

T1Q/000283/A33

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
Facultad de Ingeniería Química
Escuela Profesional de Ingeniería Química



“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FERMENTATIVA DE GLICÓSIDOS DE STEVIA REBAUDIANA BERTONI EN PULPA DE GUANÁBANA (*Annona muricata*)”

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUÍMICO

PRESENTADO POR : ALARCÓN SILVA, OLINDA

ASESOR : MSC. GUTIERREZ CUBA, CÉSAR



BELLAVISTA-CALLAO
2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Olinda Alarcón Silva".

A handwritten signature in black ink, appearing to read "César Gutiérrez Cuba".

PRÓLOGO DEL JURADO

La tesis fue sustentada por la bachiller Olinda Alarcón Silva, ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes docentes:

Mg. PABLO BELIZARIO DÍAZ BRAVO	: Presidente
Mg. MARIA ESTELA TOLEDO PALOMINO	: Secretaria
Ing. VIORICA STANCIUC STANCIUC	: Vocal
Mg. CESAR GUTIÉRREZ CUBA	: Asesor

Tal como está sentado en el libro de actas de sustentación de tesis: **LIBRO 2 FOLIO N° 51 ACTA N° 234** con fecha ocho del mes de junio de dos mil doce.

AGRADECIMIENTOS

Al Msc. José R. Cáceres Paredes, Msc Edgar Zarate Sarapura y mi asesor Msc. César Cuba Gutierrez por la ayuda en la realización del presente trabajo de investigación. También a mis compañeros de la FIQ con quienes compartí en los laboratorios del CET-UNAC.

DEDICATORIA

A Dios,
Mis padres
Y hermanos.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Planteamiento del Problema.....	10
1.2 Formulación del problema.....	11
1.3 Objetivos de la Investigación.....	12
1.4 Justificación.....	13
1.5 Limitaciones.....	14
1.6 Hipótesis.....	14
1.7 Variables.....	15
II. MARCO TEORICO.....	17
2.1 Antecedentes.....	17
2.2 Tecnología de las Frutas.....	20
2.2.1 La Guanábana (<i>Annona muricata</i> L.).....	20
2.2.2 Las Levaduras.....	22
2.3 Los Néctares de Fruta.....	24
2.3.1 Elaboración de néctar.....	24
2.4 Los Edulcorantes.....	27
2.4.1 Los Edulcorantes no calóricos naturales.....	28
2.4.2 La Stevia Rebaudiana Bertoni.....	29
2.5 Parámetros de cinética de crecimiento bacteriano.....	33
III. MATERIALES,EQUIPOS Y MÉTODOS.....	34
3.1 Materiales.....	34
3.2 Equipos.....	34
3.3 Métodos.....	37

3.3.1 Aislamiento de levaduras nativas de guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	37
3.3.2 Elaboración de néctar de guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	41
3.3.3 Determinación de los parámetros fermentativos.....	45
3.3.4 Efecto de diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana.....	48
IV. RESULTADOS.....	49
4.1 Levaduras nativas de guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	49
4.1.1 Tiempo de reducción decimal.....	49
4.2 Análisis fisicoquímicos de la pulpa y del néctar de guanábana.....	53
4.3 Parámetros cinéticos de crecimiento de las levaduras.....	54
4.4 Parámetros fermentativos del néctar inoculado con levaduras.....	56
4.5 Efecto de diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana.....	66
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	67
VI. CONCLUSIONES.....	73
VII. RECOMENDACIONES.....	74
VIII. REFERENCIAS.....	75
APENDICES.....	81
APENDICE N° 1 Análisis estadístico de <i>Hansenula anomala</i>	82
APENDICE N° 2 Análisis estadístico de <i>Saccharomyces Cerevisae</i>	83
APENDICE N° 3 Análisis estadístico de las levaduras inoculadas en el néctar de guanábana.....	84
APENDICE N° 4 Análisis estadístico de la presión gas.....	85
APENDICE N° 5 Análisis estadístico de pH.....	86
APENDICE N° 6 Análisis estadístico de Acidez.....	87

APENDICE N° 7 Análisis de los grados Brix (°B).....	88
ANEXOS.....	89
ANEXO N° 1 Constancia de realización de tesis en el CET.....	90
ANEXO N° 2 Especificaciones técnicas de Stevia Rebaudiana Bertoni..	91
ANEXO N° 3 Preparación del medio de cultivo para el crecimiento y recuento de las levaduras nativas de guanábana.....	92
ANEXO N° 4 Sistema de identificación de levaduras.....	92
ANEXO N° 5 NTP 203.070: 1977.....	93
ANEXO N° 6 Ficha técnica del Agar ogye.....	94
ANEXO N° 7 Ficha técnica del kit de glucosa.....	95
ANEXO N° 8 Software Microfit 1.0	97

PROLOGO

Las tendencias actuales de consumo, han llevado al desarrollo de productos dietéticos y naturales que han adquirido importancia, debido a características de salud, estética y por supuesto el disfrute de los alimentos. Las bebidas a base de frutas, como lo son los néctares edulcorados con Stevia, satisfacen estos requerimientos ya que la Stevia es un edulcorante natural alternativo al azúcar y a los edulcorantes sintéticos, que al no poseer calorías hace al néctar un producto más saludable ya que la ingesta de los glicósidos de Stevia no afecta los niveles de azúcar en la sangre.

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo determinar la actividad antifermmentativa de los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana (*Annona muricata*). Para el cumplimiento de dicho objetivo, se realizó tres tratamientos de néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni con concentraciones de 0,74 g/L; 0,50 g/L y 0,32 g/L a las cuales se les inoculó levaduras nativas aisladas de la fruta de guanábana (*Annona muricata*). Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por ml de muestra (UFC/mL) cada 30 minutos durante los 3 horas, realizando el seguimiento de la presión (Kpa), pH, % acidez, glucosa y °B. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia ($p=0.05$) demostrando que hubo diferencia significativa entre los tratamientos. El resultando es menor crecimiento microbiano y menor formación de CO₂ (expresado como la presión) en el néctar elaborado con 0,50 g/L de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

La industria de bebidas a partir de frutas incorpora variedad de aditivos para conservar su tiempo de vida útil e inocuidad, sin embargo la presencia de levaduras termoresistentes obligan a utilizar elevadas temperaturas de pasteurización que alteran las bondades de las pulpas y de su estructura molecular. Reemplazando la sacarosa por glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni se obtendrá un producto dulce al paladar, bajo en calorías.

Los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni son un endulzante natural alternativo al azúcar y a los endulzantes artificiales, obtenido a partir de un arbusto originario de Paraguay y Brasil. Ha sido usado desde tiempos muy antiguos, como endulzante, por los indios guaraníes y que en países como Japón, hoy en día, supone el 41 % de los endulzantes consumidos.

El edulcorante que se extrae de las hojas de Stevia Rebaudiana Bertoni es aproximadamente hasta 300 veces más dulce que el azúcar, las hojas secas son entre 20 y 35 veces más dulces que el azúcar (DÍAZ, et al, 1999).

Esta planta fue introducida al Perú hace una década y actualmente se ha incorporado en el portafolio de cultivos en pequeñas extensiones en Cajamarca, Amazonas, San Martín Ucayali y Apurímac de manera orgánica (INCAAGRO Y EDAC, 2008).

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

¿Fermentan los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana (*Annona muricata*) por acción de levaduras nativas de guanábana?

1.2.2 Problemas Específicos

a) ¿Qué levaduras se encuentran en el fruto de guanábana (*Annona muricata*)?

b) ¿Cuáles son los parámetros de cinética de crecimiento de las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*) en néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni?

c) ¿Qué parámetros fermentativos se afectan usando glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni por acción de levaduras de guanábana (*Annona muricata*)?

d) ¿Cómo es el comportamiento de diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en el proceso fermentativo en néctar de guanábana (*Annona muricata*)?

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antifermentativa de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana (*Annona muricata*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Aislar levaduras nativas del fruto de guanábana (*Annona muricata*) y determinar su tiempo de reducción decimal (D) a 50 °C, 60 °C y 70 °C.

- b) Determinar los parámetros de cinética de crecimiento de las levaduras nativas termoresistente de guanábana, en néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni.

- c) Determinar la producción de dióxido de carbono CO₂ y la variación de pH usando glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni por acción de levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*).

- d) Comparar el comportamiento de tres concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni durante el proceso fermentativo en el néctar de guanábana (*Annona muricata*).

1.4 Justificación

El presente trabajo permitió obtener una bebida a partir de fruta, que al estar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni, hace a dicha bebida más natural ya que al ser dicho glicósidos no metabolizable no será necesario adicionar al néctar de guanábana aditivos químicos para inhibir o eliminar microorganismos fermentativos.

Además cada vez crece más el número de consumidores cuya preferencia o necesidad es dirigida hacia los alimentos de mínimo proceso, preparados sin conservadores químicos, con la adición de algún ingrediente benéfico.

El steviosido es un endulzante natural alternativo al azúcar y a los endulzantes sintéticos como son el aspártame, la sucralosa, el cyclamato y la sacarina. Además de que los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni no aportan calorías, su ingesta no afecta los niveles de azúcar en la sangre, sino todo lo contrario, restablece la tolerancia a la glucosa siendo recomendada a pacientes con diabetes tipo 2 (PEÑA, 2006).

Hoy en día la Stevia es una opción diferente para la dieta diaria. Existen muchas empresas dedicadas a su procesamiento y comercialización, así como también se multiplican las investigaciones científicas en Japón, Estados Unidos, Suiza, Italia y Alemania (SANTILLAN, 2002).

1.5 Limitaciones de la investigación

El presente trabajo de investigación está limitado por las condiciones de preparación del néctar de guanábana que fue a nivel de laboratorio, el número de repeticiones está supeditado a las condiciones del Laboratorio de análisis químico y laboratorio de microbiología del Centro Experimental Tecnológico (CET) de la Universidad Nacional del Callao debido a los costos de reactivos y medios de cultivo, por otro lado para determinar la actividad antimicrobiana de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni se realizó de manera forzada por la inoculación de levaduras en néctar de guanábana.

1.6 Hipótesis

1.6.1 Hipótesis General

Si los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni no fermentan en néctar de guanábana (*Annona muricata*) por acción de sus levaduras nativas, entonces se puede utilizar como edulcorante evitando así el uso de aditivos químicos para inhibir o eliminar microorganismos termoresistentes fermentativos.

1.6.2 Hipótesis Especificas

- a) Las levaduras nativas del fruto de guanábana son de la clase ascomicetos y tienen menor tiempo de reducción decimal "D" a 70 °C que a 50 °C y 60 °C.

b) Los parámetros de cinética de crecimiento de las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*) son la velocidad de crecimiento (μ_{max}), tiempo de latencia (t-lag) y el tiempo generacional (t-gen).

c) La acción fermentativa de las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*) sobre néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni produce dióxido de carbono CO₂ y la variación de pH.

d) Las tres concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni regulan o inhiben el proceso fermentativo del néctar de guanábana (*Annona muricata*).

1.7 Variables

1.7.1 Variables Independientes

Concentración de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana (*Annona muricata*).

1.7.2 Variables Dependientes

La actividad antimicrobiana de los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana (*Annona muricata*) en presencia de sus levaduras nativas.

CUADRO N° 1: Descripción de las Variables

VARIABLE	TIPO	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
Concentración de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni	Cuantitativa	Comportamiento de levaduras en néctar de guanábana.	Parámetros de cinética de crecimiento: Tiempo de latencia(t-lan) Velocidad de crecimiento(μ_{max}) Tiempo de generación (t-gen)	g/L (de glicósidos en néctar de Guanábana)
Actividad antimicrobiana de los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana	Cuantitativa	Parámetros fermentativos en el néctar de guanábana.	- CO ₂ - Acidez titulable - PH - sacarosa - [] de glucosa	KPa % acido Unidades de PH °B g/L

Fuente: Elaboración Propia

Causa: concentración de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni.

Efecto: la actividad antimicrobiana de los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana (*Annona muricata*).

II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes

Según (ROJAS *et al*; 2007) la demanda de edulcorantes naturales va en aumento en el mundo debido principalmente a los efectos secundarios que producen los edulcorantes sintéticos. Por ejemplo, Japón ya ha sustituido la mitad del consumo de azúcar de caña por glicósidos de Stevia y en este país están prohibidos los edulcorantes sintéticos desde años 70. Señalan también que el consumo ya sea como hierba o como productos industrializados, derivados de esta especie vegetal, se presenta muy interesante, pues está destinada a sustituir el uso de edulcorantes sintéticos como el aspartame, sacarinas, ciclamatos, etc.

Según (JARAMILLO *et al*; 2011) debido al incremento del biocombustible y a la utilización casi total de la caña de azúcar y la glucosa de otros alimentos se ha buscado la forma de encontrar sustitutos directos del azúcar y parar la incesante batalla contra los problemas de salud ocasionada por la misma (azúcar) y una alternativa a estos sustitutos es la Stevia Rebaudiana B.

(DIAZ *et al*; 1999) concluyen que el consumo de edulcorantes no calóricos, se da en una mayor proporción en el mercado industrial (Bebidas gasificadas, yogurt, etc.) del Japón razón por la cual direccionan su proyecto a captar un % de demanda de dichas industrias (3% en el caso de la Stevia producida en el Perú).

Según (ROJAS, 2009) la *Stevia* previene e inhibe infecciones causadas por bacterias y otros organismos patógenos, mejorando la resistencia frente a cepas que causan resfriados y gripes. Es efectiva contra las bacterias *E.coli*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium diphtheriae* así como también contra el hongo *Cándida albicans* y no afecta a bacterias útiles como la bifidobacteria y la bacteria ácido – láctica.

(ORBERÁ, 2004) estudió el aislamiento de cepas de levaduras a partir de frutos y vegetales procesados de forma parcial, reveló que la mayor cantidad de especies ascomycetes se encuentran sobre frutos, mientras que las basidiomycetes predominan sobre vegetales. Dentro de los grupos de basidiomycetes predominan muchas especies psicrófilas y de fermentación baja, capaces incluso de reinfectar vegetales conservados en cámara fría, a temperaturas por debajo de los 0°C, hasta -18 °C, ej. *Cry. albidus*, *Cry. laurentii*, *Cry. macerans*, *Spo. roseus* y *Rho. glutinis*.

(MULLER, 1981) afirma que la mayor parte de formas vegetativas microbianas se destruyen en pocos minutos a 70 °C, sin embargo existen diferentes especies microbianas con distinta resistencia al calor.

La fisiología microbiana, como edad de las bacterias, y el estado del alimento, influye también en la termoresistencia. Las bacterias “jóvenes” en fase de crecimiento logarítmico son más sensibles al calor que las “viejas” en fase de declive. Las esporas sobre todo las de *bacillus* y *clostridium*, así como las ascosporas de algunos mohos son muy resistentes al calor, las

ascosporas de *Byssochlamys fulva*, hongo que se desarrolla en algunas frutas y productos derivados no se destruyen a las temperaturas y tiempos de pasteurización normales en la industria; su valor "D" en calor húmedo a 88 °C es de 10 minutos.

(SATHISHKUMAR *et al*; 2008) estudiaron la actividad antimicrobiana in-vitro del extracto de Stevia Rebaudiana Bertoni en cuatro solventes, contra bacterias como *staphylococcus aureus*, *salmonella typhi*, *escherichia coli*, *bacillus subtilis*, *aeromonas hydrophila* y en levaduras como *candida albicans*, *cryptococcus neoformans*, *trichophyton mentagrophytes* y *epidermophyton*. El resultado fué que el extracto de Stevia tiene propiedades antimicrobianas en los cuatro solventes utilizados frente a las levaduras *candida albicans* y *epidermophyton*. También que el extracto de Stevia en acetona tiene un mejor actividad contra los microorganismos gram positivos que con los gram negativos.

2.2 Tecnología de las Frutas

Según (Sanez, 2007) las frutas constituyen un factor importante en la alimentación humana, deseable por sus excelentes características organolépticas de sabor color y aroma; así como por su valor nutritivo.

Su importancia nutritiva se debe al gran aporte que hace a la dieta alimenticia de azúcares, de gran valor energético, vitamina, minerales, ácidos orgánicos, estimulantes glandulares digestivos y enzimas. Las características organolépticas atractivas de sabor, color y aroma, han hecho que las frutas tengan una gran aceptabilidad y su utilización sea de lo más variada, pues se consume en forma de bebidas, purés, tortas, helados, mermeladas, compotas, etc.

El Perú por sus características geográficas, posee una multiplicidad de condiciones ecológicas, lo que da la posibilidad de producción de gran variedad de frutas; sin embargo, el desarrollo frutícola se ha mantenido en forma bastante limitada a pesar de que los frutales constituyen cultivos de relativa alta rentabilidad económica comparada con otros.

2.2.1 La Guanábana (*Annona muricata* L.)

La Guanábana es una especie de la familia Annonacea, del género *Annona*; incluye muchas especies diversas del grupo Guanabaní y a la Sección evannona. Se le conoce con el nombre científico *Annona muricata* L.

La especie es originaria de las Antillas y se difundió a los países tropicales de América y África occidental (OJEDA *et al*; 2007).

La fruta es muy delicada de color verde oscuro cubierta de espinas suaves. Es relativamente grande y de cáscara delgada. Se debe cosechar antes de estar madura. La pulpa es blanca, cremosa, carnosas, jugosa y ligeramente ácida, mide 2-3dm de largo, pudiendo pesar 2,5 Kg.

En el Perú los principales departamentos productores de esta fruta son Junín, La libertad, Ucayali, Loreto, Ica y Lima. (SIICEX).

CUADRO N° 2.1: Composición Química de la Guanábana

	Unidades	Contenido en 100g de Alimento
Calorías	Kcal	56,00
Agua	g	84,00
Proteínas	g	0,9
Grasa Total	g	0,2
Carbohidratos Totales	g	14,3
Carbohidratos Disponibles	g	11
Fibra Cruda	g	1,1
Fibra Dietaria	g	3,3
Cenizas	g	0,6
Calcio	mg	38
Fósforo	mg	43
Zinc	mg	0,1
Hierro	mg	0,7
Tiamina	mg	0,05
Rivoflavina	mg	0,06
Niacina	mg	1,69
Vitamina C	mg	19

Fuente: Centro nacional de alimentación y nutrición - INS

2.2.2 Las Levaduras

(BOUIX Y LEVEAU, 2000) define a las levaduras como hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fisión. Su presencia depende en primer lugar de la disponibilidad de carbono orgánico y a continuación de la temperatura, del pH y de la presencia de agua.

Si bien las levaduras son organismos interesantes, explotados por sus potencialidades propias, continúan siendo por otra parte agentes de alteración de los productos alimentarios si no se controla su desarrollo.

(BOURGEOIS *et al*; 1994) afirman que en los zumos de frutas, verduras y las bebidas a base de frutas ya que se distinguen por su gran riqueza en aminoácidos y en vitaminas, permiten el crecimiento además de las levaduras, de diversas bacterias ácido-tolerantes especialmente bacterias lácticas.

Tiempo de reducción decimal

(RODRÍGUEZ *et al*; 2002) la velocidad de la destrucción térmica de microorganismos se ajusta, en general a una cinética de primer orden respecto a la población microbiana. Es decir:

$$N = N_0 * e^{-kt}$$

Donde:

N = representa el número de microorganismos vivos (UFC/ml).

N₀ = número inicial de microorganismos (UFC/ml).

t = el tiempo de tratamiento (min).

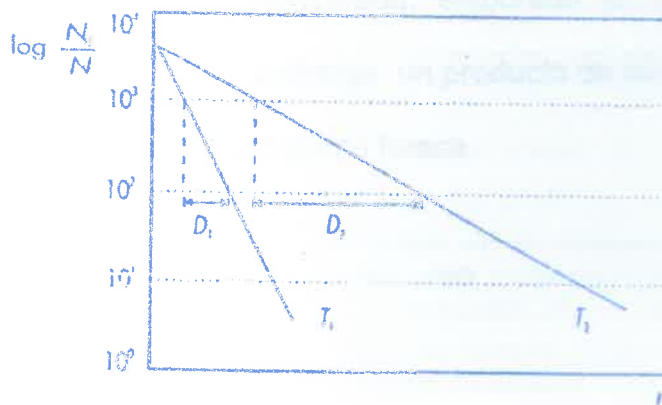
k = la constante de velocidad (min⁻¹).

El tiempo de reducción decimal (D) se define como el tiempo necesario para reducir la concentración a la décima parte ($N = 0.1N_0$) a una temperatura dada. Se tiene:

$$\log(N) = \text{Log}(N_0) - \frac{T}{D}$$

Así pues el tiempo de tratamiento térmico está relacionado con "D" a través de la siguiente ecuación: $t = D \cdot \text{Log}(N_0/N)$.

FIGURA N° 2.1: Variación del tiempo de Reducción decimal con la temperatura



Fuente: Rodríguez et al; 2002

En la figura N° 2.1 se puede apreciar que, al ser T_1 superior a T_2 , D_1 es menor que D_2 .

2.3 Los Néctares de Fruta

Según (VARMAN Y SUTHER, 1994) los néctares de fruta, de acuerdo a la directiva de la CEE, la definen como los productos no fermentados, pero fermentables, obtenidos mediante la adición de agua y de azúcares al zumo de fruta, zumo de fruta concentrado, puré de fruta o puré de fruta concentrado, o una mezcla de los anteriores y que observan las especificaciones señaladas. Los néctares pueden contener hasta un 20% de azúcar añadido (o de miel).

Para (MEYER Y PALTRINIERRI, 2002) estos productos se pueden obtener a partir de fruta fresca, refrigerada, elaborada en pasta congelada o conservada con sulfito, sin embargo un producto de alta calidad se obtiene solamente a partir de materia prima fresca.

2.3.1 Elaboración del néctar

Recepción y selección de la fruta

La fruta seleccionada debe ser de óptima calidad y con el grado de maduración requerido, de otro modo un lote puede echarse a perder por la presencia de una pequeña cantidad de fruta en mal estado. (CASTRO, 2009).

Lavado

Se realiza con la finalidad de eliminar la suciedad y/o restos de tierra adheridos en la superficie de la fruta. Esta operación se puede realizar por inmersión con soluciones desinfectantes que mayormente están compuestas de hipoclorito de sodio. Finalmente se enjuaga con abundante agua.

Pelado

El pelado se puede hacer de forma mecánica (con equipos) o manual.

Pulpeado

(CORONADO E HILARIO, 2001) este proceso consiste en obtener la pulpa o jugo, libre de cascara y pepas, esta operación se realiza empleando la pulpeadora (mecánica o manual). El uso de una licuadora con un posterior tamizado puede reemplazar eficientemente el uso de la pulpeadora.

Dilución de la pulpa

Para calcular el agua a emplear utilizamos relaciones o proporciones representadas de la siguiente manera. Por ejemplo: **1:3** donde 1 significa "una" parte de pulpa o jugo puro de la fruta y 3, significa "tres" partes de agua, es decir es una relación "uno a tres". La cantidad de agua varía de acuerdo a la fruta. Para guanábana la relación pulpa: agua es de 1:3-3.5

Estandarización

En esta operación se realiza la mezcla de todos los ingredientes que constituyen el néctar. La estandarización involucra los siguientes pasos:

- Dilución de la pulpa.
- Regulación del dulzor
- Regulación de la acidez.
- Adición del estabilizante y conservante.

Pasteurización

Esta operación se realiza con la finalidad de reducir la carga microbiana y asegurar la inocuidad del producto.

Las condiciones de pasteurización (tiempo-temperatura) varían según el producto y depende de gran medida del pH del zumo. (Sanez, 2007).

Envasado

El envasado se debe de realizar en caliente. El llenado del néctar es hasta el tope del contenido de la botella, evitando la formación de espuma. Inmediatamente se coloca la tapa.

Enfriado

El producto envasado debe ser enfriado rápidamente para conservar su calidad y asegurar la formación del vacío dentro de la botella.

2.4 Los Edulcorantes

Según (LÓPEZ Y PEÑA, 2004) la palabra edulcorante viene de la palabra latina "dulcor", que significa dulzor. Los edulcorantes son sustancias capaces de endulzar un alimento, una bebida o un medicamento, dándole un sabor dulce. Existen:

- a) Los edulcorantes calóricos.
- b) Los edulcorantes no calóricos (sintéticos y naturales).

Desde mediados de la década de los años 70's, dentro del contexto de los altos precios del azúcar en el mercado internacional, comienzan a ampliarse y desarrollarse alternativas de edulcorantes, tanto naturales como artificiales. Esta alternativa ha tenido éxito y ha ocupado cierto espacio en el mercado de los endulzantes del mundo.

Los científicos descubrieron edulcorantes sintéticos químicamente a fines del decenio de 1980, y los obtuvieron por ingeniería genética en el decenio de 1990. Se han mantenido en el mercado debido a necesidades tales como prevenir diabetes, cuidar la salud, mantener la línea, prevenir las caries, adelgazar, y para la prescripción médica.

Los edulcorantes artificiales tales como aspartame, acesulfame k, sacarina, entre otros tienen características comunes: son muy bajos en calorías, reducen el contenido energético global, aportan poco o ningún nutriente al organismo.

2.4.1 Edulcorantes no calóricos naturales

Las reacciones negativas sobre la salud de los edulcorantes artificiales anteriormente mencionados, son un claro reflejo de la necesidad de impulsar en el mercado un producto natural libre de efectos nocivos para los consumidores, y que a su vez cumpla las funciones del azúcar como de los edulcorantes artificiales. Entre los edulcorantes naturales conocidos se encuentran:

CUADRO N° 2.2: Edulcorantes Naturales

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	USOS
Taumatina	Se obtiene a partir del fruto del Katemfe de África Occidental <i>Thaumatococcus daniellii</i> , conocida como la "fruta del milagro"	Bebidas a base de café, gomas de mascar, aperitivos, productos bajos en grasas, yogures, postres, productos farmacéuticos, bebidas alcohólicas.
Neohesperidina	Se produce por hidrogenación de neohesperidina, un flavonoide que se encuentra de modo natural en las naranjas amargas.	Goma de mascar, caramelos, bebidas carbonatadas y no carbonatadas, postres, edulcorantes de mesa.
Monelina	Se obtiene de la planta <i>Dioscorephyllum cumminsii</i> , esta forma formada por dos aminoácidos y cadenas compuestas, es de los edulcorantes naturales más dulces.	Es útil en la obtención de nuevas variedades de tomate y lechuga con mejor sabor.
Hemandulcina	Endulzante natural usado por los aztecas, se obtiene de la planta <i>Lippia dulcis</i> .	Su principal uso esta en las infusiones.
Esteviósido	Es un glicósido diterpenico cristalino y dulce. Su sabor dulce es considerado excelente y se obtiene de las hojas de <i>Stevia rebaudiana bertonii</i> .	Eduicorante de mesa, en bebidas, en pastelería, en dulces, en confituras, en yogures, en chicles, entre otros.
Brazeína	Una proteína dulce extraída de la baya originaria del África occidental "brazeina".	Utilizado en África como edulcorante natural en comidas y bebidas.

2.4.2 La Stevia Rebaudiana Bertoni

Según (ROJAS, 2009) la Stevia es una planta cuyo nombre científico es *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Dicha denominación propuesta por el suizo Dr. Moises Santiago Bertoni (1887) fue en homenaje al químico paraguayo Ovidio Rebaudi, quién en 1905 fue el primero en aislar los principios dulces de la planta.

Existen 154 variedades del género *Stevia*, pero sólo la *Stevia Rebaudiana Bertoni* es la única especie que contiene el factor dulce en sus hojas.

Según (SOTO y DEL VAL, 2002) la *Stevia Rebaudiana*, Caá-ché o yerba dulce, crece en forma silvestre en algunas zonas de Paraguay, Brasil y provincias del nordeste argentino. Sus hojas tienen un intenso sabor dulce, propiedad que se debe al contenido de glicósidos, de los cuales el steviósido es el que se halla en mayor proporción.

La hoja en su forma natural es de 10 a 15 veces más dulce que el azúcar común. Los steveósidos tienen un poder edulcorante de 200 a 300 veces mayor que el azúcar, constituyendo un sustituto no calórico y seguro para los diabéticos.

Según (DÍAZ *et al*; 1999) los glicósidos de *Stevia Rebaudiana Bertoni* no es metabolizado por el organismo, por lo tanto no es calórico, adecuado para uso dietético.

Glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni

Los glicósidos diterpénicos dulces de Stevia han sido objeto de numerosas revisiones (Kinghorn and Soejarto 1985, Crammer and Ikan 1986, and Hanson and De Oliveira 1993). Sin embargo el interés en la química de los principios dulces data de hace muy poco, Rasenach 1900 y Dietrich 1909, fueron quienes demostraron que el principio edulcorante de la Stevia es totalmente diferente al de la Glicirricina. Mediante el uso del alcohol lograron sustraer la sustancia gustativa dulce de las hojas, purificarla y luego posteriormente obtenerla en forma de cristales blancos inodoros que se fundían a 238° C. En 1921 el principio activo fue denominado como Steviósido por la Unión Internacional de Química (ROJAS, 2009).

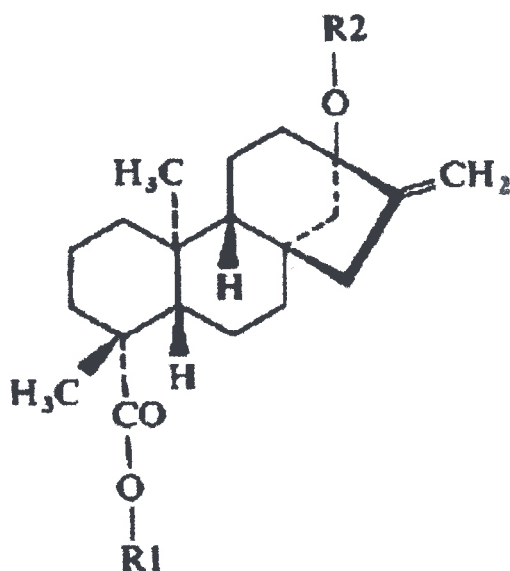
Los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni está permitida según el comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios, más conocido como JECFA.

Según (ROJAS, 2009) las hojas contienen principalmente steviósido y Rebausiósido A, siendo este último en proporción de 3 a 5%, mucho más dulce y con menor sabor amargo que el primero. El steviosido se encuentra en mayor proporción, 6 a 8%, y es más estable que los demás glicósidos, además de ser el segundo con mayor poder edulcorante.

(SOTO Y DEL VAL, 2002) el steviósido es un glicósido diterpeno de $M = 804,80$ gr/mol y fórmula $C_{38}H_{60}O_{18}$. La estructura química fue dilucidada por Mosettig E. *et al.* en 1963, siendo la aglucona el esteviol.

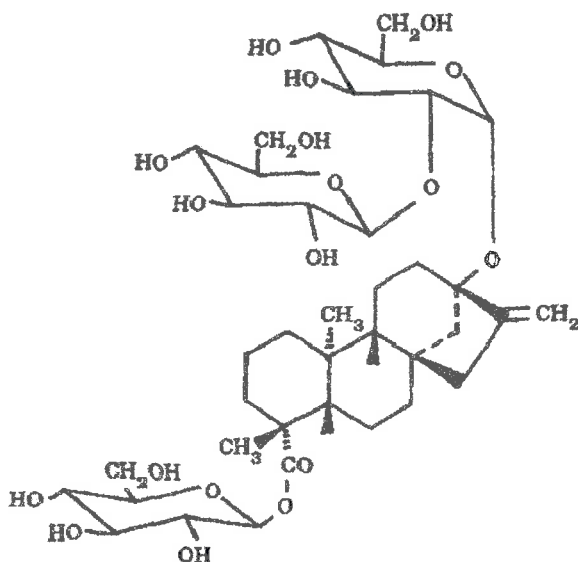
En 1982, Tanaka aisló cuatro glicósidos dulces adicionales, presentes en menor porcentaje, a los cuales denominó Rebaudiosido A, C, D y E (Cuadro 2.3). Las estructuras se muestran en las figuras N° 2.2 y N° 2.3

FIGURA N° 2.2: Estructura química general de los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni



FUENTE: (SOTO Y DEL VAL 2002)

FIGURA N°2.3: Estructura química del Steviosido



FUENTE: (SOTO Y DEL VAL, 2002)

CUADRO N° 2.3: Esteviol glicósidos presentes en la Stevia Rebaudiana

Nombre	R 1	R 2
Esteviol glicósidos más comunes		
steviosido	-G	-G(2,1)G
Rebaudiósido A	-G	-G-(2,1)G\ (3,1)G
Rebaudiósido C (dulcosido B)	-G	-G-(2,1)R\ (3,1)G
Dulcósido A	-G	-G(2,1)R\ (3,1)G
Esteviol glicósidos presentes a nivel de trazas		
Rebaudiósido D	-G(2,1)G	-G--(2,1)G\ (3,1)G
Rebaudiósido E	-G(2,1)G	-G(2,1)G\ (3,1)G
Estructura del esqueleto		
Esteviol	-H	-OH

G : b - glucopiranosil (glucosa)

R : a - ramnopiranosil (ramnosa)

Fuente: (SOTO Y DEL VAL, 2002)

2.5 Parámetros de cinética de crecimiento bacteriano

- **Tiempo de Latencia (t-lag)**

Es el tiempo necesario por los microorganismos para adaptar su crecimiento al ambiente (ADAMS, 1997).

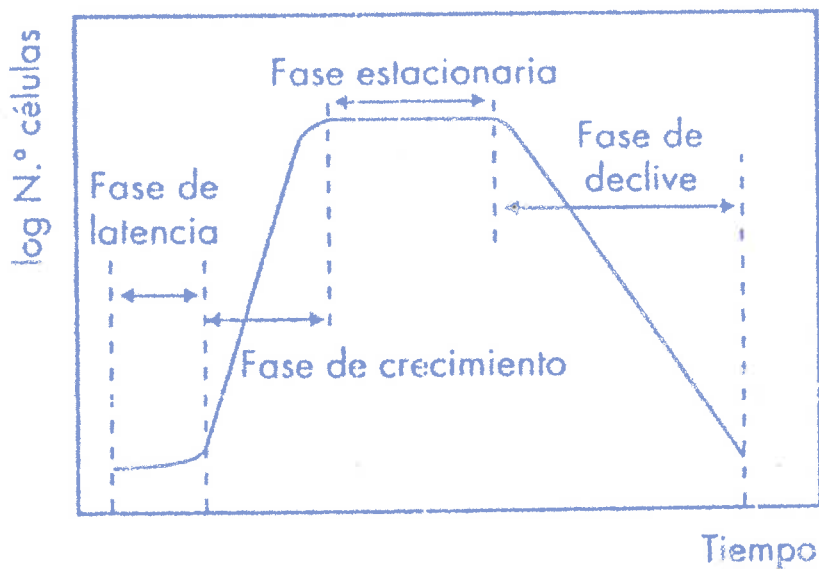
- **Tiempo de generación (t-gen)**

Es el tiempo tomado por la población dentro de la fase de crecimiento exponencial para duplicarse.

- **Velocidad de crecimiento (μ_{max})**

Es la velocidad por el cual la población se duplica dentro de la fase exponencial.

FIGURA N° 2.4: Curva de crecimiento de un cultivo microbiano



Fuente: (RODRÍGUEZ *et al*; 2002)

III. MATERIALES, EQUIPOS Y MÉTODOS

3.1 Materiales

El material de estudio son los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en cristal de procedencia Stevia Coronel S.A.C (Anexo 2), que se encuentran presentes en las muestras de néctar de guanábana elaborados en el Centro Experimental Tecnológico (CET) de la Universidad Nacional del Callao (Anexo N°1).

3.2 Equipos

- Estufa esterilizadora marca Memmert de 20°C a 250 °C.
- Estufa incubadora marca Memmert de 20°C a 50°C.
- Autoclave fabricado V. Miranda de 20°C a 300 °C y 0 a 30Lb/in.
- Equipo de baño María Salvis SBK25.
- Equipo de baño María Karl Kolb D-6072
- Cámara de refrigeración Faeda Caravelle.
- Centrifuga Engelsdorf mlw T-30.
- Centrifuga Engelsdorf mlw T-52.1.
- Espectrofotómetro UV-VIS Varian 50 conc.
- Sensor de presión (0-700Kpa) Pasco CI-6532A
- Sensor de pH Pasco CI-6507A

- Sensor de temperatura Pasco CI-6505A.
- Interface 750 Pasco CI-7599.
- Balanza analítica GR-200 20.
- Cuenta colonias Dr. N Gerber & Co. 1143-04.
- Licuadora Black&Decker BLP 7600G
- Bioreactor enchaquetado de 2.5L applikon.
- Refractómetro digital de 0 a 60% Atago PR- 201.

Instrumentos

- Pipetas de 10 mL, 1 mL, 0,1 mL.
- Probetas 100 y 50 mL.
- Soporte universal con pinzas.
- Bureta de 50 mL.
- Fiola de 250 mL.
- Vasos de precipitados 100 mL, 200 mL.
- Propipeta (100-1000 μ L) Labmate soft LM.
- Placas petris (9cm de diámetro).
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro de 5 mL.
- Olla de Acero Inoxidable Vinod.
- Cocina eléctrica.

- Colador.
- Guantes, mascarillas y tocas.

Reactivos

- Agar ogye Merk.
- Acido cítrico.
- Acido tricloro acético 10%.
- Alcohol etílico 96°.
- Alcohol gel.
- Caldo Maltosa.
- Cloruro de Calcio CaCl_2 .
- Cloruro de Bario BaCl_2
- Kit API 20C AUX BioMérieux.
- Kit de glucosa Wiener Lab..
- Hidróxido de sodio NaOH 0.1N.
- Solución fenolftaleína 1%.
- Gentamicina 0,05g/L
- Suero Fisiológico.

3.3 Métodos

Para determinar la actividad antifermentativa de los glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana, Primero se aisló e identificó una cepa de levaduras nativas presente en el fruto, luego se midió los parámetros de fermentación (Presión, pH, acidez, glucosa y °B), así como también se determinó la cinética de crecimiento de las levaduras nativas inoculadas en el néctar de guanábana, para cada uno de los 5 tratamientos.

Ya que de forma anaeróbica las levaduras metabolizan la glucosa presente en el medio generando CO₂ (aumentando así la presión) y acidifican el medio.

También se comparó el comportamiento de tres concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni durante el proceso fermentativo.

3.3.1 Aislamiento de las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*)

Se realizó de la siguiente manera:

- Se extrajo cascara de un fruto de guanábana (*Annona muricata*) que previamente ha sido lavada.
- Se colocó 25 g de cascara de guanábana (*Annona muricata*) en un matraz de 250 mL y se enraso con caldo maltosa al 2% de sacarosa.

- Luego de agitar bien se dejó incubando a 30 °C por un tiempo de 48 horas.
- Con el uso de un asa de siembra se extrajo una cantidad significativa de levaduras de guanábana (una película líquida en el asa de siembra), y procedió a sembrar mediante el método de sembrado por estrías (Mendo, 2003) en agar ogye (oxitetraciclina glucosa) ver anexo 3.
- Se dejó incubar por lapso de tiempo de 5 días a temperatura ambiente.
- Se eligió una colonia de levadura y nuevamente se sembró por estrías en agar ogye e incubo por lapso de 5 días a temperatura ambiente.

a) Obtención de colonias de levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*)

A partir de colonias de levaduras aisladas anteriormente en agar ogye, se obtuvo un cepario en TSA (agar triptona soya) de la siguiente manera:

Se eligió una colonia de levaduras aisladas en agar ogye y se extrajo con un asa de siembra para inocularla en un tubo con agar triptona soya inclinado. Se dejó incubar el tubo por un lapso de 24 a 48h a 30°C. Luego el cepario permaneció a una T < 4°C para su posterior identificación y uso experimental.

b) Identificación de levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*)

Para la identificación de levaduras se utilizó el método del sistema API 20C AUX: basado en la asimilación de fuentes de carbono; se siguió las instrucciones del kit y por medio del software APIWEB se determinó el género y especie del cepario de levaduras (Anexo nº 4).

c) Obtención del inóculo

En un tubo de ensayo con aproximadamente 10 ml de suero fisiológico estéril se inculó una cierta cantidad de colonias de Levaduras nativas de guanábana proveniente del cepario y utilizando el asa de siembra, con el método nefelómetro (Escala de Mc Farland) se llevó a la turbidez deseada para que la muestra de néctar contenga aproximadamente 10^6 UFC/ml para la determinación del tiempo de reducción decimal.

De la misma manera se realizó para obtener 10^5 UFC/ml, 10^4 UFC/ml

d) Determinación del tiempo de reducción decimal (D)

Los valores "D" fueron obtenidos siguiendo el método de Stumbo (RODRÍGUEZ *et al*; 2002)

Se colocó en una gradilla 10 tubos que contenían 9.9 mL de néctar de guanábana cada uno, se llevó a baño maría a 50°C y se mantuvo a temperatura constante.

Luego se agregó 0.1 ml de la solución de levaduras en cada uno de los 10 tubos de néctar de tal manera de obtener así 10⁶ UFC/ml.

Se tomo cada 2 minutos un tubo de ensayo y se realizó las diluciones sucesivas para plaquearlo en agar ogye e incubar por un lapso de tiempo de 5 días a temperatura ambiente y luego se realizó el conteo de colonias de levaduras.

El tiempo de reducción decimal "D" se halló del valor inverso de la pendiente de la ecuación:

$$\mathit{Log}(N) = \mathit{Log}(N_0) - \frac{t}{D}$$

Donde:

N = número de microorganismos al tiempo t.

N₀ = número de microorganismos iniciales.

t = tiempo de exposición (min)

D = tiempo de reducción decimal (tiempo en minutos para reducir N en un 90%)

Se realizó el mismo procedimiento para hallar el tiempo de reducción decimal (D) a 60 °C y 70 °C al igual que para las escalas de turbidez de 10⁵ UFC/ml y 10⁴ UFC/ml.

3.3.2 Elaboración de néctar de guanábana (*Annona muricata*)

Se elaboraron en el laboratorio del CET cinco tratamientos de néctar de guanábana : El tratamiento 1 (control de referencia) fue elaborado con la cantidad de azúcar para alcanzar los 14 °B que fue de 103 g/L, el tratamiento 2 fue néctar con Stevia, y se agregó la cantidad de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni de tal manera que equivalga a la cantidad de azúcar agregado para alcanzar los 14 °B que fue de 0,74 g/L, la equivalencia tomada en cuenta es de 1g azúcar = 0,008 g de glicósidos de Stevia R.B. de acuerdo a las especificaciones técnicas de la Stevia (Anexo N° 2) , para el tratamiento 3 y tratamiento 4 se agregó menor cantidad de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni que fue de 0,50 g/L y 0,32 g/L, el tratamiento 5 fue el control de néctar sin glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni. La elaboración del néctar se realizó según la Norma estándar para zumos y néctares de frutas (Codex stan 247-2005).

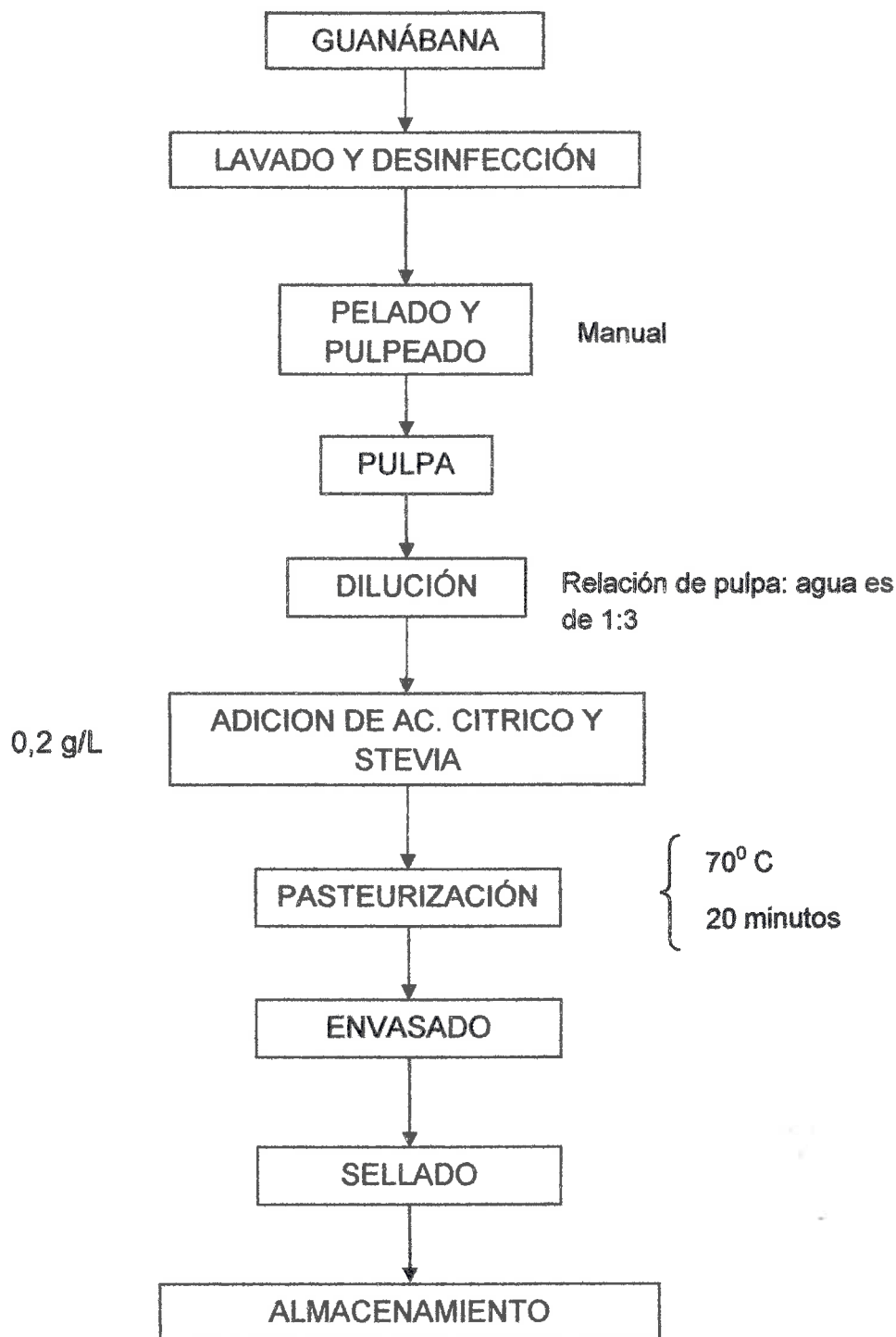
- Se trabajó con guanábana (*Annona muricata*) adquirida en el mercado Minka del Callao.
- Se realizó el lavado de la fruta con abundante agua para eliminar impurezas y sustancias contaminantes, desinfectando en una solución de hipoclorito de sodio de 200 ppm durante 10 min.
- Se peló y separó las pepas de la fruta de forma manual, obteniendo así la pulpa de guanábana.

- Se pesó 800 g de la pulpa de guanábana.
- Se licuó la pulpa con un poco de agua y luego se pasó por un colador.
- Se realizó la dilución de pulpa en agua de tal manera que el contenido de pulpa en el néctar fue del 25%, es así que la cantidad de agua agregada fue de 2,4 L.
- Se mezcló homogéneamente la pulpa, agua, Ac. cítrico (0.25 g/L) y glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni.
- Luego se llevó la mezcla a pasteurizar por 20 min.
- Terminado el tiempo de pasteurización se envasó caliente en envases de vidrio (previamente calentados); estos se cierran inmediatamente, giran de forma que el líquido caliente quede en contacto con toda la superficie interior del recipiente y lo deje aséptico, manteniéndolos así 3 a 4 minutos, antes de enfriarlos rápidamente.

Examen microbiológico del néctar

Los controles y límites permisibles de levaduras según la Norma técnica peruana (NTP 203.110:2009) fueron tomados después de la pasteurización. El método de control microbiológico está basado en el libro compendium of methods for the microbiological examination of foods 4th 2008. Usando agar ogye mediante siembra a profundidad.

DIAGRAMA N° 3.1: Diagrama de Bloques del Proceso de Elaboración del Néctar de guanábana con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni



Fuente: Elaboración propia

a) Inoculación de levaduras en el sustrato de néctar de guanábana (*Annona muricata*)

Se Midió 2.2 L de néctar de guanábana (*Annona muricata*) se adicionó al bioreactor enchaquetado y se colocó los sensores de presión, temperatura y pH. Se mantuvo a temperatura constante de 30 ° C. Luego se agregó en el néctar de guanábana 7 g de levaduras en base húmeda obtenido a partir del cepario.

Se obtuvo las muestras para el recuento microbiológico de levaduras sacando 1 mL de néctar del bioreactor y diluyendo en un tubo con 9mL de suero fisiológico, luego se realizó las diluciones sucesivas hasta llegar a la dilución de 10^{-5} . Este procedimiento se realizó para cada uno de los tratamientos.

b) Recuento de Levaduras

- Una vez obtenido la muestra en suero fisiológico en una escala de diluciones (del paso anterior), se procedió a extraer 0.1 mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y se realizó sembrando a profundidad en agar ogye por el método de recuento de microorganismos (MENDO, 2003).
- Se realizó el procedimiento anterior cada 30 min ($t_0=0$ y $t_f =240$ min) para los cinco tratamiento respectivamente.
- Para cada tiempo se procedió a contar las unidades formadoras de colonias (UFC/ml).Este procedimiento se realizó por triplicado para cada tratamiento.

c) Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de las levaduras nativas

El procedimiento anterior nos permitió obtener un conjunto de valores de las unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/ml) que fueron evaluados con el software Microfit 1.0, aquí se obtuvo los parámetros de cinética de crecimiento de las curvas obtenidas experimentalmente, para cada tratamiento de néctar de guanábana preparado a diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni.

Se evaluó la velocidad de crecimiento (μ_{max}), tiempo de latencia (t-lag) y el tiempo generacional (t-gen).

3.3.3 Determinación de los parámetros fermentativos

Se tomó muestras de 6 ml de néctar de guanábana inoculada con las levaduras nativas, para medir el % de acidez, °B y glucosa (g/L), cada 10 minutos durante 240 minutos.

Para la medición de la cantidad de CO₂ y pH se midió con sensores de Presión y pH respectivamente usando el software DataStudio.

- Para la medición de glucosa se realizó en el espectrofotómetro por el método enzimático con un kit de glucosa (Anexo 6).

- **Acidez:** Se determinó según: NTP 203.070:1977 (Anexo 5) para acidez titulable en donde 1mL. 0.1N de NaOH = 0.06404 g Ácido cítrico anhidro. Los resultados se expresan como % Acido cítrico lo cual es igual a (%) acidez.

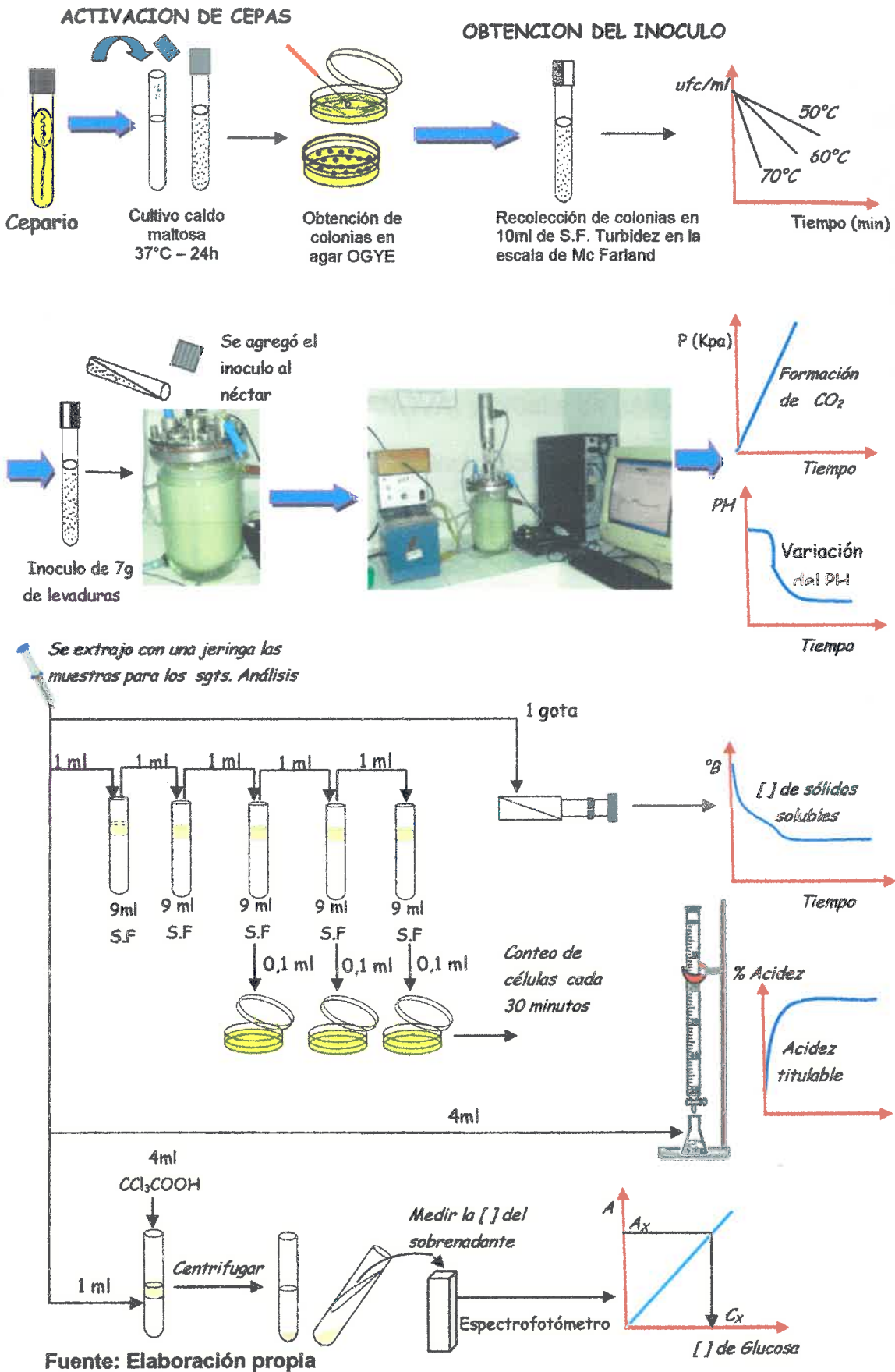
- **PH:** Se determinó según: NTP 203.070:1977 (Anexo 5) para acidez iónica, mediante un sensor de pH.

- **°B:** Se determinó según: NTP 203.072:1977 Mediante lectura en un refractómetro de unas gotas de muestra.

Se realizó los mismos procedimientos y por triplicado para los análisis de los cinco tratamientos de néctar inoculado con levaduras nativas de guanábana.

En el **Diagrama N° 3.2** se muestra en forma resumida los pasos seguidos en la realización del diseño experimental del presente trabajo.

DIAGRAMA N° 3.2: Flujoograma Experimental



Fuente: Elaboración propia

3.3.4 Efecto de diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia

Rebaudiana Bertoni en néctar de guanábana

Del néctar de guanábana elaborado con diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni se comparó y se evaluó cual es la mejor concentración de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni que no genera fermentación, expresado en sus parámetros y para lo cual se aplicó las pruebas paramétricas de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de tukey, utilizando el software Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 17.

IV. RESULTADOS

4.1 Levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*)

Del cepario de levaduras se identificó por el método del sistema API 20C AUX el género y especie de dos tipos de levaduras del fruto de guanábana que fueron: *Hansenula anómala* y *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.1 Tiempo de reducción decimal

Para cada una de las Levaduras nativas de guanábana identificadas y con poblaciones iniciales de 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/ml se realizó los gráficos que se muestran en **Grafico N° 4.1, 4.2 y 4.3** para *Hansenula anómala* y en **Grafico N° 4.4, 4.5 y 4.6** para *Saccharomyces cerevisiae*. El tiempo de reducción decimal resulta del valor inverso de la pendiente de la recta y se muestra en la **Tabla N° 4.1**, las graficas mostradas son el promedio de las tres repeticiones.

TABLA N° 4.1: Tiempo de reducción decimal(D)

Hansenula anómala			
N_0 (UFC/ml)	D(50°C) min	D(60°C) min	D(70°C) min
10^6	6	2	1
10^5	3,5	1,7	0,8
10^4	1,8	1,2	0,6

Sacchromyces Cerevisae			
N_0 (UFC/ml)	D(50°C) min	D(60°C) min	D(70°C) min
10^6	8	3,9	1,7
10^5	4	2,3	1,2
10^4	2,4	1,7	1,1

Fuente: Elaboración Propia

GRAFICO N° 4.1: Log(UFC/mL) Vs Tiempo (min)

$N_0 = 10^6$ UFC/ml - Hansenula anómala

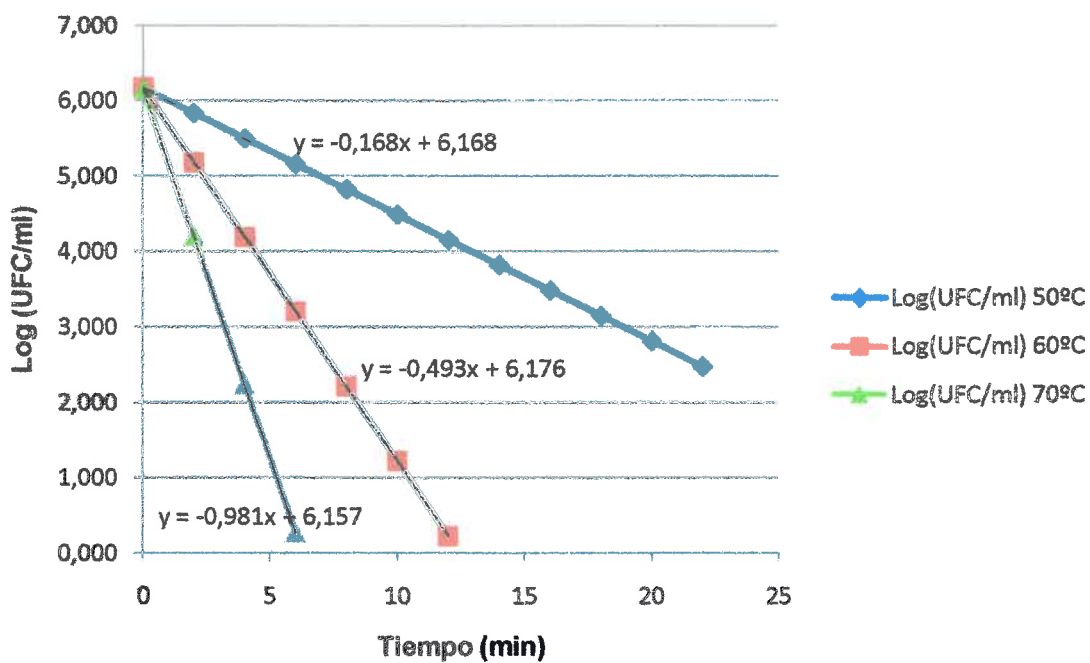


GRAFICO N° 4.2: Log(UFC/mL) Vs Tiempo (min)

$N_0 = 10^5$ UFC/ml - Hansenula anómala

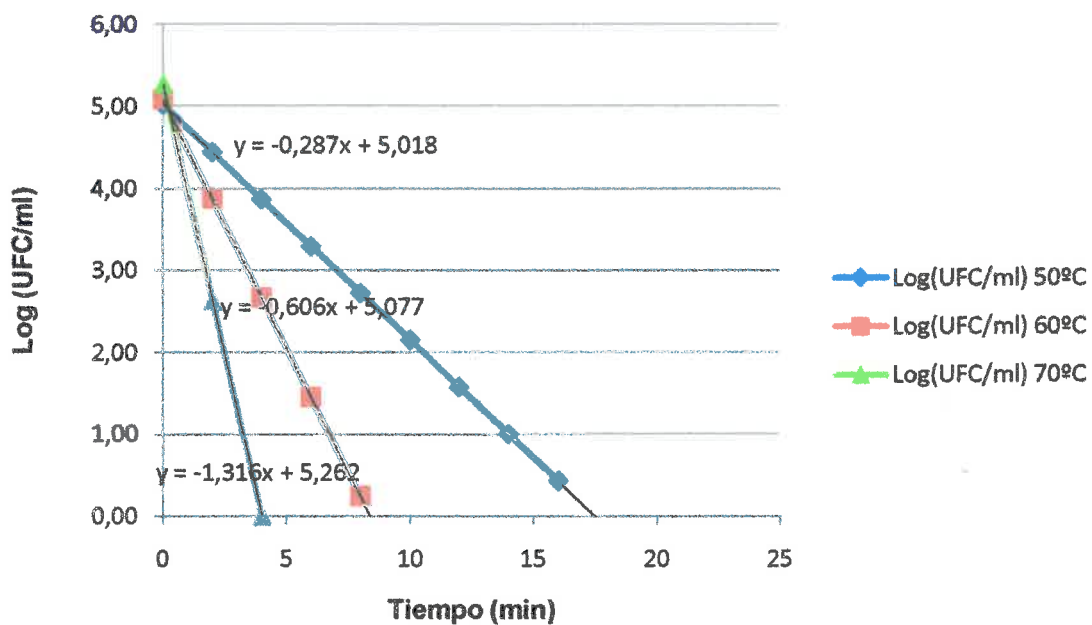


GRAFICO N° 4.3: Log(UFC/mL) Vs Tiempo (min)

$N_0 = 10^4$ UFC/ml - Hansenula anómala

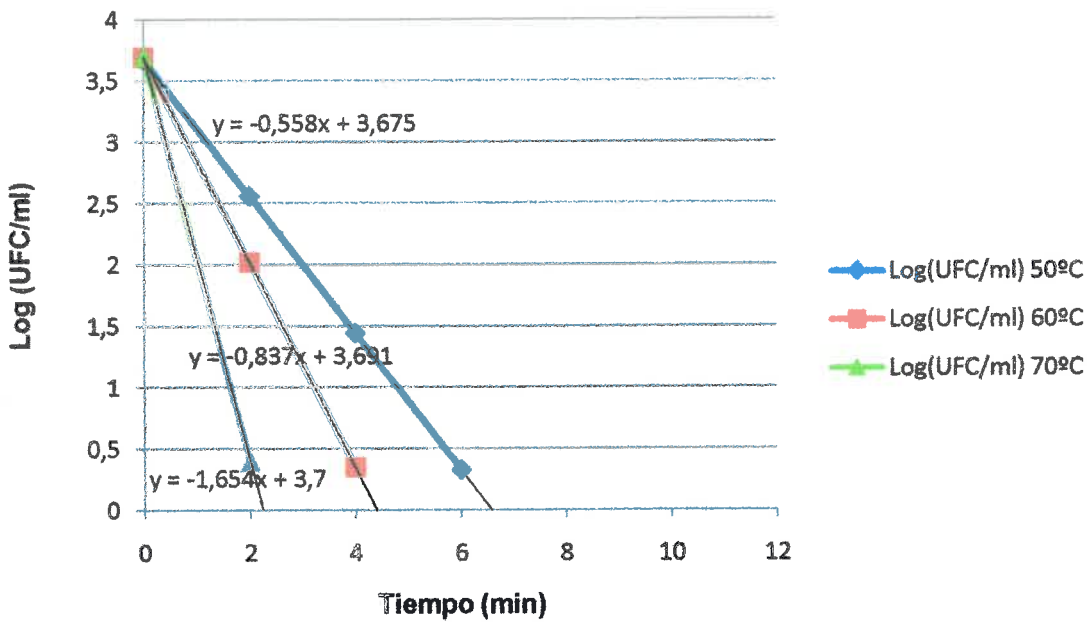


GRAFICO N° 4.4: Log(UFC/mL) Vs Tiempo (min)

$N_0 = 10^6$ UFC/ml - Saccharomyces Cerevisae

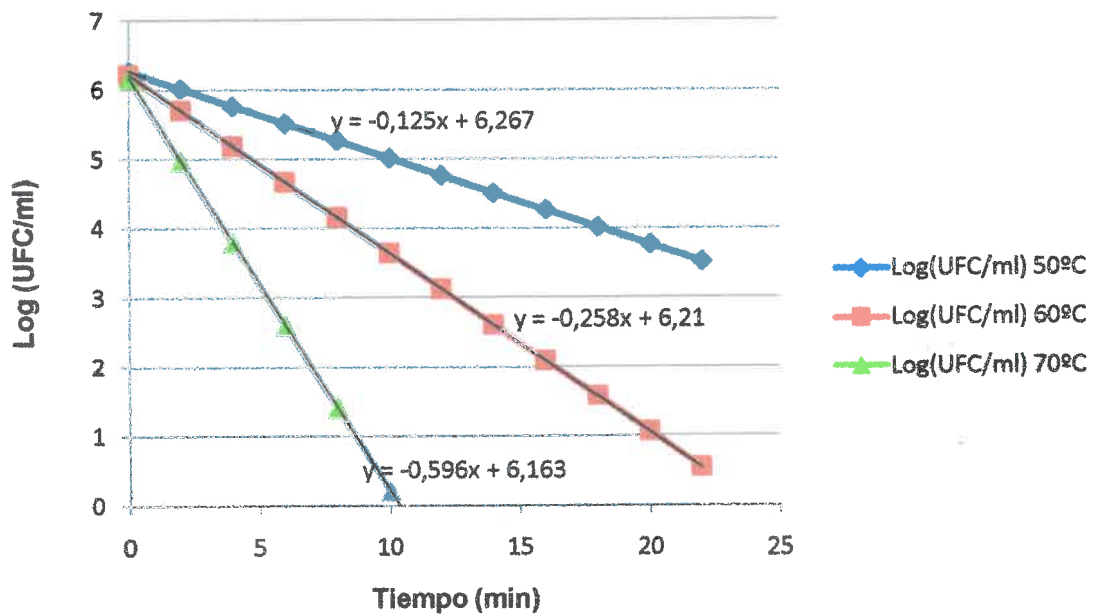


GRAFICO N° 4.5: Log(UFC/mL) Vs Tiempo (min)

$N_0 = 10^5$ UFC/ml - *Saccharomyces Cerevisae*

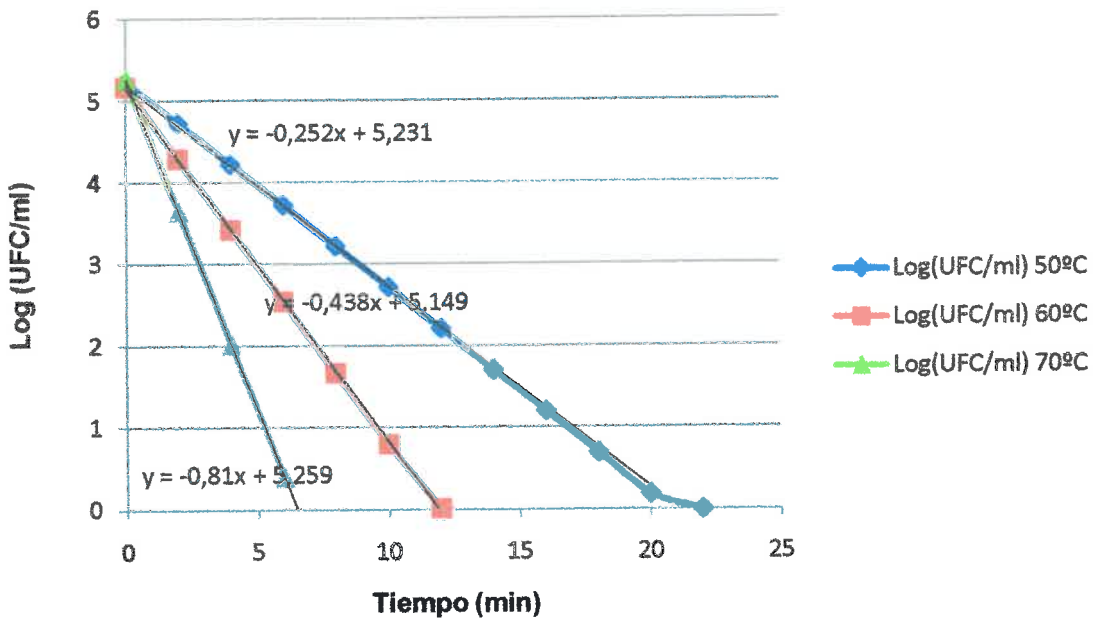
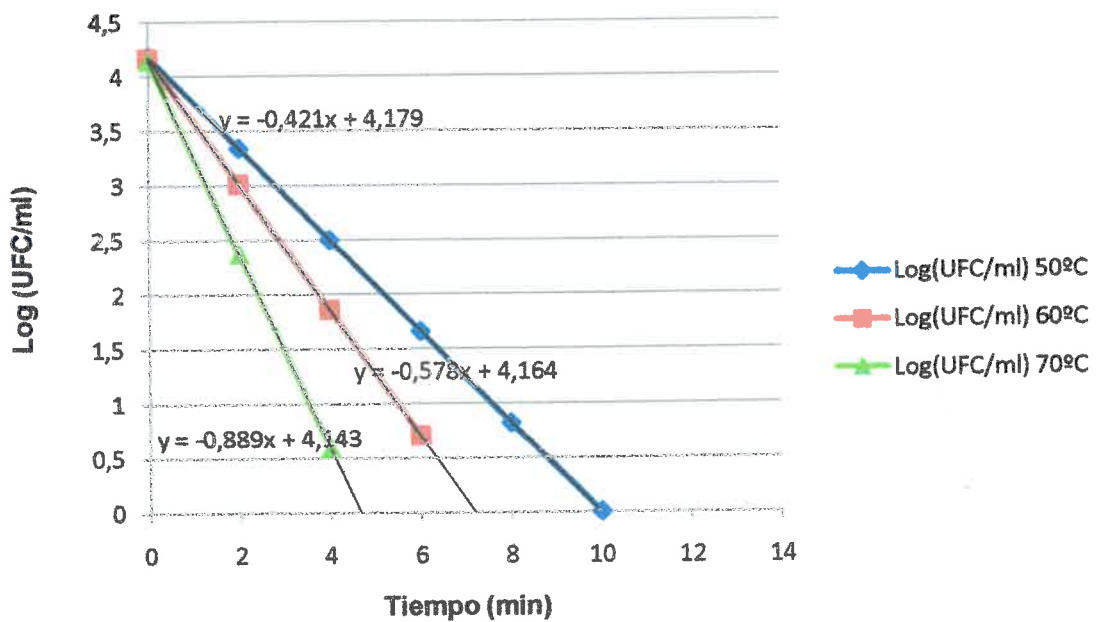


GRAFICO N° 4.6: Log(UFC/mL) Vs Tiempo (min)

$N_0 = 10^4$ UFC/ml - *Saccharomyces Cerevisae*



4.2 Análisis fisicoquímicos de la pulpa y del néctar de guanábana

Se realizó el análisis de los grados brix de la pulpa de guanábana de los cinco tratamientos que se muestra en Cuadro N° 4.1 al igual para el néctar de guanábana además del pH que se muestra en Cuadro N° 4.2. Los resultados mostrados son los valores promedio de las tres repeticiones.

El análisis microbiológico del néctar de guanábana (*Annona muricata*) se realizó usando agar ogye para recuento de levaduras que se muestra en Cuadro N° 4.3.

CUADRO N° 4.1: Pulpa de Guanábana					
	Con Azúcar	0,74g/L Stevia	0,50g/L Stevia	0,32g/L Stevia	Sin Azúcar
°B(pulpa)	15	19	15	16	15

CUADRO N° 4.2: Néctar de Guanábana					
	Con Azúcar	0,74g/L Stevia	0,5g/L Stevia	0,32g/L Stevia	Sin Azúcar
°B	14,6	4,8	3,6	3,8	3,1
pH	3,58	3,74	3,51	3,51	3,64

CUADRO N° 4.3 Néctar de Guanábana	
Microorganismos	Resultados
Levaduras	< 10 (UFC/ml)

Fuente: Elaboración Propia

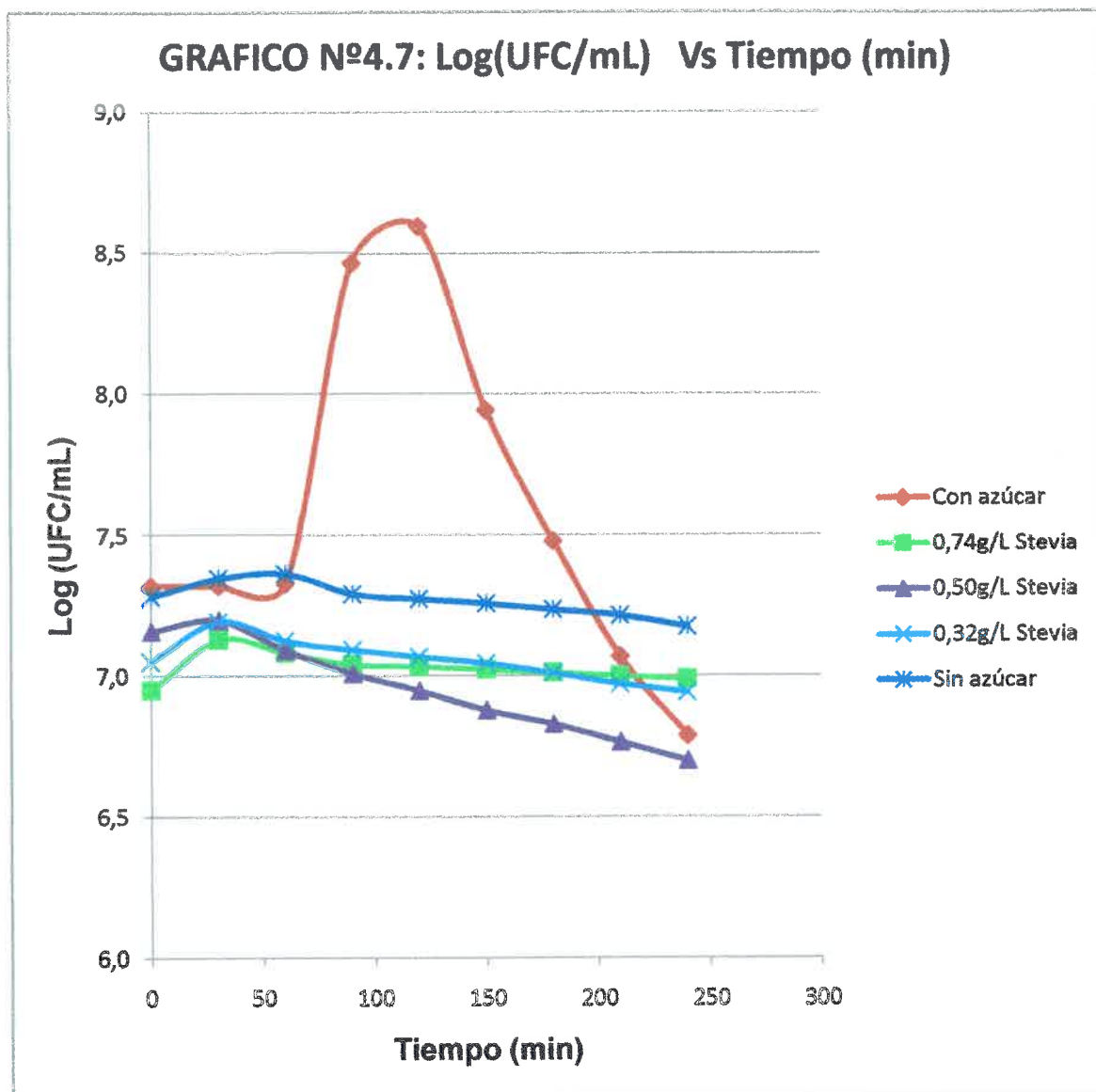
4.3 Parámetros cinéticos de crecimiento

Con la ayuda del equipo cuenta colonias del CET se obtuvieron los resultados experimentales del comportamiento de las levaduras inoculadas en el néctar de guanábana, para los cinco tratamientos que se muestran en la **Tabla N° 4.2** (promedio de las tres repeticiones) para realizar el **Grafico N° 4.7** y por medio del software Microfit 1.0 se obtuvo los parámetros de cinética de crecimiento que se muestra en **Cuadro N° 4.4**.

TABLA N° 4.2 : Levaduras sobrevivientes en el néctar inoculado con levaduras

Tiempo(min)	Log(UFC/ml)				
	Con azúcar	0,74g/L Stevia	0,50g/L Stevia	0,32g/L Stevia	Sin azúcar
0	7,317	6,949	7,157	7,051	7,281
30	7,318	7,128	7,196	7,191	7,344
60	7,327	7,081	7,089	7,123	7,359
90	8,463	7,040	7,007	7,092	7,289
120	8,591	7,032	6,948	7,066	7,270
150	7,941	7,023	6,878	7,043	7,256
180	7,478	7,010	6,828	7,010	7,233
210	7,068	6,999	6,764	6,970	7,212
240	6,787	6,989	6,699	6,941	7,173

Fuente: Elaboración Propia



Cuadro Nº 4.4 : Parámetros de cinética de crecimiento de las levaduras

Parámetros	Con azúcar	0,74g/L Stevia	0,50g/L Stevia	0,32g/L Stevia	Sin azúcar
μ (min^{-1})	0,47	0	0	0	0
t-lag (min)	67,5	-	-	-	-
t-gen (min^{-1})	1,48	-	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia

4.4 Parámetros fermentativos del néctar inoculado con levaduras

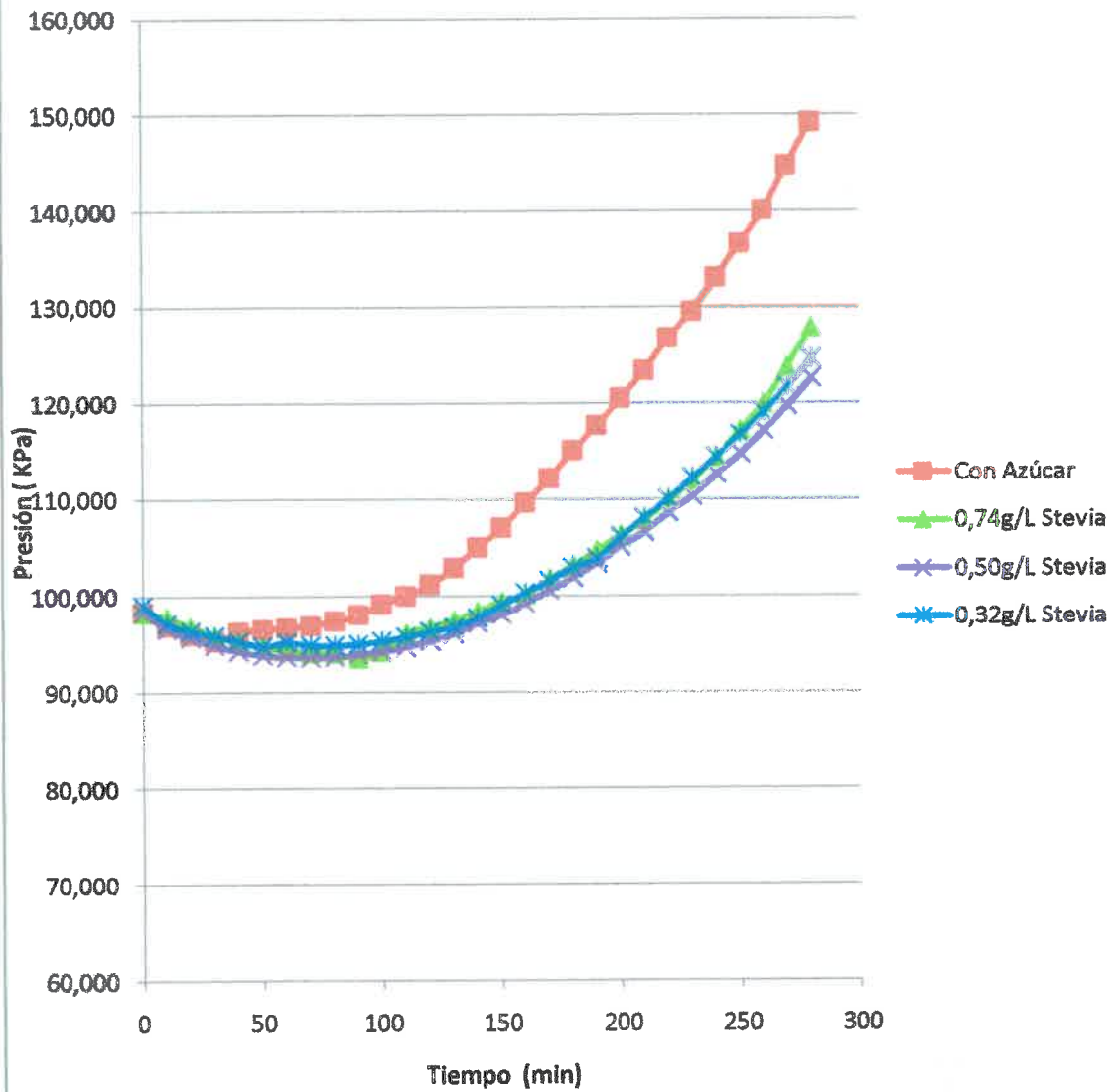
a) Con los sensores de presión, pH y con la ayuda del software Data Studio se tienen los resultados promedio de las tres repeticiones experimentales para los tratamientos que se muestran en la Tabla N° 4.3 y Tabla N° 4.4 representado en Grafico N° 4.8 y Grafico N° 4.9 de presión y pH respectivamente.

TABLA N° 4.3: Presión de gas en el Néctar Inoculado con Levaduras

Tiempo (min)	Presión (KPa)			
	Con Azúcar	0,74g/L Stevia	0,50g/L Stevia	0,32g/L Stevia
0	98,331	98,209	98,331	99,063
10	96,805	97,842	96,561	97,171
20	95,889	96,805	95,645	96,316
30	95,279	95,828	94,852	95,828
40	96,194	95,218	94,241	95,279
50	96,5	94,668	93,814	94,73
60	96,683	94,302	93,631	95,157
70	96,866	94,058	93,57	94,852
80	97,354	93,997	93,631	94,852
90	98,026	93,448	93,875	94,974
100	99,124	94,18	94,18	95,279
110	99,979	96,133	94,668	95,706
120	101,199	96,744	95,279	96,255
130	102,908	97,476	96,072	96,744
140	104,984	98,453	97,171	97,72
150	107,059	99,429	98,026	99,063
160	109,623	100,101	99,185	100,284
170	112,186	101,749	100,589	101,566
180	115,055	103,153	101,932	102,908
190	117,679	104,74	103,397	103,885
200	120,487	106,327	105,167	106,082
210	123,356	107,791	106,632	108,097
220	126,774	109,867	108,646	110,05
230	129,521	111,881	110,416	112,247
240	133,061	114,322	112,674	114,383

Fuente: Elaboración Propia

GRAFICO N° 4.8 : Presión(KPa) Vs Tiempo(min)



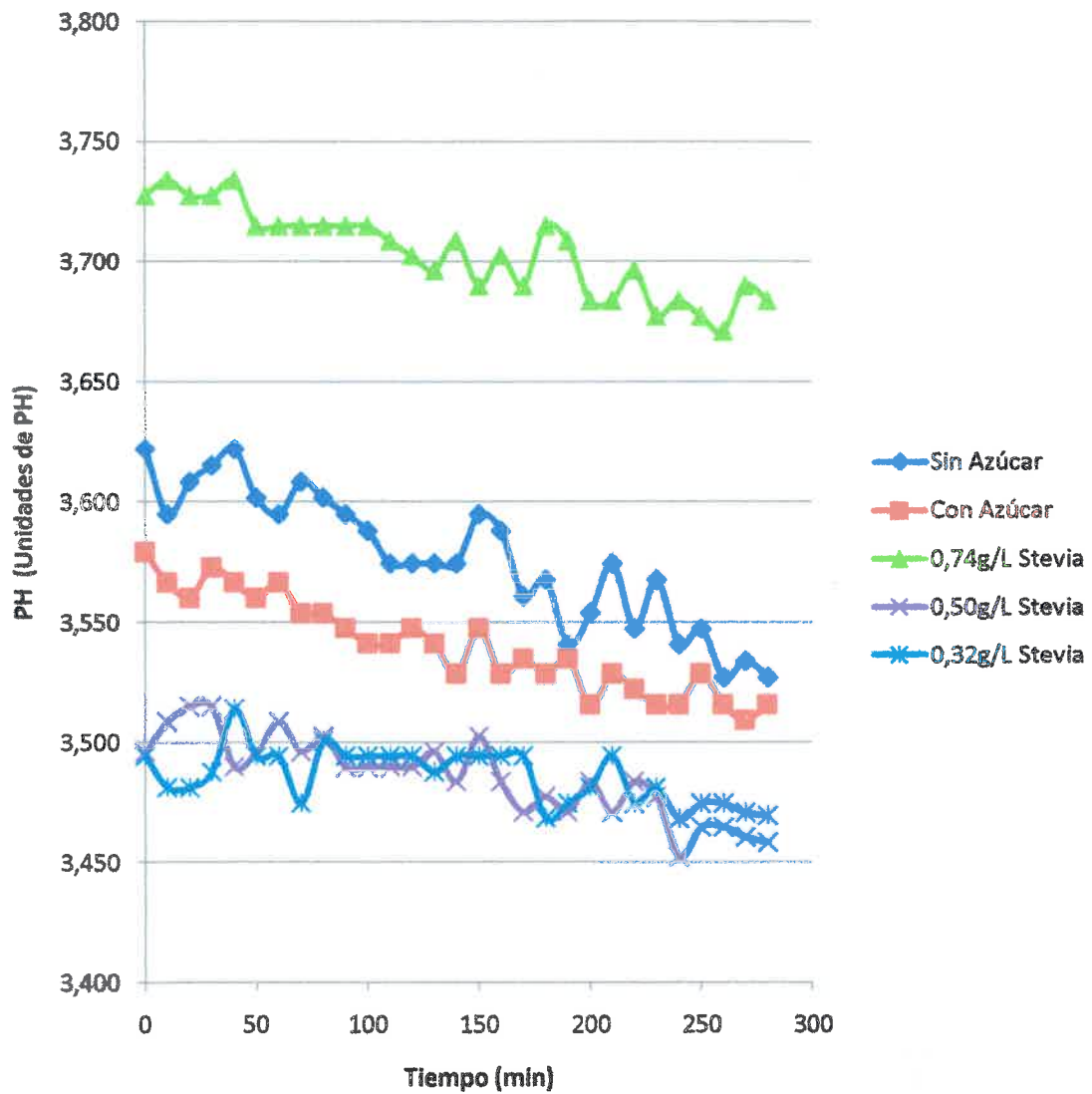
Fuente: Elaboración Propia

TABLA N° 4.4: PH del Néctar inoculado con levaduras

Tiempo (min)	PH				
	Con Azúcar	0,74 g/L Stevia	0,50 g/L Stevia	0,32 g/L Stevia	Sin Azúcar
0	3,579	3,728	3,496	3,494	3,622
10	3,566	3,734	3,509	3,481	3,595
20	3,560	3,728	3,515	3,481	3,608
30	3,573	3,728	3,515	3,488	3,615
40	3,566	3,734	3,490	3,514	3,622
50	3,560	3,715	3,496	3,494	3,602
60	3,566	3,715	3,509	3,494	3,595
70	3,554	3,715	3,496	3,475	3,608
80	3,554	3,715	3,502	3,501	3,602
90	3,547	3,715	3,490	3,494	3,595
100	3,541	3,715	3,490	3,494	3,588
110	3,541	3,709	3,490	3,494	3,575
120	3,547	3,703	3,490	3,494	3,575
130	3,541	3,696	3,496	3,488	3,575
140	3,528	3,709	3,484	3,494	3,575
150	3,547	3,690	3,502	3,494	3,595
160	3,528	3,703	3,484	3,494	3,588
170	3,535	3,690	3,471	3,494	3,561
180	3,528	3,715	3,477	3,468	3,568
190	3,535	3,709	3,471	3,475	3,541
200	3,516	3,684	3,484	3,481	3,554
210	3,528	3,684	3,471	3,494	3,575
220	3,522	3,696	3,484	3,475	3,547
230	3,516	3,677	3,477	3,481	3,568
240	3,516	3,684	3,452	3,468	3,541

Fuente: Elaboración Propia

GRAFICO N° 4.9: PH Vs. Tiempo(min)



Fuente: Elaboración Propia

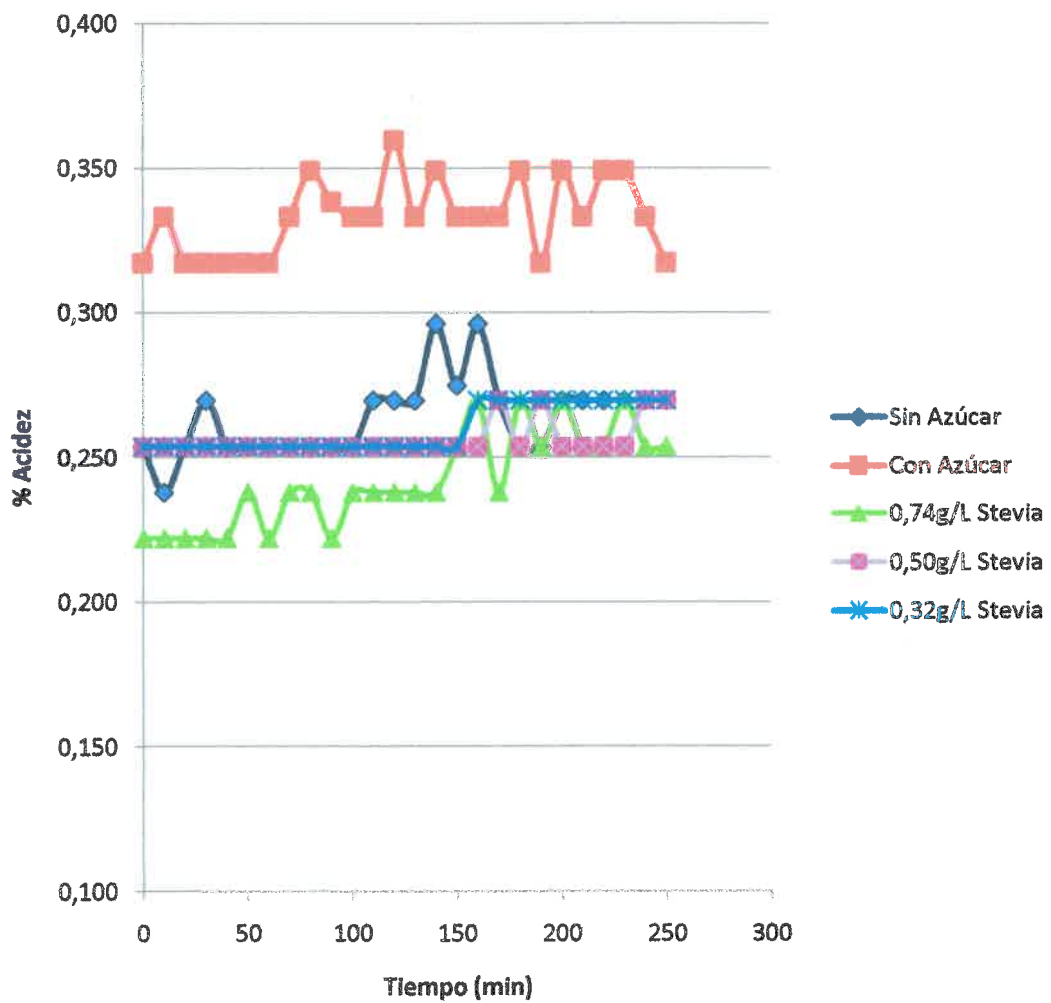
b) **Acidez:** en la **Tabla N° 4.5** se muestra los resultados promedio de las tres repeticiones de la acidez (%) para los cinco tratamientos y está representada en el **Grafico N° 4.10**.

TABLA N° 4.5: % Acidez del Néctar Inoculado con Levaduras

Tiempo (min)	%Acidez				
	Con Azúcar	0,74g/L Stevia	0,50g/L Stevia	0,32g/L Stevia	Sin azúcar
0	0,317	0,222	0,254	0,254	0,254
10	0,333	0,222	0,254	0,254	0,238
20	0,317	0,222	0,254	0,254	0,254
30	0,317	0,222	0,254	0,254	0,270
40	0,317	0,222	0,254	0,254	0,254
50	0,317	0,238	0,254	0,254	0,254
60	0,317	0,222	0,254	0,254	0,254
70	0,333	0,238	0,254	0,254	0,254
80	0,349	0,238	0,254	0,254	0,254
90	0,338	0,222	0,254	0,254	0,254
100	0,333	0,238	0,254	0,254	0,254
110	0,333	0,238	0,254	0,254	0,270
120	0,359	0,238	0,254	0,254	0,270
130	0,333	0,238	0,254	0,254	0,270
140	0,349	0,238	0,254	0,254	0,296
150	0,333	0,254	0,254	0,254	0,275
160	0,333	0,270	0,254	0,270	0,296
170	0,333	0,238	0,270	0,270	0,270
180	0,349	0,270	0,254	0,270	0,254
190	0,317	0,254	0,270	0,270	0,254
200	0,349	0,270	0,254	0,270	0,270
210	0,333	0,254	0,254	0,270	0,270
220	0,349	0,254	0,254	0,270	0,270
230	0,349	0,270	0,254	0,270	0,270
240	0,333	0,254	0,270	0,270	0,270

Fuente: Elaboración Propia

GRAFICO N° 4.10: %Acidez Vs Tiempo (min)



Fuente: Elaboración Propia

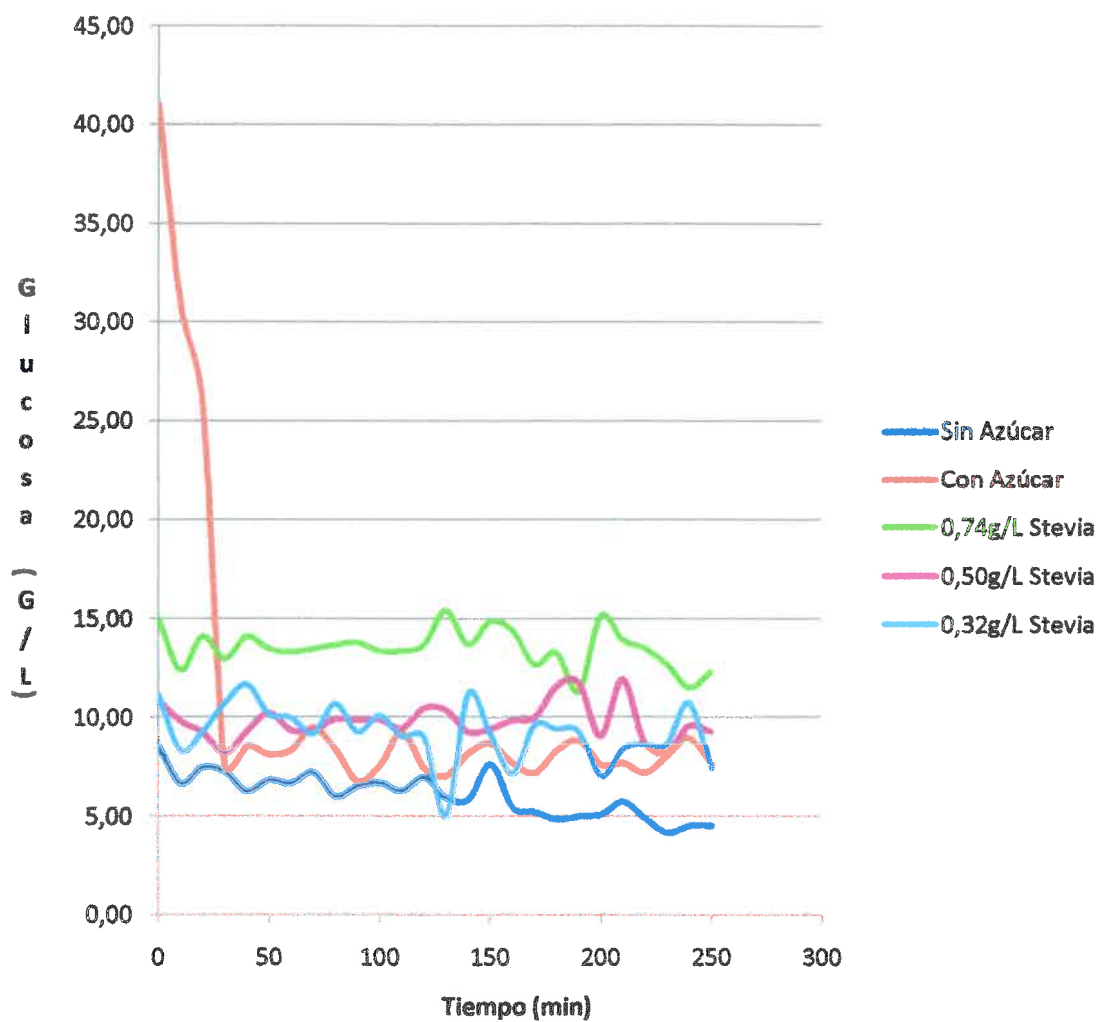
c) **Glucosa y °B:** Los resultados promedio de las tres repeticiones obtenidas de la glucosa (g/L) y °B para los cinco tratamientos se muestran en la **Tabla N° 4.6** y **Tabla N° 4.7** que están representadas en **Grafico N° 4.11** y **Grafico N°4.12** respectivamente.

TABLA N° 4.6: Glucosa(g/L) del Néctar Inoculado con Levaduras

Tiempo (min)	Glucosa(gr/L)				
	Con Azúcar	0,74 g/L Stevia	0,50 g/L Stevia	0,32 g/L Stevia	Sin Azúcar
0	41,00	15,01	10,85	11,12	8,55
10	30,82	12,39	9,82	8,32	6,66
20	25,88	14,11	9,23	9,27	7,47
30	7,49	12,96	8,18	10,71	7,24
40	8,54	14,09	9,27	11,66	6,27
50	8,12	13,48	10,22	10,16	6,84
60	8,34	13,31	9,35	9,98	6,67
70	9,48	13,48	9,37	9,16	7,22
80	8,37	13,67	9,90	10,70	6,01
90	6,77	13,79	9,87	9,25	6,52
100	7,57	13,38	9,89	10,07	6,70
110	9,23	13,35	9,44	9,02	6,28
120	7,42	13,67	10,45	9,00	6,97
130	7,05	15,40	10,37	5,01	5,95
140	8,18	13,69	9,27	11,17	5,86
150	8,66	14,84	9,41	9,19	7,63
160	7,67	14,42	9,84	7,13	5,46
170	7,19	12,69	9,99	9,59	5,22
180	8,32	13,27	11,56	9,41	4,86
190	8,81	11,29	11,77	9,29	5,00
200	7,61	15,12	9,04	7,03	5,11
210	7,69	13,94	11,92	8,42	5,74
220	7,21	13,50	8,71	8,61	4,90
230	8,07	12,70	8,22	8,65	4,18
240	8,95	11,49	9,56	10,73	4,53

Fuente: Elaboración Propia

GRAFICO N ° 4.11: Glucosa (g/L) Vs Tiempo

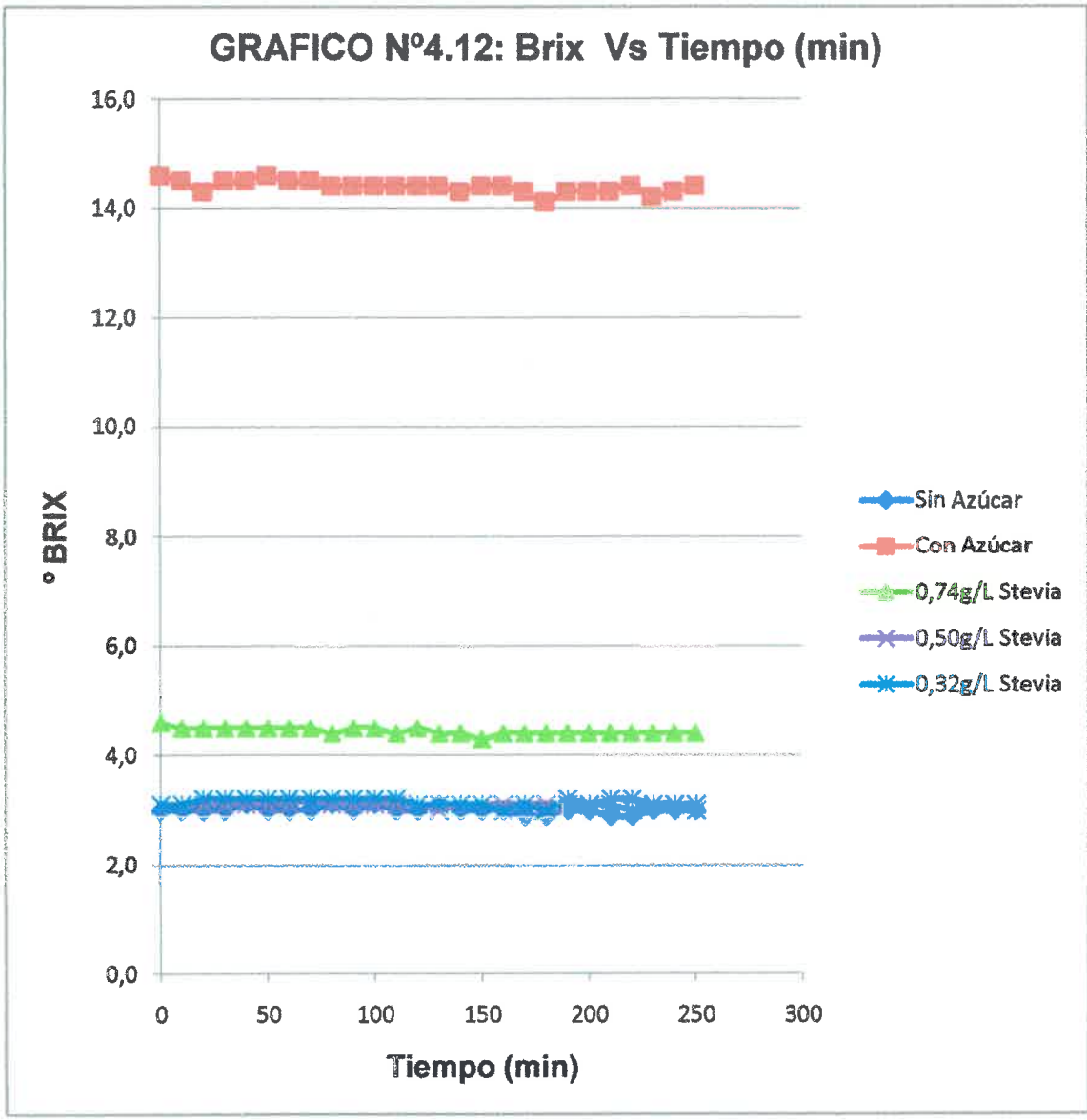


Fuente: Elaboración Propia

TABLA N° 4.7: °B del Néctar Inoculado con Levaduras

Tiempo (min)	°B				
	Con Azúcar	0,74 g/L Stevia	0,50 g/L Stevia	0,32 g/L Stevia	Sin Azúcar
0	14,6	4,6	3,1	3,1	3,0
10	14,5	4,5	3,1	3,1	3,0
20	14,3	4,5	3,1	3,2	3,0
30	14,5	4,5	3,1	3,2	3,0
40	14,5	4,5	3,1	3,2	3,1
50	14,6	4,5	3,1	3,2	3,0
60	14,5	4,5	3,1	3,2	3,0
70	14,5	4,5	3,2	3,2	3,0
80	14,4	4,4	3,1	3,2	3,1
90	14,4	4,5	3,1	3,2	3,0
100	14,4	4,5	3,1	3,2	3,1
110	14,4	4,4	3,1	3,2	3,0
120	14,4	4,5	3,1	3,1	3,0
130	14,4	4,4	3,0	3,1	3,1
140	14,3	4,4	3,1	3,1	3,0
150	14,4	4,3	3,1	3,1	3,0
160	14,4	4,4	3,1	3,0	3,0
170	14,3	4,4	3,1	3,1	2,9
180	14,1	4,4	3,1	3,0	2,9
190	14,3	4,4	3,1	3,2	3,0
200	14,3	4,4	3,1	3,1	3,0
210	14,3	4,4	3,1	3,2	2,9
220	14,4	4,4	3,0	3,2	2,9
230	14,2	4,4	3,1	3,1	3,0
240	14,3	4,4	3,1	3,1	3,0

Fuente: Elaboración Propia



Fuente: Elaboración Propia

4.5 Efecto de diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia

Rebaudiana Bertoni en el néctar de guanábana

El efecto de las diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en el néctar de guanábana se evaluó utilizando el análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de tuckey. En el apéndice nº3 se muestra análisis estadístico de las levaduras inoculadas en el néctar, en el Apéndice N°4 se muestra el análisis estadístico de la presión de gas generada.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De las levaduras nativas de guanábana aisladas en el cepario se identificó dos tipos de levaduras que son *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula anómala*. Ambos géneros de levaduras pertenecen a la clase de hongos ascomycetos a la subfamilia de saccharomycetoideae, en la que se encuentran numerosas levaduras implicadas en las fermentaciones o en las alteraciones de los productos alimentarios (BOUIX Y LEVEAU, 2000).

Se concuerda con el estudio realizado por (ORBERA, 2004) en que señala que los aislamientos de cepas de levaduras de frutos procesados de forma parcial reveló que la mayor cantidad de ascomycetos se encuentran sobre frutos ya que en la guanábana (*Annona muricata*) se encontró levaduras de la clase ascomycetos.

De la Tabla N° 4.1 se observa que la mejor temperatura para destruir las levaduras en un menor tiempo es a 70 °C, lo cual se contrasta con el análisis estadístico (ANOVA) con ($p=0,05$) que demostró que existieron diferencias significativas entre la temperatura de 70 °C y las temperaturas de 60 °C y 50°C (Apéndice N° 1 y Apéndice N° 2). El tiempo de reducción decimal hallado a dicha temperatura es de $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1$ min para *Hansenula anómala* y para *Saccharomyces cerevisiae* fue de $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1.7$ min para una población inicial de 10^6 UFC/ml en ambos casos.

Este resultado nos indica que para pasteurizar el néctar de guanábana se requiere un tiempo de 12 min para reducir la carga microbiana de las levaduras estudiadas, de tal manera que existe la probabilidad de encontrar 1 muestra de 1 millón contaminada.

De los parámetros de cinética de crecimiento de las levaduras nativas obtenidos mediante el software microfit 1.0 que se muestran en la **Cuadro N° 4.4** se observa que el néctar edulcorado con sacarosa tiene una velocidad de crecimiento de $\mu_{max} = 0.47 \text{ min}^{-1}$ un tiempo de latencia de $t\text{-lag} = 67.5 \text{ min}$ y tiempo de generación de $t\text{-gen} = 1.48 \text{ min}^{-1}$ a diferencia de los tres tratamientos de néctar de guanábana edulcorado con diferentes concentraciones de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni en la que, la velocidad de crecimiento (μ_{max}) es nula lo cual nos indica que las levaduras inoculadas no crecen en el néctar edulcorado con Stevia por lo tanto tampoco hay parámetros de $t\text{-lag}$ y $t\text{-gen}$.

El análisis estadístico (ANOVA) con ($p=0,05$) demostró que existieron diferencias significativas entre los cinco tratamientos de néctar de guanábana (*Annona muricata*), y mediante el test de tukey se demostró que hay homogeneidad entre los tres tratamientos de néctares edulcorados con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni y el néctar sin Stevia; además que el tratamiento de néctar edulcorado con 0,50 g/L de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni es el que tiene el menor valor de Log (UFC/ml) (**Apéndice N° 3**).

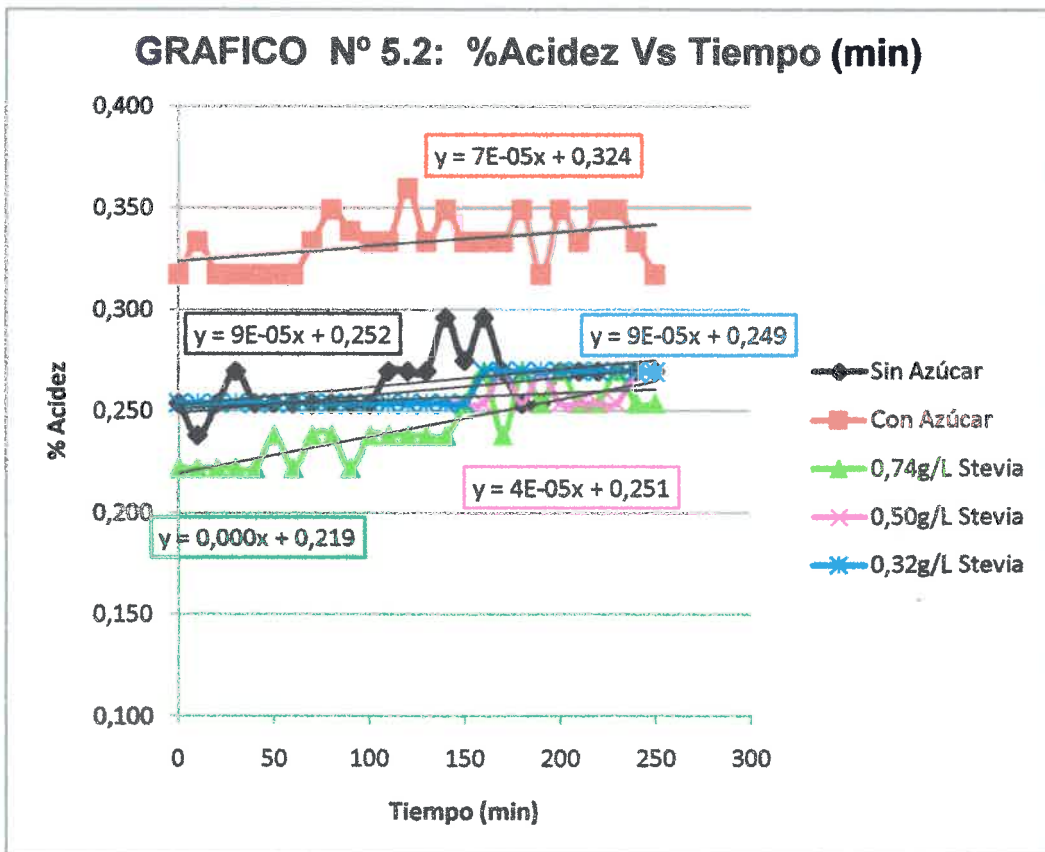
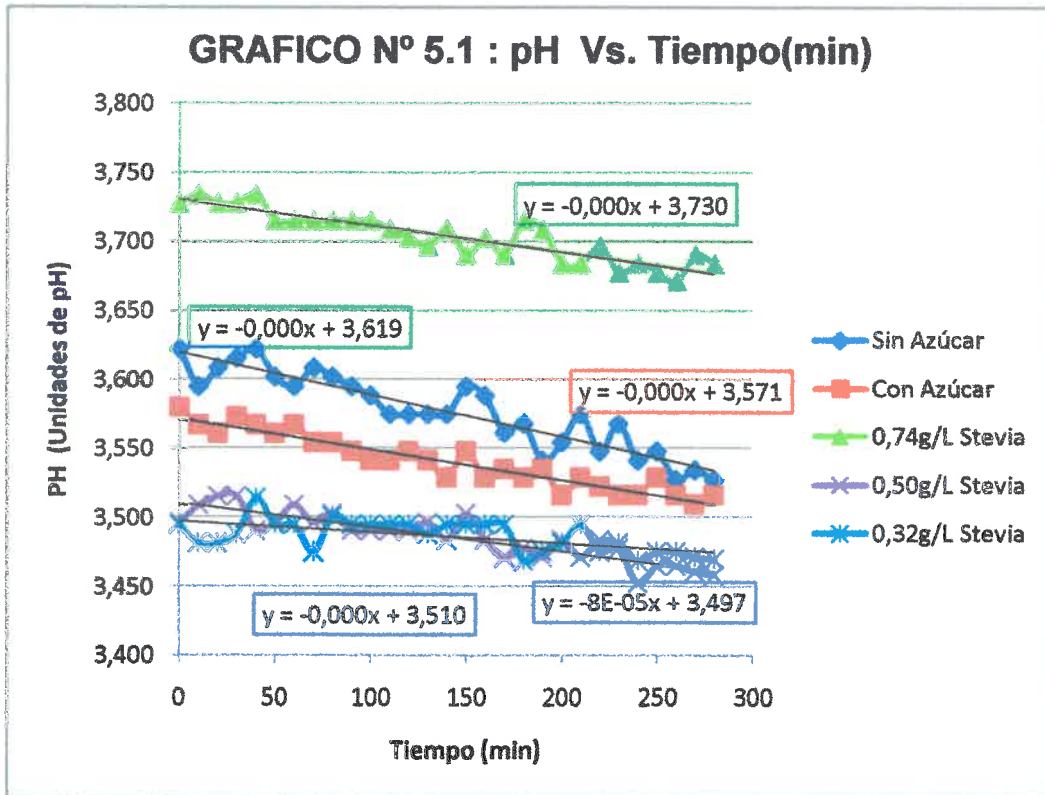
Del **Grafico N° 4.8** se observa que el tratamiento de néctar edulcorado con sacarosa tiene un incremento de la presión más elevado que los tres tratamientos de néctar con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni. El análisis estadístico (ANOVA) con ($p=0,05$) demostró que existieron diferencias significativas entre los tratamientos y mediante el test de rango múltiple de Tukey se demostró que hay homogeneidad entre los tres tratamientos de néctar edulcorados con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni (**Apéndice N° 4**); además que los néctares con Stevia tienen menor tendencia a la formación de gas que se refleja en menores valores de presión.

Del **Grafico N° 4.9** se observa que los cinco tratamientos se tiene una ligera disminución del pH, para el caso de los néctares con Stevia se observa que los tres tratamientos con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni con concentraciones de 0,32 g/L, 0,50 g/L y 0,74 g/L tienen una variación del pH de 0,026; 0,044 y 0,044 respectivamente, para el néctar con azúcar la variación es de 0,063g/L y el néctar sin azúcar de 0,081 g/L.

Sin embargo las líneas de tendencia del promedio de los tratamientos mostrado en el **Grafico N° 5.1** demostraron por medio de las pendientes, que para los cinco tratamientos es similar, esto es debido a que la variación del pH es mínima.

Un comportamiento similar tiene el %acidez que se muestra en el **Grafico N° 5.2** en el que están representadas las líneas de tendencia, demostrando por

medio de las pendientes, que la acidez (%) es similar en los cinco tratamientos, ya que la variación es mínima.



En el **Grafico N° 4.11** se representa los resultados obtenidos de la glucosa (g/L) Vs el tiempo (min) mostrados en la **Tabla N° 4.6**, en la que se puede observar que para los tres tratamientos de néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni la glucosa se mantiene constante a diferencia del néctar edulcorado con sacarosa, en el que se observa que la glucosa disminuye notablemente, y esto se debe a que las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*) inoculadas en el néctar consumieron la glucosa presente en ese medio.

En la **Tabla N° 4.7** se presentan los resultados promedios de las tres repeticiones, obtenidos de los grados °brix para los tratamientos de néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni y sin glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni obtenidos durante los 240 minutos, representado en el **Grafico N° 4.12** en el que se puede observar que para todos los tratamientos los °brix se mantienen constante, esto se explica ya que para el lapso de tiempo estudiado las levaduras han consumido inicialmente la glucosa presente en el medio en el caso del néctar edulcorado con sacarosa.

Comparando los resultados estadísticos obtenidos para los tres tratamientos de néctar de guanábana (*Annona muricata*) edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni con concentraciones de 0,74 g/L; 0,50 g/L y 0,32 g/L en cuanto al recuento microbiológico de las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*), se observa que la mejor concentración en la que generó menores valores del recuento es el néctar con 0,50 g/l de glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni y al mismo resultado se llega al realizar la comparación de la presión de dichos tratamientos, cabe resaltar

que los tres tratamientos se comportan de manera similar para los parámetros antes mencionados y que la comparación entre los valores es bien estrecha. (Apéndice N° 3 y Apéndice N°4)

VI. CONCLUSIONES

- A. El género y especie de levaduras encontradas en el fruto de guanábana fueron *Hansenula anomala* con un tiempo de reducción decimal a 70 °C, 60 °C y 50 °C de $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1$ min, $D_{60^{\circ}\text{C}} = 2$ min y $D_{50^{\circ}\text{C}} = 6$ min y *Saccharomyces cerevisiae* con $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1.7$, $D_{60^{\circ}\text{C}} = 3.9$ min y $D_{50^{\circ}\text{C}} = 8$ min, para una población inicial de 10^6 UFC/mL.
- B. La velocidad de crecimiento de las levaduras nativas de guanábana (*Annona muricata*) en los tres tratamientos de néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni fue nula ($\mu_{\text{max}} = 0$) por lo tanto se comprueba la actividad antimicrobiana de la Stevia frente a las levaduras *Hansenula anomala* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- C. Los parámetros fermentativos que variaron son: la producción de dióxido de carbono CO_2 generó cambios en la presión, con un valor promedio para los tres tratamientos de néctar con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni de 16Kpa en un lapso de 240 minutos, y la variación de pH es mínima con un valor promedio de 0,038.
- D. De los tres tratamientos de néctar de guanábana (*Annona muricata*) edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni, quien mostro mejor actividad antimicrobiana fue la concentración de 0,50 g/L.

VII. RECOMENDACIONES

- A. Se debe activar previamente las levaduras nativas antes de Inocularlas en los néctares de guanábana (*Annona muricata*) edulcorado con Stevia y los néctares sin Stevia, para obtener los resultados esperados en un menor tiempo.

- B. Se debe mantener constante la temperatura de 30°C del fermentador antes de iniciar la fermentación del néctar de guanábana (*Annona muricata*) inoculando las levaduras, para mantener la homogeneidad entre los tratamientos.

- C. Realizar posteriores investigaciones para comparar el comportamiento de un néctar edulcorado con Stevia y otro néctar con aditivos químicos que inhiben el crecimiento microbiano.

- D. Realizar la vida útil del néctar edulcorado con glicósidos de Stevia Rebaudiana Bertoni.

VIII. REFERENCIAS

- ADAMS M. Y MOSS M. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza, España. Editorial Acribia, 1997.
- ARIANSEN J. **Proyecto Ciencia Y Tecnología De Los Alimentos, Fermentaciones, Levaduras y Panificación Industrial**, Perú, editorial Universidad de Lima, 1991.
- AURORA A. SAULO. **Sugars And Sweeteners In Foods**, University of Hawaii at Manoa, Marzo 2005.
- BADUI D. **Química De Los Alimentos**, México, Editorial pearson, 4ta edición, 2006.
- BLANCO T. Y ALVARADO C. **Aditivos Alimentarios**, Perú, Editorial Fundación Ajinomoto, 1era edición, 2006, Pág 169.
- BOUIX M., LEVEAU J. **Microbiología Industrial**, España, Editorial Acribia, 2000, pág. 3-9
- BOURGEOIS C. **Microbiología Alimentaria, Fermentaciones Alimentarias**, España, Editorial acribia, 1era edición, 1994, pág. 295 y 299.
- BOURGEOIS C., MESCLE J., ZUCCA J. **Microbiología Alimentaria, Aspectos Microbiológicos De La Seguridad Y Calidad Alimentaria**, España, Editorial acribia, 1994, pág. 173-175, 295 y 299
- CARDENAS C., GONZALEZ P., PALOMINO G. **Estudio De Pre-Factibilidad Para La Instalación De Una Planta Procesadora De Stevia**

Para El Mercado Peruano, Trabajo de Investigación para optar por el título de Ing. En Industrias Alimentarias , Lima, Universidad Nacional Agraria la Molina, 2007.

- **CASTRO M., Los Néctares ¿Bebidas Necesarias?, Colombia, Universidad del Valle, 2009, N° 2, Vol. 9, pág. 13-14.**
- **CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN / INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Tablas Peruanas De Composición De Alimentos, Perú, editado por Deposito legal de la biblioteca Nacional del Perú N° 2009-02091, 8° Edición, 2009, págs. 24 y 25.**
- **CODEX ALIMENTARIUS., Norma General Del Codex Para Zumos (Jugos) Y Néctares De Frutas, CODEX STAN 247-2005. págs. 1-21**
- **CORONADO M. E HILARIO R. Elaboración De Néctar/ Procesamiento de Alimentos para Pequeñas y Micro Empresas agroindustriales, Perú, Centro de investigación, educación y desarrollo CIED, 2001, pág. 10-14 y 23.**
- **CUBER N. Y ALBERT J. Aditivos Alimentarios, España, editorial Mundi prensa, 1er edición, 2002**
- **DÍAZ B., NUÑEZ G., LADRÓN DE G., QUINTANA V., YNCHÁUSTEGUI P. Evaluación Del Mercado Japonés De Edulcorantes No Calóricos Como Destino De La Stevia Y Del Yacón Producidos En El Perú, Tesis magistral, Lima, 1999, pág. 129 y 184.**

- DOMINGEZ M., **Manual Técnico De Procesamiento de Frutas Bajo Reglamentos Y Estándares Internacionales De Calidad.**, El Salvador, Noviembre de 2007.
- DOYLE M., BEAUCHAT L., MONVILLE T., **Microbiología De Los Alimentos**, España, editorial acribia, 1era edicion,1997
- INCAGRO Y EDAC, **Manual Técnico De Producción De Stevia**, Perú, Cajamarca 2008, pág 3.
- FRAZIER W. Y WESTHOFF D., **Microbiología De Los Alimentos**, España, editorial acribia, 1993
- HARRIS D., **Análisis Químico Cuantitativo**, España, editorial reverté, 2da edición, 2001
- JARAMILLO V. HUAYAMAVE B, LARA G. Y OTROS. **Stevia: Producción Y Procesamiento De Un Endulzante Alternativo**, Ecuador, Escuela superior politécnica del litoral, 2011, pág. 2
- KIRK R. **Composición Y Análisis De Los Alimentos De Pearson**, México, Editorial cecsa, 9 novena edicion1996.
- LOPEZ D. Y PEÑA G. **Plan Estratégico Para La Creación De Una Empresa Dedicada A La Producción Y Comercialización De Edulcorante A Base De Stevia.**, Colombia, diciembre 2004, págs. 8,10 y 12.

- **MARÍN W. Sondeo De Mercado De Stevia, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Colombia, 2004. Págs. 1-66.**
- **MENDO RUBIO M. Medios de Cultivo en Microbiología – Manual de Laboratorio, Perú, ediciones Laborales SRL, 5ta edición, 2003.**
- **MEYER R. Y PALTRINIERI G. Elaboración De Frutas Y Hortalizas, España, Editorial Trillas,2002, pág. 65**
- **MULLER GUNTHER. Microbiología De Los Alimentos Vegetales, España, editorial acribia, 1981, pág 31.**
- **MURILLO FRANCO E. Actividad Antioxidante De Bebidas De Fruta Y De Té Comercializadas En Costa Rica, Universidad de panamá/Instituto de alimentación y nutrición, 2002, págs. 1-18**
- **ORBERÁ RATÓN T. Acción Perjudicial De Las Levaduras Sobre Los Alimentos, Revista Cubana de salud pública, N° 003, julio-set 2004.**
- **PEÑA MONTESINOS N.E. La Stevia Rebaudiana y Su Propiedad Hipoglicemiante En Pacientes Con Diabetes Mellitis Tipo 2 Realizado En El Instituto De Gastroenterologia Boliviano Japonés, Tesina para optar el titulo en Licenciatura en Bioquímica, Bolivia, Universidad Mayor De San Andrés, 2006.**
- **POUCH DOWNES KEITM ITO. Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods, Editorial American public health association, 2008. 4th Edition. Page 53.**

- RODRÍGUEZ G., CORONADO J., NAVA R., Y OTROS. **Caracterización fisicoquímica de la pulpa, de la guanábana (*Annona Muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela**, *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, vol. 41, N° 2, 2007, PP. 151–160
- RODRIGUEZ S., AGUADO A., CALLES M., CANIZARES C., LÓPEZ P., OTROS. **Ingeniería de La Industria Alimentaria**, España, Editorial síntesis, 2002 , pág. 16-18
- ROJAS MONTOYA S. **Stevia, Edulcorante Orgánico Del Siglo XXI**, Perú, Editado Por Universidad Nacional Agraria La Molina, 1era Edición, 2009, Pág. 37,40 y 108 ,
- ROJAS S., DIAZ C., ALFONSO R., OTROS. **Stevia El Dulce Sabor De Tu Vida**, Colombia Community COLLEGE, 2007. Pág. 4.
- SANEZ FALCÓN L. **Tecnología De Los Alimentos**, Separatas del curso de tecnología de alimentos de la UNAC, 2007, pág. 1 y 8.
- SATHISHKUMAR J., MUTHU S., SEETHALAKSHMI L. **In-Vitro Antimicrobial And Antitumor Activities Of Stevia Rebaudiana (Asteraceae) Leaf Extracts**, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, December 2008, N° 7, vol 4, pages 1143-1143
- SANTILLAN ROJAS G.J., **Perpestivas De Producción Del Cultivo De La Yerba Dulce (Stevia Rebaudiana B.) En La Provincia De Rodriguez De Mendoza, Amazonas**, Monografía para optar titulo de Ing. Agrónomo, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina, 2002.

- SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACION DE COMERCIO EXTERIOR (SIICEX). **La Guanábana**, Disponible en <http://www.siicex.gob.pe> , articulo web consultado el 10 enero del 2012

- SOTO E.ALICIA Y DEL VAL S. **Extracción De Los Principios Edulcorantes De La Stevia Rebaudiana Bertoni**, *Revista de ciencias agrarias y tecnología de los alimentos / Universidad de Buenos Aires*, Argentina, Vol. 20-2002, pág. 6-7.

- VARMAN A. Y SUTHER J. **Bebidas: Tecnología Química Y Microbiología**, España, editorial acribia, 1994, pág 29 y 123.

APENDICES

APENDICE N° 1: Análisis estadístico de Hansenula anómala

ANOVA

Tasa de muerte

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,509	2	,755	12,314	,008
Intra-grupos	,368	6	,061		
Total	1,877	8			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

Tasa de muerte

HSD de Tukey^a

Temperaturas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tasa de muerte 50°C	3	,33789	
Tasa de muerte 60°C	3	,64533	
Tasa de muerte 70°C	3		1,31856
Sig.		,347	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APENDICE N°2: Análisis estadístico de Saccharomyces Cerevisae

ANOVA

Tasa de muerte

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,551	2	,276	12,403	,003
Intra-grupos	,200	9	,022		
Total	,751	11			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

Tasa de muerte

HSD de Tukey^a

Temperaturas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tasa de muerte S50°C	4	,29775	
Tasa de muerte S60°C	4	,46467	
Tasa de muerte S70°C	4		,81225
Sig.		,301	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.

APENDICE N°3: Análisis estadístico de las levaduras Inoculadas en el néctar de guanábana (*Annona muricata*)

ANOVA

UFC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,387	4	,597	7,071	,000
Intra-grupos	3,375	40	,084		
Total	5,762	44			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

Log (UFC/ml)

HSD de Tukey^a

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
0,50g/L	9	6,95167	
0,74g/L	9	7,02784	
0,32g/L	9	7,05409	
Sin azúcar	9	7,26844	7,26844
Con azúcar	9		7,58772
Sig.		,162	,156

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000.

APENDICE N°4: Análisis estadístico de la presión de gas

ANOVA

Presión

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,017	4	,004	147,017	,000
Intra-grupos	,000	10	,000		
Total	,017	14			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

Presión de gas Formado

HSD de Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0,50g/L Stevia	3	,19833		
0,32g/L Stevia	3	,19900		
0,74g/L Stevia	3	,20333		
Sin Azúcar	3		,25600	
Con Azúcar	3			,27900
Sig.		,786	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APENDICE N°5: Análisis estadístico de pH

ANOVA

pH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,845	4	,211	661,992	,000
Intra-grupos	,040	125	,000		
Total	,885	129			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

pH

HSD de Tukey^a

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0,32g/L	26	3,48764			
0,50g/L	26	3,48857			
Con azúcar	26		3,54313		
Sin azúcar	26			3,58204	
0,74g/L	26				3,70633
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 26,000.

APENDICE N°6: Análisis estadístico de la Acidez

ANOVA

Acidez

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,132	4	,033	231,379	,000
Intra-grupos	,018	125	,000		
Total	,150	129			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

Acidez

HSD de Tukey^a

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0,74g/L	26	,24211		
0,50g/L	26		,25614	
0,32g/L	26		,25979	
Sin azúcar	26		,26386	
Con azúcar	26			,33298
Sig.		1,000	,141	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 26,000.

APENDICE N°7: Análisis estadístico de los grados Brix (°B)

ANOVA

°B

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2539,296	4	634,824	121721,409	,000
Intra-grupos	,652	125	,005		
Total	2539,948	129			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

°B

HSD de Tukey^a

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Sin azúcar	26	3,00000			
0,50g/L	26		3,09231		
0,32g/L	26		3,14231		
0,74g/L	26			4,44231	
Con azúcar	26				14,38846
Sig.		1,000	,098	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 26,000.

ANEXOS

ANEXO N° 1: Constancia de realización de tesis en el C.E.T.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
Vicerrectorado de Investigación



"AÑO DEL CENTENARIO DE MACHU PICCHU PARA EL MUNDO"
"AÑO DE LA CONSOLIDACIÓN PARA LA ACREDITACIÓN"

CONSTANCIA N° 0095-11-CET/VRI

Bellavista, julio 01 de 2011

EL DIRECTOR DEL CENTRO EXPERIMENTAL TECNOLÓGICO
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO, QUE SUSCRIBE HACE:

CONSTAR

Que, la señorita **OLINDA ALARCÓN SILVA**, egresada de la Escuela Profesional de Ingeniería Química, de la Facultad de Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Callao, Código N°.010772-G y DNI. N°.42045398, **ha desarrollado su trabajo de tesis "Actividad antimicrobiana de glicósidos de *Estevia Rebaudiana Bertoni* en pulpa de guanábana"**, durante el periodo de setiembre 2009 hasta mayo de 2011 tal como consta en libro de registro-control.

Se expide el presente documento a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
Centro Experimental Tecnológico

Ing. Victor A. Higinio Rubio
DIRECTOR

0095CST010711CET/VRI

ANEXO N° 2: Especificaciones Técnica de la Stevia Rebaudiana Bertoni



HOJA DE ESPECIFICACIONES TECNICAS

NOMBRE DEL PRODUCTO:	STEVIOCTO
MARCA:	STEVIA CORONEL® STEVIASWEET®
COMPOSICION RECURSO NATURAL:	Extracto sólido de Stevia Rebaudiana Bertoni (stevioside), maltodextrina
NOMBRE COMUN:	Stevia
NOMBRE CIENTIFICO:	Stevia Rebaudiana Bertoni
NOMBRE BOTANICO:	Stevia SP
FAMILIA:	Compositae (asteráceas)
ORIGEN DE PRODUCCION:	Parcelas propias en Peru
VARIEDAD:	Stevia Coronel 1 criolla
PARTES USADAS DE LA PLANTA:	Hojas
CERTIFICACION ORGANICA:	En trámite
DESCRIPCION DEL PRODUCTO:	
ENVASE:	Pote plástico bolsa de celofán
CONTENIDO:	4g 50g 100g 2.5kg
REGISTRO SANITARIO:	F4900809N-NAUIFR- DIGESA
MEDIDAS:	Altura 3.2 cm por Diámetro 3 cm otras medidas
ASPECTO:	Polvo muy fino
COLOR:	Blanco/amarillo
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS:	
EQUIVALENCIA:	0.1 g de steviocto por taza de 180 ml = 10-15g de azúcar
PRINCIPIO ACTIVO:	STEVIOCTO glycoside (Steviosido y Rebaudiosido A, B y C)
PH:	5.5 - 6.5
TIPO DE DULCE:	Glucosido
SOLUBILIDAD:	Ligeramente soluble agua en bebidas caliente o frías
HUMEDAD:	2 - 4 %
STEVIOSIDO:	41.15 %
REBAUDIOSIDO A:	32.41 %
REBAUDIOSIDO B y C:	24 %
VALORES MICROBIOLÓGICOS:	
MOHOS:	100 CFU/g
COLIFORMES:	Negativo
E. COLI:	Negativo
SALMONELLA:	Negativo
PSEUDOMONAS AERUGINOSA:	Negativo
INFORMACION NUTRICIONAL:	
Contiene: Carbohidratos de fácil asimilación, polipeptidos (proteínas vegetales), lípidos, potasio, calcio, magnesio, fósforo, cobalto, manganeso, silicio, ácido ascórbico, vitamina (B 1) ETC.	
No contiene: Azúcares, calorías, calcio, colesterol, grasas saturadas, grasas totales, hierro, sodio, etc.	
USOS Y BONDADES:	
Como edulcorante 100 % natural, suplemento nutricional, sustituto, alternativo al azúcar y más sano que los edulcorantes artificiales sintéticos.	
Para endulzar, utilice un promedio de 5 gotas por taza (120 ml) de STEVIA CORONEL o al gusto en comidas y bebidas de mesa, dulces, confituras, pastelería, jugos, refrescos, emolientes, mates, tisanas frías o calientes.	
Para prevenir, el uso debe de ser cotidiano para evitar gastritis, caries (enjuagues bucales), sobre peso (regula la insulina, por lo tanto el cuerpo almacena menos grasas), diabetes, hambres falsas, contrarresta la fatiga, combate las dolencias del hígado, páncreas, bazo y lo nutre, etc. Alarga la vida.	

Para controlar el nivel de glucosa (en caso de diabetes), sobre peso, hipertensión arterial, es cardiotónico, ayuda al funcionamiento vascular, regula las hambres falsas, es digestiva, diurética, elimina las grasas malas en la sangre (colesterol y triglicéridos). Es desinfectante, coadyuva con los riñones en la limpieza de la sangre, por la presencia de clorofila, magnesio, etc. Ingere al gusto de manera cotidiana.

En caso de uso excesivo, debe ser controlado por prescripción médica.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO:

VIDA ÚTIL DEL PRODUCTO: 24 meses.
EMPAQUE: Doble bolsa de plástico celdafán por 2,5 kg (04 bolsas) en cajas de cartón corrugado.
ALMACENAMIENTO: Debe mantenerse en un ambiente fresco y seco y protegido de la luz solar. No permitir más de 60 °C de calor continuo.

PRECAUCIONES: Es inocuo.
TOXICIDAD: No predice ningún riesgo potencial para la población humana.

ANEXO N° 3: Preparación del medio de cultivo para el crecimiento y recuento de las levaduras nativas de guanábana

Se peso 18,5 g. de Agar O.G.Y. y se adiciono agua destilada hasta enrasar un matraz de 500ml, Se calentó agitando frecuentemente y llevo a ebullición durante 1 ó 2 minutos hasta su disolución total. Luego se llevo a la autoclave a presión 15psi. y temperatura de 121°C por un tiempo de 15 minutos, enfriar a 45-50°C y se adiciono 0,5ml de gentamicina 0,05g/L.

ANEXO N° 4: Sistema de Identificación de levaduras

El kit API 20C AUX (bio Mérieux S.A) está constituida por 20 cúpulas que contienen sustratos carbonados deshidratados, y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio minimo semi-agar y las levaduras crecen solamente si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. La lectura de estas reacciones se realiza por comparación con el testigo de crecimiento y la identificación se obtiene con la ayuda del software de identificación.

ANEXO N° 5: NTP 203.070: 1977 "Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales. Determinación de la acidez"

* Para la determinación de acidez iónica se efectúa directamente en el producto tal como se expende, teniendo cuidado de homogenizarlo y llevarlo a 20°C antes de la determinación. Se usa un potenciómetro con electrodos de vidrio y los resultados se expresan en unidades de PH a la temperatura Indicada.

* Para la determinación de acidez titulable En donde 1mL. 0.1N NaOH = 0.06404 g. Ácido Cítrico anhidro. Los resultados se expresan como % Acidez y se calcula por la fórmula siguiente:

$$Ac(\%) = \frac{V \times N_{REAL(NaOH)} \times P_{meq}}{V_{muestra}} \times 100\%$$

Donde:

Ac = Acidez titulable, en gramos por 100ml

$V_{muestra}$ = Volumen de la muestra en ml.

V = Volumen gastado de la solución NaOH mL.

$N_{REAL(NaOH)}$ = Normalidad de la solución de NaOH.

P_{meq} = Numero de mili equivalente gramo de Acido Cítrico.

ANEXO N° 6: Ficha técnica del agar OGYE

Application



Oxytetracyclin-Glucose-Yeast Extract Agar (OGYE Agar) Base

Medium for the selective isolation and enumeration of yeasts and moulds in foods

General Information

Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar (OGYE Agar) is described by MOSSEL et al. (1962, 1970) used for the isolation and enumeration of yeasts and moulds in foods.

Mode of Action

The base medium allows good growth of yeasts and moulds. Oxytetracycline inhibits the growth of bacteria.

Typical composition (g/liter)

Yeast Extract 5.0; glucosa (dextrose) 20.0; Agar-agar 12.0

Preparation

Suspend 18.5 g in 500 ml of purified water. Heat to boiling to dissolve completely. Autoclave at 121°C for 15 minutes. Cool the medium to 45-50°C and aseptically add the contents of 1 vial OGYE Selective Supplement. Mix well and pour into plates.

pH: 6.6 ± 0.2 at 25°C.

The prepared medium is clear and slight yellowish-brown in color.

Experimental Procedure and Evaluation

The plates are inoculated using the pour-plate method or the surface spreading method.

Incubation, up to 5 days at 20-25°C.

Count the number of colonies per plate. Calculate the dilution factor into the final count for the sample tested.

Literature

MOSSEL, D.A.A., VISSER, M., and MENDERINK, W.H.J.: A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages. - *Lab. Pract.* **11**: 109 - 112 (1962).

MOSSEL, D.A.A., KLEYNEN-SEMMELING, A.M.C., VINCENTIE, H.M., BEERENS, H., and CATSARAS, M.: Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. - *J. Appl. Bact.* **33**: 454 - 457 (1970).

ANEXO N° 7: Ficha Técnica del Kit de Glucosa



Glicemia

enzimática

Método enzimático para la determinación de glucosa en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

La patología más común relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono es la diabetes mellitus. El diagnóstico precoz y el control de los pacientes diabéticos, tienen por objeto evitar la cetoacidosis y las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglicemia, mediante el tratamiento adecuado.

Dado que existen múltiples factores causales de hiper o hipoglicemia, debe considerarse en cada caso la condición fisiológica y/o la patología presente en el paciente en cuestión.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema de reacción es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

Standard: solución de glucosa 1 g/l.

GOD/POD: solución de glucosa oxidasa (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml).

Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en Buffer Tris 0.92 mol/l.

Reactivo Fenol: solución de fenol 55 mmol/l.

Concentraciones finales

GOD	≥ 3000 U/l
POD	≥ 400 U/l
4-AF	1.25 mM
Fenol	2.75 mM
pH	7.4 ± 0.1

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: listo para usar.

GOD/POD: homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo 4-AF: listo para usar.

Reactivo Fenol: listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

Reactivo de Trabajo: de acuerdo al volumen de trabajo, colocar en una probeta 500 partes de agua destilada, 50 partes de Reactivo 4-AF, 50 partes de Reactivo Fenol y llevar a 1000 partes con agua destilada. Agregar 3 partes de GOD/POD previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.

Pueden prepararse distintas cantidades respetando las porciones

anteadichas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de que el Reactivo Fenol no deteriore el Reactivo de Trabajo.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El fenol es tóxico e irritante.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: en refrigerador (2-10°C) y en frasco color caramelo es estable un mes a partir de la fecha de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo de Trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta su funcionamiento siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0.160 D.O. o las lecturas del Standard sean anormalmente bajas.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: se debe obtener suero o plasma de la manera usual.

También es posible realizar la determinación en líquido cefalorraquídeo. Además, cuando no es posible extraer sangre venosa o en casos de extrema urgencia, la determinación se puede realizar en sangre capilar.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante G de Wiener lab. para su obtención (el mismo contiene fluoruro como conservador).

c) Sustancias interferentes conocidas: los sueros o plasmas con hemólisis visible o intensa deben ser desproteinizados. Las muestras de líquido cefalorraquídeo hemorrágicas deben ser centrifugadas antes de procesar.

No se observan interferencias por: bilirubina hasta 200 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l, hemólisis ligera.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: los

hematías y leucocitos son los responsables de la destrucción enzimática de la glucosa sanguínea, siendo máxima a 37°C, razón por la cual debe centrifugarse la sangre dentro de las dos horas posteriores a la extracción, hasta obtener un sobrenadante límpido y transferir a otro tubo para su conservación. En estas condiciones la glucosa es estable 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas refrigerada (2-10°C). En caso de no poder procesarse la muestra de la forma antes indicada, deberá adicionarse un conservador en el momento de la extracción para inhibir la glucólisis.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Material volumétrico adecuado.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCIÓN

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
 - Temperatura de reacción: 37°C
 - Tiempo de reacción: 10 minutos
 - Volumen de muestra: 20 µl
 - Volumen de Reactivo de Trabajo: 2 ml
 - Volumen final de reacción: 2,02 ml
- Los volúmenes de Muestra y de Reactivo pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 50 µl de Muestra + 5 ml de Reactivo de Trabajo).

PROCEDIMIENTO

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	-	20 µl	-
Muestra	-	-	20 µl
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 10 minutos en baño de agua a 37°C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con el blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCIÓN FINAL

El color de reacción final es estable 1 hora, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{glucosa g/l} = D \times f \quad \text{donde } f = \frac{1,00 \text{ g/l}}{S}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Standatrol S-E 2 niveles.

861234005 - 02 Pág. 3 de 4

VALORES DE REFERENCIA

Suero o plasma: 0,70 - 1,10 g/l

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Los reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Dichos agentes son frecuentemente encontrados en el agua destilada empleada para preparar el Reactivo de Trabajo, por lo que se recomienda controlar la calidad de la misma. Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.

PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
1,00 g/l	± 0,022 g/l	2,37 %
2,00 g/l	± 0,030 g/l	1,50 %

b) **Recuperación:** agregando cantidades conocidas de glucosa a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99 y 101%.

c) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 4,5 g/l. Para valores superiores, diluir 1/2 la solución coloreada final con el Reactivo de Trabajo y repetir la lectura multiplicando el resultado final por dos.

d) **Exactitud:** empleando el método de la hexoquinasa como referencia, se observa que la correlación estadística entre ambos métodos es excelente ($r = 0,99$).

PRESENTACION

Equipo para 1000 ml de Reactivo de Trabajo (Cód. 1400101).

BIBLIOGRAFIA

- Henry, R.J.; Cannon, D.C; Winkelman, J. - Clinical Chemistry. Principles and Techniques, 2nd. ed., Harper and Row Publishers Inc. N.Y. (1974) p. 1288.
- Lott, J.A. and Tumer, K. - Clin. Chem. 21, 1754-1760 (1975)
- Tietz, N.W. - Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. p. 154 (1970).
- Trinder, P. - Ann. Clin. Biochem., 6/24 (1969).
- Young, D. S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- Ziegenhorn, J.; Newman, U.; Hegen, A. - J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15/1:13 (1977).
- Caraway - Stand. Meth. Clin. Chem. 4:240 (1963).

Distribuido por:
Wiener Laboratorios S.A. S.
Rosario 2000
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wienerlab.com.ar>
Dir. Tec.: Viviana E. Catela
Bióquímica
Producto registrado M.S.
Sup. Nº 135776 - 31-8-00



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

ANEXO N° 8: Software Microfit

MicroFit es un Software de aplicación diseñado para analizar parámetros de crecimiento microbiano y permite al usuario ver una representación gráfica de los datos de crecimiento microbiológico.

Se puede obtener estimaciones de los parámetros de:

- Tiempo de Latencia (t-lag).
- Tiempo de generación (t-gen).
- Velocidad de crecimiento (μ_{max}).

MicroFit fue desarrollado con fondos del Ministerio del Reino Unido de Agricultura, Pesca y Alimentación, UnitedBiscuits, Supermercados Sainsbury, Unigate alimentos europeos y DuPont, se puede descargar de: Microfit1.software.informer.com/1.0/.

