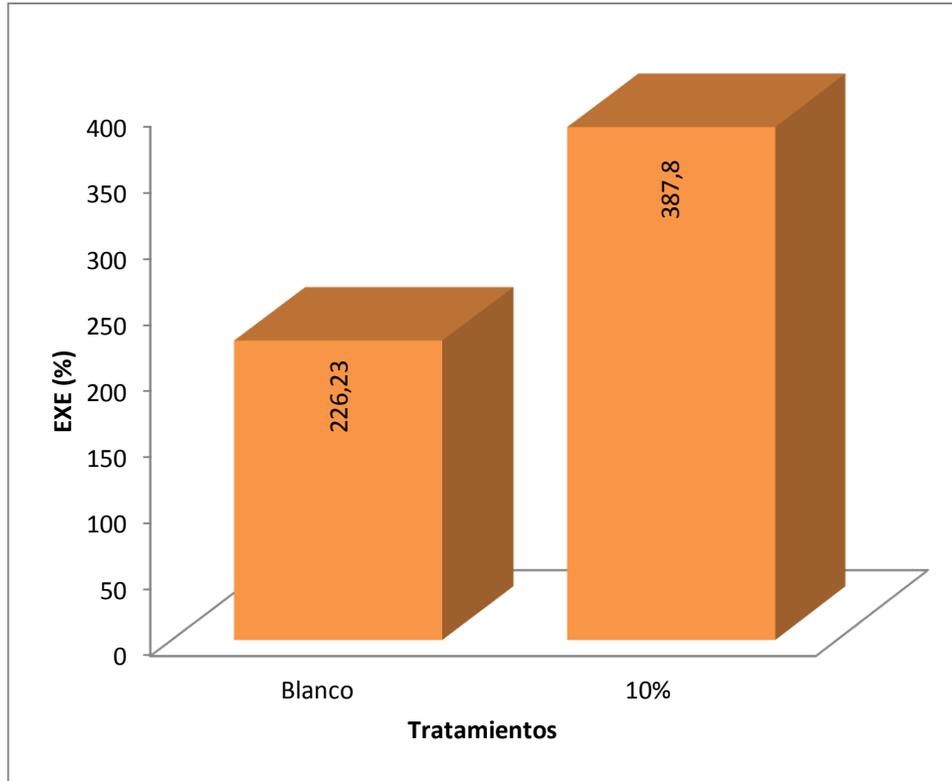
### 3.2.7.- ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS TOTALES

**GRÁFICO No 14.- RESULTADO DE CARBOHIDRATOS TOTALES Kcal/100g DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



Se puede observar que la comparación de los carbohidratos totales de las dos muestras se ve que en el caso del blanco con respecto a Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), tiene mayor porcentaje ya que su alimento obtuvo 365,43 Kcal/100g con respecto a 226.23 Kcal/100g correspondientes a los mini cupcakes de la investigación, de la misma manera obtuvieron para el 10% de fortificación 360.88 kcal/100g, y 387.8 Kcal/100g pertenecientes a la fortificación con un 10% para los mini cupcakes.

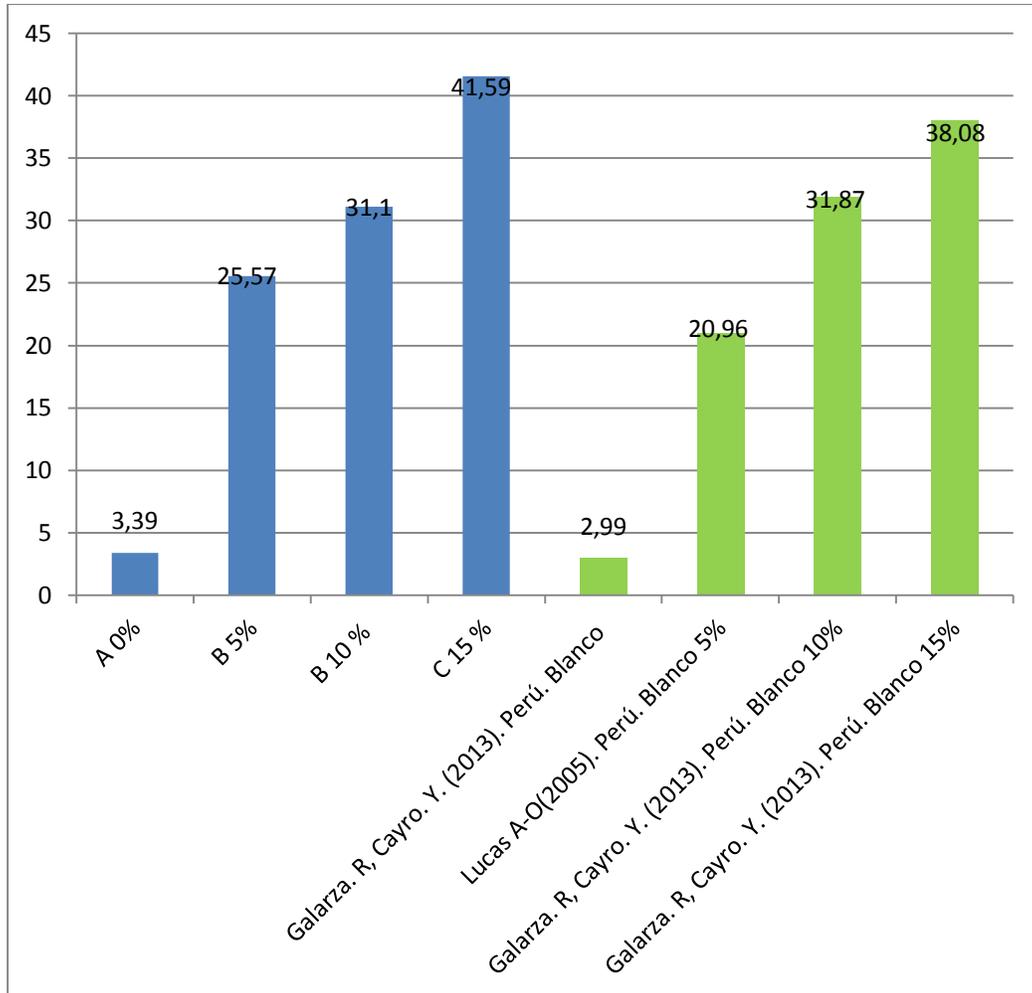
**GRÁFICO No 15.- RESULTADO DE CARBOHIDRATOS TOTALES DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE**



Se ve claramente que el producto de experimentación 10% de Harina de sangre con respecto al blanco es significativamente mayor debiéndose al valor agregado que se le da al mismo.

### 3.3.- ANÁLISIS DE CANTIDAD DE HIERRO PRESENTE EN CADA MUESTRA.

**GRÁFICO No 16.- RESULTADO DE CANTIDAD DE HIERRO. mg/kg DE MINI CUPCAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE, CON RESPECTO A LOS VALORES OBTENIDOS EN PERÚ.**



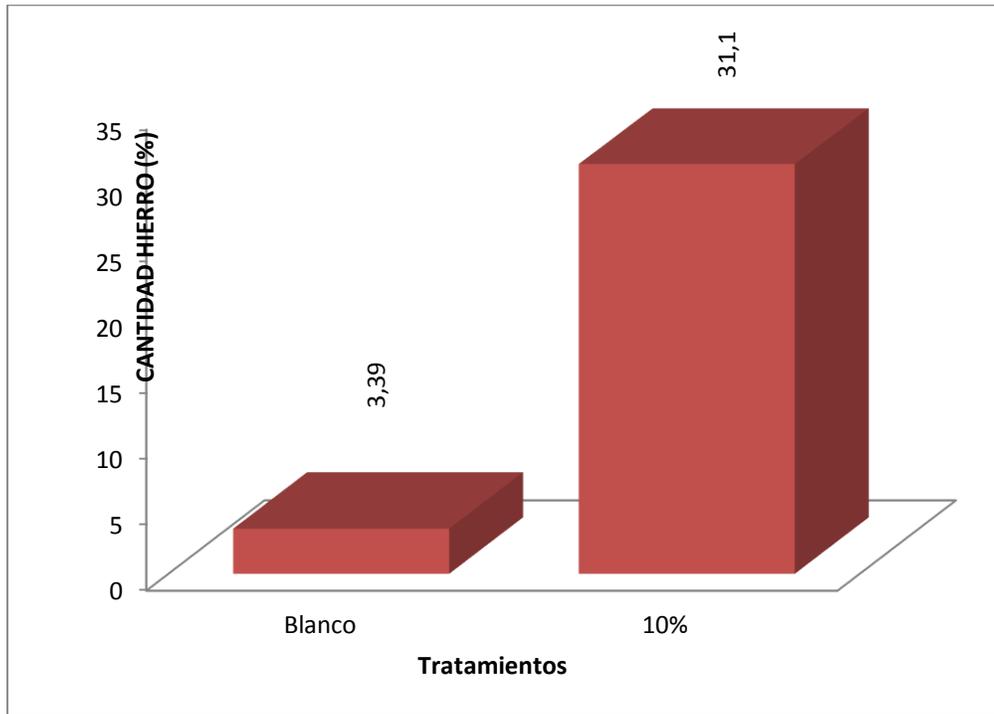
Los datos que se muestran en el gráfico N° 16 muestran la cantidad de hierro presente en los dos tipos de alimentos tanto las galletas como en los mini cupcakes. El propuesto por Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), quienes elaboraron tres concentraciones 0%,10% y 15%, en cuanto a cantidad de hierro, razón por la que también se hace mención a Lucas A-O quien también

utilizó sangre secada por atomización al igual que los dos investigadores anteriores, realizando otro nivel de fortificación del 5% en su análisis en los que obtienen 2.99%, 20.96%, 38.08%, y 20.96% respectivamente. En comparación con resultados en cuanto a contenido de hierro presente en el alimento investigado fue de 3.39%, correspondiente al blanco o testigo de la investigación, 31.1%, 41,59%, y 25.57% respectivamente, en la que sí existe correlación con un nivel de significancia del 0.05.

Los porcentajes de hierro presente en la muestras de cupcakes son bastante cercanos, esto puede deberse al aporte de los ingredientes de la formulación, ya que éstos también contribuyen a el valor nutricional del alimento como es el contenido de hierro principalmente de la cocoa la cual especifica en su etiqueta de valor nutricional que la misma aporta con un 10% de hierro al ser consumida, y este ingrediente es fundamental en la formación, ya que ayuda a enmascarar el sabor y color del alimento por la presencia de harina de sangre que es casi del mismo color de la cocoa.

Los datos reportados con los de Perú son bastante próximos entre sí para cada uno de los porcentajes empleados de sangre en la elaboración del producto.

**GRÁFICO No 17.- ANÁLISIS DEL RESULTADO DE CANTIDAD DE HIERRO. mg/kg DE MINI CUP CAKES BLANCO Y 10% DE HARINA DE SANGRE O EXPERIMENTAL**



En el mini cupcakes de 10% de harina de sangre se encuentra un incremento sustancial al contenido de hierro, con un incremento considerable alcanzando un valor de 10 veces mayor que el blanco. Donde se ratifica que el alimento elaborado puede servir de gran ayuda a personas que padezcan de deficiencia de hierro, sabiendo el valor recomendado para la ingesta de hierro según la NTE INEN 1334-2: 2008 Rotulado de Productos Alimenticios para Consumo Humano, es de 18mg del mismo, se debería por lo tanto se debería consumir al menos un mini cupcakes diario para personas de 4 años en adelante.

**CUADRO No 2.- COMPOSICIÓN PROXIMAL Y CONTENIDO DE HIERRO DE LA HARINA DE SANGRE BOVINA SECADA POR EL MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN Y SECADOR DE BANDEJAS.**

Tratamiento	H. S. liofilización	H.S. atomización
Cenizas (%)	3,97	3,34
Grasa (%)	0,9	1,09
Humedad (%)	4,13	3,67
Proteína (%)	89,1	91,8
Carb.T. g/100g	9,4	0
Hierro mg/kg	206,96	210,39
E.T(Kcal/100g)	372,1	377,01

Según la composición proximal y contenido de hierro de la harina de sangre secada por liofilización y secador de bandejas con respecto a la harina de sangre secada por el método de atomización propuesta por los investigadores Galarza R, Cayro Y. Perú (2013), se puede decir que el contenido proximal de la harina de sangre de esta investigación muestra valores semejantes, en los que el porcentaje de proteína fue del 89.1%, para nuestra harina de sangre investigada, con respecto al 91.8% de la harina de sangre secada por atomización. Las variaciones pueden deberse al método utilizado y que al someter a la sangre a dos tratamientos previos antes de ser convertida en harina, ésta puede perder su valor nutricional, y desnaturalizarse la misma.

En cuanto al contenido de hierro presente en las dos muestras presentan valores similares al igual que su composición proximal, y puede ser menor debido a factores como es la alimentación del animal, pese a esto no son datos significativamente muy dispares.

### 3.4.- ANÁLISIS MICRIBIOLÓGICO DE MINI CUPCAKES.

**CUADRO No 3.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MINI CUPCAKES 0%, 10%, HECHO A BASE DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO POR EL MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN Y SECADOR DE BANDEJAS, Y EL DE REFERENCIA PROPUESTO POR Galarza R, Cayro Y. Perú (2013).**

#### Microbiológico de mini cupcakes y galletas de referencia.

Pruebas	mini A 0%	mini C 10%	galletas 0%	galletas 10%	L. máximo
Aerobios Mesófilos (UFC/g)	10	70	< 10	35	105
Mohos y levaduras (UFC/g)	Ausencia	Ausencia	155	15	103
Coliformes totales (NMP/g)	Ausencia	Ausencia	15	4	102
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

❖ Galarza R, Cayro Y. Perú (2013).

En el cuadro número tres se muestra el análisis microbiológico de los mini cupcakes con los de referencia propuestos por Galarza R, Cayro Y. Perú (2013). Se puede apreciar la variación en cuanto Mohos y levaduras, Coliformes Totales, teniendo en nuestro caso la ausencia de los microorganismos, esto hace que el producto garantice su calidad sanitaria, y junto con el análisis bromatológico sea óptimo para el consumo humano.

De esta forma se garantiza que nuestro alimento (mini cupcakes) con alto contenido de hierro hecho a base de sangre de origen bovino, objetivo de esta investigación fue elaborado bajo condiciones sanitarias, y su estado de conservación de la misma forma demuestra ser efectiva.

## CAPÍTULO IV

### 4.- CONCLUSIONES.

1. Se elaboró y valoró con éxito los mini cupcakes con alto contenido de hierro a base de sangre de origen bovino secada por el método de liofilización y secador de bandejas, los mismos que presentaron cantidades elevadas de hierro, en relación a una muestra considerada como blanco(sin harina de sangre), siendo estos en su formulación de distintas concentraciones por lo tanto, se tuvo que los cuatro alimentos fortificados con hierro el de más alto valor en mg/Kg fue el de 15% de harina de sangre, siendo este del 41.5mg/Kg de hierro presente, seguido del mini cupcake más aceptado que fue el del 10% de harina de sangre, con una concentración de 31.1 mg/Kg, por lo tanto el contenido de hierro va aumentando conforme se añada más cantidad de harina de sangre en la formulación.
2. Previa la deshidratación las condiciones de la sangre deben ser de animales provenientes de camales que tengan control veterinario, con la finalidad de asegurar la calidad microbiológica del producto final (harina de sangre), y a su vez luego de su recolección debe ser almacenada en un recipiente estéril, y transportada en cadena de frío, en este caso hasta llegar al laboratorio donde va a ser liofilizada. De esta manera se asegura su conservación y su estado microbiológico.
3. El mini cupcake más aceptable por los jueces no entrenados, fue el de grado de concentración del 10% de harina de sangre, el mismo que en su formulación lleva

157.5g de harina de trigo fortificada, 17,5g de harina de sangre, 50g de cocoa. 70g de azúcar, 15mL de aceite girasol, 1 huevo, y 30mL de zumo de fruta (maracuyá).

4. Se evaluó las características nutricionales del alimento más aceptable 10% de harina de sangre, y blanco 0% de harina de sangre en su formulación, en la que se demuestra que contienen: cenizas 2.14% y 2.00%, fibra 0.11%, 0.39%, grasa 8,47%, 10,23%, humedad 11.67%, 11.91%, proteína 12.05% y 9.01%, respectivamente, y sus estado microbiológico demuestra que los dos tiene excelente calidad sanitaria.
  
5. Se cuantificó la cantidad de hierro presente en las cuatro concentraciones distintas, siendo estas: en el 0% de harina de sangre o blanco se obtuvo 3.39mg/Kg, en 5% de harina de sangre el 25.5mg/Kg, 10% de harina de sangre el 31.1mg/kg, y para el 15% de harina de sangre se obtuvo el 41.59mg/kg., demostrando que el alimento (mini cupcake) tiene alto contenido de hierro, y que el mismo puede ser introducido sin ningún problema en la alimentación de niños y mujeres en estado de gestación que tengan déficit de hierro.

## CAPÍTULO V

### 5.- RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que al realizar la harina esta sea “molida” en instrumentos óptimos ya que al realizarlo en un molino convencional pueden quedar partículas demasiado grandes que pueden sentirse al momento de la degustación.
2. Se puede mejorar la calidad de cenizas reemplazando en su formulación por un aceite mejor como es el de oliva extra virgen ya que este es fuente de minerales y oligoelementos
3. Se recomienda que en la formulación al momento de mezclar los ingredientes, puede aumentarse la cantidad tanto de cocoa, como de zumo de fruta, de esta manera el resultado del alimento será más agradable, en su aroma y color.
4. Dejarlos reposar después del horneado, hasta su enfriamiento, así se evitará la formación de humedad en el empaque.
5. Se puede recomendar la formulación de otros productos relacionados para diversificarlos, pudiendo así sacar más provecho de las propiedades que tiene el alimento como tal.

6. Se recomienda nuevas investigaciones como, la biodisponibilidad de hierro en animales de experimentación.

## CAPÍTULO VI

### 6.- RESUMEN.

El objetivo de la presente investigación fue elaborar mini cupcakes con alto contenido de hierro, a base de sangre de origen bovino por el método de liofilización y secador de bandejas, el mismo que fue elaborado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, así como en el laboratorio de Servicios Analíticos, Químicos y Microbiológicos en Aguas y Alimentos “SAQMIC”, para aportar a la calidad nutricional de niños y mujeres en estado de gestación, que tengan deficiencia de hierro en su organismo. Para lo cual se elaboraron mini cupcakes fortificados en diferentes concentraciones de 0, 5, 10, y 15% de harina de sangre, los cuales fueron sometidos a degustación, dando como resultado que los mini cupcakes elaborados con el 0 y 10% de harina de sangre, fueron los más satisfactorios para los 30 jueces no entrenados, en la que la muestra más aceptada fue la de grado de concentración del 10% de harina de sangre con 23 resultados satisfactorios. Mediante la aplicación de métodos analíticos, los mini cupcakes fueron sometidos a análisis bromatológico y microbiológico obteniéndose mini cupcakes con cenizas en (10% de harina de sangre) 2.14% y (0% harina de sangre), 2.00%, fibra en (10% de harina de sangre) 0.11%, (0% de harina de sangre) el 0.39%, grasa en (10% de harina de sangre) el 8,47%, y (0% de harina de sangre) el 10,23%, humedad (10% de harina de sangre) 11.67%, (0% de harina de sangre) 11.91%, proteína (10% de harina de sangre) 12.05% y (0% de harina de sangre) 9.01%. los valores de Aerobio Mesófilos, Mohos y levaduras, Coliformes totales y *Salmonella s.p*, encontrados fueron para el caso de la concentración del 0% 10UFC/g, y ausencia para cada uno de las demás investigaciones, para el caso del mini cupcake enriquecido con el 10% se tiene: Aerobios Mesófilos fue de 70 UFC/g y para las demás investigaciones se reporta como

ausencia, por lo tanto se puede realizar un alimento con alto contenido de hierro a base de sangre de origen bovino, que servirá para aportar en la nutrición de niños y mujeres embarazadas que tengan déficit de hierro en su organismo por consiguiente se demuestra que la formulación experimental (mini cup cake 10% de harina de sangre) posee alto contenido de hierro en su formulación y a la vez demuestra la calidad sanitaria, además de ser considerado un alimento con calidad nutricional por la cantidad de proteína, y a la vez un producto novedoso y económico, se recomienda que la formulación sea aplicada en la industria alimentaria por sus beneficios, y calidad nutricional.

## SUMMARY

The objective of this research was to make mini cupcakes with high iron content, based on blood, of bovine origin by the method of lyophilization and tray dryer, the same which was developed at the Polytechnic School of Chimborazo, and in Analytical laboratory Services, Chemical and Microbiological Water and Food "SAQMIC" to contribute to the nutritional quality of children and women in pregnancy state, having iron deficiency in their body. For which, fortified mini cupcakes were prepared at different concentrations of 0, 5.10, and 15% flour blood which were subject to tasting, resulting in the mini cupcakes made with the 0 and 10% flour blood, were the most satisfactory for the 30 untrained judges, in which the sample was accepted grade 10% concentration of flour blood with 23 satisfactory results. By applying analytical methods, mini cupcakes were subject to bromatological and microbiological analysis obtained mini cupcakes with ash (10% flour blood) 2.14% and (0% flour blood), 2.00% fiber (10% flour blood) 0.11% (0% flour blood) 0.39% fat (10% of flour blood) 8.47% and (0% flour blood) 10.23% , humidity (10% flour blood) 11.67% (0% flour blood) 11.91% protein (10% of flour blood) and 12.05% (0% flour blood) 9.01%. Aerobic values, mesophiles, molds and yeasts, total coliforms and *Salmonella s.p.* were found for the case of the concentration of 10% UFC / g, and absence, for each of the other investigations, in the case of mini cupcake enriched with 10% we have: Aerobic mesophiles was 70 CFU / g for the other investigations is reported as absent, so it can make a food with high iron content, based on blood of bovine origin, which serve to provide the nutrition of children and women pregnant women have iron deficiency in their bodies Consequently shows that the experimental formulation (mini cupcake 10%, flour blood) has high iron content in its formulation and also demonstrates the sanitary quality as well as being considered a food with nutritional quality because the amount of protein, and simultaneously; a novel and economical product, it is recommended that the formulation is applied in the food industry for its benefits, and nutritional quality.

## **CAPÍTULO VII**

### **BIBLIOGRAFÍA.**

**ANZALDÚA, A.** 1982. Evolución sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. España. ACRIBIA. 13, 67-77.

**BELLO, A.** 2004. Consecuencias funcionales de la deficiencia de hierro. Boletín médico del Hospital Infantil de México. México. (61): 1-3

**BOTÁNICA DE LAS PLANTAS. BENEFICIOS DEL ACEITE DE GIRASOL. 2012.**

[http://www.botanical-online.com/aceite\\_de\\_girasol\\_propiedades.htm](http://www.botanical-online.com/aceite_de_girasol_propiedades.htm)

20140617

**CANO, S.** 2006. Métodos de análisis microbiológicos. Norma ISO, UNE. Determinación de salmonella. Madrid. s.e. 33p.

**CARDERO, Y. SARMIENTO, R. SELVA, A.** 2009. Importancia del consumo de hierro y vitamina C para la prevención de anemia ferropénica. MEDISAN. (Santiago de Cuba). (6): 1- 13

## **II CONGRESO ECUATORIANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS.**

<http://ecuador.nutrinet.org/noticias/1/200-exponen-fortificacion-de-alimentos-en-loja-en-ii-congreso-ecuatoriano-de-ingenieria-de-alimentos>

20140509

**CONTRERAS, F. BLANCO, M.** Fisiopatología

[http://books.google.com.pe/books?id=XmStAAAACAAJ&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=XmStAAAACAAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

20140509

## **CONSEJO ARGENTINO PARA LA INFORMACIÓN Y EL DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA**

<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=91>

20140509

## **CUPCAKE.**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Cupcake>

20141010

**DEFINICIÓN DE RENDIMIENTO ESCOLAR.**

<http://www.definicion.org/rendimiento-escolar>

20141009

**EL MUNDO CUPCAKE SANTANDER.**

<http://elmundocupcakesantander.wordpress.com/category/consejos-basicos-2/>

20141010

**ESPIN, J.** 2011. (Tesis). Elaboración de galletas de sal enriquecidas con clorofila. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. pp. 10, 58-60, 78, 81-84.

**FREIRE, W. y otros.** 2013. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del Ecuador. ENSANUT-ECU 2012-2013. Ministerio de Salud Pública/ Instituto Nacional de Estadística y Censos. s.e. Quito. 46, 58, 60-62. P

**FORRELLAT, M. GAUTIER, H. FERNANDEZ, N.** 2000. Metabolismo del hierro. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. Ciudad de la Habana. (16): p. 149-160.

**GALLEGOS, J.** 2003. Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos. Riobamba. Xerox. 35-40 p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 2006. Harina de trigo. Requisitos. Quito. Ecuador. INEN. 1-2 p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 2006. Harina de trigo. Clasificación. Quito. Ecuador. INEN. 1p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 1978. Determinación de humedad. Quito. Ecuador. INEN. 1,2p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 1980. Determinación de Cenizas. Quito. Ecuador. INEN. 1-3p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 1980. Determinación de Fibra. Quito. Ecuador. INEN. 1-4p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 1980. Determinación de Proteína. Quito. Ecuador. INEN. 1-4p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 1980. Determinación de Grasa. Quito. Ecuador. INEN. 1-3p.

**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** 2009. Control Microbiológico de los Alimentos, Salmonella. Método de Detección. Quito. Ecuador. INEN. 1-14p.

**INSTITUTO DE ESTUDIOS DEL HUEVO 2002**

[http://www.institutohuevo.com/images/archivos/lecciones\\_del\\_huevo\\_completo.pdf](http://www.institutohuevo.com/images/archivos/lecciones_del_huevo_completo.pdf)

20140613

**LUCERO, O.** 2013. Guía de Prácticas de Bromatología. Riobamba. Centro de Copiado Xerox. 12, 15, 17

**MORETA, V. CARDENA, E.** 2013. (Tesis). Prevalencia de anemia por deficiencia de hierro y su relación con el rendimiento escolar en niños/as de la escuela Francisco José de Caldas parroquia Andrade Marín cantón Antonio Ante provincia de Imbabura-2008. Lic. Nutrición y Salud Comunitaria. Imbabura. Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ciencias de la Salud. pp. 15-16, 20, 29-30.

**OLIVARES, M. WALTER, T.** (2003). CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO. Revista chilena de nutrición. (Chile) (3): 226-233

**RODRÍGUEZ, A.** Programa de Integración de Micronutrientes; Fortificación de la harina de trigo con hierro.

<http://issuu.com/ecuador.nutrinet.org/docs/4-dra.-rodriguez>

20140509

## **SANGRE GASTRONOMÍA**

Wikipedia enciclopedia libre

20140509

**SECCIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN.** 2008. Procedimiento para determinar hierro en harinas y alimentos. Método espectrofotométrico de absorción atómica/llama. (Chile). s.e. 1-6 p.

**ZIEGLER, E. FILER, R.** 1996. Conceptos actuales sobre nutrición. Traducido por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida. 7ma. ed. Washington, D.C. s.e. 307p

## CAPÍTULO VIII

### 8.- ANEXOS:

ANEXO No 1.- MODELO DE FICHA PARA PRUEBA DE DEGUSTACIÓN ESCALA HEDÓNICA, CINCO PUNTOS.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**TEST DE ACEPTABILIDAD: ESCALA HEDÓNICA**

**SEMESTRE:**.....**NOMBRE**.....

**PRODUCTO:** Mini cupcakes..... **FECHA:** -----

Pruébese las muestras de mini cupcakes que se le presentan e indique, **según la escala**, su opinión sobre ellas.

Marque con una X el reglón que corresponda a la calificación para cada muestra.

#### MUESTRAS

ESCALA	M 1	M 2	M 3	M 4
Me gusta mucho	-----	-----	-----	-----
Me gusta ligeramente	-----	-----	-----	-----
Ni me gusta ni me disgusta	-----	-----	-----	-----
Me disgusta	-----	-----	-----	-----
Me disgusta mucho	-----	-----	-----	-----

**Comentarios:** -----  
-----

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**MUESTRAS DE CUPCAKES**

<b>ALUMNOS</b>	<b>MUESTRA 1</b>	<b>MUESTRA 2</b>	<b>MUESTRA 3</b>	<b>MUESTRA 4</b>
1	A	B	C	D
2	B	A	D	C
3	D	C	A	B
4	A	D	B	C
5	B	C	A	D
6	C	A	D	B
7	A	B	C	D
8	C	B	A	D
9	D	A	B	C
10	B	C	A	D
11	A	B	C	D
12	B	A	D	C
13	D	C	A	B
14	A	D	B	C
15	B	C	A	D
16	C	A	D	B
17	A	B	C	D
18	C	B	A	D
19	D	A	B	C
20	B	C	A	D
21	A	B	C	D
22	C	D	B	A
23	B	D	C	A
24	C	A	B	D
25	D	B	C	A
26	B	A	D	C
27	A	B	C	D
28	B	C	D	A
29	A	B	C	D
30	A	B	C	D

A: 0%

B: 5%

C: 10%

D: 15%

**ESCALA HEDONICA DE CINCO PUNTOS**

**MUESTRA DE MINI CUCPKAKES**

**VALORACION**

<b>DESCRIPCION</b>	<b>VALOR</b>
Me gusta mucho	<b>+2</b>
Me gusta ligeramente	<b>+ 1</b>
Ni me gusta ni me disgusta	<b>0</b>
Me disgusta	<b>-1</b>
Me disgusta mucho	<b>-2</b>

Escala hedónica verbal de cinco puntos (Andueza-Morales, 1982)

**PRUEBA DE DEGUSTACIÓN, ESCALA HEDÓNICA VERBAL, ALUMNOS DE LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**



**ANEXO No 2.- ELABORACIÓN DE HARINA DE SANGRE DE ORIGEN BOVINO.**

**RECOLECCIÓN DE MUESTRA DEL CENTRO DE FAENAMIENTO "MONTERREY" QUERO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA, EN CADENA DE FRÍO, 8°C.**



**MUESTRA LISTA PARA LIOFILIZACIÓN, LABORATORIO DE PROCESOS INDUSTRIALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ESPOCH.**



**MUESTRA LISTA PARA SER PROCESADA EN SECADOR DE BANDEJAS, LABORATORIO DE PROCESOS INDUSTRIALES, ESPOCH.**



**MUESTRA SECA, LISTA PARA SU MOLIENDA**



**HORNEO DE MINI CUPCAKES, A BASE DE SANGRE DESHIDRATADA DE ORIGEN BOVINO.**



**ANEXO No.3 Determinación de Humedad y Materia Seca**



CDU: 684.1

AL 02-04-302

<b>Norma Técnica Ecuatoriana</b>	<b>AZÚCAR DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD (método de rutina)</b>	<b>INEN 265 1978-08</b>
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta norma tiene por objeto establecer el método para determinar el contenido de humedad en el azúcar.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. RESUMEN</b></p> <p>2.1 El método se basa en la pérdida de peso que sufre la muestra al ser eliminada la humedad por secado al vacío.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. INSTRUMENTAL</b></p> <p>3.1 Balanza analítica. Sensible a/ 0,1 mg</p> <p>3.2 Estufa con circulación de aire, capaz de mantener la temperatura entre 60° y 70°C y una presión absoluta que no exceda de 25 hPa (50 mm de mercurio).</p> <p>3.3 Mortero.</p> <p>3.4 Cápsula de níquel, platino o aluminio con tapa de cierre hermético.</p> <p>3.5 Desecador, con sílica gel, alúmina activada u otro deshidratante adecuada</p> <p>3.6 Pinza, para la cápsula.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. PREPARACION DE LA MUESTRA</b></p> <p>4.1 Si la muestra está compuesta de cristales gruesas, triturar en el mortero hasta que se pulverice.</p> <p>4.2 Mezclar íntimamente, en el menor tiempo posible, y guardar en un frasco herméticamente cerrado hasta el momento del análisis.</p> <p style="text-align: center;"><b>5. PREPARACION DE LA MUESTRA</b></p> <p>5.1 La determinación debe realizarse por duplicado, sobre la misma muestra preparada.</p> <p>5.2 Sobre la cápsula de níquel, previamente tarada, pesar con exactitud al 0,1 mg, 5 g de azúcar crudo o 10 g de azúcar refinado, o blanco sin refinar, de la muestra preparada.</p> <p>5.2 Calentar la cápsula junto con su contenido en la estufa con circulación de aire, permitiendo que la temperatura se eleve entre 60°C y 70°C, y una presión absoluta no mayor de 25 hPa (50 mm de mercurio) y por un tiempo de dos horas.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-31000 - Baños de San Marcos EB-09 y Almagro - Guano-Ecuador - Prohibida la reproducción

5.4 Retirar la cápsula y su contenido de la estufa bien tapada; dejar enfriar en el desecador y pesar con aproximación a 0,1 mg; repetir el calentamiento por periodos de una hora, enfriando y pesando, hasta que la disminución en masa, en dos pesadas sucesivas, no difiera en más de 0 1 mg.

5.5 A través de la estufa debe pasarse una corriente de aire seco para asegurar la remoción del vapor de agua.

#### 6. CALCULOS

6.1 El contenido de humedad se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$H = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

Siendo:

- H = contenido de humedad en porcentaje de masa
- $m_1$  = masa de cápsula, con la muestra, antes del calentamiento, en g.
- $m_2$  = masa de la cápsula, con la muestra, después del calentamiento, en g.
- m = masa de la muestra, en g.

#### 7. ERRORES DE METODO

7.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,05%; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

#### 8. INFORME DE RESULTADOS

8.1 Como resultado final debe reportarse la media aritmética de los dos resultados de la determinación, aproximada a centésimas.

8.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse además, cualquier condición no especificada en esta norma, o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

8.3 Debe incluirse todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra.

Anexo No. 4.- Determinación de Cenizas

CDU: 684.2.543.082



AL 02.02-311

<b>Norma Técnica Ecuatoriana</b>	<b>HARINAS DE ORIGEN VEGETAL. DETERMINACION DE LAS CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO</b>	<b>INEN 527 1980-12</b>
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJ ETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece el método para determinar el contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en las harinas de origen vegetal.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. RESUMEN</b></p> <p>2.1 Incinerar la muestra en medio ácido, hasta obtención de cenizas.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. INSTRUMENTAL</b></p> <p>3.1 Crisol de porcelana o de otro material inalterable a las condiciones del ensayo.</p> <p>3.2 Mufla, con regulador de temperatura ajustada a <math>550 \pm 1^\circ\text{C}</math>.</p> <p>3.3 Desecador, con cloruro de calcio u otro deshidratante adecuado.</p> <p>3.4 Pinza, para la cápsula.</p> <p>3.5 Baño María.</p> <p>3.6 Embudo de vidrio.</p> <p>3.7 Papel filtro, de poro fino, para determinación de cenizas.</p> <p>3.8 Estufa con regulador de temperatura, ajustado a <math>110^\circ \pm 2^\circ\text{C}</math>.</p> <p>3.9 Balanza analítica, sensible al 0,1 mg.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. REACTIVOS</b></p> <p>4.1 Solución 0,5 N de ácido clorhídrico, aproximada.</p> <p style="text-align: center;"><b>5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</b></p> <p>5.1 Las muestras para el ensayo deben estar acondicionadas en recipientes herméticos, limpios, secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable) y completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.</p> <p>5.2 La cantidad de muestra de harina de origen vegetal extraída dentro de un lote determinado debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-31999 - Baquerizo Moreno Es-26 y Almagro - Cuito-Ecuador - Prohibida la reproducción

5.3 Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que la contiene.

## 6. PROCEDIMIENTO

6.1 La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

6.2 Colocar el crisol en la mufla y calentarla durante 15 minutos a  $550 \pm 1^\circ\text{C}$ , transferir al desecador para enfriamiento y pesar con aproximación al 0,1 mg.

6.3 Transferir al crisol y pesar, con aproximación al 0,1 mg, 20 g de muestra, y colocar el crisol con su contenido cerca de la puerta de la mufla abierta y mantenerla allí durante unos pocos minutos, para evitar pérdidas por proyección del material, lo que podría ocurrir si el crisol se introduce directamente en la mufla.

6.4 Introducir el crisol en la mufla a  $550^\circ\text{C}$ , hasta obtener cenizas de un color gris claro. No deben fundirse las cenizas.

6.5 Sacar de la mufla el crisol con las cenizas, dejar enfriar en el desecador y agregar  $25\text{ cm}^3$  de la solución 5N de ácido clorhídrico; cubrir con un vidrio de reloj y calentar en baño María durante 10 minutos.

6.6 Dejar enfriar el contenido del crisol, filtrar a través de un papel filtro de poro fino y lavar con agua destilada hasta que el líquido filtrado no tenga reacción ácida.

6.7 Transferir el papel filtro con su contenido al mismo crisol y colocarlo en la estufa de aire calentada a  $110 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 3 horas.

6.8 Llevar el crisol y su contenido a la mufla calentada a  $550 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 3 horas, y calentar nuevamente.

6.9 Transferir al desecador y pesar, tan pronto haya alcanzado la temperatura ambiente, con aproximación al 0,1 mg.

6.10 Repetir la incineración por periodos de 30 minutos, enfriando y pesando, hasta que no haya disminución en la masa.

## 7. CÁLCULOS

7.1 El contenido de cenizas insolubles en ácido, en muestras de harinas de origen vegetal, se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\text{CIA} = \frac{100(m^2 - m)}{m^1 - m}$$

Siendo:

CIA = contenido de cenizas insolubles en ácido, en harinas de origen vegetal, en porcentaje de masa.

m = masa del crisol vacío, en g.

$m^2$  = masa del crisol con las cenizas insolubles en ácido, en g.

$m^1$  = masa del crisol con la muestra tomada para la determinación de cenizas totales.

Anexo No. 5.- Determinación de Fibra Cruda.

CDU: 684.2:



AL 02.02-308

Norma Técnica Ecuatoriana	HARINAS DE ORIGEN VEGETAL DETERMINACION DE LA FIBRA CRUDA	INEN 522 1980-12
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece el método para determinar el contenido de fibra cruda en harinas de origen vegetal.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. TERMINOLOGÍA</b></p> <p>2.1 <b>Fibra cruda.</b> Es el residuo insoluble obtenido después del tratamiento de la muestra de harina de origen vegetal y determinada mediante procedimientos normalizados.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. RESUMEN</b></p> <p>3.1 Digerir la muestra sin grasa con solución de ácido sulfúrico, lavar y nuevamente digerir con solución de hidróxido de sodio, lavar, secar y pesar. Calcinar hasta destrucción de la materia orgánica. La pérdida de peso después de la calcinación es el contenido de fibra cruda en la muestra.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. INSTRUMENTAL</b></p> <p>4.1 Estufa, con regulador de temperatura, ajustada a <math>130 \pm 2^\circ\text{C}</math>.</p> <p>4.2 Desecador, con sulfato de calcio anhidro u otro deshidratante adecuado.</p> <p>4.3 Aparato de extracción tipo Soxhlet u otro similar.</p> <p>4.4 Cápsula de porcelana o de sílice.</p> <p>4.5 Muña con regulador de temperatura ajustado a <math>600 \pm 15^\circ\text{C}</math>.</p> <p>4.6 Embudo de 12 cm de diámetro, con una tela de algodón de tejido fino (tela de lino) para filtración.</p> <p>4.7 Matraz Erlenmeyer de 1 000 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.8 Filtro de succión, compuesto de crisol de Gooch, colocado sobre un frasco de succión conectado a una trampa, y éste, a su vez, a cualquier aparato para efectuar el vacío. Debe estar dotado de una válvula para romper el vacío.</p> <p>4.9 Pipeta volumétrica, de 25 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.10 Aparato de digestión, compuesto por un condensador adaptado a la boca de balón de precipitación de 600 cm<sup>3</sup>, con diámetro de 82 mm y altura de 151 mm, y una plancha eléctrica de calentamiento con regulador de temperatura ajustado en tal forma que eleve la temperatura de 200 cm<sup>3</sup> de agua, desde <math>25^\circ\text{C}</math> hasta la ebullición durante <math>15 \pm 2</math> min.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-3088 - Baquerizo Moreno EB-29 y Almagro - Guano-Ecuador - Prohibida la reproducción

4.11 Balanza analítica, sensible al 0,1 mg.

## 5. REACTIVOS

5.1 *Éter anhidro.* Preparar lavando éter etílico comercial con dos o tres porciones de agua; agregar hidróxido de sodio o hidróxido de potasio sólidos y dejar en reposo hasta que todo el agua sea extraída del éter. Transferir a un frasco seco que previamente ha sido limpiado con cuidado y agregar pequeños pedazos de sodio metálico; cuando ya no se observe desprendimiento de hidrógeno, guardar el éter deshidratado sobre sodio metálico, en el mismo frasco, sin ajustar la tapa.

5.2 *Solución 0,255 N de ácido sulfúrico.* Disolver 1,25 g de ácido sulfúrico, reactivo para análisis, en 80 cm<sup>3</sup> de agua destilada y completar a 100 cm<sup>3</sup>.

5.3 *Solución 0,313 N de hidróxido de sodio.* Disolver 1,25 g de hidróxido de sodio, libre de carbonato de sodio, en 80 cm<sup>3</sup> de agua destilada y completar a 100 cm<sup>3</sup>.

5.4 *Alcohol etílico al 95%.* (puede usarse alcohol metílico o alcohol isopropílico).

5.5 *Antiespumante,* apropiado, a base de silicones.

5.6 *Perlas de vidrio.*

5.7 *Asbesto preparado.* Colocar en la cápsula de porcelana las fibras de asbesto tratadas para usarse en análisis (ver Anexo A), calentar 16 h a 600 °C en la mufla, sacar de la mufla y transferir a un balón de precipitación, hervir durante 30 min con solución 0,255 N de ácido sulfúrico, filtrar, lavar con agua destilada y transferir a un balón de precipitación para hervir durante 30 min con solución 0,313 N de hidróxido de sodio, filtrar, lavar con la solución 0,255 N de ácido sulfúrico, lavar nuevamente con abundante agua, secar e incinerar a 600°C en la mufla, por un tiempo de dos horas.

## 6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 Las muestras para el ensayo deben estar acondicionadas en recipientes herméticos, limpios, secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable), completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.

6.2 La cantidad de muestra de la harina de origen vegetal extraída dentro de un lote determinado debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.

6.3 Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que la contiene.

## 7. PROCEDIMIENTO

7.1 La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

7.2 Pesar, con aproximación al 0,1 mg, 3 g de muestra y transferir a un dedal de porosidad adecuada, tapar con algodón, colocar en la estufa calentada a  $130 \pm 2^\circ\text{C}$ , por el tiempo de una hora.

7.3 Transferir al desecador el dedal que contiene la muestra, dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

7.4 Colocar en el aparato Soxhlet y llevar a cabo la extracción de la grasa, con una cantidad suficiente de éter anhidro; el tiempo de extracción será de cuatro horas, si la velocidad de condensación es de 5 a 6 gotas por segundo, o por un tiempo de 16 h, si dicha velocidad es de 2 a 3 gotas por segundo.

7.5 Sacar el dedal con la muestra sin grasa, dejar en el medio ambiente para que se evapore el solvente, colocarlo en la estufa y llevar a una temperatura de 100°C, por el tiempo de dos horas. Transferir al desecador y dejar enfriar a la temperatura ambiente.

7.6 Pesar, con aproximación al 0,1 mg, aproximadamente 2 g de la muestra desengrasada y transferir al balón de precipitación de 600 cm<sup>3</sup>, con mucho cuidado.

7.7 Agregar aproximadamente 1 g de asbesto preparado, 200 cm<sup>3</sup> de solución hirviendo, 0,255 N de ácido sulfúrico, una gota de antiespumante diluido o perlas de vidrio (ver Nota 1).

7.8 Colocar el balón de precipitación y su contenido en el aparato de digestión, dejar hervir durante 30 min exactos, girando el balón periódicamente, para evitar que los sólidos se adhieran a las paredes.

7.9 Filtrar a través de la tela de tejido fino puesta en el embudo, el que, a su vez, se coloca en el Erlenmeyer de 1 000 cm<sup>3</sup>, lavar el residuo con agua destilada caliente, hasta que las aguas de lavado no den reacción alca-  
da.

7.10 Colocar el residuo en el balón de precipitación, agregar 200 cm<sup>3</sup> de solución 0,313 N de hidróxido de sodio hirviendo, colocar en el aparato de digestión y llevar a ebullición durante 30 min exactos.

7.11 Filtrar a través de la tela de tejido fino, lavar el residuo con 25 cm<sup>3</sup> de la solución 0,255 N de ácido sulfúrico hirviendo y luego con agua destilada hirviendo, hasta que las aguas de lavado no den reacción alcalina.

7.12 El residuo es transferido cuantitativamente al crisol de Gooch que contiene asbesto, y previamente pesado, agregar 25 cm<sup>3</sup> de alcohol etílico poco a poco y filtrar aplicando el vacío.

7.13 Colocar el crisol Gooch y su contenido en la estufa calentada a 130 ± 2°C por el tiempo de dos horas, transferir al desecador, dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar.

7.14 Colocar el crisol con la muestra seca en la mufla e inclinar a una temperatura de 500 ± 50°C, por el tiempo de 30 min; enfriar en desecador y pesar.

7.15 Realizar un solo ensayo en blanco con todos los reactivos, sin la muestra y siguiendo el mismo procedimiento descrito a partir de 7.7 para cada determinación o serie de determinaciones.

---

**NOTA 1.** Un exceso de antiespumante puede dar resultados altos, por lo que se debe usar solamente, si es necesario, para controlar la espuma.

## 8. CALCULOS

8.1 El contenido de fibra cruda en muestras de harina de origen vegetal se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$F_c = \frac{(m1 - m2) - (m3 - m4)}{m} \times 100$$

Siendo:

$F_c$  = contenido de fibra cruda, en porcentaje de masa.

$m$  = masa de la muestra desengrasada y seca, en g.

$m1$  = masa de crisol conteniendo asbestos y la fibra seca, en g.

$m2$  = masa de crisol contiendo asbesto después de ser incinerado, en g.

$m3$  = masa de crisol del ensayo en blanco conteniendo asbestos, en g.

$m4$  = masa de crisol del ensayo en blanco conteniendo asbesto, después de ser incinerado, en g.

## 9. ERRORES DE METODO

9.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,1%; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

## 10. INFORME DE RESULTADOS

10.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los dos resultados de la determinación, aproximada a centésimas.

10.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

10.3 Deben incluirse, además, todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra.

Anexo No.6.- Determinación de Proteína

CDU: 664.2:543.8



AL 02.02-303

Norma Técnica Ecuatoriana	HARINAS DE ORIGEN VEGETAL DETERMINACION DE LA PROTEINA	INEN 519 1980-12
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece el método para determinar el contenido de proteína en las harinas de origen vegetal.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. TERMINOLOGÍA</b></p> <p>2.1 <b>Proteína.</b> Es la cantidad de nitrógeno total, expresado convencionalmente como contenido de proteína y determinado mediante procedimientos normalizados.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. RESUMEN</b></p> <p>3.1 Se determina el contenido de proteína en harinas de origen vegetal mediante el método Kjeldahl y se multiplica el resultado por un factor para expresarlo como proteína.</p> <p>3.2 El factor para convertir el contenido de nitrógeno a proteínas se indica en la Tabla 1.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. INSTRUMENTAL</b></p> <p>4.1 Aparato Kjeldahl, para digestión y destilación.</p> <p>4.2 Matraz Kjeldahl, de 650 a 800 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.3 Matraz Erlenmeyer, de 500 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.4 Bureta, de 50 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.5 Probetas, de 50 y 200 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.6 Balanza analítica, sensible al 0,1 mg.</p> <p>4.7 Parafina o piedra pómez.</p> <p style="text-align: center;"><b>5. REACTIVOS</b></p> <p>5.1 Ácido sulfúrico concentrado, con densidad 1,84 g/cm<sup>3</sup> a 20°C, exento de nitrógeno.</p> <p>5.2 Solución 0,1 N de ácido sulfúrico, debidamente estandarizada.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-3/999 - Baquerizo Moreno 09-09 y Almagro - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

5.3 Solución concentrada de hidróxido de sodio, (Soda Kjeldahl). Disolver 450 g de hidróxido de sodio sólido en agua destilada y diluir la solución hasta 1 000 cm<sup>3</sup>. La densidad relativa de la solución final debe ser mayor de 1,36 g/cm<sup>3</sup> a 25°C.

5.4 Solución 0,1 N de hidróxido de sodio, debidamente estandarizada.

5.5 Sulfato de potasio o sulfato de sodio y sulfato de cobre, anhidros exentos de nitrógeno, reactivos para análisis (ver Anexo A).

5.6 Granallas de zinc, reactivo para análisis.

5.7 Solución alcohólica de rojo de metilo. Disolver 1 g de rojo de metilo en 200 cm<sup>3</sup> de alcohol etílico al 95% v/v.

## 6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 Las muestras para el ensayo deben estar acondicionadas en recipientes herméticos, limpios, secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable), completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.

6.2 La cantidad de muestra de la harina de origen vegetal extraída dentro de un lote determinado debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.

6.3 Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que la contiene.

## 7. PROCEDIMIENTO

7.1 La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

7.2 Pesar, con aproximación al 0,1 mg de 0,7 g a 2,2 g de la muestra y transferir al matraz Kjeldahl.

7.3 Agregar 15 g de la mezcla catalizadora sulfato de cobre, sulfato de potasio (o sulfato de sodio) anhidros (ver Anexo A) y 25 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico concentrado.

7.4 Agitar cuidadosamente el matraz y colocarlo en la hornilla del aparato Kjeldahl. Calentar suavemente hasta que no se observe formación de espuma y luego aumentar el calentamiento, rotando el matraz frecuentemente durante la digestión, hasta que el contenido del matraz se presente cristalino e incoloro; continuar el calentamiento durante dos horas y dejar enfriar.

7.5 Agregar aproximadamente 200 cm<sup>3</sup> de agua destilada, enfriar la mezcla hasta una temperatura inferior a 25°C y añadir trocitos de parafina o granallas de zinc para evitar proyecciones durante la ebullición.

7.6 Inclinar el matraz con su contenido y verter cuidadosamente por sus paredes, para que se formen dos capas, 50 cm<sup>3</sup> de la solución concentrada de hidróxido de sodio (o mayor cantidad, si fuere necesario, para alcanzar un alto grado de alcalinidad).

7.7 Conectar el matraz Kjeldahl al condensador mediante la ampolla de destilación. El extremo de salida del condensador debe sumergirse en 50 cm<sup>3</sup> de la solución 0,1 N de ácido sulfúrico contenido en el matraz Erlenmeyer de 500 cm<sup>3</sup>, a la que se ha agregado unas gotas de la solución alcohólica de rojo de metilo.

7.8 Agitar el matraz Kjeldahl hasta mezclar completamente su contenido y calentar.

7.9 Destilar hasta que todo el amoníaco haya pasado a la solución ácida contenida en el matraz Erlenmeyer, lo que se logra después de destilar por lo menos 150 cm<sup>3</sup>.

7.10 Antes de retirar el matraz Erlenmeyer, lavar con agua destilada el extremo del condensador y titular el exceso de ácido contenido en el matraz Erlenmeyer con la solución 0,1 N de hidróxido de sodio.

7.11 Realizar un solo ensayo en blanco con todos los reactivos, sin la muestra y siguiendo el mismo procedimiento descrito a partir de 7.3 para cada determinación o serie de determinaciones.

## 8. CALCULOS

8.1 El contenido de proteína en muestras de harina de origen vegetal, en base seca, se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$P = (1,40)(F) \frac{(V_1 N_1 - V_2 N_2) - (V_3 N_1 - V_4 N_2)}{m(100 - H)}$$

Siendo:

P = contenido de proteínas en harinas de origen vegetal, en porcentaje de masa.

V<sub>1</sub> = volumen de la solución 0,1 N de ácido sulfúrico, empleado para recoger el destilado de la muestra, en cm<sup>3</sup>.

N<sub>1</sub> = normalidad de la solución de ácido sulfúrico.

V<sub>2</sub> = volumen de la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, empleado en la titulación, en cm<sup>3</sup>.

N<sub>2</sub> = normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

V<sub>3</sub> = volumen de la solución 0,1 N de ácido sulfúrico empleado para recoger el destilado del ensayo en blanco, en cm<sup>3</sup>.

V<sub>4</sub> = volumen de la solución 0,1 N de hidróxido de sodio empleado en la titulación del ensayo en blanco, cm<sup>3</sup>.

m = masa de la muestra, en g.

H = porcentaje de humedad en la muestra.

F = factor para convertir el contenido de nitrógeno a proteínas, cuyo valor para cada harina se indica en la Tabla 1.

**TABLA 1. Factor de conversión de nitrógeno a proteína**

Harina de	Factor F
Trigo	5,7
Malz	6,25
Arroz	6,25
Soya	6,25
Avena	6,25
Centeno	6,25
Yuca	6,25
Cebada	6,25
Haba	6,25

**9. ERRORES DE METODO**

**9.1** La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,10%; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

**10. INFORME DE RESULTADOS**

**10.1** Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los dos resultados de la determinación.

**10.2** En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

**10.3** Deben incluirse todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra.

Anexo No.7.- Determinación de Extracto Etéreo

		
CDU: 684.2:		AL 02.02-307
Norma Técnica Ecuatoriana	HARINAS DE ORIGEN VEGETAL DETERMINACION DE GRASA	INEN 523 1980-12
<b>1. OBJETO</b>		
<p>1.1 Esta norma establece el método para determinar el contenido de grasa o extracto etéreo en harinas de origen vegetal.</p>		
<b>2. RESUMEN</b>		
<p>2.1 El contenido de materia grasa es extraído de una muestra de harina de origen vegetal mediante un solvente orgánico.</p>		
<b>3. INSTRUMENTAL</b>		
<p>3.1 Estufa, con regulador de temperatura, ajustado a <math>100 \pm 5^\circ\text{C}</math>.</p>		
<p>3.2 Desecador, con cloruro de calcio anhidro u otro deshidratante adecuado.</p>		
<p>3.3 Aparato de extracción, tipo Soxhlet u otro similar.</p>		
<p>3.4 Plancha eléctrica de calentamiento.</p>		
<p>3.5 Pincel.</p>		
<p>3.6 Dedal de Soxhlet de porosidad adecuada.</p>		
<p>3.7 Vaso de precipitación.</p>		
<p>3.8 Espátula de acero inoxidable.</p>		
<p>3.9 Balanza analítica, sensible al 0,1 mg.</p>		
<b>4. REACTIVOS</b>		
<p>4.1 Eter anhidro. Preparar lavando éter etílico comercial con dos o tres porciones de agua; agregar hidróxido de sodio o hidróxido de potasio sólidos y dejar en reposo hasta que toda el agua sea extraída del éter. Transferir a un frasco que previamente ha sido limpiado con cuidado y agregar pequeños pedazos de sodio metálico; cuando ya no se observe desprendimiento de hidrógeno, guardar el éter deshidratado sobre sodio metálico en el mismo frasco, sin ajustar la tapa.</p>		
<p>4.2 Arena purificada con ácido y calcinada, con un tamaño de grano entre 0,1 y 0,3 mm.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-33989 - Baquerizo Moreno EB-09 y Almagro - Cacha-Cacha - Prohibida la reproducción

## 5. PREPARACION DE LA MUESTRA

- 5.1 Las muestras para el ensayo deben estar acondicionadas en recipientes herméticos, limpios, secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable), completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.
- 5.2 La cantidad de muestra de la harina de origen vegetal extraída dentro de un lote determinado debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.
- 5.3 Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que lo contiene.

## 6. PROCEDIMIENTO

- 6.1 La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.
- 6.2 Lavar el balón del aparato Soxhlet y secarlo en la estufa calentada a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ , por el tiempo de una hora. Transferir al desecador y pesar con aproximación al 0,1 mg, cuando haya alcanzado la temperatura ambiente.
- 6.3 En el dedal de Soxhlet, pesar, con aproximación al 0,1 mg, 2,35 g de la muestra de harina, 2 g de arena bien seca; mezclar íntimamente con la espátula, limpiando ésta con el pincel.
- 6.4 Colocar algodón hidrófilo en la parte superior del dedal a manera de tapa e introducir en la estufa calentada a  $130 \pm 5^\circ\text{C}$ , por el tiempo de una hora, y luego transferir el dedal con su contenido al desecador y dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
- 6.5 Colocar el dedal y su contenido en el aparato Soxhlet, agregar suficiente cantidad de éter anhidro y extraer durante cuatro horas, si la velocidad de condensación es de 5 a 6 gotas por segundo, o durante 16 h, si dicha velocidad es de 2 a 3 gotas por segundo.
- 6.6 Terminada la extracción, recuperar el disolvente por destilación en el mismo aparato y eliminar los restos de disolvente en baño María.
- 6.7 Colocar el balón que contiene la grasa, durante 30 min, en la estufa calentada a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ ; enfriar hasta temperatura ambiente en el desecador y pesar.
- 6.8 Repetir el calentamiento por periodos de 30 min, enfriando y pesando, hasta que la diferencia entre los resultados de dos operaciones de pesaje sucesivas no exceda de 0,2 mg.

## 7. CALCULOS

- 7.1 El contenido de grasa en muestras de harina de origen vegetal, en porcentaje de masa sobre base seca, se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$G = \frac{(m_2 - m_1)}{m(100 - H)} \times 100$$

Siendo:

- G = contenido de grasa en la harina de origen vegetal, en porcentaje de masa.
- m = masa de la muestra, en g.
- $m_1$  = masa del balón vacío, en g.
- $m_2$  = masa del balón con grasa, en g.
- H = porcentaje de humedad en la muestra.

### 8. ERRORES DE MÉTODO

8.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,2%; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

### 9. INFORME DE RESULTADOS

9.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los dos resultados de la determinación.

9.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

9.3 Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

Anexo No. 8.- Determinación de pH.

CDU 664.8



AL 02. 01 - 314

Norma Ecuatoriana	CONSERVAS VEGETALES DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DEL ION HIDRÓGENO (pH)	INEN 389 Primera Revisión 1985-12
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece el método potenciométrico para determinar la concentración del ion hidrógeno (pH) en conservas vegetales.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. INSTRUMENTAL</b></p> <p>2.1 Potenciómetro, con electrodos de vidrio.</p> <p>2.2 Vaso de precipitación de 250 cm<sup>3</sup>.</p> <p>2.3 Agitador.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</b></p> <p>3.1 Si la muestra es líquida, homogeneizarla convenientemente mediante agitación.</p> <p>3.2 Si la muestra corresponde a productos densos o heterogéneos, homogeneizarla con ayuda de una pequeña cantidad de agua (recientemente hervida y enfriada) y mediante agitación.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. PROCEDIMIENTO</b></p> <p>4.1 Efectuar la determinación por duplicado sobre la misma muestra preparada.</p> <p>4.2 Comprobar el correcto funcionamiento del potenciómetro.</p> <p>4.3 Colocar en el vaso de precipitación aproximadamente 10 g ó 10 cm<sup>3</sup> de la muestra preparada, añadir 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada (recientemente hervida y enfriada) y agitar suavemente,</p> <p>4.4 Si existen partículas en suspensión, dejar en reposo el recipiente para que el líquido se decante.</p> <p>4.5 Determinar el pH introduciendo los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando que éstos no toquen las paredes del recipiente ni las partículas sólidas, en caso de que existan.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, Casilla 3909 - Baquerizo 464 - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

#### 5. ERRORES DE METODO

5.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,1 unidades de pH; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

#### 6. INFORME DE RESULTADOS

6.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación.

6.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse además cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

6.3 Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

(Continúa)

**ANEXO No 9.- Determinación de *Salmonella*.**



**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**

Quito - Ecuador

**FE DE ERRATAS**  
(2009-04-03)

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 1529-15:2009**

---

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.  
SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN.**

**Primera Edición**

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. SALMONELLA. DETECTION METHOD

First Edition

En la página 14. Numeral 9.2

Dice:

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisueros con que se aglutinó fueron:...; la marca..."

Debe decir:

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisueros con que se aglutinó fueron:...; la marca..."

<b>Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria</b>	<b>CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN</b>	<b>NTE INEN 1 529-15:95 1995-01</b>
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p><b>1.1</b> Esta norma describe el método de ensayo para detectar <i>Salmonella</i> en alimentos.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. ALCANCE</b></p> <p><b>2.1</b> Este método no es cuantitativo y solo es aplicable para determinar la presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> en los alimentos, en general.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. DEFINICIONES</b></p> <p><b>3.1</b> <i>Salmonella</i>. Género perteneciente a la familia <i>Enterobacteriaceae</i>. Está integrado por microorganismos que forman colonias típicas sobre medios selectivos sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas. Generalmente son móviles, Gram negativas, fermentan la glucosa con formación de gas y no fermentan la lactosa.</p> <p><b>3.2</b> <i>Detección de Salmonella</i>. Es la determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos en una determinada masa, cuando el ensayo es realizado según el método prescrito.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. FUNDAMENTO</b></p> <p><b>4.1</b> Las salmonelas, cuando presentes en los alimentos, generalmente lo están en pequeños números, algunas veces debilitadas y frecuentemente acompañadas de un gran número de otros miembros de <i>Enterobacteriaceae</i>, por tanto, en este método se considera las siguientes etapas:</p> <p><b>4.1.1</b> <i>Pre-enriquecimiento</i>. Cultivo de la muestra a 37°C en medios mínimos sencillos, exentos de agentes químicos selectivos a fin de lograr la revitalización de las salmonelas lesionadas.</p> <p><b>4.1.2</b> <i>Enriquecimiento selectivo</i>. Subcultivo a 37°C y entre 42 a 43°C, en medios líquidos selectivos del cultivo pre-enriquecido, para inhibir o restringir el crecimiento de la flora competitiva y favorecer la multiplicación de las salmonelas.</p> <p><b>4.1.3</b> <i>Siembra en placa de medios selectivos sólidos</i>. Inoculación de los cultivos de enriquecimiento selectivo en la superficie de agares selectivos y diferenciales, para visualizar las colonias que por su aspecto característico se las considera como de <i>Salmonella</i> presuntiva.</p> <p><b>4.1.4</b> <i>Identificación</i>. Subcultivo de las colonias de <i>Salmonella</i> presuntiva y determinación de sus características bioquímicas y serológicas para identificarlas como miembros del género <i>Salmonella</i>.</p>		

## 5. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 El pre-enriquecimiento debe ser utilizado para alimentos que han sido sometidos a tratamientos de conservación: físicos (térmicos, desecación, irradiación); químicos (sal común, curado, ahumado, ácidos y sustancias conservadoras). Los alimentos que no han sido sometidos a tratamiento alguno, o que son altamente contaminados, homogeneizarlos directamente en los medios de enriquecimiento selectivo (8.3).

## 6. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL

### 6.1 Medios de cultivo y reactivos

6.1.1 *Requisitos básicos.* Para que haya uniformidad en los resultados, es necesario que los componentes de los medios sean de una calidad uniforme y de grado analítico o, a su vez, utilizar medios completos deshidratados, que se los reconstituye según las instrucciones del envase.

6.1.2 *Composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos.* Ver NTE INEN 1529-1.

6.1.2.1 Agar bismuto-sulfito (BS)

6.1.2.2 Agar citrato de Simmon

6.1.2.3 Agar cristal-violeta rojo-neutro bills lactosa

6.1.2.4 Agar fenilalanina

6.1.2.5 Agar hierro lisina (LIA)

6.1.2.6 Agar hierro triple-azúcar (TSI)

6.1.2.7 Agar nutritivo semisólido

6.1.2.8 Agar SS

6.1.2.9 Agar urea o caldo urea

6.1.2.10 Agar verde-brillante rojo-fenol (BG)

6.1.2.11 Agua peptona tamponada

6.1.2.12 Caldo base con púrpura de bromocresol

6.1.2.13 Caldo lisina-descarboxilase

6.1.2.14 Caldo MR-VP

6.1.2.15 Caldo selenito cistina

6.1.2.16 Caldo tetracionato (Muller Kauffmann)

- 6.1.2.17 Caldo Triptona (Ljutov)
- 6.1.2.18 Caldo de soya triptica (TSB)
- 6.1.2.19 Caldo nutritivo
- 6.1.2.20 Leche descremada en polvo
- 6.1.2.21 Solución de gelatinasa al 5%
- 6.1.2.22 Solución de hidróxido de sodio 1 N
- 6.1.2.23 Solución alcohólica de  $\alpha$  naftol al 6%
- 6.1.2.24 Solución de ácido clorhídrico 1 N
- 6.1.2.25 Solución de KOH al 40%
- 6.1.2.26 Solución fisiológica
- 6.1.2.27 Solución de creatina al 0,5%
- 6.1.2.28 Solución fisiológica formalizada
- 6.1.2.29 Solución de ONPG (O-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosida)
- 6.1.2.30 Solución verde brillante al 1 %
- 6.1.2.31 Reactivo de Kovacs
- 6.1.2.32 Sulfito de potasio en polvo
- 6.1.2.33 Rojo de metilo
- 6.1.2.34 Tergitol aniónico 7
- 6.1.2.35 Tritón X-100
- 6.1.2.36 Antisueros "VF" y polivalentes "O" y "H".

## 6.2 Instrumental y vidriería

6.2.1 *Requisitos básicos.* Toda la vidriería y utensilios que se utilicen en los ensayos deben ser de material inerte y resistente a esterilizaciones repetidas, además, deben estar perfectamente limpios y estériles.

6.2.1.1 Molino de carne para laboratorio, provisto de placas crivadas, cuyos agujeros no excedan de 4 mm de diámetro.

6.2.1.2 Licuadora de 8 000 a 45 000 rpm, con vasos de metal o vidrio autoclavables, de capacidad adecuada.

6.2.1.3 Equipo para esterilizar medios de cultivo y material: autoclave, almohadillas de asbesto, membranas filtrantes, bujías de porosidad adecuada.

6.2.1.4 Estufa de secado, con regulador de temperatura

6.2.1.5 Incubadora, con regulador de temperatura, para cultivos a 37°C

6.2.1.6 Baño de agua, con regulador de temperatura

6.2.1.7 Incubadora o baño de agua para cultivos entre 42 y 43°C

6.2.1.8 Microscopio

6.2.1.9 Refrigeradora

6.2.1.10 Balanza de 0,1 g de sensibilidad

6.2.1.11 Mechero Bunsen

6.2.1.12 Gradillas o tuberas

6.2.1.13 Asas y agujas para cultivos

6.2.1.14 Materiales varios: cucharas, cuchillos, pinzas, tenedores, espátulas, tijeras, saca-bocados, etc.

6.2.1.15 Tubos de ensayo: de 150 mm x 20 mm; 160 mm x 16 mm; 120 mm x 12 mm; 100 mm x 12 mm

6.2.1.16 Probetas graduadas

6.2.1.17 Pipetas bacteriológicas de punta ancha graduadas en 1/10 de cm<sup>3</sup>

6.2.1.18 Placas Petri de vidrio o desechable de 100 mm x 15mm

6.2.1.19 Erlenmeyer

6.2.1.20 Frascos para muestreo con tapas de rosca, autoclavables

6.2.1.21 Pipetas Pasteur.

## 7. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 La unidad analítica debe provenir de una unidad de muestra de por lo menos 100 g, y se la tomará según la NTE INEN 1529-2. Si el alimento está congelado, a la cantidad necesaria descongela durante la noche entre 2 a 5°C ó, a una temperatura menor de 45°C por aproximadamente 15 minutos, de preferencia, en un baño de agua con agitación.

7.2 Las unidades de muestras perecederas que llegan al laboratorio deben mantenerse en refrigeración (2 a 5°C), por no más de 24 h. En general, las muestras se deben mantener en las condiciones adecuadas al producto, hasta el momento del examen.

## 8. PROCEDIMIENTO

**8.1 Diluyentes.** Los líquidos de dilución empleados para el objeto de esta norma son:

**8.1.1 Agua peptona tamponada.** Para colorantes alimentarios de  $\text{pH} > 6$ ; productos del mar: crustáceos (camarones, cangrejos, etc), moluscos (bivalvos, caracoles), pescados; carnes y productos cárnicos; huevos pasteurizados, líquido o en polvo, productos con huevo; gelatinas y postres de gelatina; frutas y vegetales desecados; productos de panadería y pastelería; pastas alimenticias; quesos.

**8.1.2 Caldo de soya triptica con 0,5% de  $\text{K}_2\text{SO}_3$ .** Para ajos y cebollas en polvo. El sulfito de potasio se añade al caldo antes de esterilizado.

**8.1.3 Caldo de soya triptica.** Para especias como, comino, pimienta, pprika, apio, perejil, tomillo, etc, vegetales en hojuelas, levadura seca.

**8.1.4 Agua destilada estéril.** Para productos desecados con alto contenido en sólidos solubles tales como, leche en polvo, productos desecados para bebes, etc.

**8.1.5 Caldo nutritivo.** Para productos de repostería.

**8.1.6 Leche desnatada en polvo reconstituda.** Para caramelos, chocolates y productos de confitería.

**8.2 Pre-enriquecimiento.** Preparar el homogeneizado con 25g de muestra y 225  $\text{cm}^3$  de diluyente (8.1), y si es necesario, ajustar el pH a  $6,8 \pm 0,2$  con una solución estéril de hidróxido de sodio 1N,  de ácido clorhídrico 1 N,  de fosfato tripotásico al 8% ( $\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

**8.2.1 Productos procesados en general**

**8.2.1.1** Asépticamente, pesar 25 g de la muestra en un frasco de boca ancha con tapa de rosca (500  $\text{cm}^3$ ), adicionar 225  $\text{cm}^3$  de diluyente, homogeneizar a alta velocidad durante 2 minutos. Si la muestra es pequeña, hacer la dilución proporcionalmente y proceder según el método (informar el resultado en base a la cantidad de muestra realmente analizada).

**8.2.1.2** Tapar el frasco y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos.

**8.2.1.3** Mezclar bien y ajustar el pH. Si la muestra es rica en grasa, después de ajustar el pH, adicionar hasta 2,2  $\text{cm}^3$  de Tergitol Aniónico-7 , dos a tres gotas de Trifn X-100, esterilizados a vapor por 15 minutos. Utilizar estos surfactantes en la cantidad mínima necesaria para iniciar la formación de espuma.

**8.2.1.4** Con la tapa aflojada 1/4 de vuelta, incubar a 37°C durante no menos 16 horas y no más de 20 horas.

**8.2.1.5** Continuar con 8.3.6.

**8.2.2 Leche en polvo**

**8.2.2.1** Pesar asépticamente 25 g de muestra, adicionar 225  $\text{cm}^3$  de agua destilada estéril, tapar, mezclar bien y dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

**8.2.2.2** Mezclar y ajustar el pH, adicionar 0,45 cm<sup>3</sup> de verde brillante al 1 % y mezclar bien.

**8.2.2.3** Con la tapa aflojada 1/4 de vuelta, incubar el frasco mínimo 16 horas y máximo 20 horas a 37°C.

**8.2.2.4** Continuar con 8.3.6.

**8.2.3** *Levadura deshidratada.* Utilizando como diluyente caldo de soya triptica, proceder según 8.2.1 y continuar con 8.3.6, excepto que para la levadura deshidratada activa, sustituir el caldo de enriquecimiento selenito cistina por el caldo lauril sulfato triptosa.

**8.2.4** *Galatinas.* Pesar aseptícamente 25g de muestra, adicionar 225 cm<sup>3</sup> de agua peptona tamponada y 5 cm<sup>3</sup> de una solución acuosa de gelatinasa al 5,0% esterilizada por filtración y proceder según 8.2.1.2 a 8.2.1.5

**8.2.5** *Caramelos, chocolates y productos de confitería.* Pesar 25 g de muestra y añadir 225 cm<sup>3</sup> de leche en polvo desnatada reconstituida estéril. Homogeneizar dos minutos a alta velocidad, tapar y dejar 60 minutos a temperatura ambiente. Proceder según 8.2.2.2 a 8.2.2.4 utilizando como agente inhibidor 0,9 cm<sup>3</sup> de una solución acuosa de cristal violeta al 1 % ó 0,45 cm<sup>3</sup> de verde brillante al 1 %.

**8.2.6** *Bivalvos (conchas, almejas, ostiones, ostras).* Las muestras de moluscos frescos con sus valvas deben mantenerse en ambiente seco, a temperaturas de refrigeración inferiores a 10°C evitando que entren en contacto con el hielo. A estas muestras, con valvas, y a las desbulladas no congeladas examinarlas dentro de las seis horas a partir de la colecta, en ningún caso se debe examinar muestras que después de la colecta hayan sido guardadas más de 24 h. Las muestras de conchas desbulladas congeladas deben mantenerse en su estado congelado, a temperaturas próximas a la que se encontraban durante la colecta y pueden analizarse tras períodos más prolongados, siempre que se mantengan ininterrumpidamente congeladas.

**8.2.6.1** En un recipiente estéril, de boca ancha, de cualquier lote de conchas, desbullar aseptícamente 30 conchas sanas.

**8.2.6.2** Al azar, subdividir las 30 conchas en dos porciones de 15 conchas cada una, calcular el peso de cada porción y separar dos volúmenes de agua peptona tamponada en cantidad suficiente para obtener una suspensión de 10<sup>7</sup>.

**8.2.6.3** De cada una de las dos porciones, y dependiendo del peso de cada concha individual, en vasos estériles adecuados para homogeneizar, pesar por separado, alícuotas de aproximadamente 100 g (carne y líquido).

**8.2.6.4** Adicionar 300 cm<sup>3</sup> de agua peptona tamponada a cada vaso y homogeneizar a alta velocidad durante 90 segundos, adicionar el restante del agua peptona hasta obtener la suspensión madre de 10<sup>7</sup>. Mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

**8.2.6.5** Mezclar bien por agitación, ajustar el pH.

**8.2.6.6** Incubar los dos frascos a 37°C por no menos 16 h y no más de 20 h.

**8.2.6.7** Continuar con 8.3.6.

### **8.2.7 Aves**

**8.2.7.1** Colocar la canal, o trozos de la misma, dentro de una bolsa plástica, adicionar 300 cm<sup>3</sup> de agua peptona tamponada y lavarla frotando la superficie de la carcasa durante un minuto.

**8.2.7.2** Asépticamente, retirar la canal y transferir el líquido de enjuague a un frasco con tapa. Proceder según 8.2.1.2 a 8.2.1.5.

**8.2.7.3** Cuando no se requiere de pre-enriquecimiento, recoger el líquido de enjuague en dos frascos, en volúmenes iguales. Al un frasco añadir igual volumen de caldo tetratonato doble concentración, y al otro, caldo selenito cistina doble concentración. Mezclar bien y dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

**8.2.7.4** Continuar con 8.3.4 a 8.3.7 teniendo cuidado de mantener la concentración del verde brillante.

### **8.3 Enriquecimiento selectivo**

**8.3.1** Tomar dos vasos vacíos estériles del homogeneizador (o sustituto) de aproximadamente 500 cm<sup>3</sup> de capacidad. Asépticamente, en cada uno, de las distintas zonas de la unidad de muestra pesar 25 ± 0,1 g (en pequeños pedazos).

**8.3.2** Al uno, añadir 225 cm<sup>3</sup> de caldo selenito cistina y al otro 225 cm<sup>3</sup> de caldo tetratonato sin verde brillante. Sin pérdida de tiempo homogeneizar el alimento a alta velocidad por no más de 2,0 minutos, comenzar con pocas revoluciones hasta llegar entre 15 000 y 20 000 rpm. Omitir la trituración si la muestra es pulverulenta, molida o triturada.

**8.3.3** Asépticamente, transferir el homogeneizado a frascos estériles de boca ancha con tapa de rosca (500 cm<sup>3</sup>) o a otros similares. Dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

**8.3.4** Mezclar bien y ajustar el pH.

**8.3.5** Adicionar 2,25 cm<sup>3</sup> de verde brillante al 0,1 % al frasco con caldo tetratonato, mezclar bien.

**8.3.6** Cuando la muestra ha sido sometida a pre-enriquecimiento (8.2), entre las 16 y 20 horas de incubación, ajustar la tapa y delicadamente mezclar el cultivo de pre-enriquecimiento, pipetear 10 cm<sup>3</sup> en 100 cm<sup>3</sup> de caldo tetratonato verde brillante y otros 10 cm<sup>3</sup> en 100 cm<sup>3</sup> de selenito cistina.

**8.3.7** Incubar el caldo selenito cistina a 37 ± 1°C por 48 horas y el caldo tetratonato entre 42 y 43°C durante 48 horas.

### **8.4 Siembra en placa de medios sólidos selectivos y diferenciales**

**8.4.1** Cuando el período de incubación de los medios tetratonato y selenito alcanza entre las 18 y 24 h, ajustar las tapas y de cada uno de ellos, con asa de cultivo sembrar en estría sobre la superficie seca de placas de agar verde-brillante rojo-fenol (BG), agar *Salmonella-Shigaña* (SS), agar bismuto sulfito (BS) de manera a obtener colonias aisladas (primer subcultivo).

**8.4.2** Invertir las placas e incubarlas a 37 ± 1°C por 24 h.

**8.4.3** Al término de las 48 horas de incubación de los caldos de enriquecimiento selectivo (8.3.7), de cada uno de ellos, realizar en idéntica forma un segundo subcultivo.

**8.4.4** Examinar las placas entre las 20 y 24 horas, si el crecimiento es pobre y no aparecen colonias típicas de salmonelas, examínarlas después de 24 horas más de incubación.

**8.4.5** *Aspecto de las colonias de Salmonella en los medios de agar selectivos*

**8.4.5.1** *Agar verde-brillante rojo-fenol.* La mayoría de las colonias típicas de salmonelas son opacas o translúcidas de color rosa o rojo oscuro, y el medio que las rodea varía de rosáceo a rojo. Las colonias típicas pueden presentarse incoloras, otras pueden aparecer de un color verde translúcido cuando están rodeadas por colonias de color verde o verde amarillento de microorganismos fermentadores de la lactosa o sacarosa. Las salmonelas fermentadoras de la lactosa (menos del 1%) presentarán colonias de color verde amarillento o verde.

**8.4.5.2** *Agar Salmonella-Shigella.* La mayoría de las colonias típicas de salmonelas son opacas o translúcidas, incoloras o de color crema, con o sin centro negro. Las pocas salmonelas que fermentan la lactosa presentan colonias lisas de color rosa o naranja.

**8.4.5.3** *Agar bismuto-sulfito.* Las colonias típicas tienen el centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias ("ojo de conejo", "ojo de pez"). El medio que las rodea es, generalmente, oscuro al principio, tornándose negro a medida que aumenta el período de incubación, produciéndose el llamado efecto halo. Algunas cepas pueden producir colonias verdes con poco o ningún oscurecimiento del medio circundante.

**ADVERTENCIA.** Cualquier colonia típica o sospechosa debe ser confirmada, ya que reconocer las colonias de *Salmonella* supone mucha experiencia y el aspecto puede variar no solo de especie a especie sino también de lote a lote de medio de cultivo.

**8.5** *Selección y purificación de las colonias que serán confirmadas*

**8.5.1** *Selección.* De cada placa de medio selectivo (8.4) seleccionar 5 colonias típicas o sospechosas bien aisladas y sembrarlas directamente en agar TSI y en LIA (8.6.1). Si en una placa hay menos de cinco colonias típicas, sembrar todas.

**8.5.2** *Purificación de las colonias elegidas*

**8.5.2.1** Si en alguna placa, las colonias típicas o sospechosas están contaminadas con colonias de otras enterobacterias, con un asa inocular estas colonias en caldo tetrionato y en caldo selenito - citina y proceder según 8.3.7 y 8.4.

**8.5.2.2** Si en alguna placa no hay colonias bien aisladas, con un asa de cultivo, sin rozar en el agar, tocar solo el centro de la colonia seleccionada y sembrar en estria la superficie seca de placas individuales de agar cristal-violeta rojo-neutro bilitis lactosa (ó BG ó, agar MacConkey), de tal manera que se obtengan colonias bien aisladas.

**8.5.2.3** Invertir las placas e incubarlas a 37°C por 20 a 24 horas.

**8.5.2.4** Elegir colonias incoloras (lactosa negativas), resemebrarlas en tubos de agar nutritivo inclinado e incubarlas a 37°C por 20 a 24 horas.

**8.5.2.5** Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar nutritivo inclinado y tefirlas por el método de Gram. Si se comprueba la pureza de los cultivos, utilizarlos para la confirmación bioquímica y serológica.

## 8.6 Confirmación bioquímica

### 8.6.1 Prueba exploratoria

8.6.1.1 De los cultivos purificados (8.5.2.5) o, directamente de cada una de las colonias típicas (8.5.1), evitando rozar en el agar selectivo, tocar con la aguja solo en el centro y superficie de la colonia elegida.

8.6.1.2 Inocular en agar TSI y en agar LIA, inoculando primero un medio y, sin flamear la aguja, inocular el segundo medio de la misma manera. Sembrar por picadura la columna del agar y la superficie inclinada en estrías, tapar-los con un tapón flojo. En la columna del agar LIA, hacer dos picaduras (la columna de éste, debe ser de por lo menos 3cm de altura y el sesgo corto).

8.6.1.3 Incubar los tubos de TSI y LIA entre 35 y 37°C por 24 ± 2 horas y 48 ± 2 horas, respectivamente.

8.6.1.4 Examinar conjuntamente los cambios habidos en el TSI y en el LIA e interpretar de la siguiente manera:

Reacciones típicas:

Agar TSI

Agar LIA

Columna:

Columna:

- Amarilla: reacción ácida, por fermentación de la glucosa
- Burbujas o grietas en el agar: gas a partir de la glucosa (la *S.typhi* y *S.gallinarum* fermentan sin producción de gas).
- Sin ennegrecimiento: sin producción de H<sub>2</sub>S
- Ennegrecimiento: producción de H<sub>2</sub>S

- Púrpura: reacción alcalina, por descarboxilación de la lisina
- Ennegrecimiento: producción de H<sub>2</sub>S
- Sin ennegrecimiento: sin producción de H<sub>2</sub>S.

Lengüeta:

- Roja o inalterada: reacción alcalina, sin fermentación de la lactosa y sacarosa
- Amarilla: reacción ácida por utilización de la lactosa o sacarosa (menos del 1 % de las salmonelas fermentan la lactosa y la lengüeta será amarilla).

8.6.1.5 Purificar los cultivos mixtos en TSI o LIA siguiendo lo indicado en los numerales 8.5.2.

**8.6.2 Pruebas complementarias.** A partir de cada cultivo purificado que presenta reacciones de presuntas salmonelas en agar TSI y LIA, realizar las siguientes pruebas:

**8.6.2.1 Prueba de la ureasa.** Sembrar en estría sobre la superficie de agar urea inclinado (o caldo). Incubar entre 24 y 48 horas a 37°C. La reacción es positiva cuando el color del medio cambia a rosa más intenso o cereza intenso. El medio inalterado indica una reacción negativa. Las salmonelas dan reacción negativa.

**8.6.2.2 Prueba de la lisina-decarboxilasa.** Inocular en el fondo de la superficie líquida del caldo lisina-decarboxilasa, vedar con vaselina líquida estéril. Incubar 24 horas a 37°C. La reacción es positiva cuando el color del medio es púrpura, el cambio a amarillo indica una reacción negativa. Si el color del medio no es ni púrpura ni amarillo, añadir una o dos gotas de una solución al 0,2% de púrpura de bromocresol y volver a leer. Las salmonelas dan reacción positiva.

**8.6.2.3 Prueba de la  $\beta$  galactosidasa**

- a) En un tubo estéril hacer una suspensión bacteriana densa con 0,5 cm<sup>3</sup> de solución salina estéril, agregar una gota de tolueno y agitar vigorosamente. Incubar el tubo en baño de agua a 37°C por 10 minutos. Añadir 0,25 cm<sup>3</sup> de la solución tamponada 0,0133 M de ONPG, agitar e incubar en baño de agua a 37°C por 24 horas. La reacción es positiva cuando aparece un color amarillo, frecuentemente la reacción suele ser apreciable antes de tres horas. Las salmonelas dan reacción negativa.
- b) También se puede utilizar discos impregnados de ONPG que se los añade a la suspensión bacteriana, luego, se agita el tubo delicadamente e incuba de 4 a 6 horas a 35°C.

**8.6.2.4 Prueba de Voges-Proskauer**

- a) Sembrar en un tubo de caldo glucosa fosfato (caldo MR- VP) el cultivo en análisis, incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- b) Después de este período, añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:
  - b.1) Solución alcohólica de  $\alpha$  naftol al 6%: 3 gotas
  - b.2) Solución de KOH al 40%: 2 gotas
  - b.3) Solución de creatina al 0,5%: 2 gotas (para acelerar la reacción, es opcional).
- c) Leer el resultado después de 4 horas, el color rosa - rojo rubí del medio indica una reacción positiva y es negativa cuando permanece inalterado. Frecuentemente la reacción es apreciable a los 15 minutos. Las salmonelas dan reacción negativa.

**8.6.2.5 Prueba del indol.** Sembrar en un tubo de agua triptona el cultivo en análisis. Incubar 24 horas a 37°C. Adicionar al tubo 0,2 ó 0,3 cm<sup>3</sup> del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo oscuro en la capa del reactivo indica una reacción positiva, amarillo una reacción negativa. Las salmonelas son indol negativas.

**8.6.2.6 Prueba de la fenilalanina-desaminasa.** Sembrar en estría sobre la superficie inclinada de agar fenilalanina. Incubar 24 horas a 37°C. Después de este período añadir unas gotas de solución de cloruro férrico 0,5 M. La reacción es positiva cuando aparece un color verde-azulado oscuro. Las salmonelas dan reacción negativa.

**8.6.2.7 Prueba de la utilización del citrato.** Sembrar en estria sobre la superficie inclinada de agar citrato de Simmon. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C. El cambio del color del medio a un azul fuerte indica una reacción positiva. La mayoría de las salmonelas dan reacción positiva.

**8.6.2.8** En la Tabla 1 se resume las características bioquímicas y serológicas de la *Salmonella*. Cualquier cultivo que no haya sido claramente identificado como perteneciente, o no, al género *Salmonella* se debe someter a pruebas bioquímicas adicionales, tales como: pruebas relacionadas con aminoácidos, hidratos de carbono, resistencia al KCN, utilización de fuentes de carbono.

### **8.7 Confirmación serológica**

**8.7.1** Para la determinación en porta-objetos de los antígenos "O", "H" y "Vi" de las salmonelas, utilizar cultivos puros de 18 a 24 h en agar nutritivo inclinado, no autoaglutinables, procedentes del crecimiento en TSI y LIA. Por este procedimiento, que a continuación se indica, no es posible la confirmación serológica de las cepas autoaglutinables (se aglutinan espontáneamente en ausencia de antisuero).

#### **8.7.2 Análisis del antígeno somático "O" y capsular "Vi"**

**8.7.2.1** Comprobar la eficacia de los antisueros, ensayando el antisuero con cultivos testigos conocidos.

**8.7.2.2** Preparar una suspensión densa del microorganismo en análisis, suspendiendo el crecimiento del agar inclinado (8.7.1) en aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de solución fisiológica. Tener cuidado para asegurar una suspensión uniforme.

**8.7.2.3** En una lámina de vidrio o en la cara interna de una placa Petri de vidrio marcar con un lápiz grueso secciones de alrededor 2,5 cm de lado.

**8.7.2.4** Poner una gota (0,05 cm<sup>3</sup>) de la suspensión bacteriana (8.7.2.2) en cada una de dos secciones marcadas, adyacentes.

**8.7.2.5** Colocar una gota de solución salina sobre una de las gotas de la suspensión bacteriana. Utilizando un asa de cultivo limpia y estéril, mezclar bien. Es el control negativo de la suspensión bacteriana y no debe aglutinarse. Desechar el cultivo si hay aglutinación.

**8.7.2.6** Colocar una gota del antisuero *Salmonella* O poly A sobre la otra gota de la suspensión bacteriana, mezclar bien. Continuar con el poly B.

**8.7.2.7** Balancear el porta o la placa Petri, por 1 ó 2 minutos, evitar una evaporación excesiva.

**8.7.2.8** Observar la reacción contra un fondo negro, de preferencia con ayuda de una lupa. La aglutinación positiva será rápida y completa. Una aglutinación retrasada o parcial considerarla negativa.

**8.7.2.9** Si se obtiene un resultado negativo con poly A o poly B, ensayar con el antisuero *Salmonella* Vi de la manera indicada.

**8.7.2.10** Si el cultivo se aglutina con el antisuero *Salmonella* Vi, calentar la suspensión bacteriana en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriar. Una vez fría, volver a ensayarla con el antisuero Vi y con los antisueros O de grupo: D<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>.

y con los antisueros O de grupo: D<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>.

**TABLA 1. Reacciones bioquímicas y serológicas de los miembros del género *Salmonella*.**

Prueba o sustrato	Positiva	Negativa	Reacción positiva, + o negativa, -	% medio de serotipos que tienen esta reacción (1)
TSlglucosa-ácido	Columna amarilla	Columna roja	+	100
TSlglucosa-gas	Burbujas-grietas	Sin burbujas ni grietas	+	91,9
TSlactosa-ácido	Lengüeta amarilla	Lengüeta roja	-(a)	99,2
TSlcsacarosa-ácido	Lengüeta amarilla	Lengüeta roja	-	99,5
TSlH <sub>2</sub> S	Ennegrecimiento	Sin ennegrecimiento	+	91,6
Ureasa	Color rojo púrpura	Color inalterado	-	100
Decarboxilación de la lisina	Color púrpura	Color amarillo	+	94,6
β-galactosidasa	Color amarillo	Sin cambio	-(a)	98,5
Voges Proskauer	Color rosa a rojo	Color inalterado	-	100
Indol	Anillo púrpura (superficie)	Anillo amarillo	-	98,9
Fenilalanina-desaminasa	Verde-azulado obscuro	Color inalterado	-	100
Utilización de citrato	Crecimiento y color azul	Sin crecimiento y color inalterado.	v	87,1
Suero polivalente "O"	Aglutina	No aglutina	+	100
Suero polivalente "H"	Aglutina	No aglutina	+	100

(1) +, -, indican que las reacciones son positivas o negativas en 1 o 2 días; v, variable. Estos porcentajes solo indican que no todas las cepas de *Salmonella* reaccionan conforme a lo calificado como + ó -. Estos porcentajes pueden variar de país a país y de producto alimenticio a producto alimenticio.

(a) El subgénero III de *Salmonella* (*Arizona*) puede dar reacciones lactosa y β-galactosidasa positivas; el subgénero II de *Salmonella* puede dar una reacción lactosa negativa, pero una reacción β-galactosidasa positiva.

## 9. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

9.1 Si en ninguna de las placas de agar selectivo sembradas con el cultivo de enriquecimiento selectivo, se desarrolla colonia alguna de *Salmonella*, reportar: "No se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio sólido selectivo secundario fue (SS, bismuto sulfito...)".

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisueños con que se aglutinó fueron:..., la marca..."

## 10. INFORME DEL ENSAYO

10.1 En el informe del ensayo reportar el resultado como se indica en el numeral 9. Además, indicar la norma de referencia y el nombre exacto del Centro donde se identificó la cepa.

10.2 Indicar cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional. El reporte debe incluir todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra.

**Anexo No. 10.- Análisis Bromatológico, Cuantificación de Hierro.**



**EXAMEN BROMATOLÓGICO DE ALIMENTOS**

**CÓDIGO: 191-14**

**CLIENTE:** Srta. Flor Soliz

**TIPO DE MUESTRA:** Minis

**FECHA DE RECEPCIÓN:** 04 de julio del 2014

**FECHA DE MUESTREO:** 04 de julio del 2014

**EXAMEN FÍSICO**

**COLOR:** Café

**OLOR:** Característico.

**ASPECTO :** Homogéneo, libre de sustancias extrañas.

DETERMINACIONES	UNIDADES	MÉTODO DE ANÁLISIS	VALOR ENCONTRADO
Harina A"	mg/kg	Espectrofotométrico	206.29
Mini A 0%	mg/kg	Espectrofotométrico	3.39
Mini B 5%	mg/kg	Espectrofotométrico	25.57
Mini C 10%	mg/kg	Espectrofotométrico	31.1
Mini D 15%	mg/kg	Espectrofotométrico	41.59

**RESPONSABLES:**

**Dra. Gina Álvarez R.**



**Dra. Fabiola Villa**

El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo; el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.

\*La muestra es receptada en laboratorio.

Anexo No. 11.- Análisis Microbiológico, Mini cupcake 0% o Blanco.



EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

CÓDIGO 166-14

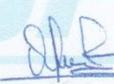
<b>CLIENTE:</b> Srta. Flor Soliz			
<b>DIRECCIÓN:</b> Álamos		<b>TELÉFONO:</b>	
<b>TIPO DE MUESTRA:</b> nimi A 0%			
<b>FECHA DE RECEPCIÓN:</b> 04 de julio de 2014			
<b>FECHA DE MUESTREO:</b> 04 de julio de 2014			
<b>EXAMEN FISICO</b>			
COLOR: Café			
OLOR: Chocolate			
ASPECTO: Homogéneo , libre de material extraño			
PARÁMETROS	MÉTODO	RESULTADO	*REFERENCIAL
Aerobios mesófilos UFC/g	Siembra vertido en placa	10	1 x 10 <sup>5</sup>
Mohos y levaduras UPC/g	Siembra en extensión	Ausencia	1 x 10 <sup>3</sup>
Coliformes totales UCF/g	Siembra vertido en placa	Ausencia	1 x 10 <sup>2</sup>
Salmonella UFC/25g	Método Betas star	Ausencia	Ausencia
<b>*Tesis Galarza M R; Cairo Y. 2013</b>			
<b>OBSERVACIONES:</b>			
<b>FECHA DE ANÁLISIS:</b> 04 de julio del 2014			
<b>FECHA DE ENTREGA :</b> 11 de julio del 2014			
<b>RESPONSABLES:</b>			
<b>Dra. Gina Álvarez R.</b>		<b>Dra. Fabiola Villa</b>	
El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo, el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.			
*Las muestras son receptados en laboratorio.			

**Anexo No. 12.- Análisis Microbiológico, Mini cupcake 10% de Harina de Sangre en la Formulación**



**EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS**

**CÓDIGO 167-14**

<b>CLIENTE:</b> Srta Flor Soliz			
<b>DIRECCIÓN:</b> Álamos		<b>TELÉFONO:</b>	
<b>TIPO DE MUESTRA:</b> nimi C 10%			
<b>FECHA DE RECEPCIÓN:</b> 04 de julio de 2014			
<b>FECHA DE MUESTREO:</b> 04 de julio de 2014			
<b>EXAMEN FISICO</b>			
COLOR: Café			
OLOR: Chocolate			
ASPECTO: Homogéneo , libre de material extraño			
PARÁMETROS	MÉTODO	RESULTADO	*REFERENCIAL
Aerobios mesófilos UFC/g	Siembra vertido en placa	70	$1 \times 10^5$
Mohos y levaduras UPC/g	Siembra en extensión	Ausencia	$1 \times 10^3$
Coliformes totales UCF/g	Siembra vertido en placa	Ausencia	$1 \times 10^2$
Salmonella UFC/25g	Método Betas star	Ausencia	Ausencia
<b>*Tesis Galarza M R; Cairo Y. 2013</b>			
<b>OBSERVACIONES:</b>			
FECHA DE ANÁLISIS: 04 de julio del 2014			
FECHA DE ENTREGA : 11 de julio del 2014			
<b>RESPONSABLES:</b>			
			
			
 <b>Dra. Gina Álvarez R.</b> Servicios Analíticos Químicos y Microbiológicos <b>Dra. Fabiola Villa</b>			
El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo, el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.			
*Las muestras son receptados en laboratorio.			