



UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS



TEMA:

Evaluación de un método alternativo de pasteurización por inyección directa de ozono en vino de frutas elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*pyrus malus l.*), pera (*pyrus communis l.*) y uva (*vitis vinifera*).

Trabajo de Titulación, modalidad Experiencia Práctica de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia en Ingeniería en Alimentos.

AUTOR: LUIS RODRIGO VALLE ESPINOSA.

TUTOR: Ph.D. MILTON RAMOS.

AMBATO – ECUADOR

Septiembre 2016

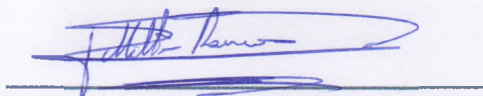
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Milton Rubén Ramos Moya.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Experiencia Practica de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 28 de julio de 2016



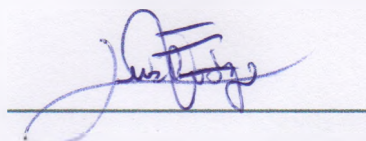
Ph.D. Milton Rubén Ramos Moya.

C.C.: 1801119635

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Rodrigo Valle Espinosa, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas.



Rodrigo Valle Espinosa.

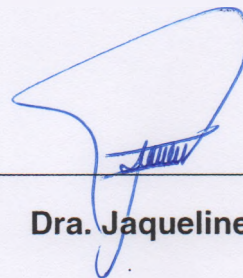
C.C.: 1803589355

AUTOR

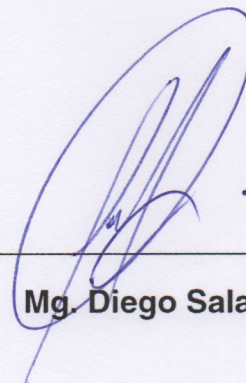
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadoros, aprueban el presente trabajo de titulación modalidad experiencia practica de investigacion y/o intervención. El mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingenieria en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

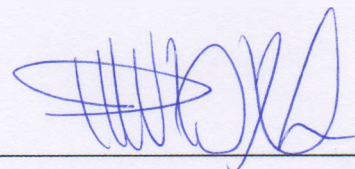
Para constancia firman:



Dra. Jaqueline Ortiz



Mg. Diego Salazar



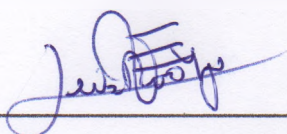
Mg. Paulo Baquero

Ambato, 22 de agosto de 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Tecnica de Ambato para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de el, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en linea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión publica, ademas apruebo la reproducción de este Trabajo dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia economica y se realice respetando mis derechos de autor.



Rodrigo Valle Espinosa.

C.C.: 1803589355

AUTOR

“Tu tiempo es limitado, de modo que no malgastes viviendo la vida de alguien distinto.

No quedes atrapado en el dogma, de vivir como otros piensan que deberías vivir. No dejes que los ruidos de las opiniones de los demás acallen tu propia voz interior. Y, lo más importante, ten el coraje para hacer lo que te dicen tu corazón y tu intuición”

Steve Jobs.

DEDICATORIA

“No hay nada imposible, porque los sueños de ayer son las esperanzas de hoy y pueden convertirse en realidad mañana”

Anónimo.

A la vida por que las metas cumplidas son solo una parte del camino, las experiencias y errores son los verdaderos tesoros.

A ti Mamita Chío, luchadora incansable, heroína y ejemplo de toda mi vida, por tu amor, por tus consejos, por tu apoyo, por tu esfuerzo, a mis Abuelitos, mi soporte, mis raíces, Papá Fabian tus bendiciones nunca me faltaran, Maminita tu amor incondicional me acompañará siempre, a Gonzalo más que mi padre mi amigo, mi apoyo, a mi Familia el impulso para seguir adelante y por su amor, combustible para seguir consiguiendo éxitos.

“La innovación distingue a los líderes de los seguidores”

Steve Jobs.

AGRADECIMIENTOS

El tiempo de Dios es perfecto. “Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora”

Eclesiastés 3:1.

A mi Facultad por haberme permitido crecer, aprender y formarme, a todos mis maestros quienes impulsaron la chispa para seguir adelante.

Al Ing. Milton Ramos por haber sido parte y apoyar esta loca idea, al Ing. Freddy del Pozo por incentivar el gusto por la carrera, al Ing. Juan de Dios Alvarado por promover en mi la investigación, al Ing. Rubén Vilcacundo por sus consejos y experiencias, a los Ing. Jorge Vélez e Ing. Diego Salazar por su amistad, cariño.

A mis amigos, pilar fundamental para alcanzar las metas propuestas, Emilio más que mi amigo mi hermano de la vida, Solange, Thiago, Mireya, Adrián; cómplices de tantas locuras. A María Luisa, por su amor y cariño, por acompañarme en el camino, quien fue motor fundamental para luchar y alcanzar esta meta.

A Industrias Licoreras Asociadas S.A. por confiarme en mi y en mi talento, por permitirme crecer y desarrollarme profesionalmente, por el cariño y aprecio recibidos, por las experiencias vividas y por los errores aprendidos.

Al Ing. Wilson Santana Álvarez. por su cariño, consejos y lecciones. Al Sr. Trajano Santana Álvarez por su estima, apoyo y confianza.

Y a todos aquellos a quienes en estas palabras olvido, porque de todos soy un poco y un poco tengo de todos.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁG.
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	3
1.1 Tema.....	3
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes investigativos.....	7
2.1.1 Desarrollo histórico del vino.....	9
2.1.2 Acción de las levaduras en los procesos vinícolas.....	11
2.1.3 Proceso de elaboración de vino.....	14
2.1.4 Pasteurización del vino.....	15
2.1.5 Química y propiedades del ozono.....	17
2.1.6 Acción del ozono sobre los microorganismos.....	18
2.1.7 Factores que afectan el poder oxidante del ozono.....	19
2.1.8 Generación de ozono.....	20

2.1.8.1	Factores ambientales que inciden en la generación de ozono.....	23
2.1.9	Alternativas de inyección de ozono.....	25
2.1.10	Cinética de consumo de ozono.....	27
2.1.11	Concentración de ozono residual.....	28
2.1.12	Fundamentos legales sobre el uso de ozono en alimentos.....	30
2.2	Hipótesis.....	31
2.3	Señalamiento de variables de la hipótesis.....	32
2.3.1	Variable independiente.....	32
2.3.2	Variable dependiente.....	32
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....		33
3.1	Materiales.....	33
3.1.1	Materia prima.....	33
3.1.1.1	Proceso de elaboración de vino de frutas.....	33
3.1.2	Generación de ozono.....	38
3.2	Métodos Analíticos.....	38
3.2.1	Determinación de ozono residual y cinética de consumo de ozono (CT)...	38
3.2.2	Determinación de UFC/ml de mohos y levaduras.....	39
3.2.3	Determinación bromatológica del mejor tratamiento ozonificado.....	40
3.2.4	Perfil cromatográfico del vino ozonificado.....	40
3.2.5	Determinación organoléptica.....	41

3.3	Diseño experimental.....	42
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		44
4.1	Análisis y discusión de los resultados.....	44
4.1.1	Resultados de la determinación de ozono residual y cinética de consumo de ozono (CT).....	44
4.1.2	Resultados microbiológicos.....	46
4.1.3	Resultados bromatológicos.....	55
4.1.4	Resultado cromatográfico.....	56
4.1.5	Resultados organolépticos.....	58
4.2	Verificación de hipótesis.....	60
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		62
5.1	Conclusiones.....	62
5.2	Recomendaciones.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		65
ANEXOS.....		69

RESUMEN

La presente investigación tiene el propósito de evaluar la factibilidad de emplear inyección directa de ozono (O_3) en el vino de frutas elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*) como un método alternativo de pasteurización. Para esto, se planteó un diseño experimental A x B, con el factor A (concentración de O_3) a 1.0, 1.5 y 3,0 mg/L y el factor B (tiempo de inyección de O_3) a 1, 3 y 5 minutos. Los parámetros evaluados fueron la cinética de consumo de O_3 , la concentración de O_3 residual, las UFC/ml de mohos y levaduras del vino pasteurizado y ozonificado. Se efectuó la caracterización bromatológica del mejor tratamiento ozonificado, su perfil cromatográfico de alcoholes y su calidad organoléptica. El mejor tratamiento en base a los resultados microbiológicos fue el tratamiento a2b1 que corresponde a una concentración de 1,5 mg/L de O_3 inyectado al vino de frutas durante 1 minuto, que reduce el 99.9 % de la carga microbiológica del vino de frutas, que comparado con el método tradicional de pasteurización mediante intercambio de calor (80 °C durante 9 segundos) presenta un aumento en la eficiencia del 20 % al emplear ozono. En relación al análisis bromatológico se observó que el efecto de la molécula de O_3 no influye sobre los parámetros analizados, lo que corrobora la teoría de acción del ozono que únicamente actúa degradando los microorganismos, sin afectar a los demás componentes químicos del vino de frutas. La curva del perfil cromatográfico de los alcoholes del vino de frutas mostró una estabilidad de los intervalos entre los alcoholes analizados, lo que demuestra que la aplicación de ozono al vino de frutas no afecta a los componentes estructurales del vino y potencialmente podría mejorar la estabilidad del producto en el tiempo. Con respecto a la calidad organoléptica, el grupo de catadores semi entrenados no distinguieron entre las combinaciones de la prueba triangular aplicada, la muestra de vino de frutas sometida a inyección directa de ozono. En conclusión, el ozono no produce cambios que sean significativos ni perceptibles en el producto final, sustentando la factibilidad del empleo de la ozonización como un método alternativo de pasteurización de vino de frutas.

Palabras claves: Vino, frutas, pasteurización, ozonización.

ABSTRACT

This research aims to evaluate the feasibility of using direct injection of ozone (O_3) in the fruit wine made from a combined apple juice (*Pyrus malus* L.), pear (*Pyrus communis* L.) and grape (*Vitis vinifera*) as an alternative method of pasteurization. For this, it raised an experimental design A x B, with factor A (concentration of O_3) 1.0, 1.5 and 3.0 mg/L and factor B (injection time O_3) at 1, 3 and 5 minutes. The parameters evaluated were the kinetics of consumption of O_3 , the residual concentration of O_3 , the CFU/ml of molds and yeasts in pasteurized wine and ozonized wine. It was performed the bromatological characterization of ozonized best treatment, chromatographic profile of alcohol and its organoleptic quality. The best treatment based on microbiological results was the a2b1 treatment which corresponds to a concentration of 1.5 mg/L O_3 injected into fruit wine for 1 minute, reducing the microbiological load in 99.9 % of wine fruits, which compared to traditional pasteurization method by heat exchange (80 ° C for 9 seconds) has an increase in efficiency of 20 % when using ozone. Regarding the compositional analysis, it was observed that the effect of the O_3 molecule does not influence the analyzed parameters, which supports the theory of action of ozone that only acts degrading microorganisms, without affecting other chemical components of the fruit wine. The curve of the chromatographic profile of alcohols of fruit wine showed a stability of the intervals between the analyzed alcohols, which shows that the application of ozone fruit wine does not affect the structural components of wine and could potentially improve product stability in the time. With regard to the organoleptic quality, the group of semi-trained tasters did not distinguish between combinations of the triangular test applied. In conclusion, the ozone does not produce significant or perceptible changes in the final product, supporting the feasibility of ozonation as an alternative method of pasteurization of fruit wine.

Keywords: Wine, fruit, pasteurization, ozonation.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de elaboración de vino de frutas, una operación importante es la estabilización biológica del producto mediante la pasteurización con el propósito de garantizar su vida útil. El presente trabajo de investigación plantea el uso de inyección directa de ozono como un método alternativo de pasteurización de vinos de frutas, es decir, sustituir el o los procesos tradicionales de intercambio de calor o de uso de sustancias químicas (inhibidores microbiológicos), aprovechando las características oxidantes de las moléculas de ozono (O_3).

Históricamente, desde la década de los 70 del siglo pasado, el O_3 se ha empleado para la desinfección y potabilización de agua, y potencialmente es una de las sustancias con mejor desempeño para el aseguramiento de la calidad e inocuidad de alimentos. Es conocido que después de su acción sobre la materia orgánica, la molécula de O_3 inicia un proceso de descomposición hasta O_2 , característica que lo hace único y completamente aprovechable, garantizando que no se encuentren trazas o subproductos luego de su acción y que el tiempo de residencia posterior a su aplicación favorezca a la estabilidad en el tiempo de los productos tratados por este método. **(Robertson, 2013)**

A partir de 1997, el O_3 es considerado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) como una sustancia Generalmente Reconocida como Segura (GRAS) y desde 2011 autorizado su uso en el proceso de conservación y manipulación de alimentos como un aditivo que puede ser empleado directa o indirectamente en dichas operaciones partiendo del principio de aseguramiento de la calidad de los productos alimenticios. **(FDA, 2011)**

En la industria vinícola, una operación importante dentro de los procesos, es el de someter al producto a condiciones determinadas con el objetivo de detener la fermentación producida por las levaduras, ya sea empleando métodos físicos o químicos, pero que potencialmente afectan las características sensoriales del mismo. Por lo tanto, se plantea el uso de O₃ como una alternativa viable, ya que el mecanismo de acción del O₃ genera cambios en la permeabilidad celular de los microorganismos, seguido de una lisis celular sin alterar las características organolépticas del vino de frutas, una diferencia marcada con otros métodos tradicionales. Por tanto, la presente investigación pretende presentar a la industria vinícola una nueva alternativa de pasteurización dentro de las operaciones de los procesos de producción.

CAPITULO I. EL PROBLEMA

1.1 Tema

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE PASTEURIZACIÓN POR INYECCIÓN DIRECTA DE OZONO EN VINO DE FRUTAS ELABORADO A PARTIR DE UN MOSTO COMBINADO DE MANZANA (*Pyrus malus L.*), PERA (*Pyrus communis L.*) Y UVA (*Vitis vinifera*).

1.2 Justificación

Tradicionalmente, la industria comercial de procesamiento de alimentos se basa en numerosas modalidades para esterilizar y conservar los alimentos. Estos incluyen la pasteurización por calor y el uso de aditivos químicos, tales como benzoato de sodio y sorbato de potasio, para prevenir el deterioro y extender la vida útil de los alimentos procesados. No obstante, la necesidad de aumentar la seguridad de los alimentos, unida a la demanda de los consumidores de alimentos para que éstos sean más “naturales”, más “frescos”, con menor tratamiento tecnológico, mejor calidad nutricional y con una vida útil relativamente larga está determinando que se modifique la forma de aplicar algunas de las técnicas de conservación tradicionales y que progresivamente surjan nuevas tecnologías. **(Alonso, 2010)**

Desde el punto de vista empresarial, la búsqueda de nuevas técnicas de procesamiento de los alimentos está ligada directamente con el objetivo de mejorar el desempeño de los procesos, al ser más productivos y eficientes, abaratando costos, lo que conlleva a que los consumidores puedan acceder a productos de diversas gamas, seguros, cuidando la calidad y respondiendo a sus necesidades, así como también a la inocuidad del producto, sin dejar de lado la estabilidad en el tiempo.

En el campo de la biotecnología alimentaria se destaca la industria de producción de bebidas alcohólicas, en la que se pueden distinguir bebidas alcohólicas destiladas, generalmente a partir de un producto de fermentación y con volúmenes de alcohol que incluso superan el 40 % (VOL.) y las producidas por fermentación alcohólica (vino, cerveza, hidromiel, sake), cuyo contenido de alcohol no supera el 20 % (VOL.). Cabe señalar que en el proceso básico de elaboración de un vino se mencionan las operaciones pre-fermentativas, la fermentación alcohólica y las operaciones pos-fermentativas. Entre las operaciones pos-fermentativas se destaca la pasteurización con el propósito de obtener un vino final definido y estable. La pasteurización tiene por objetivo detener la actividad de las levaduras y eliminar potenciales microorganismos presentes. Su aplicación puede variar de acuerdo a la necesidad y disponibilidad de equipos y maquinarias dentro de la industria, pudiendo ser lenta o rápida, y además de las características finales que se requieran conseguir en el producto final, luego un vino estable microbiológicamente significa estar protegido frente al desarrollo de microorganismos. **(García, 2014)**

Es importante mencionar que, la pasteurización convencional del vino empleando choques térmicos o inhibidores químicos de crecimiento fúngico, como por ejemplo el anhídrido sulfuroso y sus sales; cumplen con el objetivo de inhibir la actividad microbiana que causa un deterioro de las características organolépticas del producto final. Aquí la necesidad de buscar un método alternativo, más eficiente, que cumpla con el objetivo microbiológico y otorgue características adicionales, junto con un valor agregado como el aumento del tiempo de vida útil o la mejora de las propiedades organolépticas percibidas por el consumidor.

En el marco del empleo de desinfectantes químicos en la producción de alimentos, el ozono es el segundo mayor oxidante y el desinfectante más potente que se conoce, propiciando un excelente control microbiológico debido a la gran capacidad destructora (oxidante) y por la rapidez en que

se disgrega su tercer átomo, por lo que puede ser empleado con absoluta seguridad. **(Hoigné, 1998)**

La ozonación es una tecnología bien establecida en el tratamiento de agua potable y en la esterilización de ambientes, pero no en el tratamiento de otros fluidos, de allí la importancia de este estudio con el fin de determinar la factibilidad del empleo de ozono como método alternativo a la pasteurización en vinos de fruta obtenidos por fermentación natural, partiendo del principio químico activo del O₃. Además, el ozono luego de su aplicación sufre un proceso de conversión en oxígeno, sin dejar ningún residuo químico perjudicial ni afectar las características organolépticas del producto, pero que garantizaría la inocuidad final del mismo. **(Robertson, 2013)**

En adición a las razones expuestas anteriormente sobre la búsqueda de una nueva alternativa a los tratamientos convencionales de pasteurización y al uso del ozono como un método innovador de desinfección, la presente investigación está promovida por la necesidad de Industrias Licoreras Asociadas S.A. (ILA S.A.) por mejorar sus procesos de producción para la optimización de recursos y con el enfoque de siempre brindar a los consumidores productos de calidad, seguros e inocuos, como lo ha venido desarrollando a través de los 54 años de presencia en el mercado local y nacional. ILA S.A. empresa Ambateña, mentalizadora del desarrollo local y del fomento productivo, pionera en la zona centro en la elaboración de bebidas alcohólicas, líder a través de los años, impulsadora de la innovación de sus procesos y consciente de la sinergia que debe existir entre la industria y la academia, busca mediante la investigación, como la que pretende el presente trabajo de titulación, obtener resultados que puedan ser reproducidos y aplicados en sus procesos productivos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Mejorar la estabilidad biológica del vino de frutas obtenido por fermentación natural a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*), mediante la inyección directa de ozono.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto oxidativo e inhibidor del ozono sobre el crecimiento de mohos y levaduras en el vino de frutas.
- Determinar la concentración óptima de ozono para asegurar la estabilidad microbiológica del vino de frutas.
- Evaluar las características bromatológicas, organolépticas y cromatográficas del vino de frutas tratado por inyección directa de ozono como parámetros de calidad.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

En el Departamento de Química – Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, se desarrolló una investigación sobre el efecto de los polifenoles en el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación, lo cual muestra el interés por el desarrollo de métodos alternativos de pasteurización en los procesos vinícolas, ya que como se asevera, la diversificación de los métodos es uno de los pasos fundamentales en el desarrollo de productos y procesos. Como resultado de esta investigación se pudo demostrar que los polifenoles actúan directamente sobre el metabolismo de las bacterias lácticas que en el vino acarrearán consecuencias graves como es el deterioro de las características organolépticas del producto final y afectan directamente a la estabilidad biológica del producto. **(García, 2012)**

Con respecto al empleo de ozono, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Antenor Orrego de Perú, se planteó el estudio del efecto del tiempo de exposición al ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y aceptabilidad general en fresas (*Fragaria vesca L.*), empleando al ozono como método de conservación de mínimo proceso bajo atmósferas modificadas. Esta investigación demostró la eficiencia del empleo de O₃ al reducir en un 82 % la presencia de *Botrytis cinerea* en las capas superficiales de la fruta, producto de lo cual las características microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas mejoraron, aumentando el tiempo de vida de la fruta sin afectar su calidad nutricional. **(Vite, 2015)**

Dentro de esta línea, Springer Science publicó un trabajo de investigación en el cual se estudió la factibilidad del empleo de ozono como método de conservación de frutas y vegetales cortados y frescos, en los

procesos de poscosecha para controlar posibles microorganismos que afectan la vida útil de frutas y vegetales. Esta investigación arrojo como resultado que el empleo de agua potabilizada mediante O₃ con una dosis de 1 mg/L en los procesos de lavado de frutas y vegetales cortados previene la contaminación cruzada y aumentan la estabilidad microbiológica del producto hasta su operación de empaque y distribución, lo que por ende mejora su tiempo de vida útil sin afectar sus propiedades nutricionales y previene posibles contaminaciones en la cadena de distribución. **(Miller & Silva, 2013)**

El empleo de ozono dentro de la industria vinícola ha estado limitado al estudio de los efectos sobre los materiales y equipos que se usan dentro del proceso en sí; así en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile se planteó el estudio de los efectos del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces spp.*, con el objetivo de controlar la población de microorganismos perjudiciales que afectan el proceso de fermentación en los recipientes en los que se desarrolla esta operación. Esta investigación determinó que efecto de la aplicación de O₃ gaseoso en el interior de las barricas de roble tuvo una eficiencia del 97 % en el control de *Brettanomyces spp.*, conllevando a que no existan problemas de deterioro del producto durante las etapas fermentativas e incluso mejorando y brindando mayor estabilidad al proceso. Esto demuestra, como efectivamente se asevera, la búsqueda de alternativas para el uso de ozono dentro de la industria de alimentos, y no solamente como método para la purificación de agua. **(Colil, 2013)**

En la Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral se planteó la determinación de la cinética de inactivación de la *Escherichia Coli* con ozono para el tratamiento de efluentes y aguas negras, basándose en el poder sanitizante y bactericida del ozono. Se demostró una eficiencia del 98 % en la reducción de la población microbiológica del patógeno al aplicar una dosis de 5 mg/L de ozono durante 3 minutos, permitiendo que los efluentes

y agua negras tratadas sean devueltas a las fuentes naturales de acuerdo a lo que establece el Libro V de la Legislación Ambiental en materia de control y prevención de la contaminación de fuentes de agua dulce. **(Villacís, 2006).**

Esta investigación demuestra la efectividad del uso de O₃ y que, en conjunto con los demás antecedentes presentados, respaldan el presente trabajo.

2.1.1 Desarrollo histórico del vino

Los orígenes del vino se remontan a la antigüedad, en torno a los años 6.000 - 5000 a.C. Existen indicios del cultivo de la especie salvaje *Vitis vinífera sylvestris* y de la obtención de bebidas a partir de uva y otras combinaciones de frutos nativos de esa época. Actualmente, la manufactura de vinos de frutas distintas a la uva es muy popular en muchos países donde las condiciones climáticas impiden el desarrollo de la vitivinicultura. El vino de fruta es una bebida obtenida a partir de fermentación alcohólica del zumo de frutas diferentes a la uva tradicional. Si bien el método de elaboración es semejante al del vino, no lo es en sentido estricto. **(Dubourdieu, 2006)**

Los romanos heredaron la afición al vino de los griegos, gracias a las viñas plantadas por los etruscos. Los chinos fueron conocedores en el arte de fermentar mostos de la uva y los primeros en reglamentarlo. Durante la edad media la elaboración del vino fue una importante tarea en los monasterios. Cada uno poseía su propio viñedo, de donde se extraían los vinos litúrgicos, de tal modo que los monjes medievales pueden considerarse precursores de la moderna viticultura, cultivo de uva, vinicultura y fabricación del vino. **(Hampson, 2000)**

Otros historiadores del vino señalan que hace poco más de cinco milenios, en algún punto ribereño del Mar Negro, fue donde por primera

vez, en forma accidental, comenzaron a elaborar vino, al producirse la fermentación espontánea del jugo fresco de uvas contenidas en vasijas o ánforas, en las cuales era almacenados para ser consumidos como frutos frescos lo que da cuenta de la amplia tradición vinícola ligada al desarrollo de la cavilación a lo largo de la historia. **(Barbado, 2005)**

Actualmente, la **Organización Internacional de la Viña y el Vino (2015)** define los vinos de frutas como una bebida alcohólica obtenida por la fermentación parcial o completa de jugos de frutas frescos, jugo concentrado o reconstituido; macerado de pulpa con la adición de agua, azúcar o miel. Según la estimación de esta organización, la producción mundial de vino de frutas en 2014, se situó en 252 millones de hectolitros (hl), 15 millones menos que en el año anterior. El primer país productor de vino y vino de frutas fue Francia, con 41,4 millones de hl, seguido por Italia con 40,1 millones de hl y España con 30,4 millones de hl. Con menor volumen, la producción creció en Portugal, Grecia y disminuyó en Alemania.

Con respecto a nuestro país, el **Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (2015)** señala que aunque Ecuador no es un país con tradición en el consumo de vino de frutas, el crecimiento promedio de más del 178% en las importaciones de este producto en los últimos 10 años refleja un aumento en el gusto por esta bebida; y en términos de índices económicos significan al menos \$11 millones de dólares que importa el país de este producto, abriendo amplios mercados para la producción nacional y la tecnificación de los procesos con el enfoque del desarrollo de la matriz productiva y considerando el incremento de tasas arancelarias a este producto.

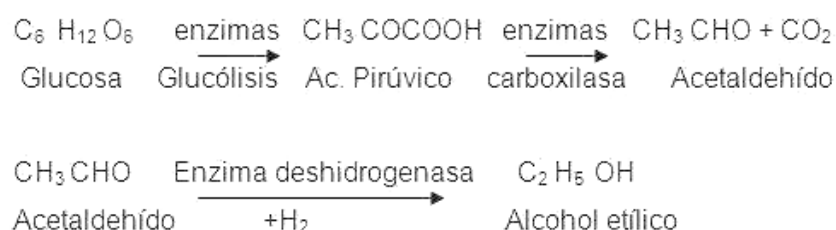
Pese a que Ecuador no tiene una tradición vinícola arraigada como en otros países de la región, la producción de vinos podría ser una de las alternativas para hacer más sostenible el cultivo de frutas típicas del Ecuador, ya que hoy en día muchas de estas frutas casi ni se cultivan

debido a la pérdida de interés y demanda del mercado. En la actualidad, esfuerzos ciertamente aislados pretenden lograr productos de alta calidad a partir de frutas propias del país, industrializándolas y haciéndolas atractivas a los consumidores cada vez más exigentes, quienes se ven obligados a consumir productos importados ya que la industria local no es capaz de responder adecuadamente a sus necesidades.

En la industria vinícola, variedades específicas de fruta como materia prima, cepas determinadas de levadura con mayor poder de fermentación, equipos industriales con sistemas de control de operaciones, aditivos que ayudan a mejorar los niveles de conservación o características organolépticas, entre otras, son las herramientas que permiten hoy en día lograr productos de gran aceptación comercial. Al trabajar con vinos de frutas el reto tecnológico es, lograr transformar las materias primas autóctonas y lograr un producto de óptima calidad y con valor agregado. Estas transformaciones están dirigidas a asegurar tres aspectos fundamentales: la viabilidad del proceso al emplear materias primas innovadoras, la optimización organoléptica con el fin de resaltar los sabores tradicionales y la rentabilidad en la búsqueda de ingresos económicos. **(Kilcast, 2014)**

2.1.2 Acción de las levaduras en los procesos vinícolas

Según **Kenneth (2011)**, un vino de frutas se obtiene por la fermentación de los azúcares contenidos en el mosto que se transforman en alcohol, principalmente, junto con otros compuestos orgánicos. Este complejo proceso se lleva a cabo por la mediación de las levaduras que al quedarse sin aire van metabolizando los azúcares en alcohol y gas carbónico, como se muestra en la reacción química:



Las levaduras son cuerpos unicelulares (generalmente de forma esférica) de un tamaño que ronda los 2 a 4 μm y que están presentes de forma natural en algunos productos como las frutas, cereales y verduras, denominados organismos anaeróbicos facultativos, es decir que pueden desarrollar sus funciones biológicas sin oxígeno. Se puede asegurar que el 96% de la producción de etanol la llevan a cabo diferentes especies de levaduras, entre las que se encuentran principalmente la *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panificación, quien convierte un 90 % del azúcar en cantidades equimoleculares de alcohol y CO_2 . **(Kenneth, 2011)**

Cuando el medio es rico en azúcar, la transformación del mismo en alcohol por la acción metabólica de las levaduras hace que la presencia de una cierta concentración afecte a la supervivencia de las levaduras, lo que ocasiona que no puedan realizar la fermentación en tal medio (las altas concentraciones de azúcar frenan los procesos osmóticos de las membranas celulares). Aunque hay distintos tipos de levaduras con diferentes tolerancias a las concentraciones de azúcares y de etanol, el límite suele estar en torno al 14 % de volumen de alcohol. Los azúcares empleados en la fermentación generalmente son: dextrosa, maltosa y sacarosa, propios de las frutas del mosto y en ocasiones en las que el proceso lo requiera adicionadas intencionalmente. **(Fernández, 2014)**

Tras la introducción de las levaduras vivas al mosto, los fosfatos se unen a las moléculas de azúcar, y las de seis carbonos comienzan a dividirse en tres piezas de carbono y pasar por una serie de reacciones de reordenamiento. Durante este proceso, el átomo de carbono se libera en forma de dióxido de carbono con el resto de los componentes convirtiéndose en acetaldehído. La falta de oxígeno en este proceso anaeróbico permite que el acetaldehído se convierta con el tiempo, por una reacción química redox, en etanol. Durante la conversión de acetaldehído, una pequeña cantidad se convierte, por la oxidación, en ácido acético que, en exceso, puede contribuir al defecto del vino conocido como acidez volátil. **(Kenneth, 2011)**

Si bien es cierto, el oxígeno es el desencadenante inicial de la fermentación, ya que las levaduras lo van a necesitar en su fase de crecimiento, al final de la fermentación conviene que la presencia de oxígeno sea mínima para evitar la pérdida de etanol y la aparición en su lugar de ácido acético. La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, es decir, se desprende energía en forma de calor y es uno de los factores claves a controlar durante el proceso de fermentación, ya que, debido al propio proceso bioquímico, crea una gran cantidad de residuos de calor que puede sacar el mosto del rango de la temperatura ideal (15 y 25 °C). La fermentación a temperaturas más altas puede tener efectos perjudiciales para el vino, ya que pueden aturdir a la levadura y dejarla en inactividad e incluso "evaporizando" algunos de los sabores y aromas característicos del vino. **(Fernández, 2014)**

Según **Vázquez (2015)** las condiciones básicas requeridas para una fermentación alcohólica independientemente del producto final que se decida obtener, son:

- Concentración de azúcares: 10 – 18 %
- pH: 4 y 4,5
- Ausencia de O₂ y presencia de fosfatos.
- Temperatura de fermentación: 15 – 25 °C.

Es importante mencionar que las características organolépticas finales del producto obtenido a través de la fermentación dependen mucho de la materia prima empleada en la preparación del mosto y que serán las responsables de sabores característicos de cada producto vinícola priorizando la calidad de las frutas, de allí la aseveración de que jamás un vino será igual a otro.

2.1.3 Proceso de elaboración de vino

La elaboración del vino o vinificación es el conjunto de procesos que llevan al mosto a una bebida alcohólica denominada vino. El proceso principal por el que ocurre esta transformación es la fermentación alcohólica. La elaboración del vino comienza con el prensado de la uva para la obtención del mosto y acaba exactamente en las operaciones de embotellado. Los procesos que llevan a la fermentación del mosto, así como las reacciones durante la maduración, son muy diversas y dan el carácter propio al vino. En la elaboración de vinos encontramos varios procesos diferentes e incluso algunos que dependen si se habla de tintos, blancos o de frutas diferentes a la uva. Como ya se mencionó la etapa más importante, el eje central de todo el proceso, es la fermentación, durante la cual, el azúcar de la uva es transformada en alcohol. En la piel u hollejo del grano de uva, se encuentran pequeños microorganismos que pertenecen al grupo de los hongos llamados levaduras. Estas levaduras son las responsables de la transformación del azúcar. Cuando las condiciones son las adecuadas, las levaduras comienzan a reproducirse y van transformando los azúcares en alcohol y gas carbónico. Si bien es cierto, adheridas al hollejo del grano de uva, vienen las levaduras naturales (silvestres), en la nueva industria vinícola se agregan cepas de levaduras seleccionadas (de laboratorio) para asegurar la fermentación óptima y conseguir características únicas en ciertos tipos de vino, sabores afrutados más fuertes o dulzores específicos. Tras la fermentación, el vino del depósito se va clarificando ya que en su fondo se van acumulando materias sólidas. Este proceso de aclarado llamada trasiego se ve favorecido por el frío y las bajas temperaturas las cuales permiten que el vino adquiera su color característico. Los trasiegos se repiten periódicamente, evitando así posibles contaminaciones producidas por la descomposición en el vino de estas materias sólidas. Una vez finalizados los procesos anteriores, los vinos son sometidos a un proceso de pasteurización para asegurar la estabilidad microbiológica del producto e inhibir la acción de las levaduras que pueden seguir actuando, los vinos se

seleccionan por calidades y se decide cuál será su destino: salida inmediata al mercado o un mayor o menor proceso de crianza y envejecimiento (Vino de Crianza, Vino de Reserva o Vino Gran Reserva), el proceso concluye con las etapas de envasado, etiquetado y distribución. **(Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2015)**

2.1.4 Pasteurización del vino

Durante el procesamiento del vino, la estabilización microbiológica involucra la aplicación de tratamientos, tales como: el uso de anhídrido sulfuroso, la filtración esterilizante o la pasteurización, con el propósito de garantizar la ausencia de las levaduras utilizadas en la fermentación alcohólica y de cualquier microorganismo alterante que pudiera afectar posteriormente la calidad del vino.

La pasteurización o pasterización, es el proceso térmico realizado a líquidos (generalmente alimentos) con el objetivo de reducir la presencia de agentes patógenos (como por ejemplo ciertas bacterias, protozoos, mohos, levaduras, etc.) que puedan contener. Es una "esterilización parcial" de los alimentos, alterando lo menos posible su estructura física, sus componentes químicos y sus propiedades organolépticas. Tras la operación de pasteurización, los productos tratados se enfrían rápidamente y se sellan herméticamente con fines de seguridad alimentaria; por esta razón, es básico en la pasteurización el conocimiento del mecanismo de la transferencia de calor en los alimentos. A diferencia de la esterilización, la pasteurización no destruye totalmente las esporas de los microorganismos, ni elimina todas las células de microorganismos termofílicos, de allí la necesidad de emplear tratamientos combinados o nuevos procesos. **(Alonso, 2010)**

En el caso de la aplicación de la pasteurización, ésta implica tratamientos térmicos suaves, como, por ejemplo, un calentamiento del vino a granel a 60 – 65 (°C) durante 10 – 30 minutos. **(García, 2014)**

Desde el punto de vista microbiológico la muerte de los microorganismos se define generalmente como la pérdida de su capacidad de reproducción, pudiendo entonces definirse este concepto como la “temperatura límite de crecimiento”, independientemente de otros factores del vino que también pueden influir. Otro concepto es el “punto de destrucción térmica”, donde las temperaturas aplicadas consiguen la muerte efectiva de los microorganismos, siendo aproximadamente unos 10 grados más elevadas que las temperaturas límites de crecimiento. **(Adams, 2008)**

Si bien es cierto resultaría impensable creer que podría existir contaminación microbiológica en bebidas alcohólicas; sin embargo, un grupo de éstas presenta cierta vulnerabilidad debido a su método mismo de producción. Además, las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación de azúcares empleando cepas de levaduras, tienden a ser más propensas a un deterioro más rápido de sus características si no se controlan de manera adecuada los factores que influyen sobre ellas. **(Dubourdieu, 2006)**

Un problema con la pasteurización por calor de los alimentos, es que altera el perfil nutricional de los alimentos, también hay una pérdida de enzimas, vitaminas y minerales. El tratamiento térmico también puede deteriorar la textura, el aroma y el sabor del producto alimenticio. Del mismo modo, el uso de aditivos químicos presenta problemas con los residuos que superen los límites prohibidos establecidos por las agencias gubernamentales. Además, los aditivos químicos pueden imponer un problema de salud a algunas personas. **(Choi, 2005)**

El empleo de anhídrido sulfuroso o intercambios de calor son las técnicas más empleadas dentro de los procesos vinícolas; por un lado, la aplicación de derivados azufrados puede causar la pérdida de atributos organolépticos en el producto final, mientras que el empleo de choques térmicos encarece el proceso de producción.

Una característica importante del proceso de tratamiento de alimentos con el empleo de ozono es que el oxígeno liberado luego de su acción va a destruir el crecimiento de bacterias sin afectar negativamente a la calidad estructural y sensorial del producto final. **(O'Donnell, 2012)**

2.1.5 Química y propiedades del ozono

La molécula de oxígeno está constituida por dos átomos de oxígeno, mientras que la molécula de ozono está formada por tres átomos de oxígeno. En la Tabla 1 se comparan algunas propiedades del oxígeno y del ozono. La razón de las particularidades del O₃ radica en el hecho de que las fuerzas de atracción entre átomos (enlace covalente) son muy pequeñas, lo cual hace a la molécula de ozono muy inestable. Dicha inestabilidad da al ozono la característica de ser muy oxidante, ya que fácilmente cede uno de sus átomos a otros compuestos oxidándolos, por la cual es empleado como desinfectante y germicida, esta inestabilidad aumenta con el incremento de la temperatura como se presenta en la Tabla 2. **(Hill, 1982)**

Tabla 1: Comparación de las propiedades del oxígeno y del ozono

PROPIEDAD	OXIGENO (O ₂)	OZONO (O ₃)
Color	Sin color	Azul claro a altas concentraciones
Olor	Sin olor	Picante y penetrante (umbral olfativo 0,01-0,015 [ppm])
Peso específico	1.429	2.144
Peso molecular	32	48
Potencial de oxidación	1.23 [V]	2.07 [V]
Punto de ebullición a 100 [kPa]	-183 °C	-112 °C
Solubilidad a 0 [°C]	0.049	0.64

Fuente: Manousaridis, 2005

Tabla 2: Tiempo de vida media del ozono a distintas temperaturas

OZONO EN FASE GAS		OZONO RESIDUAL EN EL AGUA (pH 7)	
TEMPERATURA [°C]	TIEMPO DE VIDA MEDIA	TEMPERATURA [°C]	TIEMPO DE VIDA MEDIA [min]
- 50	3 meses	15	30
- 35	18 días	20	20
- 25	8 días	25	15
20	3 días	30	12
120	1,5 horas	35	8
250	1,5 segundos	*****	*****

Fuente: Manousaridis, 2005

2.1.6 Acción del ozono sobre los microorganismos

La inactivación de microorganismos con ozono es considerada como una reacción de oxidación. La membrana de los microorganismos es el primer lugar de ataque del ozono; las vías de acceso pueden ser dos, por el camino de las glicoproteínas o glicolípidos, o a través de los aminoácidos. El ozono también rompe la actividad enzimática de los microorganismos al actuar sobre los grupos sulfhídricos en ciertas enzimas. En este momento los microorganismos pierden su capacidad de degradar azúcares y producir gases. El deshidrogenado de fosfato-6 de glucosa es afectado del mismo modo que el sistema enzimático. La muerte del microorganismo puede ser debido a los cambios en la permeabilidad celular, posiblemente seguido de una lisis celular. Existen reportes de que el ozono tiene capacidad de inactivar a las esporas bajo condiciones de esterilización clínica. **(Adams, 2008)**

En la Tabla 3 se presentan algunos microorganismos inactivados por ozono, entre los cuales están mohos, levaduras, bacterias y virus.

Tabla 3: Microorganismos inactivados por ozono

<i>Aspergillus Níger</i>	<i>Coxsackie Virus A9</i>	<i>Vibrio Cholera</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Diphtheria Pathogen</i>	<i>Legionella Pneumophila</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Bacillus Anthracis</i>	<i>Eberth Bacillus</i>	<i>Mucor Piriformis</i>	<i>Staph Epidermidis</i>
<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Enterovirus virus</i>	<i>Mycobacterium Foruitum</i>	<i>Staphylococci</i>
<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Stomatitis Virus</i>
<i>Botrytis Cinerea</i>	<i>Encephalomyocarditis</i>	<i>Phytophthora Parasitica</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Candida</i>	<i>Endamoebic Cysts.</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Verticillium Dahliae</i>

Fuente: Adams, 2008

2.1.7 Factores que afectan el poder oxidante del ozono

Entre los factores representativos que afectan la efectividad del ozono en su poder desinfectante se encuentran la temperatura, el pH y la turbidez del fluido a ser oxidado, y en el caso particular de vinos de frutas el grado alcohólico. De acuerdo con **Kilcast (2009)**, el efecto del ozono sobre muestras de bebidas alcohólicas (vinos) con un contenido de alcohol etílico C_2H_6O hasta el 20 % (VOL.) es significativo al aumentar la estabilidad del producto por la acción de la molécula de O_3 comparándolas con muestras tratadas tradicionalmente.

- **Temperatura**

El índice de destrucción de microorganismos crece con incrementos en la temperatura. De acuerdo con la teoría de Van't Hoff-Arrhenius, la temperatura determina el índice al cual el desinfectante se difunde a través de la superficie del microorganismo y su índice de reacción con el sustrato. Se dice que un incremento de 10 °C en la temperatura incrementa el índice de reacción en un factor de 2 o 3. Esta es la razón por la cual se puede lograr el mismo efecto de desinfección con concentraciones de ozono residual menores cuando la temperatura del fluido se encuentra entre 20 y 25 °C. (**Calderón, 2014**)

- **pH**

El impacto del pH sobre la acción bactericida o viricida es considerado pequeño en rangos de pH de 5.8 a 8. Los cambios en la eficiencia de desinfección debido al pH son provocados por cambios en el índice de destrucción de ozono. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que, para diferentes valores de pH, a valores constantes de concentración de ozono, el grado de inactivación de microorganismos prácticamente no sufre cambios. (**O'Donnell, 2012**)

- **Turbidez**

Los microorganismos normalmente no están en estado libre en el agua o en la fase acuosa de los fluidos, generalmente están adheridos a la superficie de minerales o materia orgánica. Las sustancias o minerales inoxidables prácticamente no reducen la eficiencia de desinfección del ozono. Sin embargo, los materiales orgánicos u oxidables consumen grandes cantidades de ozono limitando su acción sobre los microorganismos. Los virus asociados con células o fragmentos de ellas son protegidos del efecto del ozono. Por lo cual, previo al proceso de desinfección con ozono, el vino de frutas deberá obligatoriamente ser sometido a un doble proceso de filtración empleando para este fin placas de celulosa y tierras diatomeas para mejorar la calidad del fluido, en términos de turbidez y materia orgánica disuelta para lograr una óptima desinfección. **(O'Donnell, 2012)**

2.1.8 Generación de ozono

Desde la década de los 60 del siglo pasado muchos han sido los estudios para intentar desarrollar métodos más eficientes de generación de ozono con el objetivo de dinamizar su uso, no solo en la industria y medicina, y de igual forma varios han sido las investigaciones enfocadas a buscar posibles nuevas aplicaciones en todo ámbito. **(Beutelspacher & Calderón, 2014)**

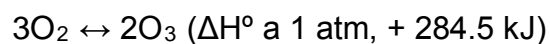
La generación de ozono por el método de radiación ultravioleta - descargas eléctricas es la forma más eficiente de crear este gas altamente oxidante. La producción de ozono por este método permite alcanzar un incremento en la eficiencia de generación de alrededor del 30 % a comparación de los otros métodos, tomando en cuenta que se requiere un tiempo más largo de exposición del gas a la fuente UV. **(O'Donnell, 2012)**

El ozono se forma cuando se aplica la energía suficiente a la molécula de oxígeno para dissociarla y formar radicales libres de oxígeno como se presenta en la Figura 1; de esta forma se cumple con la condición para formar una reacción entre una molécula y un átomo de oxígeno, obteniendo de esta forma la molécula de ozono, la cual será la encargada de actuar en el proceso de desinfección. **(Beutelspacher & Calderón, 2014)**



Figura 1: Proceso de generación de ozono por radiación ultravioleta - descargas eléctricas. Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2014.

La formación del ozono se describe como una reacción endotérmica, la cual se expresa como:



Para formar la molécula de ozono se requiere de una celda, formada por dos electrodos separados por una distancia, del orden de los milímetros; a este espacio se le conoce como espacio de descarga. Sobre uno de los electrodos se coloca un material dieléctrico, y en el espacio de descarga se inyecta un flujo de aire o de oxígeno de alta pureza, el cual

proporciona oxígeno para la formación del ozono. Para el funcionamiento de la celda, se conecta a los electrodos una señal eléctrica alterna, la cual permite la creación de un campo eléctrico intenso. Este campo eléctrico se encarga de acelerar los electrones que se encuentran en el espacio de descarga, de tal forma que, en la trayectoria del recorrido de estos electrones, colisionan con las moléculas de oxígeno y logran la disociación de sus átomos. El siguiente paso para la formación de la molécula de ozono es la reacción entre uno de estos átomos y una molécula de oxígeno. En la generación de ozono sólo de un 4% a un 12% de la energía es aprovechada para la formación de ozono, el resto es transformado en calor y luz. **(Beutelspacher & Calderón, 2014)**

Con el método de generación de ozono por radiación ultravioleta es posible alcanzar producciones del orden de 100 kg O₃/h, lo cual, resulta complejo alcanzar con otros métodos, lo que potencializa el rendimiento y efecto de aplicación del O₃.

En la Tabla 4 se muestran valores comparativos de los métodos de generación de ozono más comunes: Radiación ultravioleta y Electrolisis.

Tabla 4: Comparativa de métodos de generación de ozono

MÉTODO	CONCENTRACIÓN DE GENERACIÓN DE OZONO [g/h]	FACILIDAD DE IMPLEMENTACIÓN	VOLUMEN DE FLUIDO A TRATAR [L/h]	CONSUMO ENERGÉTICO [watts]
Radiación Ultravioleta	100	Sencilla	150	Menor a 125
Electrolisis	5 - 25	Complicada	25	10 veces más que el primer método

Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2014

Un equipo generador de ozono para aplicaciones de desinfección está constituido por los elementos que se muestran en la figura 2.

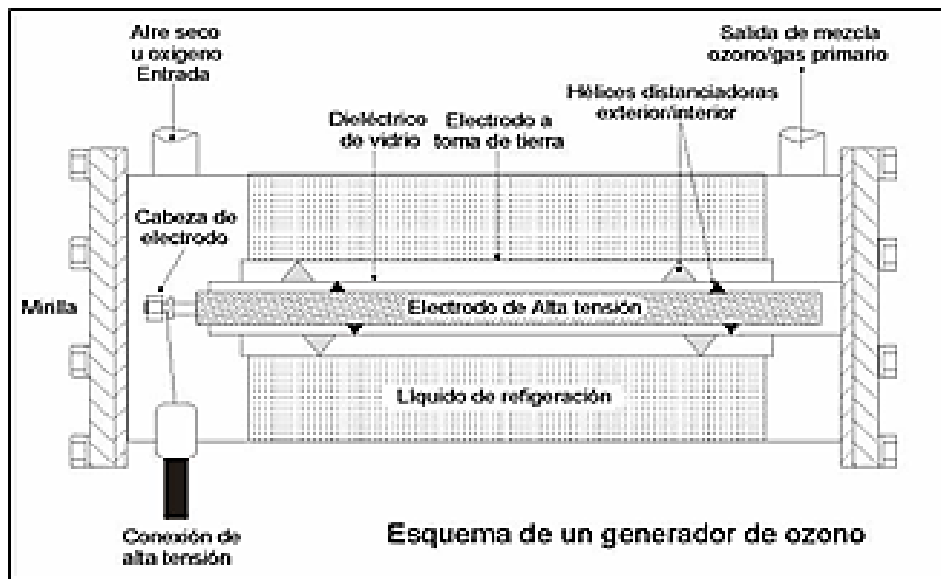


Figura 2: Esquema de un generador de ozono por radiación ultravioleta – descargas eléctricas. Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2014.

La dosificación de ozono para tratar un fluido puede encontrarse experimentalmente, mediante la estimación de la cinética de consumo de ozono para cada caso específico comparándola con las características del fluido a tratar, aunque otra forma de estimarla es aplicando reglas de desinfección establecidas por los organismos que rigen estas aplicaciones.

2.1.8.1 Factores ambientales que inciden en la generación de ozono

La generación de ozono es afectada, también por diversas variables externas medio ambientales que intervienen en la formación de la molécula y que tienen que ver directamente con el gas de alimentación, como la humedad, la temperatura, la calidad y el flujo de alimentación.

- **Humedad**

El grado de humedad, que se mide como punto de rocío presente en el gas de alimentación, afecta de manera importante la concentración de ozono. El vapor de agua contenido en el gas de alimentación causa la formación de compuestos químicos, tales como los óxidos de nitrógeno y ácido nítrico, que limitan la generación del ozono. Para controlar este parámetro los equipos de generación de

ozono cuentan con filtros y secadores en la entrada del gas de alimentación lo que contrarresta significativamente este efecto. **(Beutelspacher & Calderón, 2014)**

- **Temperatura**

La molécula de ozono es muy inestable y a temperaturas mayores a 45 °C degradando la producción de ozono. Para un funcionamiento eficiente de la celda y el equipo debe mantenerse una temperatura máxima de alrededor de 25 °C en su interior. **(Pacheco & Caiza, 2013)**

- **Gas de alimentación**

La formación de la molécula de ozono se realiza a partir del oxígeno, existen dos opciones para suministrar oxígeno a la celda, por medio del aire con una concentración de oxígeno presente del 21 % en volumen, aunque en ciertos casos se puede emplear oxígeno de alta pureza con una concentración cercana al 99 %, pero que implicaría un aumento del costo de operación del equipo. **(Pacheco & Caiza, 2013)**

- **Flujo del gas de alimentación**

Un incremento en el flujo del gas de alimentación se traduce en un incremento en la velocidad de sus moléculas que atraviesan el espacio de descarga, lo cual, reduce la oportunidad de que estas moléculas sean ionizadas. Lo anterior ocasiona una menor ionización de este gas y también menor formación de moléculas de ozono. **(Beutelspacher & Calderón, 2014)**

Todas estas variables pueden ocasionar una baja en la eficiencia del equipo durante la generación de ozono, mas no un descenso en el poder oxidante de la molécula sobre el efecto desinfectante, por lo que lo ideal es reducir al máximo las condiciones ambientales adversas

para conseguir una eficiencia significativa durante la etapa de generación de O_3 .

2.1.9 Alternativas de inyección de ozono

Una de las etapas fundamentales del proceso de generación de ozono es el método por el cual el gas será inyectado en el fluido ya que, de este, dependerá fundamentalmente la eficiencia de la oxidación. Para lograr la desinfección se requiere de una técnica adecuada de contacto del ozono, de las cuales, destacan la difusión por burbujeo (equipos de laboratorio) y la inyección por tubo Vénturi (equipos industriales).

- **Difusión por burbujeo**

Esta técnica consiste en utilizar un difusor de material cerámico, este dispositivo tiene en su superficie orificios del orden de 3 – 5 micras, por los cuales se libera el ozono en forma de finas burbujas que entran en contacto con el fluido. Esta técnica de difusión de ozono por burbujeo es fácil de implementar, no tiene partes móviles y requiere bajo mantenimiento. La técnica de difusión por burbujeo se la emplea en equipos domésticos y de laboratorio. En la Figura 3 se muestran los difusores cerámicos por burbujeo convencionales.

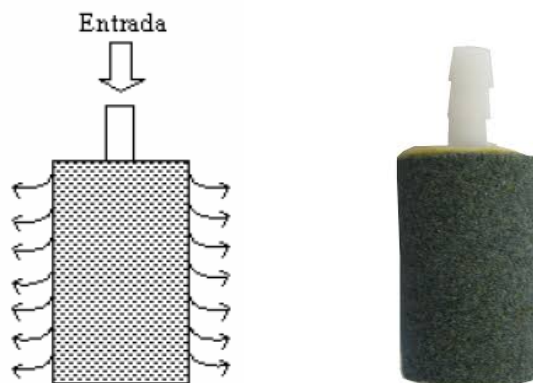


Figura 3: Difusor de ozono de material cerámico. Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2014

- **Inyector Vénturi**

Consiste de una sección de tubería, por la cual circula el fluido que se desea ozonificar; en esta sección de tubería se tiene una reducción de su diámetro, de tal forma, que la caída de presión en el tubo Vénturi origina una fuerza de succión del gas, de esta forma se logra el contacto y la mezcla del ozono con el fluido, como se muestra en la Figura 4.

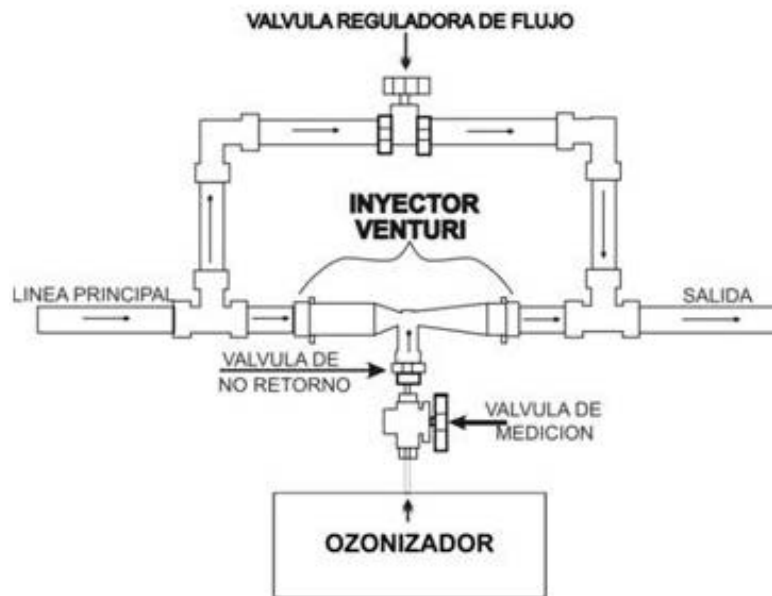


Figura 4: Esquema de instalación del equipo ozonizador en línea continua. Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2014

En la Figura 5 se muestra un inyector Venturi convencional empleado en el acople del sistema de tuberías



Figura 5: Inyector Venturi de ozono en línea. Fuente: Beutelspacher & Calderón, 2014

2.1.10 Cinética de consumo de ozono

La cinética de consumo de ozono (CT) permite estimar la cantidad de ozono que se debe aplicar para conseguir una cierta concentración de ozono residual, es un parámetro que depende de múltiples factores. Por ejemplo, las pérdidas de ozono por oxidación de materia orgánica, la técnica de aplicación del ozono, la temperatura y el pH del fluido, la presión parcial del gas sobre el líquido (ley de Henry), la difusión del ozono en el agua (ley de Fick), entre otros. Todos estos factores hacen imposible un cálculo de solubilidad de la molécula. Por lo que es recomendable encontrar la cinética de consumo de ozono mediante la experimentación de cada caso en particular. Generalmente una dosis de 1 a 2 mg de ozono por litro de agua aplicado de 4 a 10 minutos producirá el residual de 0.1 a 0.4 mg/l necesarios para la desinfección de agua. **(Beutelspacher & Calderón, 2014)**

La dosis de desinfectante aplicado al agua está relacionada con un factor llamado "CT" que es resultado de la multiplicación de la concentración residual del desinfectante en el agua (mg/L) por el tiempo de contacto (minutos). La práctica europea contempla la aplicación de 0.4 mg/l con un tiempo de contacto de 4 minutos, es decir, un $CT = 1.6$. Sin embargo, la **Agencia de Protección Medioambiental** (EPA por sus siglas en inglés) de los EE.UU. **(2015)**, señala que un $CT = 0.72$ aplicado al agua a 30 °C es suficiente para desactivar 99.9 % de los quistes de *Giardia lamblia* (parásitos transmitidos por el agua muy difíciles de matar) y el 99.9% de virus entérico. La diferencia entre la práctica europea de desinfección y la americana depende principalmente de la temperatura del agua. **(Hill, 1982)**

En la Tabla 5 se muestran valores de CT para desinfectar agua con ozono a distintas temperaturas.

Tabla 5: Factor CT requerido para desinfectar agua con ozono a distintas temperaturas

Temperatura del Agua [°C]	CT
Menor a 1	2,9
5	1,9
10	1,4
20	0,72
Mayor a 25	0,48

Fuente: Hill, 1982

2.1.11 Concentración de ozono residual

A la concentración de ozono disuelta en un fluido después de un proceso de ozonificación se le conoce como ozono residual. Con el objetivo de tener certeza del poder oxidante de las moléculas de ozono en los fluidos, es necesario conocer la cantidad de ozono residual que continuará actuando sobre dicho fluido, ya que en muchos casos el efecto del ozono residual sobre el fluido es beneficio al inhibir la proliferación de microorganismos (reflora) y aumentar así la estabilidad y tiempo de anaquel del producto. **(Robertson, 2013)**

La mayoría de equipos cuentan con sensores integrados al sistema, que miden la concentración de ozono residual en el fluido; ésta medición consiste en determinar la concentración de mg/L o g/m³ a la que se encuentra diluido en un líquido, para lo cual existen varios métodos que permiten conocer este valor. Los métodos varían entre la complejidad y los equipos empleados para su medición, pero los más empleados son:

- Método Amperométrico

Este método tiene la posibilidad de ser empleado para mediciones continuas y automatizadas de ozono residual. El electrodo de membrana para medición de ozono residual está compuesto de un cátodo de oro, un ánodo de plata, un electrolito y una membrana de teflón. El ozono disuelto en el fluido atraviesa la membrana y el electrolito hasta colocarse en la superficie del cátodo. Al aplicarle una diferencia de

potencial eléctrico a las terminales del cátodo y ánodo, el ánodo liberará electrones al electrolito, dichos electrones atravesarán el electrolito hasta el cátodo en donde al encontrar una molécula de ozono la reducirán a oxígeno. El resultado es una conducción de corriente eléctrica la cual será proporcional a la concentración del ozono disuelto en el agua, muchos de los equipos de generación de ozono actuales, integran este método de medición, el cual lo expresan en [mg/L] residual a través de paneles LCD. **(Pacheco & Caiza, 2013)**

- Método Colorimétrico

El método de medición consiste en titular la muestra del agua ozonificada con una solución de índigo carmín hasta que el agua tome la coloración azul de la solución. El agua tomará color azul hasta que todo el ozono contenido en el agua sea consumido al oxidar el colorante, es decir, la concentración de ozono será proporcional a la cantidad de índigo carmín oxidado.

En el mercado existen Kits para la determinación de ozono residual, como el que se muestra en la Figura 6, en el que la reacción entre el ozono y el reactivo origina una coloración azul, que es proporcional a la concentración de ozono, la cual es comparada con una muestra patrón a contra.

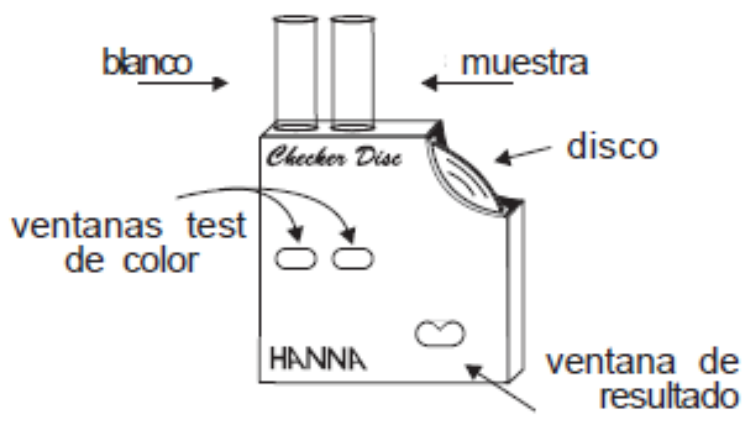


Figura 6: HI 38054 Test Kit de Ozono residual. Fuente: Hanna Instrument, 2015.

2.1.12 Fundamentos legales sobre el uso de ozono en alimentos

El uso de ozono en la elaboración de alimentos ha sido aprobado en diversos grados en muchos países, incluidos los EE.UU., Japón, Australia, Francia y Canadá.

En las últimas dos décadas el uso de ozono en la elaboración de alimentos se ha convertido cada vez más en un punto importante de investigación y aplicación, esto como consecuencia de la afirmación del ozono como sustancia química GRAS en 1997 y su posterior aprobación por parte de la FDA de los EE.UU. como un aditivo antimicrobiano para que pueda ser empleado al contacto directo con los alimentos de todo tipo. **(Graham, 2008)**

La FDA aprobó el uso de ozono en 2011 como un aditivo alimentario antimicrobiano, siempre y cuando se aplique de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura; este aditivo puede ser usado directa o indirectamente sobre el alimento a ser tratado. Pruebas de terceros empleando los equipos disponibles en el mercado para producir agua que contiene ozono para la pulverización en las plantas de procesamiento de alimentos para una serie de aplicaciones de lavado, han demostrado que proporcionan de entre 2 a 6 reducciones logarítmicas de los microorganismos que se encuentran típicamente en las plantas de procesamiento de alimentos, así como los alimentos susceptibles a estos como frutas y verduras. **(FDA, 2011)**

Los resultados de estas pruebas demuestran además que los trabajadores de las plantas pueden operar dicho equipo con una mínima exposición al ozono gaseoso, a niveles que están debajo de la normativa (5 mg/H) de la **Administración de Seguridad y Salud Ocupacional** (OSHA por sus siglas en inglés) **(2014)** en los máximos estándares de exposición permisible existentes.

Además, la combinación de varios métodos de conservación puede aumentar el efecto antimicrobiano en general; de modo que intensidades más bajas del proceso pueden ser empleados. Este enfoque, conocido como " tecnología de barreras " ya se ha aplicado con éxito utilizando técnicas tradicionales de conservación de los alimentos. La combinación de métodos de ozono con otras técnicas de conservación de alimentos puede mejorar los efectos letales, reducir la gravedad de tratamiento requerido para obtener un nivel dado de inactivación microbiana o incluso aumentar la estabilidad del producto. **(Leistner & Gorris, 1995)**

2.2 Hipótesis

Evaluación de un método alternativo de pasteurización por inyección directa de ozono en vino de frutas elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*).

- **H₀**

No es efectivo el empleo de inyección directa de ozono en vino de frutas elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*) como un método alternativo de pasteurización.

- **H_a**

Es efectivo el empleo de inyección directa de ozono en vino de frutas elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*) como un método alternativo de pasteurización.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Variable independiente

Pasteurización por inyección directa de ozono a diferentes concentraciones y tiempos de inyección.

2.3.2 Variable dependiente

Vino de frutas estable biológicamente (pasteurizado) y elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*).

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materia prima

Se dispuso de una mezcla combinada de mosto de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*) en una proporción de 1:1:1 de acuerdo a los procesos de fabricación estandarizados por ILA S.A. para su posterior fermentación y obtención de vino de frutas.

3.1.2 Proceso de elaboración de vino de frutas

Previamente se efectuaron las operaciones de lavado, selección y despulpado de las frutas empleadas como materia prima para la obtención de la pulpa de fruta, cuya descripción es la siguiente:

- *Lavado y Selección:* Las frutas fueron lavadas y seleccionadas de modo que solamente se utilizaron frutas maduras (no sobre maduras), limpias y sanas.
- *Despulpado o prensado:* La fruta se sometió a un despulpado o prensado (partículas de menor tamaño), de manera que la pulpa o el jugo de fruta, quede expuesto a la acción de las levaduras. El producto de esta operación se conoce como mosto y puede contener jugo, cáscara, semillas, etc. dependiendo de la fruta empleada, las cáscaras o las semillas pueden impartir sabores indeseables al vino final, o bien, pueden ser deseable en algunos casos, esta es una variable que se puede modificar según sea conveniente para el producto final.

En la Figura 8 se indica el proceso tradicional de elaboración de vino de frutas en ILA S.A., cuyas operaciones se describen a continuación:

- **Recepción:** En esta etapa se recibe el mosto de fruta obtenido en el proceso mencionado anteriormente.
- **Preparación del Mosto:** Involucra adecuar la concentración de azúcar del mosto. Si se determina que la cantidad de azúcar del mosto es muy bajo (medición de grados Brix), se puede enriquecer con la adición de jugo concentrado de la fruta, o bien, se puede adicionar sacarosa. Para lo cual se mezcla la pulpa de fruta, agua y azúcar de ser necesario de acuerdo al tipo de materia prima empleada o el tipo de producto final que se desee obtener. En esta investigación se consideró un mosto con 20 °Brix.
- **Sulfitado:** Se adicionó sulfito de potasio al mosto para evitar que ocurra oxidación y que haya cambios de color indeseables, además ayuda a controlar la presencia de microorganismos no deseados como bacterias lácticas y otros. La concentración de sulfito fue de 10 gramos por hectolitro de mosto preparado.
- **Fermentación:** Una vez listo el mosto, se inoculó con un cultivo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a una concentración de 1 a 2 % del volumen. Este proceso se llevó a cabo en tanques de acero inoxidable, por un lapso no menor a 90 días. En este proceso se da la conversión de azúcar en alcohol, dióxido de carbono y la liberación de energía como otro producto de la reacción.

Esta liberación de energía es muy importante ya que con la reducción de un 1 % de azúcar en el mosto (por conversión a alcohol), se tiene un aumento de temperatura de 1.3 °C; lo que permite alcanzar una temperatura adecuada de modo que se puedan morir las levaduras por la acción del calor liberado y la concentración de etanol alcanzado. Es importante mencionar que el rendimiento de etanol es aproximadamente de un 55 %, de modo que un jugo que tenga un contenido de azúcar de 20 % (20 °Brix), producirá un vino con un 11 % de etanol en volumen.

- **Trasiego y decantado:** El mosto se colocó en un tanque de acero inoxidable para que las partículas que están suspendidas en el mismo se sedimenten, lo cual permitió mejorar las características sensoriales del producto, obteniendo un vino claro y translúcido.
- **Filtración:** Para clarificar y estabilizar el vino, se utilizaron varios métodos, como placas de celulosa, tierra de diatomeas o agentes filtrantes más sencillos como tela de manta o lienzo.
- **Hidratación y mezclado:** Con el fin de mantener el producto bajo el estándar de calidad y conservar el mismo grado alcohólico, es necesario ajustar el porcentaje de alcohol agregando agua al producto, y posteriormente mezclándolo con el objetivo de conseguir la homogenización total del producto. En este caso se agregó agua hasta alcanzar 8 % de etanol en el vino de frutas.
- **Pasteurizado:** Antes de ser embotellado, el vino se lleva a un tanque contenedor para ser pasteurizado empleando métodos tradicionales de intercambio de calor (80 °C durante 9 segundos) o mediante la

aplicación de inhibidores microbianos de origen químico como el anhídrido sulfuroso. Es esta operación que se reemplaza por la inyección directa de ozono, según el diseño experimental planteado.

- **Envasado, etiquetado y embalado:** Estas operaciones del proceso ocurren de manera automática, pues a través de bombas y tuberías el producto es enviado hasta la línea de llenado automático, en la cual 12 botellas se llenan cada 30 segundos; e inmediatamente son capsuladas y etiquetadas, de igual forma automáticamente, con el objetivo de que no exista ningún riesgo de contaminación cruzada entre etapas. Una vez que esto concluye, se realiza el embalado en cartones de forma manual y finalmente el producto es enviado a bodega.
- **Envejecimiento:** Una vez finalizado la línea de proceso, se almacenan las botellas de vino durante 30 días a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C) a modo de añejamiento adicional. Durante este periodo, se puede monitorear el producto para detectar cualquier posible problema por inestabilidad o re flora microbiana que pueden alterar las condiciones organolépticas del producto final.
- **Distribución:** Cuando el vino cumple con el tiempo de añejamiento en botella y con los controles de calidad establecidos por la empresa en bodega, el producto se distribuye y comercializa a través de los canales directos.

VINO DE FRUTAS

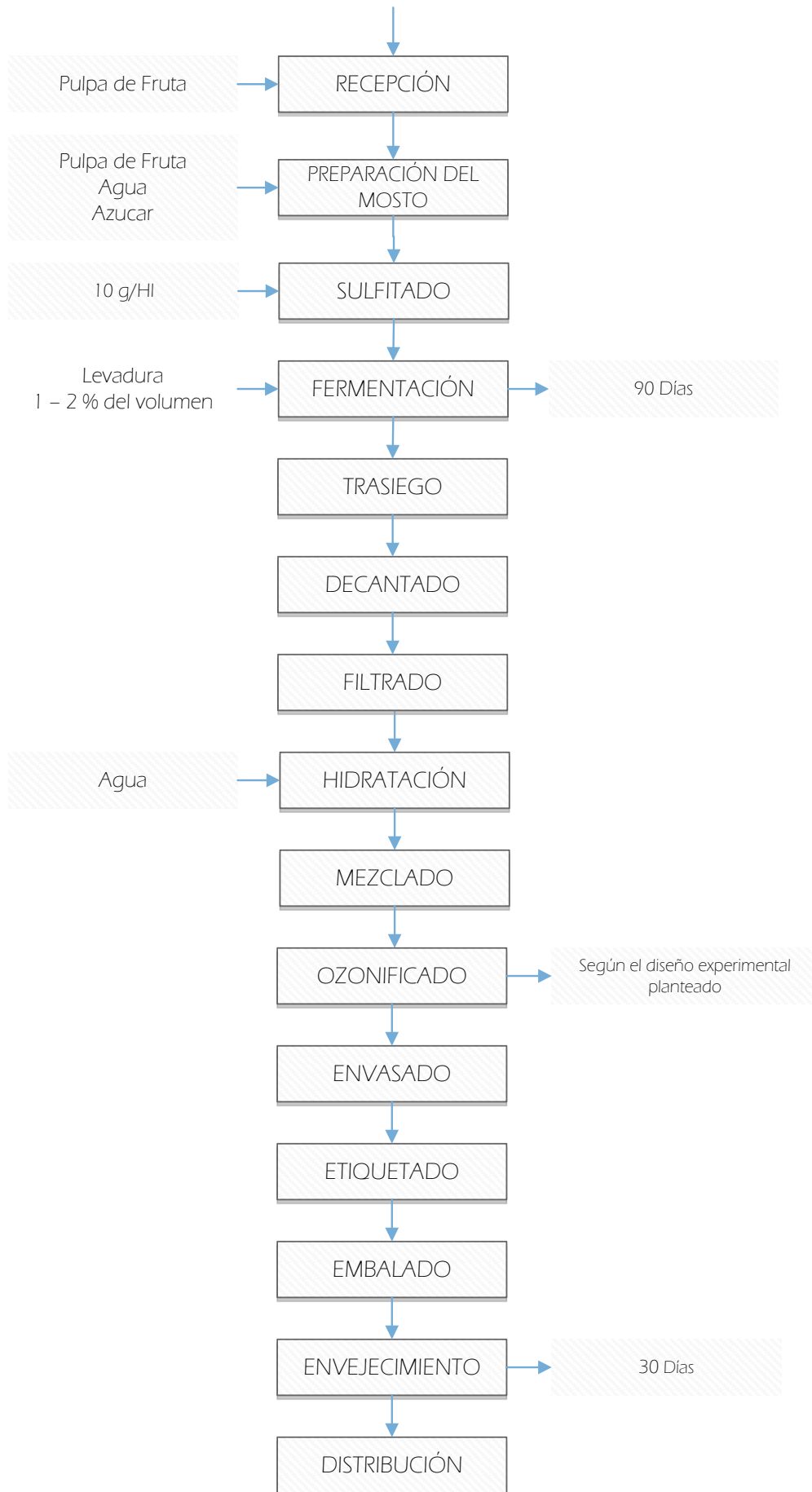


Figura 8: Proceso de elaboración de vino de frutas. Fuente: ILA S.A., 2016.

3.1.3 Generador de ozono

Se utilizó un equipo de generación de Ozono por radiación Ultravioleta, marca ENALY serie OZX-300AT de fabricación canadiense, suministrado por la empresa GRAFFIOLI. El equipo cuenta con una capacidad de generación de 500 mg/h, y ajustes que regulan la producción de ozono a partir de 100 % a menos del 40 %; además en conjunto cuenta con un controlador Redox (ORP) para controlar la cantidad de ozono residual en el fluido tratado y determinar las concentraciones de acuerdo al diseño experimental planteado.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Determinación de ozono residual y cinética de consumo de ozono (CT)

Para determinar la cantidad de ozono residual luego del proceso de inyección en las muestras de vino, se empleó el Test Kit de Hanna Instrument 38054, que se basa en el principio colorimétrico de índigo carmín, donde la reacción entre el ozono y el reactivo origina una coloración azul en la muestra, proporcional a la concentración de ozono. Este método colorimétrico permitió tener certeza y comprobar la lectura de ozono residual ofrecida por el equipo generador de ozono.

Con el fin de comparar los valores obtenidos en esta investigación con los resultados bibliográficos, se determinó el valor de cinética de consumo de ozono CT para las muestras de vino de frutas tratadas con ozono, el cual es el resultado de la multiplicación de la concentración residual por el tiempo de contacto, empleando la siguiente ecuación:

$$CT = \text{Concentración } O_3 \text{ Residual} * \text{Tiempo}$$

3.2.2 Determinación de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de mohos y levaduras

En el proceso de análisis microbiológico se efectuó el conteo de las UFC/ml de muestras de agua de las vertientes subterráneas adjudicadas a ILA S.A., previo y pos inyección de ozono; y de una muestra de vino pasteurizada de forma tradicional con el objetivo de tener datos comparativos iniciales sobre el efecto del O₃. Además, se efectuó el conteo de las muestras de vino sometidas a la inyección de ozono a las concentraciones establecidas en el modelo experimental.

Estos análisis microbiológicos se los realizó en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, en el Laboratorio Independiente SEIDLA CIA. LTDA. y en el Laboratorio Móvil de la Subsecretaría de Calidad, empleando los métodos microbiológicos siguientes:

- INEN 1529-10:1998 - Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad.
- ISO 7954 - Procedimiento recuento mohos y levaduras en alimentos.

Es importante señalar que los análisis microbiológicos de las muestras se los realizó por duplicado y sin dilución con el fin de conseguir la fiabilidad de los resultados a obtenerse en los laboratorios antes señalados.

Se efectuó además la determinación del porcentaje de reducción microbiana para evaluar la efectividad de aplicación de ozono en los tiempos y concentraciones del diseño experimental, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción microbiana} = \frac{UFC_{\text{iniciales}} - UFC_{\text{finales}}}{UFC_{\text{iniciales}}} * 100$$

3.2.3 Determinación bromatológica del mejor tratamiento ozonificado

Para la determinación de los parámetros bromatológicos del mejor tratamiento de la muestra de vino de frutas se emplearon los siguientes métodos:

- NTE INEN 340:1994 – Determinación de alcohol etílico.
- NTE INEN 341:1978 – Determinación de alcoholes superiores.
- NTE INEN 346: 1978 – Determinación de congéneres.
- AOAC 958.04 – Determinación de estabilidad.
- NTE INEN 348:1978 – Determinación de colorante.

Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y Productos Procesados – LASA.

3.2.4 Perfil cromatográfico del vino ozonificado

Con el propósito de comprobar que el ozono, luego de su proceso de degradación de materia orgánica, no influye sobre los demás parámetros químicos, se realizó un análisis del perfil cromatográfico de alcoholes de la muestra de vino ozonificada. Este análisis es un método acelerado a fin de identificar si en la curva de alcoholes existe estabilidad o sufre alteraciones. Es decir, comprobar si el tratamiento con ozono no produce cambios a nivel micro en los demás compuestos presentes en el vino de frutas en el tiempo, además de la reducción microbiológica, lo que teóricamente podría conllevar a un aumento del tiempo de vida útil del producto debido a la acción del ozono residual resultado del proceso de inyección.

El análisis se llevó a efecto en el Laboratorio Independiente SEIDLA CIA. LTDA. Los alcoholes analizados en el perfil mediante el análisis de cromatografía de gases fueron:

- ✓ acetato de etilo
- ✓ metanol
- ✓ 1-propanol
- ✓ Isobutanol
- ✓ 4-metil-2-pentanol (estándar interno)
- ✓ 2-metil-1-butanol
- ✓ 3-metil-1-butanol.

3.2.5 Determinación organoléptica

Para medir el grado de aceptabilidad y determinar si existían diferencias apreciables del producto ozonificado frente a las muestras pasterizadas por el método tradicional de pasterización a través de intercambio de calor, se realizó una prueba triangular del tratamiento con el mejor resultado microbiológico, empleando 27 panelistas semi-entrenados de edades comprendidas entre 25 y 70 años, y su ejecución implicó repetir tres veces la serie asignando al azar cada una de las combinaciones en los vértices del triángulo de la hoja de catación. **(Saltos, 2010)**

En el Anexo C se presenta la hoja de catación empleada en la prueba triangular para esta investigación.

La muestra testigo fue una muestra de vino de frutas pasterizada con el método convencional de intercambio de calor producida en diciembre de 2015 por ILA S.A.; y las combinaciones de las muestras en las hojas de cata fueron las que se presentan en la Tabla 6:

Tabla 6: Combinaciones de las muestras de vino ozonificado y pasterizado para la prueba sensorial

Muestra A: Vino de frutas ozonificado. Muestra B: Vino de frutas pasterizado.	Series	ABB
		AAB
		ABA
		BAA
		BBA
		BAB

Elaborado por: Rodrigo Valle Espinosa

La hipótesis nula planteada es unilateral de la siguiente forma:

- H_0 : Los catadores no identificaron la muestra de vino de frutas ozonificada.
- H_a : los catadores si identificaron la muestra de vino de frutas ozonificada.

Los números aleatorios para identificar las muestras en las hojas de catación fueron: 425, 027 y 915.

3.3 Diseño experimental

Dado que no existen estudios relacionados con la aplicación de ozono sobre bebidas alcohólicas de bajo grado, se tomó como referencia la dosificación de ozono para desinfección de agua potable, lo cual permitió contar con un dato real de estimación de la cantidad de ozono que debe ser aplicado para obtener un volumen residual cierto de acción oxidante de la molécula de ozono para conseguir la pasteurización.

Las concentraciones de ozono propuestas están basadas en valores máximos para la esterilidad del agua empleadas en procesos quirúrgicos y de potabilización de acuerdo con la **FDA** y la **Agencia Europea de Medicamentos**, ya que al aplicar 1 mg/L de O_3 por 30 segundos es suficiente para la desinfección de 1 litro de agua sin la necesidad de emplear otro método posterior. Además, se considera que la muestra de vino en su composición contiene un 92 % de agua.

Con el fin de determinar la concentración adecuada de ozono y el tiempo de aplicación para pasteurizar el vino de frutas, se empleó un diseño experimental A x B, mismo que contó con tres subniveles en cada uno de sus factores:

- Factor A: Concentración de O₃ (mg/L)
 - Subnivel a₁: 1,0
 - Subnivel a₂: 1,5
 - Subnivel a₃: 3,0

- Factor B: Tiempo de inyección directa de O₃ (minutos)
 - Subnivel b₁: 1
 - Subnivel b₂: 3
 - Subnivel b₃: 5

Por consiguiente, se tuvieron 9 tratamientos con sus correspondientes réplicas, cuyas combinaciones fueron las siguientes:

- **a1b1**: Concentración de 1 mg/L de O₃ durante 1 minuto.
- **a1b2**: Concentración de 1 mg/L de O₃ durante 3 minutos.
- **a1b3**: Concentración de 1 mg/L de O₃ durante 5 minutos.
- **a2b1**: Concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto.
- **a2b2**: Concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 3 minutos.
- **a2b3**: Concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 5 minutos.
- **a3b1**: Concentración de 3,0 mg/L de O₃ durante 1 minuto.
- **a3b2**: Concentración de 3,0 mg/L de O₃ durante 3 minutos.
- **a3b3**: Concentración de 3,0 mg/L de O₃ durante 5 minutos.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 Resultados de la determinación de ozono residual y cinética de consumo de Ozono (CT)

En la Tabla 7 se presentan los resultados comparativos de los valores de ozono residual de cada tratamiento determinados por el equipo de generación de ozono y por el método colorimétrico empleando el test kit de Hanna Instrument, lo que permite conocer la cantidad de ozono residual que continuará actuando sobre las muestras de vino de frutas e inhibir la proliferación (reflora) de mohos y levaduras una vez finalizado el proceso fermentativo del mosto de fruta y aumentar así potencialmente la estabilidad y tiempo de anaquel del producto.

Tabla 7: Resultados comparativos de los valores de ozono residual (mg/l) mostrados en el equipo generador de ozono y el Test Kit colorimétrico de los tratamientos propuestos.

TRATAMIENTOS	MÉTODOS UTILIZADO	
	EQUIPO GENERADOR DE OZONO (mg O ₃ /l)	TEST KIT (mg O ₃ /l)
a1b1	0.35	0.40
a1b2	0.38	0.40
a1b3	0.40	0.40
a2b1	0.80	0.80
a2b2	0.83	0.80
a2b3	0.85	0.80
a3b1	1.25	1.30
a3b2	1.30	1.30
a3b3	1.35	1.40

Autor: Rodrigo Valle Espinosa, 2016

Al comparar los valores de ozono residual de cada tratamiento presentados por el equipo de generación de ozono y el test colorimétrico, se observó que son similares y que existe una diferencia mínima entre las lecturas considerando que el equipo generador de ozono, al contar con un sistema computarizado integrado de medición, arroja lecturas más precisas; mientras que el test kit colorimétrico muestra valores redondeados. Vale señalar que los valores de ozono

residual de todos los tratamientos se encuentran por debajo de los valores máximos establecidos en la normativa de la **Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (2014)** de los EE. UU. para los niveles de exposición de ozono, que en condiciones de trabajo constante de 8 horas equivalen a 5 mg/h de O₃.

Por otro lado, el valor CT fue determinado para cada tratamiento con el fin de tener certeza que los valores de ozono residual contribuyan potencialmente a aumentar la estabilidad biológica del vino y el tiempo de vida útil, mediante la siguiente ecuación:

$$CT = \text{Concentración } O_3 \text{ Residual} * \text{Tiempo}$$

Si se considera el tratamiento a1b1 con una concentración de ozono residual de 0,35 mg/l por un tiempo de contacto de 1 minuto, el valor de CT fue el siguiente:

$$CT = 0.35 * 1 = 0.35$$

En la Tabla 8 se presentan los valores calculados de CT para cada tratamiento a una temperatura promedio de 25 °C del vino de frutas.

Tabla 8: Resultados de los valores de cinética de consumo de ozono (CT) de los tratamientos propuestos a una temperatura promedio del vino de frutas de 25 °C.

TRATAMIENTOS	OZONO RESIDUAL (mg/l)	TIEMPO APLICACIÓN (min)	VALOR CT
a1b1	0,35	1	0,35
a1b2	0,38	3	1,14
a1b3	0,40	5	2,00
a2b1	0,80	1	0,80
a2b2	0,83	3	2,49
a2b3	0,85	5	4,25
a3b1	1,25	1	1,25
a3b2	1,30	3	3,90
a3b3	1,35	5	6,75

Autor: Rodrigo Valle Espinosa, 2016

Los valores de CT calculados (rangos entre 0,35 y 0,75) sobrepasan los valores estimados bibliográficamente, entonces potencialmente la aplicación de ozono como método alternativo de pasteurización del vino de frutas puede ser efectivo no solo mejorando la estabilidad biológica del vino de frutas, sino también aumentando el tiempo de vida de anaquel del producto final. Según **Beutelspacher (2013)** una concentración residual de 0.1 a 0.4 mg/l es necesaria para la desinfección y potabilización de agua, y para la **Agencia de Protección Ambiental** de los EE. UU. **(2015)** un CT = 0.72 aplicado al agua a 30 °C es suficiente para desactivar 99.9 % de los quistes de patógenos entéricos que potencialmente podrían estar presentes.

4.1.2 Resultados microbiológicos

En el Anexo A se presentan los resultados de los análisis microbiológicos realizados a las muestras de agua de vertiente, agua de vertiente ozonificada, vino de frutas sin pasteurizar, vino pasteurizado tradicionalmente, y vino ozonificado de acuerdo al modelo experimental planteado.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de los análisis microbiológicos de muestras de agua de vertiente antes y después de la inyección de ozono para su desinfección a una concentración de 1 mg/l durante 30 segundos.

Tabla 9: Análisis microbiológicos de agua de vertiente, previo y pos uso de ozono como tratamiento de desinfección, y porcentaje de reducción microbiana

ENSAYO	MÉTODOS UTILIZADOS	RECuento (UFC/100 ml)		REDUCCIÓN MICROBIANA [%]
		AGUA DE VERTIENTE	AGUA DE VERTIENTE + OZONO	
Aerobios Totales	Standard Methods: 9215 D.	9.0 x 10 ³	4.0 x 10 ²	95,6
Coliformes Totales	Standard Methods: 9222 B.	3.4 x 10 ²	1	99,7
Coliformes Fecales	Standard Methods: 9222 D.	8	1	87,5

Fuente: LACONAL, 2015

El empleo de ozono como método de desinfección de agua de vertiente es eficiente, ya que como se puede observar en la Tabla 9, en todos los ensayos microbiológicos realizados existe una disminución de la carga microbiana; así, los contajes de aerobios totales del agua de vertiente disminuyeron de $9,0 \times 10^3$ a $4,0 \times 10^2$ UFC/100 ml en el agua de vertiente tratada con O_3 , lo que representa una reducción microbiana de 95,6 %, mismo que fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Reducción microbiana} = \frac{UFC_{iniciales} - UFC_{finales}}{UFC_{iniciales}} * 100$$

$$\% \text{ Reducción microbiana} = \frac{9,0 \times 10^3 - 4,0 \times 10^2}{9,0 \times 10^3} * 100 = 95,62$$

Similarmente, el porcentaje de reducción de coliformes totales fue de 99,7 %, y el de coliformes fecales de 87,5%, entonces los resultados de los 3 parámetros microbiológicos demuestran el poder sanitizante del ozono en el agua de vertiente. En la Figura 8 se presenta los valores logarítmicos del recuento de aerobios totales, coliformes totales y coliformes fecales de agua de vertiente, previo y pos inyección de ozono.

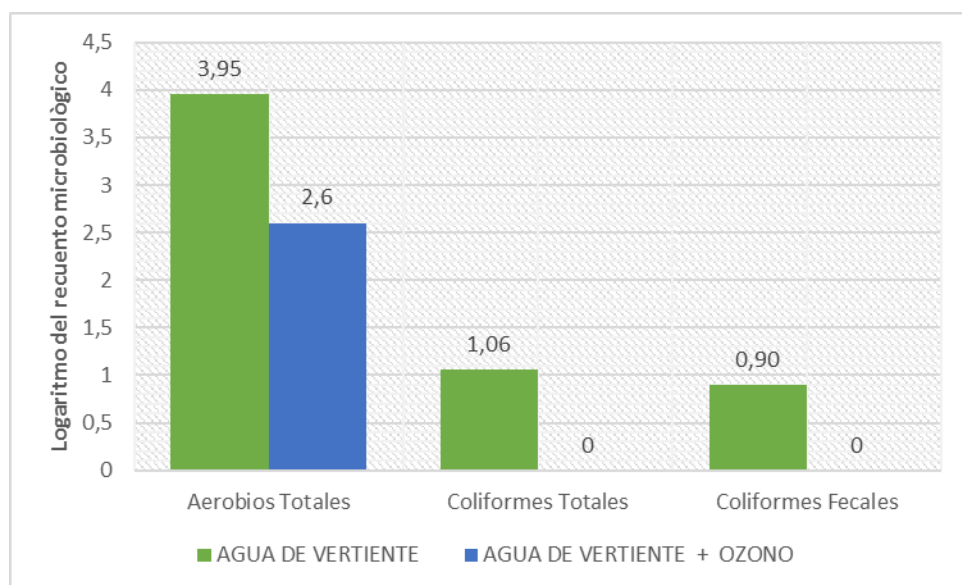


Figura 8: Valores logarítmicos del recuento microbiológico de Aerobios Totales, Coliformes Totales y Coliformes Fecales de muestras de agua de vertiente. previo v pos invección de ozono. Autor: Rodriao Valle Espinosa.

Debe señalarse que el proceso de pasteurización convencional al vino de frutas empleando choques térmicos fue a 80 °C durante 9 segundos.

En lo que respecta al vino, los resultados del análisis microbiológico de la muestra testigo de vino sin ser sometida a ningún tratamiento de pasteurización y de la muestra pasteurizada tradicionalmente mediante intercambio de calor se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Recuento de mohos y levaduras (UFC/ml) de vino de frutas sin pasteurización, pasteurizada tradicionalmente y determinación del porcentaje de reducción microbiana

ENSAYO	MÉTODOS UTILIZADOS	RECuento (UFC/100 ml)		REDUCCIÓN MICROBIANA [%]
		VINO DE FRUTAS SIN PASTEURIZAR	VINO DE FRUTAS PASTEURIZADO (80 °C – 9 seg.)	
Mohos y Levaduras	PE-07-5.4-MB INEN 1529-10. 1998	4.0 x 10 ³	8.0 x 10 ²	80,0
Condiciones Ambientales: 21.2[°C]; 51 % HR.				

Fuente: SEIDLA, 2016

Según **Kilcast (2014)**, un proceso de pasteurización se considera aceptable cuando existe una reducción de al menos el 90 % de la carga microbiana inicial, es decir la reducción de 1 log, por lo que al comparar los resultados de la muestra testigo de vino con un recuento de 4,0 x 10³ UFC/100 ml, con la muestra de vino pasteurizada mediante intercambio de calor con un valor de 8,0 x 10² UFC/100 ml, se observa que el proceso tradicional de pasteurización por intercambio de calor que se emplea en ILA S.A. reduce solamente el 80,0 % de la carga de mohos y levaduras; en consecuencia, esta reducción microbiana no es suficiente, lo que puede ocasionar un problema tecnológico de reflora y sedimentación en el vino envasado conocido como “flor del vino”.

Los resultados microbiológicos que se presentan en la Tabla 11 corresponden a los tratamientos de vino de frutas a los que se aplicó una concentración de 1 mg/L de O₃ durante 1 (a1b1), 3 (a1b2) y 5 minutos (a1b3).

Tabla 11: Recuento de mohos y levaduras (UFC/ml) de vino de frutas aplicado una concentración de 1 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos

MUESTRA	TRATAMIENTO	ENSAYOS REALIZADOS	MÉTODOS UTILIZADOS	RESULTADOS (UFC/ml)	REDUCCIÓN MICROBIANA [%]
Vino de frutas	a1b1	Mohos y Levaduras	PE-07-5.4-MB INEN 1529-10. 1998	3.0 x 10 ³	25,0
	a1b2			2.0 x 10 ³	50,0
	a1b3			2.0 x 10 ²	95,0

Condiciones Ambientales: 21.2[°C]; 53 % HR.

Fuente: SEIDLA, 2016

Los resultados microbiológicos de la Tabla 11 fueron comparados con los resultados de la muestra testigo (Tabla 10) que mostró un conteo de 4,0 x 10³ UFC/100 ml, determinándose porcentajes de reducción microbiana del 25 %, 50 % y 95 %, los cuales, reflejan una mínima reducción microbiana al aplicar 1 mg/L de O₃ durante 1 y 3 minutos, mientras que al aplicar la misma concentración durante 5 minutos el porcentaje de reducción microbiana se incrementa alcanzando incluso una mayor eficiencia si lo comparamos con el obtenido en la muestra pasteurizada tradicionalmente mediante intercambio de calor. En la Figura 9 se muestra la comparación de los porcentajes de reducción microbiana aplicando una concentración de 1 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos.

La aplicación del tratamiento a1b3 para pasteurizar el vino en ILA S.A. resultaría económicamente inviable debido al alto costo de operación, pues se requeriría de varios equipos adicionales para recircular el fluido durante 5 minutos y lograr una reducción microbiana del 95 %, altamente deseable.

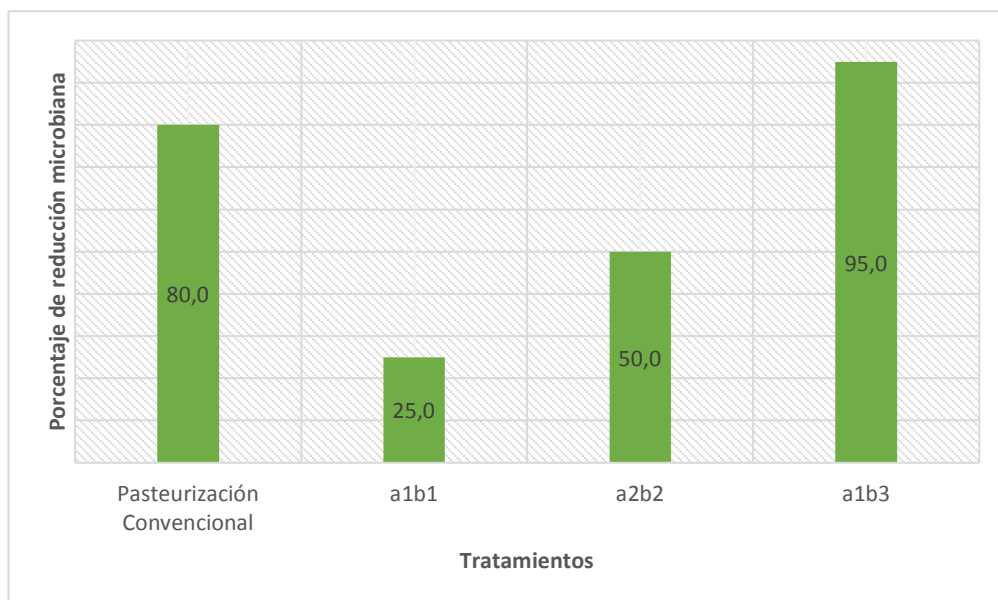


Figura 9: Comparación de los porcentajes de reducción microbiológica aplicando una concentración de 1 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos. Autor: Rodrigo Valle

En la Tabla 12 se presentan los resultados de la muestra de vino de frutas aplicando una concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos y el porcentaje de reducción microbiana alcanzado con una mayor concentración de ozono.

Tabla 12: Resultados microbiológicos del segundo tratamiento de muestras de vino aplicado una concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos

MUESTRA	TRATAMIENTOS	ENSAYOS REALIZADOS	MÉTODOS UTILIZADOS	RESULTADOS (UFC/ml)	REDUCCIÓN MICROBIANA [%]
Vino de frutas	a2b1	Mohos y Levaduras	PE-07-5.4-MB INEN 1529-10. 1998	1	99,9
	a2b2			1	99,9
	a2b3			1	99,9

Condiciones Ambientales: 19.2 [°C]; 50 % HR.

Fuente: LACONAL, 2015

Los resultados muestran una reducción microbiana del 99,9 % de la población de mohos y levaduras para los 3 tratamientos, que corresponde a una reducción de 3 log. Este resultado corrobora lo mencionado por Vite (2015), quien empleó ozono como atmosfera modificada para el almacenamiento de fresas y demostró que existía una reducción entre 1 – 3 log de población microbiana.

Adicionalmente, **O'Donnell (2012)** señaló la efectividad del uso de ozono como método de control de poblaciones microbianas en alimentos y bebidas para asegurar la inocuidad de los alimentos, demostrando que existe una reducción de hasta 3 veces la carga microbiana original de los alimentos y hasta 5 veces cuando el método es combinado, lo que demuestra la efectividad del poder oxidante del O_3 para pasteurizar el vino.

También **Miller & Silva (2013)** concluyeron que, empleando agua potabilizada con ozono, la carga microbiana inicial de las frutas y vegetales tratadas en los procesos poscosecha se reducía en un 95 % y se prevenía la contaminación cruzada en las operaciones posteriores, demostrando la acción del ozono residual. El porcentaje de reducción de 99,9 % obtenido para el caso del vino de frutas corrobora la efectividad del O_3 empleado como método de conservación, con la única diferencia que se consigue mayor efectividad al emplear el ozono directamente sobre el vino a pasteurizar.

Por lo antedicho, la efectividad de la aplicación de ozono como método alternativo a la pasteurización es viable considerando los resultados mostrados anteriormente y sustentados por trabajos similares y textos científicos, ya que existe 3 log de reducción de carga microbiana en los tres tratamientos analizados. Además, si se comparan los porcentajes de reducción microbiana se observa que existe una diferencia de 19.9 puntos porcentuales de reducción entre la pasteurización tradicional (80 %) y los tratamientos con ozono (99.9 %), lo que representa un aumento de la eficiencia del método de pasteurización de aproximadamente el 20 %.

Partiendo de la premisa que, para la desinfección de agua, según la FDA únicamente se requiere 1 mg/L de O_3 , y la consideración de que

el vino por sus características contiene otros compuestos, además del agua, se concluye que la aplicación de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto al vino de frutas es suficiente para lograr un conteo microbiológico de mohos y levaduras < 1, demostrando en la práctica el efecto oxidante del ozono para pasteurizar efectivamente el vino de frutas. El resultado microbiológico obtenido del Laboratorio Móvil de la Subsecretaría de Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad de una muestra de vino del tratamiento a2b1, aplicando 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto, se presenta en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultado microbiológico de muestra de vino aplicada una concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto

MUESTRA	TRATAMIENTO	ENSAYOS REALIZADOS	MÉTODOS UTILIZADOS	RESULTADOS (UFC/ml)	REDUCCIÓN MICROBIANA [%]
Vino de frutas	a2b1	Mohos y Levaduras	BAM CAP 18"	1	99,9

Fuente: MIPRO, 2015

El resultado presentado en la Tabla 13 ratifica el resultado presentado en la Tabla 12, demostrando que aplicar una dosis de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto es suficiente para lograr un recuento microbiológico de 1 UFC/ml y un porcentaje de reducción del 99,9 %, y por ende la pasteurización del vino de frutas.

En la Tabla 14 se muestran los resultados microbiológicos aplicando 3 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos a muestras de vino de frutas.

Tabla. 14: Resultados microbiológicos de muestras de vino aplicada una concentración de 3 mg/L de O₃ durante 1, 3 y 5 minutos

MUESTRA	TRATAMIENTO	ENSAYOS REALIZADOS	MÉTODOS UTILIZADOS	RESULTADOS (UFC/ml)	REDUCCIÓN MICROBIANA [%]
Vino de frutas	a3b1	Mohos y Levaduras	PE-07-5.4-MB INEN 1529-10.1998	1	99,9
	a3b2			1	99,9
	a3b3			1	99,9
Condiciones Ambientales: 19.2 [°C]; 50 % HR.					

Fuente: LACONAL, 2015

Los resultados obtenidos de los análisis realizados a las muestras de vino de frutas a las que se les aplicó una dosis de O₃ de 3 mg/L, durante 1, 3 y 5 minutos, muestran una reducción del 99,9 % de la carga microbiana presente, similar a los tratamientos en los que se aplicó una concentración de 1,5 mg/L durante los mismos tiempos. Esto ratifica la efectividad de las concentraciones de O₃ a 1,5 y 3,0 mg/L y a diferentes tiempos para pasteurizar el vino de frutas. También vale señalar que si bien es cierto el porcentaje de reducción microbiana (95,0 %) de la combinación a1b3 (1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto) es deseable, tecnológicamente presenta un limitante al elevar el costo de la operación por el empleo por un largo periodo de tiempo (5 minutos) de otros equipos adicionales para conseguir la recirculación del fluido; por lo que al aumentar la concentración del O₃ se logra disminuir el tiempo y por ende el costo de operación.

Dado que el objetivo de esta investigación era comprobar la fiabilidad del método de aplicación de ozono como alternativa a la pasteurización convencional y determinar la concentración y tiempo requeridos para lograr una reducción de la carga microbiana para mantener la estabilidad biológica del vino de frutas, se concluye que el mejor tratamiento es la combinación a2b1; es decir, la aplicación de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto, suficiente para lograr un conteo microbiológico de mohos y levaduras < 1 y una reducción del 99,9 % de la carga microbiana inicial.

En la Figura 10 se muestra la comparación de los porcentajes de reducción microbiana de los tratamientos planteados, en esta investigación frente a la pasteurización tradicional.

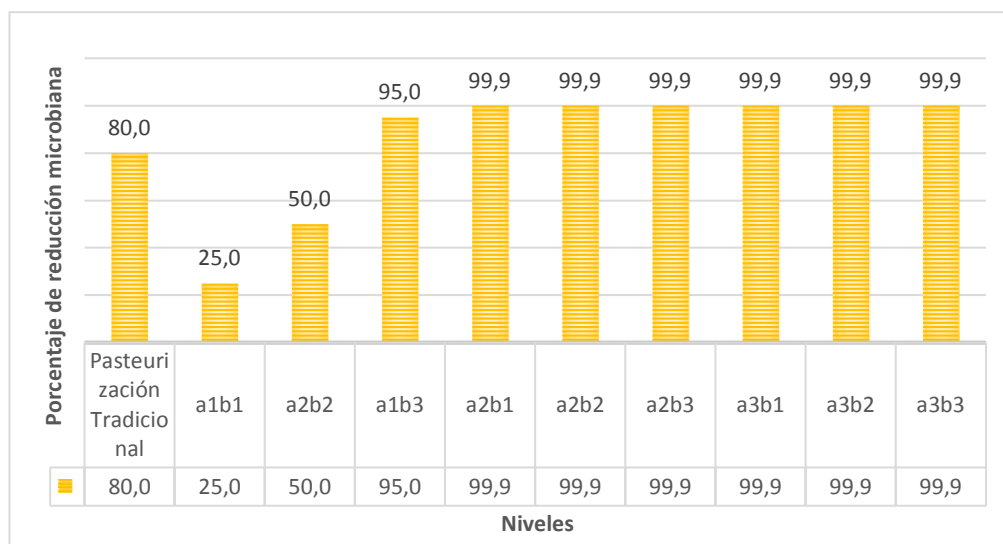


Figura 10: Comparación de los porcentajes de reducción microbiológica de los tratamientos planteados por nivel, frente al porcentaje de reducción de la pasteurización tradicional. Autor: Rodrigo Valle Espinosa.

4.1.3 Resultados bromatológicos

Con el fin de determinar la acción del O₃ en las características del producto final, tras el proceso de inyección de ozono, se realizó un perfil bromatológico de una muestra de vino de frutas sometida a pasteurización tradicional (Tabla 15), y de una muestra de vino de frutas ozonificado empleando una dosis de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto (Tabla 16). En el Anexo B se presentan los resultados bromatológicos de los análisis realizados.

Tabla 15: Resultados bromatológicos de muestra de vino pasteurizada tradicionalmente

MUESTRA	PARÁMETROS	MÉTODOS UTILIZADOS	UNIDADES	RESULTADOS
Vino de frutas	Densidad	Gravimétrico	g/ml	1,0616
	Grado alcohólico a 20 °C	NTE INEN 340	°GL	8,0
	Acidez total como ácido acético	NTE INEN 341	mg/ 100 ml	20,9
	Furfural	NTE INEN 2014 C.G.	mg/ 100 ml	0,15
	Metanol	NTE INEN 2014-1194	mg/ 100 ml	4,7
	Aldehídos como etanal	NTE INEN 2014 C.G.	mg/ 100 ml	0,0
	Alcoholes superiores	NTE INEN 2014 C.G.	mg/ 100 ml	6,1
	Azucares totales	HPLC	%	25,9

Fuente: LASA, 2016

Tabla 16: Resultados bromatológicos de muestra de vino aplicado una concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto

MUESTRA	PARÁMETROS	MÉTODOS UTILIZADOS	UNIDADES	RESULTADOS
Vino de frutas	Densidad	Gravimétrico	g/ml	1,0610
	Grado alcohólico a 20 °C	NTE INEN 340	°GL	8,0
	Acidez total como ácido acético	NTE INEN 341	mg/ 100 ml	19,7
	Furfural	NTE INEN 2014 C.G.	mg/ 100 ml	0,11
	Metanol	NTE INEN 2014-1194	mg/ 100 ml	4,2
	Aldehídos como etanal	NTE INEN 2014 C.G.	mg/ 100 ml	0,0
	Alcoholes superiores	NTE INEN 2014 C.G.	mg/ 100 ml	6,0
	Azúcares totales	HPLC	%	25,9

Fuente: LASA, 2016

Al comparar los resultados de las Tablas 15 y 16 se puede inferir que luego de la inyección de ozono, el vino de frutas presenta una disminución en los valores de acidez, furfural y metanol, que si bien es mínima indica que el efecto del ozono sobre los componentes del vino de frutas es beneficioso para la estabilidad bromatológica al disminuir la cantidad de congéneres del producto final, y evidenciando en cierta medida la teoría de acción del ozono de que únicamente oxida la materia orgánica (microorganismos) sin afectar significativamente otros componentes.

En la Figura 11 se presenta la comparativa de los valores bromatológicos analizados.

Además, es importante enfatizar que los resultados bromatológicos obtenidos, cumplen con los parámetros de calidad establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 374 Vino de Frutas. Requisitos, en la que el valor máximo de metanol es de 50 mg/ 100 ml, acidez es de 160 mg/ 100 ml y aldehídos 32 mg/ 100 ml.

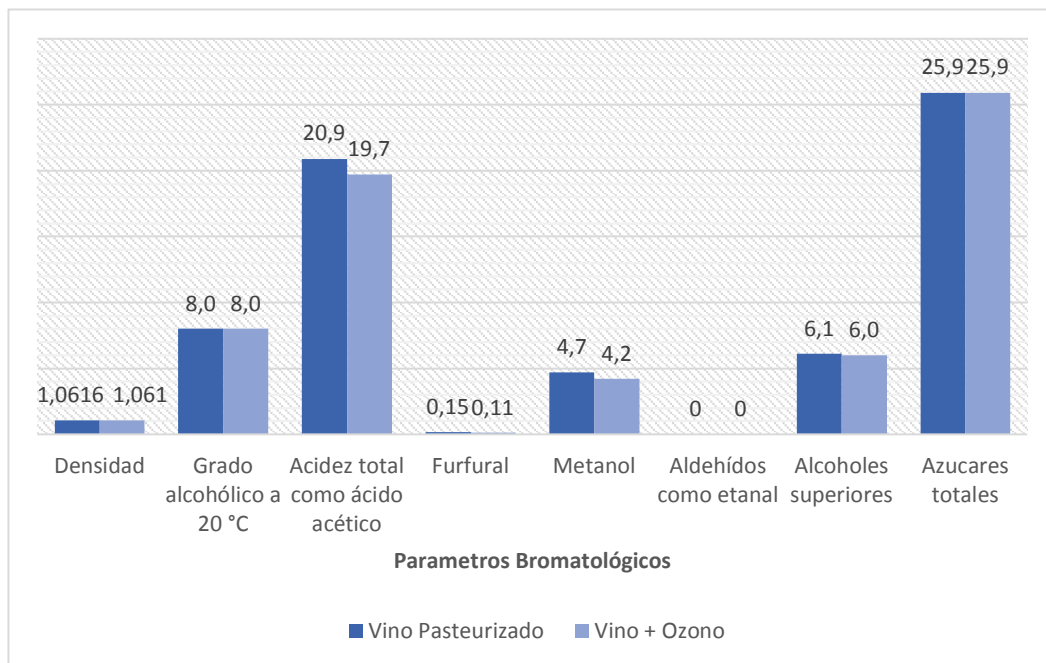


Figura 11: Comparación de los resultados bromatológicos de muestra de vino pasteurizada y muestra ozonificada. Autor: Rodrigo Valle Espinosa.

4.1.4 Resultado cromatográfico

En la Figura 12 se muestra la curva cromatográfica, con el orden de elución de los compuestos: acetato de etilo, metanol, 1-propanol, Isobutanol, 4-metil-2-pentanol (estándar interno), 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.

Con el fin de determinar posibles cambios de los componentes del perfil de alcoholes y en la estabilidad del vino de frutas, luego de aplicar una concentración de 1.5 mg/L de O₃ durante 1 minuto. Se puede apreciar que la separación de todos los compuestos es estable, excepto la de los alcoholes amílicos que aparecen parcialmente sobrepuestos. Esta sobre posición no afecta el resultado en términos de estabilidad, dado que el método aplicado cuantifica la mezcla conjunta de estos dos compuestos, que no poseen diferencias en sus propiedades químicas o sensoriales.

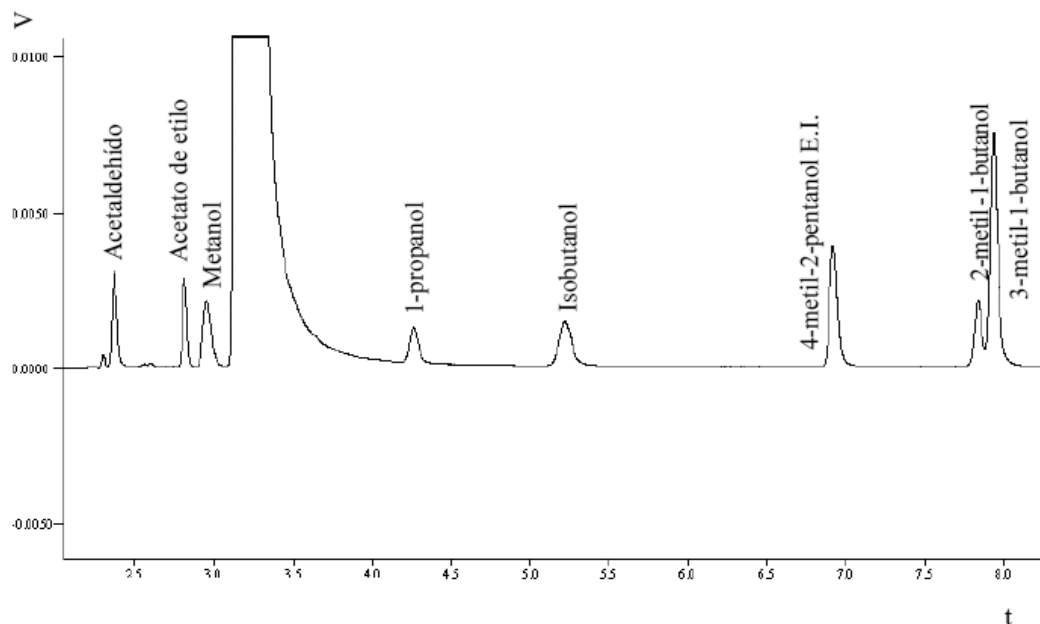


Figura 12: Cromatograma de una muestra de vino de frutas aplicada una concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto. Fuente: SEIDLA, 2016.

Dado que las separaciones de los compuestos en el cromatograma son estables, se puede concluir que la inyección de ozono a una muestra de vino de frutas en una concentración de 1.5 mg/L de O₃ durante 1 minuto no afecta el perfil de alcoholes del vino de frutas. Esto demuestra la acción del ozono únicamente sobre los microorganismos y no sobre los componentes químicos del producto, por ende aseverando la validez del empleo de ozono como método alternativo de pasteurización.

4.1.5 Resultados organolépticos

Desde el punto de vista de calidad es importante evaluar las características organolépticas del producto ozonificado, por lo que se realizó una prueba triangular comparativa con el objetivo de evaluar si el grupo de catadores podía distinguir la muestra de vino ozonificada frente a muestras de vino pasteurizadas tradicionalmente, cuyos resultados se presentan en la Tabla 17 y en la Figura 13.

Una prueba triangular se sustenta en la necesidad de demostrar estadísticamente que el consumidor final no aprecia una diferencia significativa entre el uso de ozono como método alternativo y el empleo de intercambio de calor en la pasteurización de vino de frutas, ya que, conservar las cualidades sensoriales originales del producto es un punto importante a tener en cuenta al desarrollar nuevos métodos tecnológicos.

Tabla 17: Distribución de frecuencias observadas y esperadas de la prueba triangular

	Numero de Aciertos	Numero de Equivocaciones
Frecuencias Observadas	6	21
Frecuencias Esperadas	9	18

Autor: Rodrigo Valle Espinosa

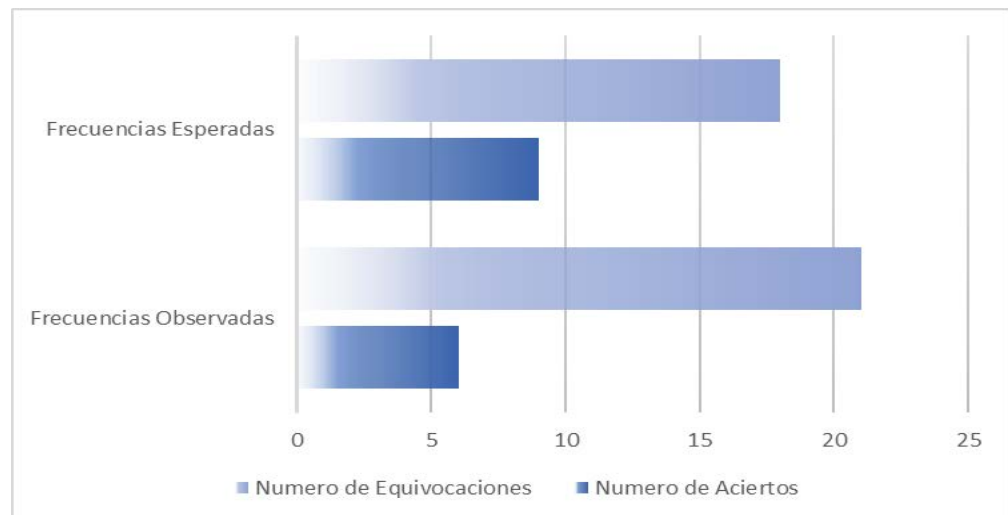


Figura 13: Distribución de frecuencias observadas y esperadas de la prueba triangular. Autor: Rodrigo Valle Espinosa.

Se determinó el estadístico de la prueba ji cuadrado con los valores de la Tabla 17 y empleando la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

En donde: χ^2 = Representa el valor estadístico de ji cuadrado

O_i = Número de frecuencias observadas

O_e = Número de frecuencias esperadas

Donde el número de aciertos fue:

$$\chi^2 = \sum \frac{(6 - 9)^2}{9} = 1$$

Y el número de equivocaciones fue:

$$\chi^2 = \sum \frac{(21 - 18)^2}{18} = 0.5$$

Por tanto:

$$\chi^2 = 1 + 0.5 = 1.5$$

Las hipótesis planteadas para comprobar el valor estadístico ji cuadrado fueron:

- H_0 : Los catadores no identificaron la muestra de vino de frutas ozonificada.
- H_a : los catadores si identificaron la muestra de vino de frutas ozonificada.

Al comparar el valor χ^2 calculado (1,5) y el valor crítico teórico (3,85) a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y un grado de libertad, se observa que el valor calculado del estadístico de la prueba ji cuadrado resulta menor al valor teórico, por tanto, se acepta la hipótesis nula, que significa que los catadores no diferencian la muestra de vino

ozonificada de la muestra de vino tratada por el método convencional de pasteurización.

Lo anterior demuestra, que no existe afectación del producto en sus cualidades sensoriales, luego del proceso de inyección de ozono, ya que los catadores no pudieron determinar diferencia significativa de las características sensoriales en la comparación de las muestras de vino de frutas.

4.2 Verificación de hipótesis

Una vez analizados los resultados microbiológicos, bromatológicos y organolépticos de las muestras de vino sometidas a inyección de ozono como método alternativo de pasteurización, y tras comparar e inferir los resultados con la teoría explicativa del uso de ozono en alimentos, se rechaza la hipótesis nula planteada para esta investigación y se acepta la hipótesis alternativa.

Por lo tanto, es efectivo el empleo de inyección directa de ozono en vino de frutas elaborado a partir de un mosto combinado de manzana (*Pyrus malus* L.), pera (*Pyrus communis* L.) y uva (*Vitis vinifera*), como un método alternativo de pasteurización, aplicando 1,5 mg/L del gas durante 1 minuto para conseguir una reducción del 99,9 % de la carga microbiana inicial.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se mejoró la estabilidad biológica del vino de frutas obtenido por fermentación natural a partir del mosto combinado de manzana (*Pyrus malus L.*), pera (*Pyrus communis L.*) y uva (*Vitis vinifera*), tras el proceso de inyección de ozono, aplicando una concentración de 1,5 mg/L de O₃ durante 1 minuto ya que el efecto oxidativo del O₃ permite la degradación de mohos y levaduras en un 99,9 %, sin alterar las características sensoriales y físico químicas de producto final.
- El efecto inhibitor del O₃ es ampliamente superior al efecto que tiene el método tradicional de pasteurización que ILA S.A. emplea en sus procesos vinícolas, y su aplicación permitirá asegurar la estabilidad microbiológica del producto.
- La teoría de acción del O₃ al actuar únicamente degradando los microorganismos fue comprobada ya que tras el proceso de inyección directa de ozono no se alteró las características bromatológicas del vino de frutas e incluso mejoraron ciertos parámetros como metanol y acidez.
- Los panelistas de la prueba triangular no fueron capaces de diferenciar la muestra tratada con ozono, mostrando la efectividad del método como alternativa a los procesos tradicionales de pasteurización por intercambio de calor, al no afectar las características organolépticas del vino de frutas y no ofrecer cambios significativos en las percepciones sensoriales de los catadores.

5.2 Recomendaciones

- Recomendar a ILA S.A. el uso del O₃ en una concentración de 1,5 mg/L durante 1 minuto en el proceso de pasteurización del vino de frutas.
- Emplear el método de difusión de ozono por burbujeo a través de un difusor cerámico, con el fin de que las micro burbujas distribuyan de mejor manera las moléculas de O₃ en el vino de frutas y puedan degradar efectivamente los microorganismos presentes.
- Desarrollar un perfil de estabilidad del producto en condiciones aceleradas con el objetivo de corroborar los resultados de tiempo de residencia de ozono.
- Establecer el tiempo de anaquel o de vida útil del vino de frutas ozonificado aplicando una concentración de 1,5 mg/l de O₃ durante 1 minuto.
- Recomendar el empleo de ozono como método alternativo de pasteurización para mejorar la calidad de otros productos mucho más complejos, como néctares de frutas, bebidas proteicas y bebidas lácteas.
- Realizar un estudio de costos comparativos para determinar los puntos de equilibrio económico y retornos de inversión, al optar por el empleo de equipos de generación de ozono para la pasteurización, en lugar del empleo de intercambiadores de calor y la necesidad constante de generación de vapor para su funcionamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. (2008). *Food Microbiology*, Londres, Inglaterra: The Royal Society of Chemistry.
- Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (21 de noviembre de 2014). *Límites máximos de exposición a ozono gaseoso en condiciones de trabajo diarias*. Obtenido de: www.osha.gov.
- Agencia de Protección Ambiental (18 de diciembre de 2015). *Legislación para potabilización de agua*. Obtenido de: www.epa.gov.
- Alonso, C. (2010). *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos*. Burgos, España: Instituto Tomás Pascual Sanz para la Nutrición y la Salud, Universidad de Burgos.
- Barbado, A. (2005). *Aspectos bioquímicos y microbiológicos del vino*. Zaragoza, España: Jornadas Científicas 99, Grupos de Investigación Enológica, Universidad de Zaragoza.
- Beutelspacher, S & Calderón, J. (2014). *Diseño y construcción de un generador de ozono para aplicaciones de purificación de agua*. Morelos, México: Centro Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Morelos.
- Boisrobert, C. (2002). *Ozone III: Agricultural & Food Processing Applications of Ozone as an Antimicrobial Agent*, US regulatory review of ozone use in the food industry. Washington D.C., EE. UU.: Federal Register.
- Choi, L. (2005). *The effects of thermal and no thermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability*, Journal of Food Quality. Chicago, EE. UU.: CRC Pres.
- Colil, F. (2013). *Efectos del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces Spp.** Santiago de Chile, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Agroindustria y Enología, Universidad de Chile.

- Dubourdieu, B. (2006). *Handbook of Enology Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*. New York, EE. UU.: John Wiley & Sons Publication.
- Duron, B. (1982). *Ozone generation with ultraviolet radiation*, Handbook of Ozone Technology and Applications. Milwaukee, EE. UU.: Ann Arbor Science Publishers.
- FDA (2011). *Hazard analysis and critical control point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice: final rule*. Washington D.C., EE. UU.: Federal Register.
- Fernández, J. (2014). *Química del Vino*. Valladolid. España: Departamento de Química Analítica, CFIE de Valladolid.
- García, A. (2012). *Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino, potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación*. Madrid, España: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid.
- García, B. (2014). *Microbiología residual en vinos tintos*, La Rioja, España: Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática, Universidad de La Rioja.
- Graham, F. (2008). *Food Plant Sanitation*. Milwaukee, EE. UU.: CRC Pres.
- Hampson, B. (2000). *Use of ozone for winery and environmental sanitation, Practical Winery & Vineyard*. Chicago, EE. UU.: Springer Science Business Media.
- Hanna Instrument (29 de diciembre de 2015). *Manual de Instrucciones Test Kit Ozono HI 38054*. Obtenido de: www.hannainst.com.ec
- Hill, A. (1982). *Historical background, properties and applications of ozone*, Handbook of Ozone Technology and Applications. Milwaukee, EE. UU.: Ann Arbor Science Publishers.
- Hoigné, J. (1998). *Chemistry of aqueous ozone, and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes*, The Handbook of Environmental Chemistry Quality and Treatment of

Drinking Water. New York, EE. UU.: Springer Science Business Media

- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (16 de agosto de 2015). *Rendición de cuentas 2014 Análisis y Estadísticas*. Obtenido de: www.proecuador.gob.ec.
- Kenneth, C. (2011). *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*. New York, EE. UU.: Springer Science Business Media.
- Kilcast, D. (2009). *Sensory analysis for food and beverage quality control*. Nueva Inglaterra, EE. UU.: Woodhead Publishing.
- Kilcast, D. (2014). *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Nueva Inglaterra, EE. UU.: Woodhead Publishing.
- Kowalski, W. (1998). *Bactericidal effects of high airborne ozone concentrations on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*, Ozone-Science & Engineering. Frankfurt, Alemania: World Press.
- Leistner, J. & Gorris, F. (1995). *Food Microbiology Protocols*. Miami, EE. UU.: Humana Pres.
- Manousaridis, G. (2005). *Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels*. Toulouse, Francia: Publication Press.
- Miller, S. & Silva, F. (2013). *Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation*. New York, EE. UU.: Springer Science Business Media.
- O'Donnell, C. (2012). *Ozone in Food Processing*. New York, EE. UU.: John Wiley & Sons Publication Ltd.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. (23 de diciembre de 2015). *Estadísticas de producción de vino Julio 2015*. Obtenido de: www.oiv.int.
- Pacheco, F. & Caiza, D. (2013). *Diseño e implementación de un prototipo de generador de ozono para purificación de agua para el consumo humano*. Quito, Ecuador: Facultad de Ingeniería Eléctrica y Electrónica, Escuela Politécnica Nacional.
- Robertson, M. (2013). *Ozone in Food Processing Applications*. Virginia, EE. UU.: Zentox Corporation of Research.

- Saltos, A. (2010). *Sensometría Análisis en el Desarrollo de Alimentos Procesados*. Quito, Ecuador: Editorial Pedagógica Freire.
- Vázquez, R. (2015). *Microbiología de vinos tintos*. La Rioja, España: Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática, Universidad de La Rioja.
- Villacis, M. (2006). *Determinación de la Cinética de Inactivación de la Escherichia Coli con Ozono*. Guayaquil, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Vite, D. (2015). *Efecto del tiempo de exposición al ozono gaseoso y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y aceptabilidad general en fresas (Fragaria vesca L.)*. Lima, Perú: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Privada Antenor Orrego.

ANEXO A
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

MUESTRAS DE AGUA DE VERTIENTE Y AGUA DE VERTIENTE OZONIFICADA



UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS



Dir: Av. Los Chasquis y Río Payamino, Huachi, Ambato Ecuador Telefonos: 2400907 Correo: laconal@hotmail.com

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

Certificado No: 15-177

Bot-5 10 08

Solicitud N°: 15-177	Pág.: 1 de 1
Fecha recepción: 27 julio 2015	Fecha de ejecución de ensayos: 27-31 julio 2015
Información del cliente:	
Empresa: Industrias Lacteras Asociadas S.A.	C.I./RUC: 189001935001
Representante: Trajano Santana Alvarez	Tlf: 032521780
Dirección: Pomasig S/N, Alemania, Sector Ingathuro Bajo, Ciudadela El Paraso	Email: ilasaoci@hotmail.com
Ciudad: Ambato	rodrigo.vale.espinosa@outlook.com
Descripción de las muestras:	
Producto: Agua	Peso: 1000g c/u
Marca comercial: n/a	Tipo de envase: PET
Lote: n/a	No de muestras: 4
F. Exp: n/a	F. Exp: n/a
Conservación: Ambiente: Refrigeración: x Congelación:	Almac. en Lab: n/a
Cierre seguridad: Ninguno: x Intaños: Rotos	Muestreo por el cliente: 27 julio 2015

RESULTADOS OBTENIDOS

Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Agua	17715481	AAMB-02	Dureza total	APHA	mg CaCO ₃	1,181
			pH	APHA	unidades pH	8.04
			Sólidos Totales en agua	APHA 2540	mg/l	0,362
			Sólidos Totales disueltos	APHA	mg/l	0,434
			Turbiedad	APHA	NTU	0,3
			Aerobios Totales	Standard Methods: 9215 D.	UFC/100ml	6,0 x 10 ³ (e)
			Coliformes totales	Standard Methods: 9222 B.	UFC/100ml	2,8 x 10 ³
Coliformes fecales	Standard Methods: 9222 D.	UFC/100ml	<1			
Agua	17715482	ACM-01	Aerobios Totales	Standard Methods: 9215 D.	UFC/100ml	9,0 x 10 ³ (e)
			Coliformes totales	Standard Methods: 9222 B.	UFC/100ml	3,4 x 10 ³
			Coliformes fecales	Standard Methods: 9222 D.	UFC/100ml	8 (e)
Agua	17715483	AAOZ-04	Aerobios Totales	Standard Methods: 9215 D.	UFC/100ml	4,0 x 10 ³ (e)
			Coliformes totales	Standard Methods: 9222 B.	UFC/100ml	<1
			Coliformes fecales	Standard Methods: 9222 D.	UFC/100ml	<1
Agua	17715484	AAUV-03	Aerobios Totales	Standard Methods: 9215 D.	UFC/100ml	6,0 x 10 ³ (e)
			Coliformes totales	Standard Methods: 9222 B.	UFC/100ml	70 (e)
			Coliformes fecales	Standard Methods: 9222 D.	UFC/100ml	<1

Conds. Ambientales: 19.3 °C; 53%HR

Los resultados marcados con (e) son valores estimados de contejo, en la dilución mas baja.

DIRECTOR TÉCNICO
Ingeniero de Alimentos
Risueño
División de Calidad
LACONAL

Autenticación para transferencia electrónica de resultados: Si No

Note: Los resultados consignados se refieren exclusivamente a la muestra recibida. El Laboratorio no es responsable por los errores de este certificado.

No es un documento negociable. Sólo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente recomendamos eliminarlo inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente.

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS SIN PASTEURIZAR



SEIDLaboratory Cia. Ltda.

SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

Melchor Toaza N61-63
entre Av. del Maestro y Nazareth
Telfs.: 248 3145 / 280 8849 / 247 6314
Telefax: 280 8825 • www.seidlaboratory.com
Quito - Ecuador

INFORME DE ENSAYO NR. 112428

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como: VINO, CODIGO: MVSP, MUESTRA 1, FECHA DE TOMA: 18/04/2018

CODIGO LABORATORIO: 112428-1

TIPO DE PRODUCTO: VINO, CODIGO: MVSP, MUESTRA 1, FECHA DE TOMA: 18/04/2018

DIRECCION: 13 DE MAYO sin AUSOS CPRESSES

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: FRASCO DE PLASTICO CONTAPA

NUMERO DE LOTE: ND

FECHA RECEPCION: 18/04/21

FECHA INICIO ENSAYO: 18/04/21

CONTENIDO DECLARADO: 2L

CONTENIDO ENCONTRADO: NS

FECHA DE ELABORACION: ND

FECHA DE CADUCIDAD: ND

CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: Temperatura 22°C

FORMA DE CONSERVACION: AMBIENTE

MUESTREO: ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Mohos y Levaduras	M. INTERNO (INEN 1829-10)	UFC/ml	4.0 x 10 ²
NS: No solicitó el cliente/ND: No declara.			

Datos tomados del cuaderno de Microbiología 88 Pág. 133B

OBSERVACIONES TÉCNICAS: Por pedido del cliente se trabaja en la muestra sin dilución.

Los resultados expresados arriba, tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representatividad de la muestra respecto a su origen y sitio de la cual fue tomada.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,


Dña. María Vinuesa
Directora de Calidad
Directora Técnica (E)

18/04/28
FECHA EMISION

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 30 días calendario
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el periodo estipulado

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS PASTEURIZADO TRADICIONALMENTE



SEIDLaboratory Cía. Ltda.
SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

Melchor Toaza N61-63
entre Av. del Maestro y Nazareth
Telfs.: 248 3145 / 260 8849 / 247 6314
Telefax: 260 8825 • www.seidlaboratory.com
Quito - Ecuador

INFORME DE ENSAYO NR. 112424

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como: VINO, CODIGO: MVPLCA, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CODIGO LABORATORIO: 112424-1
TIPO DE PRODUCTO: VINO, CODIGO: MVPLCA, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

DIRECCION: 13 DE MAYO en Y ALJOS CIPRESSES

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: FRASCO DE PLASTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE: ND
FECHA RECEPCION: 16/04/21
FECHA INICIO ENSAYO: 18/04/21
CONTENIDO DECLARADO: 2L
CONTENIDO ENCONTRADO:
FECHA DE ELABORACION: NS
FECHA DE CADUCIDAD: ND
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: ND
FORMA DE CONSERVACION: Temperatura 22 °C
MUESTREO: AMBIENTE
ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Mohos y Levaduras NS: No solicita el cliente/ ND: No declara	M. INTERNO (NEN 1529-10)	UFC/ml	8.0 x 10 ²

Datos tomados del cuaderno de Microbiología 88 Pág. 133A

OBSERVACIONES TÉCNICAS: Por pedido del cliente se trabaja en la muestra sin dilución.

Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representatividad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomada.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra.

Atentamente,

16/04/21
FECHA EMISION


Dra. Mayra Vinuesa
Director de Calidad
Director Técnico (E)

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 30 días calendario
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el periodo estipulado

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS APLICADO 1 mg/L de O₃ DURANTE 1, 3 Y 5 MINUTOS



SEIDLABORATORY Cía. Ltda.
SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

Melchor Toaza NG1-63
entre Av. del Maestro y Nazareth
Tells.: 2483145 / 2488849 / 2476314
Telefax.: 248 6525 - www.seidlaboratory.com
Quito - Ecuador

INFORME DE ENSAYO NR. 112425

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente
comerc

VINO, CODIGO: MVPLCB-002, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CODIGO LABORATORIO: 112425-1

TIPO DE PRODUCTO: VINO CODIGO: MVPLCB-002, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: FRASCO DE PLASTICO CON TAPA

NUMERO DE LOTE: NO

FECHA RECEPCION:

FECHA INICIO ENSAYO: 19/04/21

CONTENIDO DECLARADO: 19/04/21

CONTENIDO ENCONTRADO: 19/04/21

FECHA DE ELABORACION: 2L

FECHA DE CADUCIDAD: NS

CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: NO

FORMA DE CONSERVACION: Temperatura 22 °C

MUESTREO: AMBIENTE

ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYO MICROBIOLÓGICO	MUESTRA (CÓDIGO)	MÉTODO	UNIDAD	RESULTADO
Mohos y Levaduras	a1b1	M. INTERNO (INEN 1529-10)	(UFC/ml)	3.0 x 10 ¹
	a1b2			2.0 x 10 ¹
	a1b3			2.0 x 10 ¹

Datos tomados del cuaderno de Microbiología 88 Pág. 133A

OBSERVACIONES TÉCNICAS: Por pedido del cliente se trabaja en la muestra sin dilución.

Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representatividad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomada.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,


Dra. Mayra Yndiza
Directora de Calidad
Directora Técnica (E)

18/04/2016
FECHA EMISION

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 30 días calendario
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el periodo estipulado

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS APLICADO 1,5 mg/L de O₃ DURANTE 1, 3 Y 5 MINUTOS



SEIDLaboratory Cía. Ltda.

SERVICIOS INTEGRAL DE LABORATORIO

Melchor Toza N61-63
entre Av. del Maestro y Nazareth
Tells. 2483115 / 2808825 / 2476314
Telefax. 280 8825 • www.seidlaboratory.com
Quito - Ecuador

INFORME DE ENSAYO NR. 112427

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente
con: VINO, CODIGO: MVPLCB, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CODIGO LABORATORIO: 112425-1
TIPO DE PRODUCTO: VINQ CODIGO: MVPLCB-002, MUESTRA2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: FRASCO DE PLASTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE: ND

FECHA RECEPCION:
FECHA INICIO ENSAYO: 18/04/21
CONTENIDO DECLARADO: 18/04/21
CONTENIDO ENCONTRADO: 1 L
FECHA DE ELABORACION: NS
FECHA DE CADUCIDAD: ND
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: ND

FORMA DE CONSERVACION: Temperatura 22 °C
MUESTREO: AMBIENTE
RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYO MICROBIOLÓGICO	MUESTRA (CÓDIGO)	MÉTODO	UNIDAD	RESULTADO
Mohos y Levaduras	a2b1	M. INTERNO (INEN 1529-10)	(UFC/ml)	<1
	a2b2			<1
	a2b3			<1

Datos tomados del cuaderno de Microbiología 84 Pág. 133A

OBSERVACIONES TÉCNICAS: Por pedido del cliente se trabaja en la muestra sin dilución.

Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representatividad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomada.

Este Informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

* Tiempo de almacenamiento de las formas: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra.

Atentamente,

18/04/20
FECHA EMISION


Dra. Melys Vinotiza
Director de Calidad
Director Técnico (E)

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 90 días calendario
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el período estipulado

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS APLICADO 3 mg/L de O₃ DURANTE 1, 3 Y 5 MINUTOS



SEIDLABORATORY Cia. Ltda.
SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

Melchor Toaza N61-63
entre Av. del Maestro y Nazareth
Tells.: 2483115 / 2808849 / 2476314
Telefax.: 280 8825 • www.seidlaboratory.com
Quito - Ecuador

INFORME DE ENSAYO NR. 112428

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente como: VINO, CODIGO: MVPLCB, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CODIGO LABORATORIO: 112425-1
TIPO DE PRODUCTO: VINQ CODIGO: MVPLCB 002, MUESTRA 2, FECHA DE TOMA: 18/04/2016

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: FRASCO DE PLASTICO CON TAPA
NUMERO DE LOTE: NO
FECHA RECEPCION:
FECHA INICIO ENSAYO: 18/04/21
CONTENIDO DECLARADO: 18/04/21
CONTENIDO ENCONTRADO:
FECHA DE ELABORACION: 2 L
FECHA DE CADUCIDAD: N3
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: NO
FORMA DE CONSERVACION: Temperatura 22 °C
MUESTREO: AMBIENTE
ES RESPONSABILIDAD DEL CUENTE

ENSAYO MICROBIOLÓGICO	MUESTRA (CÓDIGO)	MÉTODO	UNIDAD	RESULTADO
Mohos y Levaduras	a3b1	M. INTERNO (INEN 1529-10)	(UFC/ml)	< 1
	a3b2			< 1
	a3b3			< 1

Datos tomados del cuaderno de Microbiología 88 Pág. 133A

OBSERVACIONES TÉCNICAS: Por pedido del cliente se trabaja en la muestra sin diluir.

Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representatividad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomada.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

* Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra.

Atentamente,


16/04/20
FECHA EMISION

Dra. María Yndira
Director de Calidad
Director Técnico (E)

Página 1 de 1

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio
Muestras perecibles: 8 días calendario. Muestras no perecibles: 30 días calendario.
Si desea repetición de algún parámetro, se debe generar una solicitud en el período estipulado.

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS APLICADO 1,5 mg/L de O₃ DURANTE 1 MINUTO COMPROBACIÓN

 MINISTERIO DE INDUSTRIAS Y PRODUCTIVIDAD	SUBSECRETARIA DE LA CALIDAD	CÓDIGO: FOR-MIPRO-SCA-001-012
	INFORME TÉCNICO	

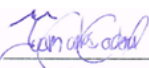
Fecha de análisis: 14-04-2016

Fecha de envío de resultados: 21-04-2016

EMPRESA - PRODUCTOR	MUESTRA- PRODUCTOS	Cantidad (g)/(ml.)	Temp. (°C)	E. Coll (ufo/g)	Conformes Totales (ufo/g)	Mohos y levaduras	E. Aureus	OBSERVACIONES
INDUSTRIAS LICORERAS ASOCIADOS S.A.	Alcohol MVOZ	=200	Ambiente 26°C	-	-	< 1	-	Solo se realiza M&L
	Alcohol MVSP	=200	Ambiente 26°C	-	-	< 3	-	Solo se realiza M&L
	Alcohol MVP	=200	Ambiente 26°C	-	-	< 1	-	Solo se realiza M&L

Nota: Para los análisis de microbiología para bebidas alcohólicas, no existe ninguna norma que solicita en los requisitos, no obstante, fue un pedido puntal de la empresa.

Firma: _____



Elaborado por: Juan Carlos Cadena

Cargo: Técnico de Gestión de Calidad (Matriz)

ANEXO B
ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS SIN PASTEURIZAR



INFORME TÉCNICO PARA REGISTRO SANITARIO

INF. LASA 02-03-15-RS00266
ORDEN DE TRABAJO No. 0023273

DATOS DEL CLIENTE

SOLICITADO POR: INDUSTRIAS LICORERAS ASOCIADAS S.A. "ILA S.A."
DIRECCIÓN INGAHURCO BAJO, CALLE PORTUGAL S/N Y ALEMANIA. AMBATO - TUNGURAHUA - ECUADOR

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

NOMBRE DEL PRODUCTO: VINO DE FRUTAS		
MARCA COMERCIAL: -	FABRICANTE: INDUSTRIAS LICORERAS ASOCIADAS S.A. "ILA S.A."	
TIPO DE PRODUCTO: BEBIDA ALCOHOLICA	COD. MUESTRA: 2370-15	IDENTIFICACIÓN: MI
ENVASE INTERNO: BOTELLA DE VIDRIO Y TAPA DE ALUMINIO	FORMA DE CONSERVACIÓN: AMBIENTE FRESCO Y SECO	
CONTENIDO NETO DECLARADO: 750 cm ³	CONTENIDO NETO ENCONTRADO: 750 cm ³	
FECHA DE ELAB.: 13-02-2016	FECHA DE EXP.: 13-02-2019	N° LOTE: 15.06.1
FECHA RECEPCIÓN: 19-02-2016	FECHA DE ANÁLISIS: 19-02-2016/27-02-2016	FECHA DE ENTREGA: 02-03-2016

ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO

PARAMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	REQUISITO DE LA NORMA INEN 1837		METODO DE ANALISIS
			MÍN	MÁX	
DENSIDAD	1,0616	g/ml	---	---	GRAVIMETRICO
GRADO ALCOHOLICO A 20°C	8,0	°GL	15	50	INEN 340
ACIDEZ TOTAL (Exp. como ácido acético)	20,9	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO	---	---	INEN 341
FURFURAL	0,15	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO	---	1,0	INEN 2014 C.G.
METANOL	4,7	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO	---	10	PEE-LASA-PQ-1063 INEN 2014-1194
ALDEHIDOS Como etanal	0,0	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO	---	---	INEN 2014 C.G.
ALCOHOLES SUPERIORES	6,1	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO	---	150	INEN 2014 C.G.
AZUCARES TOTALES	25,9	%	2,50	---	HPLC


Dr. Marco Guíjarro Ruales
GERENTE DE LABORATORIO

LASA se responsabiliza exclusivamente de los análisis, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida en el laboratorio. Prohibida su reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.

Av. de la Prensa NS3-113 y Gonzalo Gallo • Teléfonos: 2469- 814 / 2269-012
Juan Tenorio Pareja OP:5-97 v Simón Cárdenas • Teléfono: 2290-815

Page 1 of 1

MUESTRAS DE VINO DE FRUTAS APLICADO 1,5 mg/L de O₃ DURANTE 1 MINUTO



INFORME TÉCNICO PARA REGISTRO SANITARIO

INF. LASA 02-03-15-RS00566
ORDEN DE TRABAJO No. 0023273

DATOS DEL CLIENTE

SOLICITADO POR: INDUSTRIAS LICORERAS ASOCIADAS S.A. "ILA S.A."
DIRECCIÓN: INGAHURCO BAJO, CALLE PORTUGAL S/N Y ALEMANIA. AMBATO – TUNGURAHUA - ECUADOR

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

NOMBRE DEL PRODUCTO: VINO DE FRUTAS		
MARCA COMERCIAL: -	FABRICANTE: INDUSTRIAS LICORERAS ASOCIADAS S.A. "ILA S.A."	
TIPO DE PRODUCTO: BEBIDA ALCOHOLICA	COD. MUESTRA: 2370-16	IDENTIFICACIÓN: M2
ENVASE INTERNO: BOTELLA DE VIDRIO Y TAPA DE ALUMINIO	FORMA DE CONSERVACIÓN: AMBIENTE FRESCO Y SECO	
CONTENIDO NETO DECLARADO: 750 cm ³	CONTENIDO NETO ENCONTRADO: 750 cm ³	
FECHA DE ELAB.: 13-02-2016	FECHA DE EXP.: 13-02-2019	N° LOTE: 15.06.1
FECHA RECEPCIÓN: 19-02-2016	FECHA DE ANÁLISIS: 19-02-2016/27-02-2016	FECHA DE ENTREGA: 02-03-2016

ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO

PARAMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	REQUISITO DE LA NORMA INEN 1837		METODO DE ANALISIS
			MÍN	MÁX	
DENSIDAD	1,0610	g/ml	---	---	GRA VIMETRICO
GRADO ALCOHOLICO A 20°C	8,0	°GL	15	50	INEN 340
ACIDEZ TOTAL (Exp. como ácido acético)	19,7	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHEDRO	---	---	INEN 341
FURFURAL	0,11	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHEDRO	---	1,0	INEN 2014 C.G.
METANOL	4,2	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHEDRO	---	10	PEE-LASA-FQ-1063 INEN 2014-1194
ALDEHIDOS Como etanal	0,0	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHEDRO	---	---	INEN 2014 C.G.
ALCOHOLES SUPERIORES	6,0	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHEDRO	---	150	INEN 2014 C.G.
AZÚCARES TOTALES	25,9	%	2,50	---	HPLC



Dr. Marco Guizarro Ruales
GERENTE DE LABORATORIO

LASA se responsabiliza exclusivamente de los análisis, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida en el laboratorio.
Prohibida su reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.

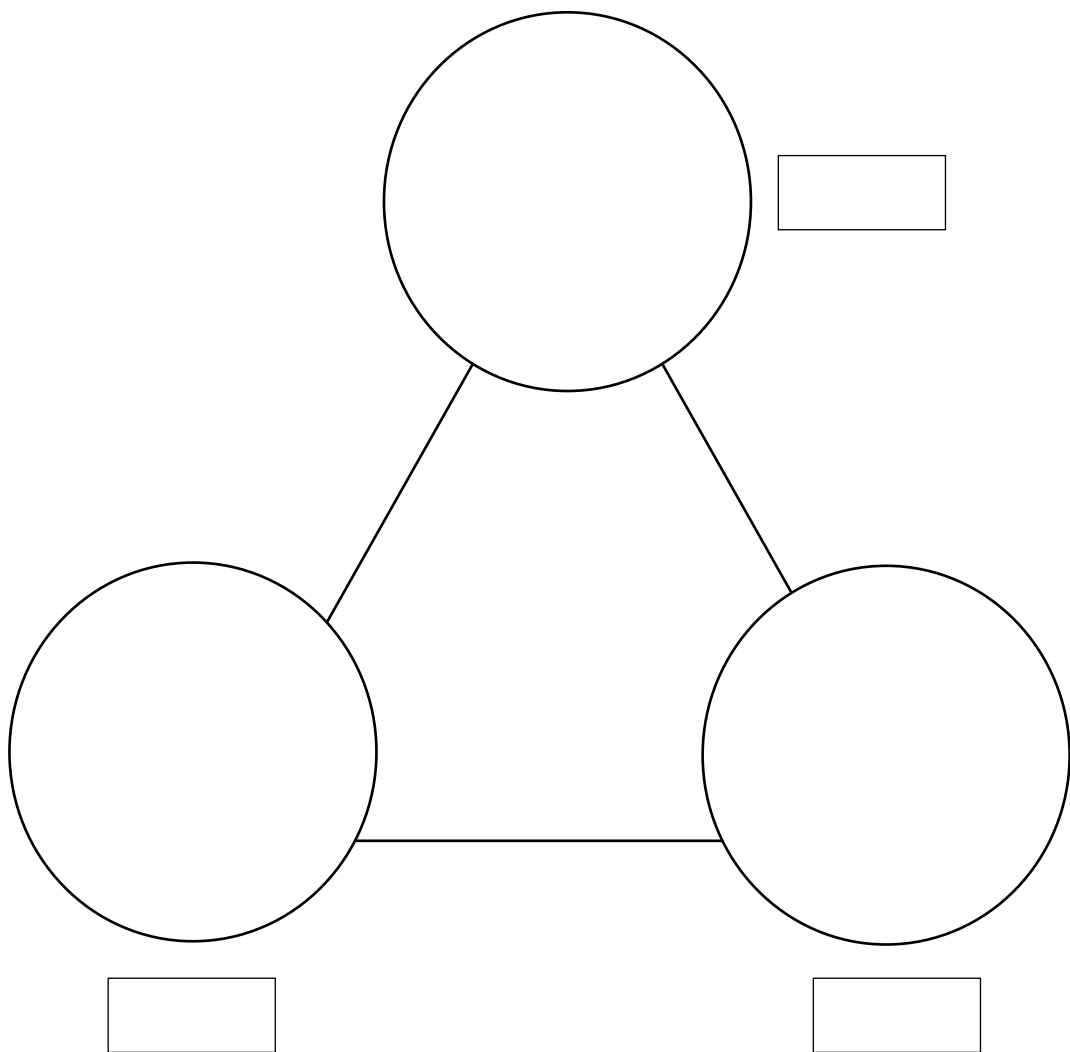
A. v. de la Prensa N53-113 y Gonzalo Gallo • Teléfonos: 2469- 814 / 2269-012
Juan Tenacón Parra OR-5-97 v. Simón Cárdenas • Teléfono: 2290-815

Page 1 of 1

ANEXO C
HOJA DE CATACIÓN
(PRUEBA TRIANGULAR)

ILA S.A. 	EVALUACIÓN SENSORIAL	CÓDIGO	EVS - 01
	HOJA DE CATACIÓN	ÁREA	PRODUCCIÓN
		REVISIÓN: 1	

INSTRUCCIONES: Por favor deguste las muestras empezando por la izquierda; a continuación, pruebe la muestra del vértice superior y termine con la muestra del vértice restante. Siéntase en la libertad de degustar las veces que desee las tres muestras y luego indique cual es la diferente, marcando con una X el código respectivo.



GRACIAS POR SU COLABORACIÓN