



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL

**APLICACIÓN DE EXTRACTO DE CANELA (*Cinnamomum
verum*) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA
EXTENDER EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN ZUMO DE
MANZANA**

TRABAJO EXPERIMENTAL

Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención del título de
INGENIERO AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL

AUTOR

SESME VELARDE ANDY BERNARD

TUTOR

Ing. KARINA MARÍN MOROCHO, MSc.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2020



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL

Aprobación del tutor

Yo, Ing. Karina Marín Morocho MSc, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: “APLICACIÓN DE EXTRACTO DE CANELA (*Cinnamomum verum*) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA EXTENDER EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN ZUMO DE MANZANA”, realizado por el estudiante SESME VELARDE ANDY BERNARD; con cédula de identidad N°094018471-6 de la carrera INGENIERIA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL, Unidad Académica Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Ing. Karina Marín Morocho MSc
Tutor

Guayaquil, 25 de Agosto de 2020



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL

Aprobación del tribunal de sustentación

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “APLICACIÓN DE EXTRACTO DE CANELA (*Cinnamomum verum*) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA EXTENDER EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN ZUMO DE MANZANA”, realizado por el estudiante SESME VELARDE ANDY BERNARD, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

Dra. Emma Jácome Murillo, M.Sc.
PRESIDENTE

Dra. Tamara Borodulina M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Luis Calle Mendoza M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Daniel Borbor Suárez, M.Sc.
EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 25 de Agosto de 2020

Dedicatoria

A Dios por darme salud y sabiduría a lo largo de mi carrera, logrando que cumpla uno de mis más importantes objetivos.

A mis padres, sin ellos no hubiese podido estar en donde estoy ahora, cumpliendo una meta más en mi vida profesional.

A mi madre, por estar pendiente en cada etapa, por el apoyo moral y su entusiasmo para poder seguir adelante, por su fé y su amabilidad, gracias. A mi papá por el tiempo y paciencia que tuvo conmigo, por compartir experiencias y consejos día a día, por su apoyo incondicional, gracias.

Agradecimiento

A Dios por sus innumerables bendiciones, a mi familia y amigos, son todo un solo conjunto: seres queridos que han estado apoyándome para cumplir mi meta académica, de una u otra forma forman parte de mi crecimiento como ser humano y profesional.

Agradezco a mis formadores académicos, personas responsables y quienes se han esforzado por ayudarme a llegar lejos definitivamente también son parte de mi crecimiento como estudiante.

A mi tutora, la cual fue muy importante para culminar esta etapa, muchas gracias por su inmensurable ayuda y paciencia. A los docentes encargados de la revisión de mi tesis final, les agradezco infinitamente, fueron de vital importancia y una excelente guía.

A todos y a cada uno de ustedes, gracias por ayudarme a salir adelante y principalmente, gracias por creer en mí.

Autorización de autoría intelectual

Yo SESME VELARDE ANDY BERNARD, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre “APLICACIÓN DE EXTRACTO DE CANELA (*Cinnamomum verum*) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA EXTENDER EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN ZUMO DE MANZANA”, para optar el título de INGENIERO AGRÍCOLA MENCIÓN AGROINDUSTRIAL, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, 7 de septiembre del 2020

.....
SESME VELARDE ANDY BERNARD
C.I. 0940184716

Índice general

Portada	1
Aprobación del tutor	2
Aprobación del tribunal de sustentación	3
Dedicatoria	4
Agradecimiento	5
Autorización de autoría intelectual	6
Índice general.....	7
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	13
Resumen.....	15
Abstract.....	16
1. Introducción.....	17
1.1 Antecedentes del problema.....	17
1.2 Planteamiento y formulación del problema	18
1.2.1 Planteamiento del problema.....	18
1.2.2 Formulación del problema.....	21
1.3 Justificación de la investigación	21
1.4 Delimitación de la investigación	22
1.5 Objetivo general	23
1.6 Objetivos específicos	23
1.7 Hipótesis	23
2. Marco teórico	24
2.1 Estado del arte	24
2.2 Bases teóricas.....	26

2.2.1 Agentes antimicrobianos	26
2.2.2 Antimicrobianos naturales	27
2.2.3 Canela (<i>Cinnamomum Verum</i>).....	27
2.2.3.1 Descripción general.....	27
2.2.3.2 Taxonomía de la canela	28
2.2.3.3 Composición nutricional	28
2.2.3.4 Aceite esencial de canela.....	29
2.2.3.5 Extracción del aceite de canela.....	30
2.2.3.6 Aplicación del aceite esencial (concentraciones)	31
2.2.4 Manzana (<i>Pyrus malus L.</i>)	32
2.2.4.1 Generalidades	32
2.2.4.2 Taxonomía del árbol de manzano	32
2.2.4.3 Composición nutricional	32
2.2.4.4 Zumo de manzana	33
2.2.5 Tiempo de vida útil	34
2.2.5.1 Estabilidad microbiológica y físico-química del zumo de manzana	34
2.2.5.1.1 Microbiológica	34
2.2.5.1.2 Propiedades químicas (sólidos solubles)	35
2.2.5.1.3 Características organolépticas del zumo de manzana	35
2.3 Marco legal.....	36
2.3.1 Norma Técnica Ecuatoriana 2074	36
2.3.2 Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529 5:2006.....	36
2.3.3 Norma técnica ecuatoriana – NTE INEN 2 337:2008.....	36
2.3.4 Norma técnica ecuatoriana obligatoria – NTE INEN 1 529-8:1990	36
2.3.5 Norma técnica ecuatoriana opcional - NTE INEN 1 529-10:1998	36

3. Materiales y métodos	37
3.1 Enfoque de la investigación	37
3.1.1 Tipo de investigación.....	37
3.1.2 Diseño de investigación	37
3.2 Metodología	37
3.2.1 Variables.	37
3.2.1.1 <i>Variable independiente</i>	37
3.2.1.2 <i>Variable dependiente</i>	38
3.2.2 Tratamientos	38
3.2.3.1 <i>Recursos</i>	39
3.2.3.1.1 <i>Equipos</i>	39
3.2.3.1.2 <i>Materiales y utensilios</i>	39
3.2.3.1.3 <i>Ingredientes</i>	39
3.2.4 Métodos y técnicas	40
3.2.4.1 <i>Diagrama de flujo de la elaboración del zumo de manzana</i>	40
3.2.4.1.1 <i>Descripción del proceso</i>	41
3.2.4.2 <i>Requisito microbiológico</i>	42
3.2.4.3 <i>Recuento de Coliformes (totales y fecales)</i>	42
3.2.4.4 <i>Recuento de mohos y levaduras</i>	43
3.2.4.5 <i>Análisis sensorial</i>	44
3.2.5 Análisis estadístico.....	44
4. Resultados	45
4.1 Adición de diferentes concentraciones del aceite esencial de canela en el zumo de manzana.....	45

4.2 Verificación de la aceptación del zumo de manzana mediante un panel sensorial.....	45
4.2.1 Evaluación del olor.....	45
4.2.2 Evaluación del color.....	46
4.2.3 Evaluación del sabor.....	47
4.2.4 Evaluación de textura.....	48
4.2.5 Resumen del análisis de varianza.....	48
4.3 Evaluación físico-química y microbiológica de la bebida de aceptación	49
4.4 Determinación del tiempo de vida útil por medio del control microbiológico	50
5. Discusión.....	52
6. Conclusiones.....	55
7. Recomendaciones	57
8. Bibliografía	58
9. Anexos	68
9.1 Anexo 1. Resultados de la encuesta sensorial.....	68
9.2 Anexo 2. Análisis de varianza	72
9.3 Anexo 3. Medidas de resumen.....	75
9.4 Anexo 4. Resumen estadístico.....	78
9.5 Anexo 5. Ficha de evaluación sensorial - formulario de evaluación.....	78
9.6 Anexo 6. Resumen estadístico.....	79
9.7 Anexo 7. Análisis físico-químico y microbiológico	80
9.8 Anexo 8. Análisis de vida útil.....	81
9.9 Anexo 9. Elaboración de tratamientos	83
9.10 Anexo 10. Normativas para el control microbiológico de alimentos	90
9.11 Anexo 11. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 2 337:2008.....	108

Índice de tablas

Tabla 1. Composición nutricional, vitaminas	29
Tabla 2. Composición nutricional, minerales.....	29
Tabla 3. Composición química del aceite esencial de canela	31
Tabla 4. Composición nutricional	33
Tabla 5. Diseño de los tratamientos a analizar	38
Tabla 6. Análisis de varianza utilizando ANOVA.....	44
Tabla 7. Evaluación de la media estadística del olor	46
Tabla 8. Evaluación de la media estadística del color.....	47
Tabla 9. Evaluación de la media estadística del sabor	47
Tabla 10. Evaluación de la media estadística de la textura	48
Tabla 11. Elección del tratamiento de mayor aceptación sensorial.....	48
Tabla 12. Análisis físicos químicos y microbiológicos	49
Tabla 13. Análisis inicial de vida útil.....	50
Tabla 14. Primer control del análisis de vida útil	50
Tabla 15. Segundo control del análisis de vida útil	51
Tabla 16. Datos del análisis del olor en los 3 tratamientos	68
Tabla 17. Datos del análisis del color en los 3 tratamientos	69
Tabla 18. Datos del análisis del sabor en los 3 tratamientos	70
Tabla 19. Datos del análisis de textura en los 3 tratamientos	71
Tabla 20. Análisis de la varianza del olor.....	72
Tabla 21. Prueba de Friedman del parámetro del olor.....	72
Tabla 22. Determinación de la media estadística del olor.....	72
Tabla 23. Análisis de la varianza del color	72
Tabla 24. Prueba de Friedman del parámetro del color	73

Tabla 25. Determinación de la media estadística del color	73
Tabla 26. Análisis de la varianza del sabor	73
Tabla 27. Prueba de Friedman del parámetro del sabor	73
Tabla 28. Determinación de la media estadística del sabor	74
Tabla 29. Análisis de la varianza de la textura	74
Tabla 30. Prueba de Friedman del parámetro de la textura	74
Tabla 31. Determinación de la media estadística de la textura	74
Tabla 32. Antecedente de la evaluación sensorial (T1)	75
Tabla 33. Antecedente de la evaluación sensorial (T2)	76
Tabla 34. Antecedente de la evaluación sensorial (T3)	77
Tabla 35. Medidas resumen del tratamiento de mayor aceptación	78

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración del zumo de manzana.....	40
Figura 2. Ficha de evaluación sensorial.....	78
Figura 3. Resumen estadístico.....	79
Figura 4. Análisis bromatológicos según las especificaciones de la norma INEN 2337.....	80
Figura 5. Análisis de vida útil, primera hoja.....	81
Figura 6. Análisis de vida útil, segunda hoja.....	82
Figura 7. Recepción de la materia prima.....	83
Figura 8. Lavado de la manzana.....	83
Figura 9. Pelado de la manzana.....	84
Figura 10. Balanza, pesado de los ingredientes.....	84
Figura 11. Balanza, pesado de los ingredientes.....	85
Figura 12. Balanza, pesado de los ingredientes.....	85
Figura 13. Balanza, pesado de los ingredientes.....	86
Figura 14. Balanza, pesado de los ingredientes.....	86
Figura 15. Elaboración del zumo de manzana.....	87
Figura 16. Adición de extracto de canela.....	87
Figura 17. Envasado.....	88
Figura 18. Tratamientos de jugo de manzana con extracto de canela.....	88
Figura 19. Evaluación sensorial.....	89
Figura 20. Panel sensorial.....	89
Figura 21. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529 5:2006.....	90
Figura 22. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529 5:2006 para aerobios mesófilos.....	95

Figura 23. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529-8:1990.....	101
Figura 24. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529-10:1998 para mohos y levaduras.....	102
Figura 25. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529-10:1998 para mohos y levaduras – recuento en placas.....	107
Figura 26. NTE INEN 2 337:2008.....	109

Resumen

El proyecto consistió en evaluar la aplicación del extracto de canela en el zumo de manzana para aumentar el tiempo de vida útil. Para ello se trabajó bajo un enfoque experimental, con un diseño completamente al azar (DCA) con 3 tratamientos y 30 repeticiones, en donde el tratamiento 1 contenía 1% de extracto, en el tratamiento 2 se usó el 3% de extracto de canela y en el tratamiento 3 se utilizó un 5% de extracto de aceite esencial de canela. Para cada formulación se elaboró 500 ml de zumo de manzana evaluando posteriormente su aceptación por medio de un panel sensorial (olor, color, sabor y textura) con el uso de una escala hedónica de 5 niveles para su respectiva calificación, y de esta manera determinar la muestra de mayor aceptación. Los resultados indicaron que el tratamiento 2 a base de 3% de aceite de canela y 67% de zumo de manzana es la formulación de mayor preferencia sensorial con una media de 4,01. Los análisis bromatológicos señalan que el contenido de sólidos solubles fue de 12.45% y la carga microbiana de Coliformes totales, Coliformes fecales, Aerobios mesófilos, Mohos y levaduras fue menor al límite máximo señalado por la norma INEN 2337 para bebidas, lo que indica la eficacia del uso de extracto de canela en una concentración del 3% para reducir la carga microbiana, permitiendo conservar el producto en refrigeración con una vida útil de 15 días, lo cual afirma la hipótesis planteada sobre la efectividad del extracto de canela como un agente antimicrobiano.

Palabras clave: canela, INEN, microbiología, organoléptico, zumo.

Abstract

This investigation consists in evaluating the application of cinnamon extract in apple juice to increase the service life. For this reason it was required under an experimental approach, with a completely randomized design (DCA) with 3 treatments and 30 repetitions, where treatment 1 contained 1% extract; in treatment 2 used 3% of cinnamon and in treatment 3 used 3 5% of cinnamon essential oil extract was processed, and for each formulation 500ml of apple juice was made, subsequently evaluating its acceptance by middle of a sensory panel (odor, color, flavor and texture) with the use of a hedonic scale of 5 level to its respective qualification and in this way determine the sample of greater acceptance. The results indicated that treatment 2 based on 3% cinnamon oil and 67% apple juice is the most preferred sensory formulation with an average of 4.01. The bromatological analyzes indicate that the soluble solids content is 12.45% and the microbial load of total coliforms, fecal coliforms, mesophilic aerobes, molds and yeasts was less than the maximum limit set by the INEN 2337 standard for beverages, indicates the efficacy of the use of cinnamon extract in a concentration of 3% to reduce the microbial load, allowing the product to be refrigeration with a shelf life of 15 days., which affirms the hypothesis raised about the effectiveness of cinnamon extract as a antimicrobial agent.

Keywords: cinnamon, INEN, microbiology, organoleptic, juice.

1. Introducción

1.1 Antecedentes del problema

Según una investigación de Morales (2015), evaluó al aceite esencial de tomillo como un aditivo alimentario en un producto lácteo (queso), el cual la extracción la realizó por el método de arrastre por vapor con un rendimiento cercano al 0.6% y aplicándolo en concentraciones no mayores de 1,6%. En este estudio observó la capacidad antimicrobiana que posee el AE de tomillo, enfocado en la reducción microbiana de (*L. innocua* y *L. monocytogenes*) lo que fue útil en su investigación para la evaluación de la efectividad del componente llamado timol presente en el AE de tomillo en un 30.97% como agente inhibidor, cumpliendo con los requerimientos microbiológicos necesarios en el análisis de las muestras.

De acuerdo a Sánchez (2013), afirma que la aplicación combinada de sonicación en aceites esenciales en la conservación de zumos naturales de fruta tiene buenos resultados, la obtención del aceite esencial de canela lo realizó por el método de hidrodestilación, aplicándolo en diferentes muestras de jugo de naranja y granada respectivamente, luego realizó análisis sensoriales para la obtención de un resultado en cuanto la aceptación de las muestras por parte de los catadores. Este estudio determinó la combinación de US (ultrasonido), AEC en concentraciones de 2, 3 y 4% y un tratamiento térmico moderado (50 °C) con el objetivo de inhibir a *S. cerevisiae* en zumo de naranja y granada. Posteriormente efectuó análisis microbiológicos para determinar la efectividad de los tratamientos aplicados sobre la inactivación de *E. coli*, y *L. Monocytogenes*, dando como conclusión la eficacia antimicrobiana en la inhibición de los microorganismos mencionados en las muestras de zumos en un 99.9%.

Según Castaño (2012), comprobó la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de clavo (*syzygium aromaticum*) y canela (*cinnamomum verum*), sobre la levadura (*rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada, donde obtuvo aceites esenciales de las especies clavo y canela, utilizando un equipo Clevenger durante 2 horas para la extracción, determinó que el método más eficaz para la extracción. Su objetivo fue aplicar 2 diferentes concentraciones de aceite esencial de clavo y canela (2% y 3%), el estudio logró demostrar una mayor capacidad antimicrobiana del aceite de canela en ambas concentraciones (70 y 80%), por último el análisis sensorial determinó una mayor aceptación en la muestra donde se aplicó el aceite esencial de clavo de olor.

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1 Planteamiento del problema

Se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye contaminantes o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales Codex (1995).

Dentro de los aditivos están los agentes antimicrobianos naturales, compuestos que son extraídos de los extractos de plantas conocidos por sus diversas propiedades las cuales sirven como inhibidores de agentes patógenos en los alimentos y posteriormente alargan la vida útil de los mismos (López, 2013).

Los diferentes agentes antimicrobianos que se añaden a los diferentes tipos de alimentos tienen que ser GRAS, esto es establecido por la FDA (Ashta et al., 2005).

Algunos ejemplos de tantos antimicrobianos que se agregan a los alimentos de manera sintética o natural tenemos al ácido cítrico, este puede ser sintético (E330) y natural el cual desencadena reacciones químicas que producen energía. Dicho aditivo acidulante regula el pH y acidez en las bebidas obteniéndolo naturalmente por extracción de frutas cítricas o de forma sintética al fermentar azúcar de sacarosa o glucosa con hongos de la familia *Aspergillus Niger* (Muñoz, 2014).

El ácido sórbico también se considera como un conservante natural o sintético el cual se lo utiliza en la industria alimentaria. Puede inhibir de forma efectiva el crecimiento de mohos y levaduras, así como el desarrollo de algunas bacterias especialmente las aeróbicas, aumentando la vida útil de los alimentos. También inhibe determinadas enzimas de la célula microbiana como la enolasa o lactodeshidrogenasa. Las características del ácido sórbico le permiten introducirlo en gran variedad de productos con un pH de hasta 6,5 (Aditivos Alimentarios, 2015).

El ácido benzoico se encuentra de manera natural en la canela, en las ciruelas y en más porcentaje en los camemoros, un tipo de grosella de Finlandia. En dicha fruta el contenido natural de ácido benzoico es muy superior al que se podría utilizar de manera legal si se emplea como aditivo. Es útil contra bacterias, mohos y levaduras, con concentraciones aproximadas de 0,01% inhibe el crecimiento de algunas especies, también sirve como inhibidor del acetato y la fosforilación oxidativa, es un conservante barato (Pastrana et al., 2015).

Los métodos utilizados en la inhibición de microorganismos para lograr alargar el tiempo de vida útil de los alimentos no suelen ser muy efectivos o no cumplen totalmente con la eliminación de los microorganismos que están presentes en los

mismos. Muchos tratamientos repercuten directamente en el producto (Valor nutricional) al exponerlos a altas temperaturas y directamente al consumidor (uso de conservantes sintéticos) para poder cumplir con las demandas para obtener alimentos totalmente inocuos. La aplicación de agentes antimicrobianos naturales que ayuden con la inhibición total de los microorganismos también se utilizan en ciertos casos con los antimicrobianos químicos, pero estos por lo general pueden exceder la cantidad necesaria, lo cual tendría un nivel alto de toxicidad lo que puede afectar la salud del consumidor a largo plazo (Sagar et al., 2012).

Los aceites esenciales están formados por una mezcla de terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes, estos suelen tener un valor alto en su volatilidad; dichos compuestos son los que permiten la actividad antimicrobiana en los alimentos (Laird y Phillips, 2012).

Las investigaciones sobre aceites esenciales están logrando más interés, ya que en una cantidad considerable de estos aceites son efectivos al momento de la inhibición de microorganismos, también son considerados naturales sin que ocasione daño en el consumidor, han sido nombrados sustancias GRAS en el año 2005 por la FDA (Espina et al., 2011).

La canela contiene resinas cianogénicas, ácido hidrocianico y taninos con acción hemostática y astringente (Martínez, 2009).

Presentando propiedades antimicrobianas. La aplicación del aceite esencial se realiza en diferentes aplicaciones como recubrimiento en alimentos sólidos como la ciruela, papaya, manzana, durazno y también en la industria panadera, también se lo aplica en bebidas lácteas y bebidas en general. Antes lo expuesto la inhibición de mohos en el pan, hongos en papaya, durazno, ciruelas, manzana (Ramos et al., 2009).

El AE de canela permite el control para la inhibición microbiana en el caso de las bebidas, es usado como un conservante para alargar el tiempo de vida útil en las mismas (Stashenko et al., 2009). Se ha logrado que la acción de estos aceites esenciales es efectiva contra diferentes bacterias, entre ellas se encuentra la *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Lactobacillus spp*, y *Pseudomonas* y *Salmonella enteritidis* (Arancibia y Cando, 2014).

La acción del aceite esencial de canela va a ser dependiente de su pH y de la actividad de agua. La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de canela en diferentes concentraciones 1%, 3% y 5% va a ser evaluada aplicándolas en tres muestras de zumo de manzana (500 ml) respectivamente, posteriormente va a permitir determinar por medio de análisis microbiológicos la capacidad de inhibición ayudando a extender la vida útil del producto.

1.2.2 Formulación del problema

¿El aceite esencial de canela aumentará el tiempo de útil del zumo de manzana?

1.3 Justificación de la investigación

Desde el punto de vista social, la investigación pretende hacer conocer el uso de conservantes naturales, el cual pretende orientar estrategias de alimentación al país. En este caso la aplicación de un antimicrobiano a partir del extracto de canela (aceite esencial de canela) en un zumo natural a base de fruta sin someterlo a tratamiento térmicos, podría lograr conservar las características nutritivas en el proceso de la bebida (Asunción, 2011).

En relación con la importancia económica tendrá efectos significativos en las economías locales contribuyendo con la creación de empleo y con una nueva innovación en el sector agroindustrial elaborando productos naturales, cuyo único

conservante o aditivo será el aceite esencial de canela, el cual servirá para extender el tiempo de vida útil e incentivar el consumo de bebidas naturales (Delgado, 2012).

Este estudio podría servir como una guía para pequeñas, medias, grandes empresas y poblaciones que les interese más el uso de un antimicrobiano natural para la extensión de la vida útil de un producto, en este caso en una bebida. Se desea determinar la aceptación del producto con la aplicación de las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela (1%, 3% y 5%), que por lo general requieren de alimentos que sean compatibles. Se ha analizado la variabilidad en cuanto a la composición del aceite esencial de canela como son los terpenoides, componente orgánico muy volátil el cual es uno de los más importantes en los aceites esenciales ya que da el olor característico que cada uno posee, estando la actividad antimicrobiana del extracto asociada con la conformación química de cada uno de sus componentes, siendo el eugenol el que actúa como agente antimicrobiano para alargar la vida útil en los alimentos (Puanpronpitag y Sittiwet 2009).

1.4 Delimitación de la investigación

- **Espacio:** La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Procesamiento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la carrera de Ingeniería Agrícola Mención Agroindustrial.
- **Tiempo:** Se ejecutó en un tiempo de 6 meses.
- **Población:** El producto fue dirigido al público en general.

1.5 Objetivo general

Evaluar la aplicación del extracto de canela en el zumo de manzana para aumentar el tiempo de vida útil.

1.6 Objetivos específicos

- Medir la adición de diferentes concentraciones del aceite esencial de canela en el zumo de manzana.
- Verificar la aceptación del zumo de manzana mediante un panel sensorial de jueces no entrenados.
- Examinar parámetros físico-químico (sólidos solubles), microbiológicos (coliformes totales y fecales, aerobios mesófilos, mohos, levaduras) y determinar el tiempo de vida útil (aerobios mesófilos, mohos y levaduras) al tratamiento de mayor aceptación según la norma NTE INEN 2 337:2008.

1.7 Hipótesis

La adición de aceite esencial de canela como agente antimicrobiano extenderá el tiempo de vida útil en un zumo de manzana.

2. Marco teórico

2.1 Estado del arte

Un estudio realizado por Becerril (2013), muestra una comparación de dos antimicrobianos: uno natural y otro sintético. En esta investigación menciona la efectividad que tiene el aceite esencial de canela en diferentes microorganismos (*E. coli*, *L. monocytogenes* y *aerobios mesófilos*) en concentración de 2,5% aplicándolo en un zumo a base de papaya, en donde utilizaron antimicrobianos sintéticos (citrato de sodio:0,6g) en muestras de 250 ml, su objetivo fue determinar cuál conservante era el más efectivo. Dicha comparación determinó una diferencia de solo un 10% entre ambos antimicrobianos, los resultados mostraron que existe un efecto inhibitor del aceite esencial de canela (AEC) en el crecimiento de *E. coli*, *L. monocytogenes* en un 80% y de aerobios mesófilos en un 83%, en concentraciones de 2.5% en muestras de 250 ml de zumo a base de papaya y el efecto de inhibición del sorbato de sodio fue de un 90% y 98%, siendo más efectivo el antimicrobiano sintético, el cual le permitió extender el tiempo de vida útil del zumo, de acuerdo a los análisis realizados.

Según Pilar y Rincón (2013), determinaron la eficacia que tienen diferentes aceites esenciales, como el tomillo y la canela aplicados en concentraciones de 2%, 4% y 6%, la investigación realizada les permitió determinar la capacidad antimicrobiana de cada uno de ellos aplicados en muestras de salsa de tomate. El resultado que obtuvieron permitió verificar las capacidades inhibitorias en microorganismos presente en la salsa (*E.coli*, *S.aeurus* y *Salmonella spp*). El aceite de tomillo se aplicó en un 2% el cual inhibió un 60%, en una concentración de 4% inhibió un 75% y en concentraciones de un 6% inhibieron el 90% de bacterias presentes en la salsa. Por otro lado, el autor logró determinar la cantidad de aceite

de canela en concentraciones de un 2% el cual inhibió un 65%, mientras que en cantidades de 4% logró inhibir un 82% y en concentraciones de 6% permitió la inhibición del 93% de microorganismos presentes en las muestras, posteriormente la vida útil del alimento se alargó 15 días de acuerdo a los análisis que realizó el investigador, posteriormente realizaron un análisis sensorial para determinar la muestra de mayor aceptación, lo cual lograron determinar que la salsa de tomate a la que le aplicaron un 2% de aceite esencial de canela obtuvo una calificación de 9,

Una evaluación realizada por Ortega (2010), determinó la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano. El objetivo del autor fue determinar la aplicación de 2 concentraciones de aceite esencial (150 y 200 ml/kg), el cual utilizó como recubrimiento en la papaya para determinar la inhibición de mohos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus spp*). El resultado obtenido de esta investigación permitió lograr la inhibición de *Rhizopus spp.* y *Aspergillus spp.* en concentraciones de 150ml/kg, y por último logró la inhibición de *Penicillium spp.* en concentraciones de 200 ml/kg por cada 150kg de muestra, logrando medir la capacidad inhibitoria del aceite aplicada como recubrimiento en una fruta.

Según Olivares y López (2013), el potencial antimicrobiano que incluyen aceites esenciales y sus componentes como el eugenol son efectivas en la erradicación de los microorganismos. El objetivo principal fue la aplicación de aceites esenciales de naranja, canela y romero en una bebida natural a base de zumo de frutas en concentraciones de 1.5% de aceite de naranja aplicado en zumo de granadilla, 2% de aceite de canela en zumo de naranja y 2.5% de aceite de romero en zumo de manzana. Según el autor de acuerdo a los análisis realizados, obtuvieron como resultado la inhibición de mohos levaduras y aerobios mesófilos en un 85.5% en concentraciones de 1.5% de AE de naranja en la muestra a base de zumo

granadilla, inhibición en un 90.0% en concentraciones de 2% de AE de canela en zumo de naranja, y por último lograron determinar la inhibición entre un 94.5% en concentraciones de 2.5% de AE de canela en el zumo a base de manzana por cada 100ml de muestra, resultados que permitieron extender la vida útil 20 días más. Posteriormente evaluaron los efectos del aceite esencial de canela sobre la calidad sensorial, donde lograron una aceptabilidad alta por parte de los catadores al momento de su evaluación. La muestra con concentraciones de 2.5% de aceite de romero tuvo una calificación de 9 (bueno) y la concentración de 1.5% de aceite de naranja tuvo una calificación de 10(excelente), en comparación a la muestra que presentaba un 2% de aceite esencia de canela la cual tuvo una calificación de 8 (bueno).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos se utilizan como aditivos, pero no todos tienen la capacidad de cumplir dicha función, la efectividad de algunos son dependientes del pH. Un antimicrobiano sea esta natural o sintético es una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos y de esta forma garantizar la inocuidad del alimento y la salud de sus consumidores. Posteriormente para que se logre un control eficaz se los usa de manera individual o combinándolos con métodos térmicos para una mayor efectividad (Álvarez, 2006).

Existe una gran variedad de antimicrobianos sintéticos aplicados en los alimentos, que van a lograr un efectivo control en agentes patógenos presentes en los mismos, aunque al ser sintéticos pueden causar una intoxicación al aplicar cantidades excesivas, no reglamentarias, siendo ésta una preocupación para el consumidor (Nedorostova et al., 2009).

2.2.2 Antimicrobianos naturales

Hay diferentes compuestos naturales que están presentes en algunas plantas, y especias, que se las obtiene por medio de aceites esenciales. Dichos aceites han mostrado una función antimicrobiana efectiva para una mejor comprensión de las respuestas bacterianas frente a la inhibición de microorganismos patógenos presentes en los alimentos, es por ello que dichas sustancias naturales tienen efectos similares frente a antimicrobianos sintéticos (Upadhyay, 2010).

Las propiedades químicas de los antimicrobianos naturales, es una alternativa para optimizar la eficacia en cuanto la conservación de alimentos, en ciertos casos para bajar el porcentaje en la pérdida de nutrientes al ser aplicados a tratamientos térmicos a altas temperaturas (UHT) (Rodríguez, 2010).

2.2.3 Canela (*Cinnamomum Verum*)

2.2.3.1 Descripción general

La canela es una especia muy utilizada para dar sabor y aroma. Su origen es de la India, la canela es la zona interna de la corteza del canelo, árbol perteneciente a la familia de las Lauráceas, de 7 a 8 metros de altura que se cultiva en zonas tropicales. Se caracteriza por poseer forma de ramas secas con tonos rojos, amarillentos o marrones, aroma agradable y sabor intenso entre dulce y amargo, tiene un amplio uso por sus propiedades y características, se aplica en la cocina como ingrediente alimenticio, también se extrae aceite de canela y se lo aplica gastronómicamente (Gago, 2017).

Las propiedades de la canela son muy útiles y van más allá en el uso de un simple condimento, también es muy usado en el ámbito de la salud por sus beneficios medicinales. Su aceite esencial se extrae de su extracto para un mayor aprovechamiento de sus características, el cual también es utilizado, pero en un

menor porcentaje en los alimentos procesados como un antimicrobiano natural en la inhibición de microorganismos presentes en los mismos (Flores y Rojas, 2018).

Hay dos tipos de canela, *Cinnamomum verum*, que es conocida por canela original o la canela Ceilán que se cultiva en Sri Lanka-Asia, y en segundo lugar está la *Cinnamomum aromaticum*, que se la conoce como *Cassia* que se caracteriza por tener un color pardo grisáceo (Eco, 2008).

2.2.3.2 Taxonomía de la canela

El árbol de la canela es un pequeño árbol o arbusto perennifolio con corteza papirácea. Puede alcanzar 10 m de altura en su estado silvestre, pero se poda en árboles más pequeños y densos para facilitar su cultivo. Hoja perenne, casi opuestas, con 3 venas prominentes, simples, coriáceas, largas y aromáticas. Flores en panículas, hermafroditas, muy inconspicuas. La corteza interna que se extrae pelando y frotando las ramas y que una vez desprendida, es a su vez separada y vuelta a pelar. Las cortezas se enrollan una dentro de otra hasta formar una barra de aproximadamente un metro de largo que se seca y blanquea antes de su comercialización (Jácome, 2019).

Crece en climas con mucha humedad y lluvia acompañados con un rico contenido de materia orgánica. Pertenecientes al reino: *Plantae*, orden *Laurales*, familia: *Lauraceae*, género: *Cinnamomum*, especie: *Cinnamomum verum* (Lorea et al., 2011).

2.2.3.3 Composición nutricional

La composición nutricional cambia de acuerdo a la cantidad ingerida, predomina la presencia de la vitamina C, vitamina B (tabla 1) y minerales como calcio, potasio y fósforo (tabla 2) también cuenta con muchos minerales en su composición también

se encuentra aldehído cinámico, felandreno, eugenol y pineno, estas moléculas son las que ejercen la actividad antimicrobiana (Dighe et al., 2019).

Tabla 1. Composición nutricional, vitaminas

Vitaminas	Cantidad (mg)	CDR(%)
Vitamina B1	0.08	6.7%
Vitamina B2	0.14	10.8%
Vitamina C	28.5	31.7

Las 3 principales vitaminas presentes en la canela.
Dighe, 2009

Tabla 2. Composición nutricional, minerales

Minerales	Cantidad (mg)	CDR(%)
Sodio	26	1.6%
Calcio	1228	102.3%
Hierro	38.07	475.9%
Magnesio	0	0%
Fósforo	61	8.7%
Potasio	500	25%

Cantidad en mg de seis tipos de minerales en la canela.
Dighe, 2009

2.2.3.4 Aceite esencial de canela

Los aceites esenciales se caracterizan por ser un medio líquido de tipo aceitoso aromático, por lo general se los extrae por el método de hidrodestilación. Se les denomina aceite esencial por su composición y consistencia a partir de material vegetal, los aceites esenciales tienen características antivirales y anti-fúngicas (hierbabuena, salvia que están y en el clavo de canela, anís, laurel, tomillo) que han sido estudiadas y analizadas como una excelente y efectiva fuente de nuevos compuestos antimicrobianos, los cuales se los puede usar como una diferente forma para preservar los alimentos (Solórzano y Mirando, 2011).

El aceite esencial de canela se distingue por sus propiedades fenólicas, es decir compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo. El aceite

esencial contiene un 4-10% de eugenol que actúa como antimicrobiano en los aceites esenciales y también están compuestos de aldehídos como el cinamaldehído en un 90 y 95%, el cual es un compuesto orgánico responsable del sabor y del olor característico de la canela (Danjanovic et al.,2005).

Se trata de un líquido amarillo pálido y viscoso que se presenta de forma natural en la corteza del árbol de la canela y otras especies del género *Cinnamomum*, estos dos compuestos son predominantes (Sánchez, 2013).

El cinamaldehído fue aislado por primera vez del AE de hojas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en 1834 por Bumaz y Peligot. El producto natural es el trans-cinamaldehído, cuya molécula consiste en un grupo fenol unido a un aldehído insaturado, clasificado como GRAS (generally regarded as safe) por la FDA y su uso está aprobado en los alimentos (Roda, 2013).

El compuesto cinamaldehído tiene un punto de ebullición de 252 °C. Dicho compuesto es el que le ofrece a la canela su sabor y olor característico y actúa como agente antimicrobiano (Gómez y López. 2009).

La composición química del aceite esencial varía de acuerdo a su especie, a las temperaturas, humedad, luminosidad y el método de extracción empleado (Montero et al., 2009).

La concentración de aplicación varía de acuerdo a la composición de compuestos que presentan en su naturaleza, así como también las moléculas predominantes y el método de extracción que se emplee (Da Porto et al., 2009).

2.2.3.5 Extracción del aceite de canela

Entre los diferentes métodos para la extracción del aceite esencial se encuentran el macerado, sumersión, hidrodestilación y la extracción por arrastre con vapor

sencillo, en seco y al vacío, incluso se los obtiene por presión en frío. También se usa la extracción con solventes, entre ellos el hexano

El aceite de canela ha demostrado una mayor capacidad antimicrobiana en la aplicación de diferentes bebidas, siendo efectivo en la inhibición de diferentes tipos de microorganismos (Seow et al., 2014).

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de canela

COMPONENTE MAYORITARIO	PROCENTAJE	TIEMPO DE RETENCION (MIN)
p-menta-1,5-dieno	90	6.8
m-cimeno	91	7.4
A-terpineno	97	7.8
a-ocimeno	96	8.0
a-pineno	95	8.2
Terpinoleno	96	9.5
Linalol	95	21.8
Eugenil acetato	97	22.4
Cinamaldehido	97	27.0
Benzoato acetato	96	27.0

Componentes predominantes presentes en el aceite esencial de canela.
Danjanovic, 2005

2.2.3.6 Aplicación del aceite esencial (concentraciones)

Se aplican para condimentar carnes, embutidos, helados etc., en la preparación de bebidas alcohólicas, no alcohólicas, en refrescos, como recubrimiento en las frutas percederas, en zumos etc. y en las bebidas naturales para extender la vida útil del mismo, por lo general las concentraciones que se usan para que no haya alteraciones en sus características organolépticas son aproximadamente del 1 y 2% dependiendo del alimento (Mora et al., 2016).

En general el uso de los aceites esenciales son principalmente aplicados en bebidas y en productos cárnicos como recubrimiento para la inhibición de bacterias al momento de su almacenamiento, esto va a permitir alargar el tiempo de vida útil

de los alimentos y la calidad de los mismos, la capacidad inhibitoria va a depender de la cantidad (concentración) de aceite esencial que se aplique (Garcinuño, 2013).

2.2.4 Manzana (*Pyrus malus L.*)

2.2.4.1 Generalidades

Es una fruta pomácea comestible, su forma es globosa hundida de extremo a extremo, presenta varios colores, amarillo, verde y rojo, posee un sabor muy dulce, formadas por pequeñas semillas localizadas en el endocarpio. El hombre desde tiempos antiguos aprendió de manera adecuada sembrar el manzano, no se conoce exactamente su origen, pero hay investigaciones que dicho fruto es originario del Caucaso-Turkia y actualmente es uno de los frutos más comercializados a nivel mundial con una extensa aplicación a nivel industrial por sus diversos usos alimentarios al momento de procesarlo (Saldivar, 2017).

2.2.4.2 Taxonomía del árbol de manzano

Árbol mediano, mide 4m de altura, posee una copa redondeada con numerosas ramas. Su tronco posee una corteza agrietada, posee con 4-4 flores hermafroditas, consta con un cáliz de cinco sépalos, una corola de 5 pétalos blancos, con uña milimétrica y 20 estambres. La manzana florece en la primavera, y por lo general suele madurar en otoño (Dávila, 2007).

2.2.4.3 Composición nutricional

En general la manzana es una de las frutas más completas ya que es muy ricas en energía, proteínas, agua, calcio, potasio, vitaminas (tabla 4). Entre otros componentes.

Tabla 4. Composición nutricional

	Por 100g de porción comestible	Por 200 g de porción comestible
Energía (Kcal)	53	89
Proteínas (g)	0,3	0,5
Agua (g)	85,7	144
Calcio (mg)	6	10,1
Potasio (mg)	120	202
Vitamina E (mg)	0,2	0,3

Valores nutricionales en porciones comestibles de 100 y 200 g. de manzana. Dávila, 2007

2.2.4.4 Zumo de manzana

El jugo o zumo de manzana es una bebida que es manufacturada de manera casera, se la envasa y luego se la comercializa en los establecimientos públicos, dicha bebida tiene una buena concentración de ácido fenólico, el porcentaje de zumo debe ser mayor al 60% para evitar que la presencia de otros ingredientes opaque las características organolépticas de la fruta (Onieva, 2014).

Los zumos que se preparan de manera industrial se los realiza mediante una serie de pasos adecuados que preservan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales de la fruta que proceden. Pueden ser turbios o de color claro y éstos deben contener todas las características nutricionales presentes en la fruta, se le pueden añadir sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles por procedimientos físicos aplicados de manera adecuada del mismo tipo de fruta, Codex (2005).

2.2.5 Tiempo de vida útil

La vida útil de una bebida es el tiempo el cual este se conserva y que es apto para el consumo humano. Los jugos naturales hecho a base de zumo fruta son muy perecederos, el zumo de manzana cuando se lo elabora de manera artesanal sin aplicar tratamientos térmicos o sin la aplicación de conservantes sintéticos la duración del mismo va entre los 2 a 3 días, se requiere extrema limpieza y mucha precaución durante el proceso (Nuñez, 2013).

2.2.5.1 Estabilidad microbiológica y físico-química del zumo de manzana

2.2.5.1.1 Microbiológica

La actividad microbiológica presente en las bebidas naturales puede presentar variaciones en cuanto su carga microbiana, en el zumo de manzana ocasiona pardeamiento cuando no es pasteurizado.

Los microorganismos presentes son levaduras, mohos y bacterias mesófilos, esto se produce cuando se trabaja con una materia prima con mala higiene, es decir, infectadas. Esto produce la proliferación de hongos con niveles de patulina de 200 ppm y ocasiona la pérdida del producto y una posible intoxicación en el consumidor (Luján, 2010).

Es decir, una proliferación microbiana elevada se presenta por una mala elaboración y por un almacenamiento no adecuado. La reproducción de microorganismos aeróbios mesófilos son los que se desarrollan cuando hay presencia de oxígeno a una temperatura de 30 y 40 °C. El control microbiológico y físico-químico es de acuerdo a lo establecido en la norma INEN para jugos y concentrados de pulpa, el cual se basa en la determinación de microorganismos presentes en el alimento, INEN (2006).

2.2.5.1.2 Propiedades químicas (sólidos solubles)

Las propiedades químicas están determinadas en los parámetros determinados dentro de la vida útil del alimento para su consumo, por ello se controla estas propiedades para tener las características específicas en los zumos de frutas (Porcar, 2016).

Los grados Brix son los que miden la cantidad o el porcentaje en peso de los sólidos solubles que se encuentran presente en las bebidas, la cifra o el valor obtenido se lo expresa por 100 gramos de producto. En la bebida a partir del zumo de manzana el nivel es de 6.0 mínimo en sólidos solubles, INEN (2008).

2.2.5.1.3 Características organolépticas del zumo de manzana

Es una técnica de medición que va a permitir observar las características de un alimento y otros materiales que son percibidas por los sentidos. El jugo debe ser claro o turbio y debe poseer las características de la fruta procedente, la pulpa debe tener las características sensoriales propias de la fruta, tanto la pulpa como el jugo tiene que estar libres de sabores raros y de olores desagradables que repercutan en la calidad propia de la bebida (González, 2016).

La turbidez es la poca claridad en los alimentos líquidos. En el caso de los zumos hechos a base de fruta la turbidez siempre va a depender de la cantidad de los sólidos solubles en suspensión. El color es un aspecto fundamental para el consumidor en cuanto la calidad de un alimento, mientras mejor color tenga es mucho más agradable, en los zumos la alteración se produce al momento de almacenarlo y del proceso adecuado al momento de su elaboración (Vásquez, 2015).

2.3 Marco legal

2.3.1 Norma Técnica Ecuatoriana 2074

Aditivos alimentarios permitidos para consumo humano. Lista positiva.

Requisitos.

La presente norma se aplica a los aditivos alimentarios permitidos y sus condiciones en que pueden ser empleados en todos los alimentos, cualquiera que sea su naturaleza u origen; natural, artificial o mixto.

2.3.2 Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529 5:2006

Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aeróbicos mesófilos (ver anexo 2).

2.3.3 Norma técnica ecuatoriana – NTE INEN 2 337:2008

Jugos, pulpas, concentrados, néctares bebidas de frutas. Requisitos químicos y microbiológicos (ver anexo 3).

2.3.4 Norma técnica ecuatoriana obligatoria – NTE INEN 1 529-8:1990

Control microbiológico de alimentos. Determinación de coliformes totales y fecales (ver anexo 4).

2.3.5 Norma técnica ecuatoriana opcional - NTE INEN 1 529-10:1998

Control microbiológico de alimentos. Mohos y levaduras viables, recuento en placa por siembra en profundidad (ver anexo 5).

3. Materiales y métodos

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

La investigación descriptiva, se enfocó a partir de realidades de hecho y su enfoque predomina en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos, procesos. Su meta limita a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables. De acuerdo a lo reportado en el uso del aceite esencial de canela, este extiende la vida útil debido a que disminuye el índice microbiano presente en el jugo de manzana. La aplicación de un método científico permitió establecer contacto con la realidad a fin de conocer y formular nuevas teorías o modificar las existentes.

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño de investigación del presente trabajo consistió en un diseño experimental, este se basó de manera cuantitativa y cualitativa en la aplicación de diferentes concentraciones de aceite esencial de canela; el cual se aplicó como un conservante en una bebida natural hecha a base de jugo de manzana para extender el tiempo de vida útil.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables.

Este proyecto fue una investigación experimental y descriptiva ya que se buscó recolectar datos una vez realizados los análisis microbiológicos y sensoriales.

3.2.1.1 Variable independiente

Concentración del aceite esencial de canela (1%, 3% y 5%) en tres cantidades de 500ml zumo de manzana.

3.2.1.2 Variable dependiente

Análisis microbiológicos (levaduras y mohos, coliformes totales y fecales, aerobios mesófilos), químico (sólidos solubles) y análisis sensorial mediante la escala hedónica.

3.2.2 Tratamientos

Para el presente trabajo se realizaron 3 tratamientos con la variable independiente mencionada. Los valores tomados en cuenta se muestran en la tabla 5 junto con el resto de los ingredientes.

Tabla 5. Diseño de los tratamientos a analizar

Ingredientes	Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
	G	%	g	%	g	%
Pulpa de manzana	690	69	670	67	650	65
Aceite de canela	10	1	30	3	50	5
Agua	220	22	220	22	220	22
Azúcar	80	8	80	8	80	8
TOTAL	1000	100	1000	100	1000	100

La tabla de tratamientos se la realiza con el fin de experimentar las diferentes formulaciones, generando una variedad de porcentajes en sus variables independientes y complementos.

Sesme, 2019.

En el tratamiento 1 se analizó la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de canela en un porcentaje menor a los 2 tratamientos restantes y con una cantidad de pulpa de manzana mayor a los 2 tratamientos.

Las variables independientes del T2 será menor en lo que corresponde la pulpa de manzana y mayor en el aceite de canela, dónde fue más efectiva la acción antimicrobiana que en el T1.

El último tratamiento presentó una formulación diferente a los T1 y T2, presentando una cantidad menor de zumo de manzana y un porcentaje mayor de aceite de canela, las demás variables serán iguales en los T1, T2 y T3.

3.2.3 Recolección de datos

3.2.3.1 Recursos

Se realizó un panel sensorial compuesto por 30 personas no entrenadas, para poder analizar los parámetros como color, sabor, olor y textura mediante una escala hedónica de 1 a 5.

3.2.3.1.1 Equipos

- Licuadora
- Balanza analítica sensible al 0,1 mg
- Pipeta de 5ml
- Mechero Bunsen

3.2.3.1.2 Materiales y utensilios

- Cuchillo
- Envases plásticos
- Cofia
- Mandil
- Guantes
- Mascarilla

3.2.3.1.3 Ingredientes

- Manzana
- Aceite de canela
- Agua
- Azúcar

3.2.4 Métodos y técnicas

3.2.4.1 Diagrama de flujo de la elaboración del zumo de manzana

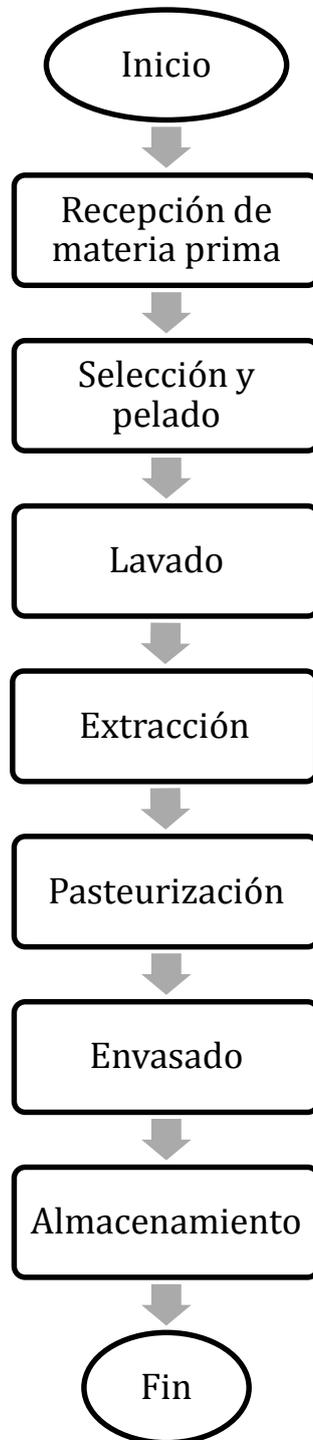


Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración del zumo de manzana. Sesme, 2019.

3.2.4.1.1 Descripción del proceso

Recepción de materia prima:

Se receptaron y se seleccionaron las manzanas sanas y con mejor aspecto.

Selección:

Se eligió la fruta con mejor aspecto y de mayor calidad, de esta manera se aseguró a la fruta idónea para el zumo.

Pelado:

Se eliminó el corazón de la manzana y se sometió posteriormente a un pelado donde se eliminó la piel (cáscara).

Lavado:

Constituye la primera etapa de la línea de procesado. La fruta fue sometida a un lavado enérgico con agua, siendo su objetivo garantizar la higiene.

Extracción:

Una vez lavada la manzana, se sometió posteriormente a un troceado de la misma para su respectiva extracción.

Pasteurización:

Se pasteurizó el zumo de manzana a una temperatura de por un tiempo de 16 a 31 segundos.

Envasado:

Se envasó el zumo de manzana en envases medianos (500ml) y se añadieron las concentraciones de aceite esencial de canela.

Almacenamiento:

El producto se almacenó adecuadamente a una temperatura de 4°C a 5°C.

3.2.4.2 Requisito microbiológico

El criterio microbiológico para un alimento define la aceptabilidad de un producto o un lote de alimento, el cual está basado en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, incluidos parásitos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote, el cual los hace alimentos de calidad e inocuos para el consumo (Cabrera, 2013).

3.2.4.3 Recuento de Coliformes (totales y fecales)

Este método se basa en la determinación del número más probable (NMP) por la técnica de dilución en tubos, en donde se utiliza el medio líquido selectivo caldo verde brillante bills-lactosa para ensayo presuntivo y cada tubo que presente gas son confirmados en agar Eosina azul de metileno (EMB). Se realizan las diluciones con una pipeta estéril y se procede a transferir 1cm^3 de la dilución 10^{-1} a cada uno de los tres tubos que contengan 10cm^3 de caldo BBGL. Con otra nueva pipeta estéril transferir 1cm de la dilución 10^{-2} en cada uno de los tubos que contengan 10cm^3 del medio, se procede de igual manera con otras diluciones. Se incuban los tubos a 30°C para productos refrigerados que se mantienen a temperatura ambiente por 48 horas. Transcurrida las 48 horas anotar en cada dilución como presuntos positivos todos los tubos que presentes crecimiento con producción suficiente de gas como para llenar el tubo cóncavo Durhan, el menisco llegaría hasta donde las paredes se harían paralelas. Se agitan cada uno de los tubos presuntamente positivos y con un asa de inoculación a partir de cada uno de ellos sembrar por estría en la superficie de placas individuales secas de Agar EMB (5.2) e identificar las placas. Invertir las placas e incubarlas a 30°C para productos refrigerados y 35°C para productos que se mantienen a temperatura ambiente por 24 horas. Si al término del periodo de incubación hay desarrollo de colonias lactosas positivas las cuales son negras o se

presentan colonias mucoides de color rosa o naranja, confirman la presencia de coliformes, INEN (1990).

3.2.4.4 Recuento de mohos y levaduras

Este método se basa en el cultivo entre 22°C y 25°C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales. Se procede con una pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ de cada dilución de manera decimal en placas Petri. Debido a la rápida sedimentación de las esporas en la pipeta, mantenerla pipeta en una posición horizontal (no vertical) posicionarse cuando se llena con el volumen apropiado de la suspensión inicial y diluciones. Agitarla suspensión inicial y diluciones con el fin de evitar la sedimentación de microorganismo que contienen partículas. Inoculación e incubación. Sobre una placa de agar previamente fundido, utilizando una pipeta estéril, transferir 0.1 ml de la muestra si es líquido o 0.1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos. Sobre una segunda placa de agar, utilizando una pipeta estéril fresco, transferir 0.1 ml de la dilución decimal primera (10-1) dilución (producto líquido), o 0.1 ml de la dilución 10-2 (otros productos). Para facilitar el recuento de bajas poblaciones de levaduras y mohos, los volúmenes pueden llegar hasta 0,3 ml de una dilución 10-1 de muestra, o de la muestra de prueba, si es líquido, puede ser extendido entres placas. Repetir estas operaciones con diluciones posteriores, utilizando una pipeta estéril nueva para cada dilución decimal. Si se sospecha un rápido crecimiento de mohos se sospecha, extender el líquido sóbrela superficie de la placa de agar con un esparcidor estéril hasta que el líquido se encuentre completamente absorbido en el medio. Incubar las placas preparadas aeróbicamente, con las tapas superiores en posición vertical en la

incubadora a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Si es necesario, deje las placas de agar de pie con luz natural difusa durante 1 día a 2 días. Se recomienda incubar las placas en una bolsa de plástico abierta con el fin de no contaminar la incubadora en el caso de la difusión de los mohos de los platos, INEN (2013).

3.2.4.5 Análisis sensorial

Para la obtención de información necesaria se realizaron pruebas de degustación en la Universidad Agraria del Ecuador a un grupo de 30 personas (catadores no entrenados) seleccionadas en edades de 15 a 29 años, con el fin de conocer si el producto cumple con los parámetros establecidos evaluando características de aroma, color, sabor y textura a los 3 tratamientos mediante la escala hedónica en una medida de 1 a 5 (Ver anexo 1).

3.2.5 Análisis estadístico

El tipo de diseño experimental que se realizó en la presente investigación es un diseño completamente al azar (DCA) con 3 tratamientos y 30 repeticiones, donde las repeticiones fueron el panel sensorial el cual permitió analizar las características organolépticas del producto, aplicando una tabla hedónica para medir del 1 al 5 para determinar la aceptación del producto. Se realizó un test de Friedman al 5% para determinar el producto de mayor aceptación. Además, se realizó un análisis de varianza mediante la tabla Anova.

Tabla 6. Análisis de varianza utilizando ANOVA

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Tratamientos	$(3-1) = 2$
Panelistas	$(30-1) = 29$
Error	$(3-1)(30-1) = 58$
Total	$(3*30) - (1) = 89$

Evaluación sensorial de los diferentes tratamientos a analizar y los panelistas participantes.
Sesme, 2019

4. Resultados

4.1 Adición de diferentes concentraciones del aceite esencial de canela en el zumo de manzana.

Para el desarrollo de los tres tratamientos de una bebida de jugo de manzana con extracto de canela, se desarrollaron mezclas con tres concentraciones de aceite de canela en las siguientes proporciones: tratamiento 1 (1% de aceite de canela y 69% de zumo de manzana); tratamiento 2 (3% de aceite de canela y 67% de zumo de manzana); tratamiento 3 (5% de aceite de canela y 65% de zumo de manzana). El uso de aceite de canela se realizó con el objetivo del control microbiano, pero al ser adicionado junto con el zumo de manzana, se debió analizar su incidencia en las características organolépticas de la bebida final eligiendo por medio de un panel sensorial la bebida de mayor aceptación.

4.2 Verificación de la aceptación del zumo de manzana mediante un panel sensorial.

La evaluación de la aceptación sensorial se realizó por degustación de los 3 tratamientos por parte de un panel sensorial en donde se evaluaron los parámetros: olor, color, sabor y textura, utilizando una escala hedónica de 5 niveles para la calificación. Los datos fueron agrupados (ver Anexo 2) y posteriormente fueron analizados por medio de un análisis de varianza para obtener las medias estadísticas (ver Anexo 3). También se consideró el nivel de significancia (p valor), ya que en caso de presentar valores mayores a 0.05 de significancia, las muestras en estudio no son semejantes entre sí

4.2.1 Evaluación del olor

El nivel de significancia obtenido fue de 0.0105, lo que indica que el olor en los 3 tratamientos no es similar, presentando diferencias en al menos 1 tratamiento.

En la tabla 7 se puede observar que la formulación 3 presenta la mayor media con un valor de 2,20, seguido del tratamiento 2 cuya media es de 2.18, ambos tratamientos tienen similitudes estadísticas y están representados con la letra (B). En el caso de la formulación 1 su promedio fue de 1.62, teniendo la menor aceptación en el olor, tal como se muestra a continuación.

Tabla 7. Evaluación de la media estadística del olor

Tratamiento	Suma Ranks	Medias(Ranks)	N	E.E
T1 V.Zumo500ml V.AC.0.6m..	48,50	1,62	30	A
T2 V.Zumo500ml V.AC.0.9m..	65,50	2,18	30	B
T3.V.Zumo500ml.V.AC.1.3m.	66,00	2,20	30	B

Medias con una letra en común no presentan diferencias significativas.
Sesme, 2019

4.2.2 Evaluación del color

El nivel de significancia obtenido de los datos de la evaluación del color en las 3 bebidas fue de 0.283 (ver Anexo 3), lo que no existen diferencias significativas en el color de las tres muestras en estudio.

En la tabla 8, en la evaluación de la media estadística del color se puede observar que la formulación 2 presenta la mayor media con un valor de 2.17, sin embargo, presenta similitudes con el tratamiento 3 cuya media es de 2.02, y con el tratamiento 1 es de 1.82. Los tres tratamientos se encuentran en la misma categoría representados con la letra (A) en la columna del error experimental (E.E), lo que indica que no hay diferencias significativas, tal como se muestra a continuación.

Tabla 8. Evaluación de la media estadística del color

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media(Ranks) n	E.E	
T1 V.Zumo500ml V.AC. 0.6m..	54,50	1,82	30	A
T3 V.Zumo500ml V.A.C. 1.3...	60,50	2,02	30	A
T2 V.Zumo500ml V.AC. 0,9m..	65,00	2,17	30	A

Medias con una letra en común no presentan diferencias significativas.

Sesme, 2019

4.2.3 Evaluación del sabor

En la tabla 9 se puede observar que la formulación 2 presenta la mayor media con un valor de 2.27, el tratamiento 3 cuya media es de 1.97 presenta similitudes con el tratamiento 1 cuya media es de 1.77. El tratamiento 1 y 3 se encuentran en la misma categoría representados con la letra (A), lo que indica que las diferencias en el sabor son mínimas o nulas, tal como se muestra a continuación. Pero hay una diferencia significativa con el tratamiento 2 representado con la letra (B), lo que indica una mayor aceptación en este tratamiento en cuanto al sabor.

El nivel de significancia obtenido del análisis de varianza en torno al sabor fue de 0,0938 (ver Anexo 3), lo que indica que existen diferencias significativas en el sabor en los tratamientos 2 y 3, tal como se muestra en la columna del error experimental (E.E), en donde las formulaciones están catalogadas bajo la letra A, tal como indica la tabla 9.

Tabla 9. Evaluación de la media estadística del sabor

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	E.E
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6m..	53,00	1,77	30	A
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	59,00	1,97	30	A
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9m..	68,00	2,27	30	B

Medias con una letra en común no presentan diferencias significativas.

Sesme, 2019

4.2.4 Evaluación de textura

El p valor o nivel de significancia de la textura en los 3 tratamientos fue de 0.1020 (ver Anexo 3), lo que indica que la textura en los 3 tratamientos no presenta diferencias significativas.

En la tabla 10 se puede observar que la formulación 2 presenta la mayor media con un valor de 2.15, sin embargo, presenta similitudes con el tratamiento T3 cuya media es de 2.12, y con el tratamiento 1 cuya media es de 1,73. Los tres tratamientos se encuentran en la misma categoría representados con la letra (A), lo que indica que las diferencias en la textura son mínimas, tal como se muestra a continuación

Tabla 10. Evaluación de la media estadística de la textura

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n	E.E
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6m..	52,00	1,73	30	A
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	63,50	2,12	30	A
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9m..	64,50	2,15	30	A

Medias con una letra en común no presentan diferencias significativas
Sesme, 2019

4.2.5 Resumen del análisis de varianza

La determinación del tratamiento de mayor aceptación sensorial se realizó mediante el cálculo del promedio global de los parámetros evaluados: color, olor, sabor y textura, obtenido los siguientes resultados

Tabla 11. Elección del tratamiento de mayor aceptación sensorial

Formulación	Olor	Color	Sabor	Textura	Promedio
Formulación 1	3.53 ^A	3.67 ^A	3.53 ^A	3.53 ^A	3.57
Formulación 2	4.17 ^B	3.97 ^A	4.10 ^B	3.80 ^A	4.01
Formulación 3	4.10 ^B	3.83 ^A	3.70 ^A	3.83 ^A	3.87

Medias estadísticas de los parámetros evaluados en los 3 tratamientos.
Sesme, 2019

La determinación de la media general indica que el tratamiento 2 a base de 3% de aceite de canela y 67% de zumo de manzana es la formulación de mayor preferencia sensorial con una media de 4.01, seguido del tratamiento 3 con una media de 3.86, siendo el tratamiento 1 la fórmula de menor aceptación con una media de 3.56.

4.3 Evaluación físico-química y microbiológica de la bebida de mayor aceptación

La evaluación bromatológica de la bebida de mayor aceptación se realizó en base a las especificaciones de la norma INEN 2337 para jugos y bebidas, en donde se detalla que toda bebida debe ser analizada en su concentración de sólidos solubles y en los parámetros microbiológicos de Coliformes totales, Coliformes fecales, Aerobios mesófilos, Mohos y levaduras.

El contenido de sólidos solubles fue de 12.45%, la norma INEN 2337 indica un mínimo de 6 °Brix para bebidas que contengan jugo de manzana, con lo cual se cumple lo especificado en la normativa.

El contenido microbiológico indicó la presencia de coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, por debajo del límite máximo tolerable señalado en la norma INEN 2337 para bebidas (ver Anexo 6).

Tabla 12. Análisis físicos químicos y microbiológicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Sólidos Solubles	%	12.45	---	AOAC 21st 932.14 C *
Coliformes totales	NMP/cm ³	< 3	< 10	BAM 8th (ME08-PG20)
Coliformes Fecales	NMP/cm ³	< 3	< 10	AOAC 21st 966.23
Aerobios mesófilos	UFC/cm ³	< 3	< 10	AOAC 21st 966.23
Mohos y levaduras	UFC/cm ³	< 3	< 10	AOAC 21st 997.02

Análisis basados en la norma INEN 2337 para jugos y bebidas
Sesme, 2019

4.4 Determinación del tiempo de vida útil por medio del control

microbiológico

La determinación de la vida útil se basó en estudios para determinar la estabilidad de formulación de mayor aceptación. Para ello se realizaron análisis de aerobios mesófilos, hongos y levaduras para evaluar el tiempo de conservación. Estos análisis se realizaron en 3 periodos: análisis inicial, control 1 y control 2, tal como se detalla a continuación:

Tabla 13. Análisis inicial de vida útil

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aerobios mesófilos	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁻¹	< 10	AOAC 21st 966.23 (ME03-PG20- PO02-7.2 M)
Mohos y levaduras	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁻¹	< 10	AOAC 21st 997.02 (ME07-PG20- PO02-7.2 M)

Análisis inicial de evaluación de estabilidad
Sesme, 2019

El control inicial se realizó el 7 de diciembre de 2019 presentando valores inocuidad en los análisis realizados, posteriormente se desarrolló el primer control 6 días después tal como muestra la tabla 14.

Tabla 14. Primer control del análisis de vida útil

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aerobios mesófilos	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁻¹	< 10	AOAC 21st 966.23 (ME03-PG20- PO02-7.2 M)
Mohos y levaduras	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁻¹	< 10	AOAC 21st 997.02 (ME07-PG20- PO02-7.2 M)

Análisis realizado el 13 de diciembre del 2019
Sesme, 2019

El primer control reflejó que la carga microbiana está por debajo del límite máximo, por ello se realizó un segundo control 10 días después, inspeccionado los mismos parámetros iniciales de aerobios mesófilos, hongos y levaduras, obteniendo los resultados detallados en la tabla 15.

Tabla 15. Segundo control del análisis de vida útil

	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aerobios mesófilos	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁻¹	< 10	AOAC 21st 966.23 (ME03-PG20- PO02-7.2 M)
Mohos y levaduras	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁻¹	< 10	AOAC 21st 997.02 (ME07-PG20- PO02-7.2 M)

Análisis realizado el 23 de diciembre del 2019
Sesme, 2019

Dado el comportamiento microbiológico del producto de jugo de manzana con extracto de canela, el tiempo de vida útil es de 15 días en condiciones de refrigeración (4°C a 7°C) estables, tal como lo indican las pruebas de laboratorio realizadas (ver anexo 7).

5. Discusión

En el presente trabajo se realizó la adición de extracto de canela en zumo de manzana con la finalidad de servir como agente antimicrobiano, para ello se utilizaron concentraciones del 1%, 3% y 5%, permitiendo el desarrollo de 3 tratamientos compuestos de la siguiente forma: T1 utilizó 69% de zumo, 1% extracto de canela, 22% de agua, 8% de azúcar; en el T2 se utilizó 67% de zumo, 3% extracto de canela, 22% de agua, 16% de azúcar; y en el T3 se empleó 65% de zumo, 5% extracto de canela, 22% de agua, 8% de azúcar). En estudios similares los autores Pilar y Rincón (2013), citan que la aplicación de aceites esenciales en concentraciones de 2 y 6% permiten potenciar el sabor de los alimentos, a su vez el autor Ortega (2010), argumenta que la aplicación de aceites esenciales como recubrimiento en frutas, mejoran las características organolépticas en aplicaciones de 100 y 200 ml/kg, de acuerdo con lo argumentado por Ortega (2010), Pilar y Rincón (2013) se puede afirmar sus teorías, es decir que en concentraciones establecidas correctamente puede potenciar de manera positiva el sabor de los alimentos, en cuanto a la comparación con la investigación realizada, se pudo determinar que la muestra 2 con un porcentaje de 67% de zumo de manzana y 3% de extracto de canela permitió lograr mejorar las características organolépticas de la bebida, lo que afirma las teorías de los autores mencionados anteriormente.

La determinación de la bebida de mayor aceptabilidad por medio del panel en la evaluación sensorial se pudo concretar que el tratamiento 2 obtuvo una mayor aceptación en todos sus parámetros por parte de los catadores. Los autores Olivares y López (2013), indican que las muestras de su bebida elaborada a base frutos verdes con adición de aceites esenciales como la canela, naranja y romero fueron evaluadas por los catadores, en donde las muestras con concentraciones de

1.5, 2 y 2,5 obtuvieron calificaciones de 8, 9 y 10 en la evaluación sensorial. A su vez los autores Pilar y Rincón (2013), citan que la adición de aceite esencial de canela en una muestra de salsa de tomate en concentraciones aproximadas de 2% potencia de manera significativa las características organolépticas de su producto, de acuerdo con sus análisis sensoriales obtuvieron una calificación de 9. En comparación a lo acotado por los autores anteriores se puede verificar que los resultados obtenidos en la investigación son similares, ya que al tratamiento 2 al cual se le aplicó un 3% de extracto de canela logró obtener una calificación de 4, lo que quiere decir que la adición de aceite de canela y aceites esenciales en general no es un factor que impida la elaboración de bebidas naturales a base de fruta con un alto grado de aceptabilidad, sin embargo, su incorporación no debe superar rangos del 1 al 3%.

Los análisis bromatológicos de la bebida indicaron una concentración de sólidos solubles de 12.45% debido al aporte del zumo de manzana, y en los análisis microbiológicos se determinó que la concentración de Coliformes totales, Coliformes fecales, Aerobios mesófilos, Mohos y levaduras está por debajo del límite máximo tolerable señalado según indica la norma NTE-INEN 2337 para jugos y zumos de frutas. Lo que permitió definir un tiempo de vida útil fue de 15 días en condiciones de refrigeración, donde la bebida no sufrió alteraciones sensoriales. El autor Becerril (2013), menciona la efectividad que tiene el aceite esencial de canela en diferentes microorganismos. Sus resultados mostraron que existe un efecto inhibitor del aceite esencial de canela (AEC) en el crecimiento *E. Coli*, *L. Monocytogenes* y aerobios mesófilos superior al 80% con el uso de concentraciones de 2.5%, extendiendo el tiempo de vida útil a 15 días. Por su parte Olivares y López (2013), evaluaron los aceites esenciales en zumos a base de frutas con

concentraciones no mayores a 3% dando como resultado la eficacia antimicrobiana en las bebidas a base de zumo para la inhibición de mohos, levaduras y aerobios mesófilos en rangos aproximados de 85.5% y 94.5, resultados que permitieron extender la vida útil su bebida en 20 días. En base a lo mencionado por Becerril (2013), Olivares y López (2013), se puede comparar que los resultados microbiológicos obtenidos en la investigación son iguales y no discrepan con las teorías de los autores, ya que el tratamiento 2 al cual se le aplicó un 3% de aceite esencial de canela fue altamente efectivo en la inhibición de microorganismos tales como aerobios mesófilos, mohos y levaduras, permitiendo alargar el tiempo de vida de la bebida de manzana en 15 días.

6. Conclusiones

El desarrollo de la investigación permitió obtener las siguientes conclusiones:

Se realizó la adición de concentraciones al 1%, 3% y 5% de aceite esencial de canela en los tres tratamientos a base zumo de manzana, con la finalidad de servir como un agente antimicrobiano natural, en donde la mezcla de los ingredientes permitió generar la obtención de una bebida con un ligero gusto a canela, a la cual posteriormente se le realizó un análisis sensorial para calificar sus características organolépticas.

La determinación de la bebida de mayor aceptabilidad realizada con la participación del panel y evaluación, cuyos resultados se tabularon y se evaluaron mediante la prueba de Friedman, la cual dejó observar las calificaciones de las medias estadísticas en todos los parámetros (olor, sabor, color y textura). El tratamiento 2 presentó la mayor preferencia en el olor, sin embargo, existe un grado de similitud al comparar las del tratamiento 1 y 3. En el parámetro del color el T2 fue superior en la media obtenida, presentado un valor de 2.17 con relación a los tratamientos 1 y 3 que presentaron medias de 1,82 y 2,02 respectivamente. En la evaluación del sabor, el T2 presentó la mayor preferencia con una media de 2.27 con relación al tratamiento 1 y 3 los cuales presentaron valores de 1,77 y 1,97. El parámetro de la textura presentó que los tratamientos 2 y 3 tuvieron similitudes estadísticas al presentar un nivel de aceptación similar, al obtener una media de 2,15 y 2,12. Concluyendo que el tratamiento 2 presentó el mayor grado de aceptación en los parámetros evaluados, más sin embargo se puede mejorar tanto su textura y olor para alcanzar un mayor grado de aceptación.

Los análisis bromatológicos de la bebida indicaron una concentración de sólidos solubles de 12.45% debido al aporte del zumo de manzana, en los análisis

microbiológicos se determinó que la concentración de Coliformes totales, Coliformes fecales, Aerobios mesófilos, Mohos y levaduras está muy por debajo del límite máximo tolerable, según indica la norma NTE-INEN 2337 para jugos y zumos de frutas. Además, los análisis de laboratorio indicaron que el tiempo de vida útil fue de 15 días en condiciones de refrigeración, sin sufrir alteraciones en sus parámetros organolépticos, concluyendo que el extracto de canela ejerce una función efectiva como conservante en una concentración del 3% para reducir la carga microbiana presente en el zumo natural a base de manzana.

7. Recomendaciones

El análisis de los resultados y conclusiones permitió desarrollar las siguientes recomendaciones.

El extracto de canela puede ser utilizado como preservante en bebidas elaboradas de manera artesanal, siempre y cuando se respete la normativa NTE INEN 2337, en donde sus fabricantes en muchas ocasiones desconocen de las normas de seguridad del uso de aditivos sintéticos.

Se aconseja desarrollar nuevas investigaciones con diferentes tipos de frutas con la finalidad de conocer nuevas opciones de bebidas naturales de buena calidad, las cuales se puedan elaborar y comercializar.

Se sugiere analizar el uso de nuevas concentraciones de extracto de canela aplicados en la bebida a base de zumo manzana, con el objetivo de conocer si en condiciones diferentes de almacenamiento y en un porcentaje de aceite esencial mayor al 3% pueda ejercer una mayor capacidad antimicrobiano que permita extender el tiempo de vida útil a más de 15 días.

8. Bibliografía

- Aditivos Alimentarios, (2015). *Aditivos alimentarios*. Obtenido de Aditivos alimentarios: <https://www.aditivos-alimentarios.com/2016/01/E200.html>
- Álvarez, P. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas. Brasil: *Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo*, 18(4), 102-109. Recuperado de http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf,
- Arancibia, S., & Cando, R. (2014). *Desarrollo de una Bebida láctea fermentada con la incorporación de Aloe vera y Aceites esenciales*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos (Tesis de pregrado). Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/22866>
- Asunción, M. (2011). Caracterización sensorial y físico-química de manzanas reineta y pera. (Tesis doctoral). Universidad de León, México. Recuperado de https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1424/Caracterizaci%C3%B3n_Alonso_Gaite.pdf?sequence=1
- Ashta, J., Rajni, S., Shikha, P., & Deepti. G. (2005). Antimicrobial activity of some natural. *ResearchGate*, 66(2), 99-102. 10.1016/j.dyepig.2004.09.005
- Becerril, R. M. (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Elsevier*, 32(2), 404-408. Doi: doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.003
- Bristhar Laboratories. (2010). Aditivos Alimentarios. Recuperado de <http://www.bristhar.com.ve/acidocitrico.html>

- Cabrera, J. (2013). Criterios microbiológicos para alimentos. Buenos Aires: Depto. Control y Desarrollo INAL – ANMAT. Recuperado de https://aam.org.ar/src/img_up/21072014.4.pdf
- Castaño, M. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*syzygium aromaticum*) y canela (*cinnamomum verum*), sobre la levadura (*rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. Medellín: Universidad Nacional De Colombia. (Tesis de maestría). Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/11058219.pdf>
- Codex Alimentarius. (2008). Aditivos. Italia: FAO Recuperado de http://www.fao.org/tempref/codex/reports/alnorm08/al31_12s.pdf
- Codex Alimentarius,. (2005). Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. Panamá: FAO. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/45003487/Norma-General-Del-Codex-Para-Zumo-y-Nectares-de-Frutas>
- Codex, Alimetarius (1995). Aditivos alimentarios. Italia: FAO. Recuperado de http://www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf
- Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (Eds.). (2009). Flavor compounds of *Lavandula angustifolia* L., of three different extraction methods. *Food Chemistre*. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.015
- Danjanovic, B., Lepojevic, Z., & Zikovic, V. (2005). Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 92(1), 143-149. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.07.019
- Dávila, G. (2007). Sistema de producción y comercialización de manzano. Corporación para el desarrollo Agropecuario del estado Nuevo León. Monterrey, 47. Recuperado de

<https://frutales.files.wordpress.com/2011/01/m-23-sistema-de-produccion-del-manzano.pdf>

Delgado, J. (2012). *Estudio de la vida útil de néctar a base de zanahoria con naranja*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://repositorio.ute.edu.ec>
http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5020/1/51577_1.pdf

Dighe, V., Gursale A., y Gauri A. (2009). Composition and varieties of cinnamon. *Springer*, 70(11), 1759-1762. doi:10.1365/s10337-009-1382-7

Eco, A. (10 de marzo del 2020). Canela y blogs: propiedades y usos medicinales. Recuperado de <https://www.ecoagricultor.com/aceite-esencial-canela-propiedades/>

Espina, L., Lorán, S., y García, D. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity. *Food Control*, 22(6), 896-902. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.021

Flores, C., y Rojas, H. (2018). *Efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (Cinnamomun zeylanicum) Frente a Helicobacter pylori*. (Tesis de Grado). Recuperado de <http://repositorio.upads.edu.pe/bitstream/UPADS/39/1/TESIS%20CINTHIA%20FLORES-HAYDEE%20ROJAS.pdf>

Gago, M. (14 de diciembre del 2017). Cultivo del árbol de canela. Recuperado de Ecología verde: <https://www.ecologiaverde.com/cultivo-del-arbol-de-canela-775.html>

Garcinuño, M. M. (2013). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Dialnet*, 36(1), 51-64. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4696799>

González, J. (2016). *Planta elaboradora de zumos y características del zumo de manzana*. (Tesis de grado). Recuperado de https://biblioteca.unirioja.es/tfe_e

/tfe_e/TFE002752.pdf

- Gómez, A., y López, M. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela. *TSIA*, 3(1), 33-45. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Gomez-Sanchez-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Gomez-Sanchez-et-al-2009.pdf)
- INEN (1990). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes*. Ecuador: instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado de <https://archive.org/details/ec.nte.1529.6.1990/page/n3/mode/2up>
- INEN (2013). *Control microbiológicos de alimentos, mohos y levaduras viables, recuento por placa por siembra en profundidad*. Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado de https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf
- INEN (2008). *Jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos*. Ecuador: instituto ecuatoriano de normalización. Recuperado de <https://archive.org/details/ec.nte.2337.2008/mode/2up>
- INEN (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. REP*. Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Recuperado de <https://archive.org/details/ec.nte.1529.5.2006/mode/2up>
- Jácome, J. (2019). *Evaluación del efecto bactericida de aceites esenciales de canela (Cinnamomum verum), jengibre (Zingiber officinale) y clavo de olor (Syzygium aromaticum) para aplicaciones agroindustriales*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10707/4/UDLA-EC-TIAG-2019-15.pdf>

- Laird, K., y Phillips, A. (2012). Vapor phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Applied Microbiology*, 54(3), 169–174. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03190.x
- López, L. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia Officinalis L.* Sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.: *Actualidad Biológica*, 35(98), 77-83. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?.script=sci_abstract&pid=S0304-35842013000100007
- López, P., Sánchez, C., y Nerín C. (2007). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21) 55-21, 14-24. doi: 10.1021/jf071737b
- Lorea, F., Jiménez, N., Janowski, C., & Reyes, R. (2011). Essential Oils in Mexican Bays (*Litsea spp.*, *Lauraceae*): Taxonomic. *Economic Botany*, 65(2), 178-189. doi: 10.1007/s12231-011-9160-5
- Luján, M. (2010). *Microorganismos en zumo de manzana*. (Tesis de maestría). Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/bitstream/handle/1185/400/Tesis.pdf>
- Martinez, L. (2012). Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 3(128), 1. doi: 10.3389/fmicb.2012.0001
- Montero, M., Revelo, J., Áviles, E., y Valle, E. (2009). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella. *Revista de Investigaciones del Peru*, 8(4), 987-993. doi: 10.15381/rivep.v28i4.13890

- Mora, V., Velasco, F., Díaz, J., Tulia, Rojas, F. Díaz, L., Ríos, T., Nurby, y Carmona, J. (2016). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Peperomia acuminata* de los Andes venezolanos. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 301-304. doi: 10.15381/rivep.v28i4.13890
- Morales, A. (2015). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta. (Tesis de grado). Recuperado de <https://core.ac.uk/display/77278344>
- Muñoz, A., Galindo, A., López, L., Cantú, L., y Barajas, L. (2014, 23 de diciembre). Citric Acid: Intersting compound. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(12). Recuperado de <http://www.actaquimicamexica.uadec.mx/?p=435>
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolkova, M., y Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against food borne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157-160. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.03.007
- Núñez, M. (2013, 15 de mayo). Métodos de estimación de la vida útil de los alimentos, *ResearchGate*. doi: 10.13140/RG.2.1.1159.9840
- Olivares, M., y López M., (8 de junio de 2017). Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales y sus componentes como el eugenol en fase vapor. *Temas selectos de ingeniería de alimentos (TSIA)*. Recuperado de <https://tsia.udlap.mx/potencial-antimicrobiano-de-mezclas-que-incluyen-aceites-esenciales-o-sus-componentes-en-fase-vapor/>
- Onieva, A. (2014). *Determinación de fitoquímicos en zumos de manzana mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a*

- espectrometría de masas en tándem*. (Tesis de grado). Recuperado de http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/3537/3319_TFG_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ortega, M., Refugio, M., Acedo, E., Gonzalez, L., y Morales, A. (2010). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri* S. Wats). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(1), 11-17. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000100004
- Pastrana, Y., Villadiego, D., y Acevedo, C. (2017). Antimicrobial effect of cloves and cinnamon on pathogens. *Bioteconología Agroindustrial*, 15(1), 56-65. doi: h10.18684/BSAA (15)56-65.
- Pilar, G., y Rincón, L. (2013). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *listeria monocytogenes* y *bacillus cereus**. (Tesis de grado). Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis101.pdf>
- Porcar, M. (2016). *Estudios de vida útil de zumos de fruta envasados*. Valencia. (Tesis de grado). Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/10251/6920/PORCAR%20-%20Estudios%20de%20vida%20%C3%BAtil%20de%20zumos%20de%20fruta%20envasados..pdf?sequence=1>
- Puangpronpitag, D., y Sittiwet, C. (2009). Antimicrobial properties of *Cinnanomum verum* Aqueous extract. *Asian Journal of Biological Sciences*, 2(2), 49-53. Recuperado de <http://docsdrive.com/pdfs/knowledgia/ajbs/2009/49-53.pdf>
- Ramos, M., Bautista, S., Barrera, L., Bosquez, E., y Estrada, M. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en

- Productos Hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 44-57.
Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a5.pdf>
- Roda, M. (2013). *Efecto Antimicrobiano de Vainilla y de Aceites Esenciales de Canela y Clavo en Leche de Vaca Pasteurizada*. (Tesis doctoral).
Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/a2bc/64cc7d5b55d08b3d6b1c92ba31ac5c595825.pdf>
- Rosulo, M., Beltran, K., Socrates, C., Matos, A., y Beltran, S. (2015, 4 de agosto). Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Orégano (*Origanum vulgare*) Microencapsuladas en β -ciclodextrina Aplicados en Cultivos Microbianos. *Investigación en Ciencia y Tecnología de alimentos*.
Recuperado de https://revistas.upeu.edu.pe/index.php/ri_alimentos/article/view/814
- Rodríguez, E. (2010). Propiedades de los antimicrobianos naturales. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/461/4611674204/pdf/461/46116742014.pdf>
- Sagar, K., Rheethi V., Prasad, S., y Akshatha, G. (2012). Antimicrobial efficacy of some natural. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 113-120. Recuperado de [tps://wwetw.researchgate.net/publication/281911933_Antimicrobial_efficacy_of_some_natural_cosmeceuticals_neutraceuticals_and_medicinal_plant_extracts_and_ultrastructural_alterations_in_food_borne_pathogens](https://www.researchgate.net/publication/281911933_Antimicrobial_efficacy_of_some_natural_cosmeceuticals_neutraceuticals_and_medicinal_plant_extracts_and_ultrastructural_alterations_in_food_borne_pathogens)
- Saldivar, P. (2017). *Cultivo del Manzano*. Universidad Autónoma del Estado de México. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/68164/Cultivo%20de%20Manzana.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Sánchez, L. (2013). *Determinación de compuestos funcionales en Canela (Cinnamomum zeylanicum)*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25267/S%c3%81NCHEZ%20MIRANDA%20LUISA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, M. (2013). *Aplicación Combinada de Sonicación y Aceites Esenciales en la Conservación de Zumos Naturales de Fruta*. (Tesis doctoral). Recuperado de <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/52281/1/MARTA%20S%c3%81NCHEZ%20RUBIO.pdf>
- Seow, Y., Yeo, Ch., Chung, H., y Yuk H. (2014). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5), 625-644. doi: 10.1080/10408398.2011.599504
- Solórzano, F., Y Mirando, M. (2011). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-150. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.005
- Stashenko, E., Martinez, R., Durán, D., & Córdoba, Y. (2009). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia Verbenaceae*. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 38(1), 89-105. doi: 10.18257/raccefyn.156
- Upadhyay, R. (2010). Essential oils: Anti-microbial, antihelminthic, antiviral, anticancer and anti-insect properties. *Journal of applied Biosciences*, 36(1), 1-22. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/236680339_Essential_oils_Anti-microbial_antihelminthic_antiviral_anticancer_and_anti-insect_properties

- Vásquez, V. (2015). Nuevo método para determinar vida útil sensorial utilizando lógica difusa. *Scientia Agropecuaria*, 6(2), 99-109. doi: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.02.02>
- Vivas, F., Rojas, L., Velazco, J., Díaz, T., Rojas, L., Díaz, L., y Carmona, J. (2016). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Peperomia acuminata* de los Andes Venezolanos. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 301-304. doi: 10.15381/rpb.v23i3.12865

9. Anexos

9.1 Anexo 1. Resultados de la encuesta sensorial

Tabla 16. Datos del análisis del olor en los 3 tratamientos

Encuestados	Olor		
	T1	T2	T3
1	5	5	5
2	1	4	3
3	4	5	5
4	5	3	4
5	4	2	5
6	2	4	3
7	3	5	2
8	4	5	5
9	2	5	3
10	4	5	4
11	4	4	5
12	2	5	5
13	4	4	5
14	3	4	5
15	3	5	3
16	5	4	5
17	3	5	3
18	4	5	4
19	5	3	3
20	5	3	5
21	4	5	5
22	3	3	1
23	2	3	4
24	3	2	2
25	5	5	5
26	4	4	4
27	3	5	5
28	3	4	5
29	4	5	5
30	3	4	5
Total promedio	3,53	4,17	4,10

Encuesta de los 3 tratamientos correspondientes al olor.
Sesme, 2019

Tabla 17. Datos del análisis del color en los 3 tratamientos

Encuestados	Color		
	T1	T2	T3
1	2	4	5
2	3	4	3
3	3	5	3
4	5	4	4
5	3	3	4
6	3	4	4
7	4	5	3
8	4	5	4
9	4	5	4
10	4	4	3
11	4	4	5
12	3	5	4
13	4	3	4
14	3	4	5
15	3	4	3
16	4	3	4
17	3	4	3
18	4	4	4
19	5	3	3
20	5	2	5
21	4	4	5
22	3	3	2
23	3	3	4
24	4	4	4
25	4	5	5
26	4	4	4
27	5	4	4
28	3	4	4
29	5	4	3
30	2	5	3
Total promedio	3,67	3,97	3,83

Encuesta de los 3 tratamientos correspondientes al color.
Sesme, 2019

Tabla 18. Datos del análisis del sabor en los 3 tratamientos

Encuestados	Sabor		
	T1	T2	T3
1	2	5	5
2	4	4	1
3	3	5	5
4	5	2	2
5	4	3	5
6	3	4	3
7	3	5	1
8	4	5	5
9	4	5	3
10	4	5	4
11	4	4	5
12	4	5	5
13	4	4	5
14	3	4	5
15	4	5	3
16	4	4	3
17	3	4	4
18	4	5	4
19	5	4	4
20	5	3	3
21	3	5	5
22	1	4	2
23	3	4	5
24	2	2	1
25	1	5	5
26	5	3	3
27	3	4	3
28	4	3	4
29	5	4	4
30	3	4	4
Total promedio	3,53	4,10	3,70

Encuesta de los 3 tratamientos correspondientes al sabor
Sesme, 2019

Tabla 19. Datos del análisis de textura en los 3 tratamientos

Encuestados	Textura		
	T1	T2	T3
1	3	4	4
2	4	3	4
3	4	5	4
4	4	4	4
5	3	3	5
6	4	2	2
7	4	5	4
8	3	5	4
9	3	5	4
10	4	4	4
11	4	4	5
12	3	4	5
13	4	2	3
14	4	4	4
15	2	4	3
16	4	3	5
17	3	4	5
18	4	4	4
19	5	5	5
20	5	2	3
21	3	4	5
22	1	3	2
23	3	4	3
24	4	2	4
25	3	4	3
26	5	4	3
27	4	5	3
28	2	4	3
29	4	4	4
30	3	4	4
Total promedio	3,53	3,80	3,83

Encuesta de los 3 tratamientos correspondientes a la textura
Sesme, 2019

9.2 Anexo 2. Análisis de varianza

Tabla 20. Análisis de la varianza del olor

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Olor	90	0,51	0,24	24,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	53,53	31	1,73	1,92	0,0157
Tratamientos	7,27	2	3,63	4,05	0,0226
Repeticiones	46,27	29	1,60	1,78	0,0315
Error	52,07	58	0,90		
Total	105,60	89			

Análisis estadístico de la evaluación del olor
Sesme, 2019

Tabla 21. Prueba de Friedman del parámetro del olor

T1 V. Zumo 500ml V.AC. 0.6m.	1,62
T2 V. Zumo 500ml V.AC. 0,9m.	2,18
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1,3m.	2,20
Promedio	4,93
Nivel de Significancia	0,0105

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 12,695
Sesme, 2019

Tabla 22. Determinación de la media estadística del olor

Tratamientos	Suma Ranks	Medias(Ranks)	n	E.E
T1 V.Zumo500ml V.AC.0.6m..	48,50	1,62	30	A
T2 V.Zumo500ml V.AC.0.9m..	65,50	2,18	30	B
T3.V.Zumo500ml.V.AC.1.3m..	66,00	2,20	30	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)
Sesme, 2019

Tabla 23. Análisis de la varianza del color

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Color	90	0,31	0,00	21,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17,84	31	0,58	0,85	0,6843
Tratamientos	1,36	2	0,68	1,00	0,3741
Repeticiones	16,49	29	0,57	0,84	0,6920
Error	39,31	58	0,68		
Total	57,16	89			

Análisis estadístico de la evaluación del color
Sesme, 2019

Tabla 24. Prueba de Friedman del parámetro del color

T1 V. Zumo 500ml V.AC. 0.6m.	1,82
T2 V. Zumo 500ml V.AC. 0,9m.	2,17
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1. 3.	2,02
Promedio	1,29
Nivel de significancia	0,2836
Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 13,139	
Sesme, 2019	

Tabla 25. Determinación de la media estadística del color

Tratamientos	Suma Rank s	Medias(Ranks)	N	E.E
T1 V. Zumo500ml V.AC. 0.6m..	54,50	1,82	30	A
T3 V. Zumo500ml V.A.C. 1.3...	60,50	2,02	30	A
T2 V. Zumo500ml V.AC. 0,9m..	65,00	2,17	30	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,050)				
Sesme, 2019				

Tabla 26. Análisis de la varianza del sabor

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Sabor	90	0,40	0,08	28,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	44,64	31	1,44	1,25	0,2296
Tratamientos	5,09	2	2,54	2,21	0,1193
Repeticiones	39,56	29	1,36	1,18	0,2884
Error	66,91	58	1,15		
Total	111,56		89		

Análisis estadístico de la evaluación del sabor

Sesme, 2019

Tabla 27. Prueba de Friedman del parámetro del sabor

T1 V. Zumo 500ml V.AC. 0.6m.	1,77
T2 V. Zumo 500ml V.AC. 0,9m.	2,27
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1. 3.	1,97
Promedio	2,47
Nivel de significancia	0,0938
Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 13,612	
Sesme, 2019	

Tabla 28. Determinación de la media estadística del sabor

Tratamientos	Suma Rank s	Medias(Ranks)	n	E.E
T1 V. Zumo500ml V.AC. 0.6m..	53.00	1,77	30	A
T3 V. Zumo500ml V.A.C. 1.3...	59.00	1.97	30	A
T2 V. Zumo500ml V.AC. 0,9m..	68.00	2,27	30	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)

Tabla 29. Análisis de la varianza de la textura

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Textura	90	0,44	0,14	22,4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,68	31	1,02	1,47	0,1030
Tratamientos	1,62	2	0,81	1,17	0,3191
Repeticiones	30,06	29	1,04	1,49	0,0986
Error	40,38	58	0,70		
Total	72,06	89			

Análisis estadístico de la evaluación de la textura
Sesme, 2019

Tabla 30. Prueba de Friedman del parámetro de la textura

T1 V. Zumo 500ml V.AC. 0.6m.	1,73
T2 V. Zumo 500ml V.AC. 0,9m.	2,15
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1. 3.	2,12

Promedio 2,37
Nivel de significancia 0,1020

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 12,761
Sesme, 2019

Tabla 31. Determinación de la media estadística de la textura

Tratamientos	Suma Rank s	Medias(Ranks)	n	E.E
T1 V. Zumo500ml V.AC. 0.6m..	52.00	1,73	30	A
T3 V. Zumo500ml V.A.C. 1.3...	63.50	2.12	30	A
T2 V. Zumo500ml V.AC. 0,9m..	64.50	2,15	30	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)

9.3 Anexo 3. Medidas de resumen

Tabla 32. Antecedente de la evaluación sensorial (T1)

Variable de calificación	Encuestas	Olor	Color	Sabor	Textura
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	1	5	2	2	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	2	1	3	4	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	3	4	3	3	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	4	5	5	5	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	5	4	3	4	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	6	2	3	3	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	7	3	4	3	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	8	4	4	4	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	9	2	4	4	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	10	4	4	4	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	11	4	4	4	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	12	2	3	4	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	13	4	4	4	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	14	3	3	3	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	15	3	3	4	2
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	16	5	4	4	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	17	3	3	3	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	18	4	4	4	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	19	5	5	5	5
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	20	5	5	5	5
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	21	4	4	3	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	22	3	3	1	1
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	23	2	3	3	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	24	3	4	2	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	25	5	4	1	3
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	26	4	4	5	5
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	27	3	5	3	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	28	3	3	4	2
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	29	4	5	5	4
T1 V.Zumo 500ml V.AC. 0.6ml	30	3	2	3	3

Calificación realizada por medio del uso de una escala hedónica de 5 niveles
Sesme, 2019

Tabla 33. Antecedente de la evaluación sensorial (T2)

Variable de calificación	Encuestas	Olor	Color	Sabor	Textura
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	1	5	4	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	2	4	4	4	3
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	3	5	5	5	5
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	4	3	4	2	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	5	2	3	3	3
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	6	4	4	4	2
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	7	5	5	5	5
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	8	5	5	5	5
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	9	5	5	5	5
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	10	5	4	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	11	4	4	4	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	12	5	5	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	13	4	3	4	2
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	14	4	4	4	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	15	5	4	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	16	4	3	4	3
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	17	5	4	4	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	18	5	4	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	19	3	3	4	5
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	20	3	2	3	2
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	21	5	4	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	22	3	3	4	3
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	23	3	3	4	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	24	2	4	2	2
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	25	5	5	5	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	26	4	4	3	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	27	5	4	4	5
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	28	4	4	3	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	29	5	4	4	4
T2 V.Zumo 500ml V.AC. 0,9ml	30	4	5	4	4

Calificación realizada por medio del uso de una escala hedónica de 5 niveles
 Sesme, 2019

Tabla 34. Antecedente de la evaluación sensorial (T3)

Variable de calificación	Encuestas	Olor	Color	Sabor	Textura
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	1	5	5	5	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	2	3	3	1	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	3	5	3	5	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	4	4	4	2	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	5	5	4	5	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	6	3	4	3	2
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	7	2	3	1	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	8	5	4	5	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	9	3	4	3	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	10	4	3	4	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	11	5	5	5	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	12	5	4	5	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	13	5	4	5	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	14	5	5	5	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	15	3	3	3	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	16	5	4	3	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	17	3	3	4	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	18	4	4	4	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	19	3	3	4	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	20	5	5	3	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	21	5	5	5	5
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	22	1	2	2	2
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	23	4	4	5	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	24	2	4	1	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	25	5	5	5	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	26	4	4	3	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	27	5	4	3	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	28	5	4	4	3
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	29	5	3	4	4
T3 V.Zumo 500ml V.A.C. 1.3ml	30	5	3	4	4

Calificación realizada por medio del uso de una escala hedónica de 5 niveles
 Sesme, 2019

9.4 Anexo 4. Resumen estadístico

Tabla 35. Medidas resumen del tratamiento de mayor aceptación

Formulación	Olor	Color	Sabor	Textura	Promedio
Formulación 1	3.53	3.67	3.53	3.53	3.56
Formulación 2	4.17	3.97	4.10	3.80	4.01
Formulación 3	4.10	3.83	3.70	3.83	3.86

Datos obtenidos por medio del uso del software estadístico Excel.
Sesme, 2019

9.5 Anexo 5. Ficha de evaluación sensorial - formulario de evaluación

FECHA _____ HORA _____

Usted tiene en frente tres muestras de zumo de manzana. Por favor observe y deguste cada una.

Indique el grado de aceptación que a usted le parezca al momento de degustar cada atributo de cada muestra, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.

Tabla. Interpretación de las muestras (códigos)

Me gusta mucho	5
Me gusta poco	4
No me gusta ni me disgusta	3
Me disgusta poco	2
Me disgusta mucho	1

Calificación para cada atributo

Código	Olor	Color	Sabor	Textura
T1				
T2				
T3				

¿Qué opina sobre las 3 muestras que probó? _____

Figura 2. Ficha de evaluación sensorial.
Sesme, 2019

9.6 Anexo 6. Resumen estadístico

Resultados

Nueva tabla : 17/10/2019 - 1:12:27 - [Versión : 24/04/2018]

Medidas resumen

Variable de calificación	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Min	Máx
T1 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.6m..	Olor	30	3,53	1,07	1,15	30,40	1,00	5,00
T1 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.6m..	Color	30	3,67	0,84	0,71	23,02	2,00	5,00
T1 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.6m..	Sabor	30	3,53	1,07	1,15	30,40	1,00	5,00
T1 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.6m..	Textura	30	3,53	0,90	0,81	25,46	1,00	5,00
T1 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.6m..	Encuestados	30	15,50	8,80	77,50	56,80	1,00	30,00
T2 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.9m..	Olor	30	4,17	0,95	0,90	22,80	2,00	5,00
T2 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.9m..	Color	30	3,97	0,76	0,59	19,28	2,00	5,00
T2 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.9m..	Sabor	30	4,10	0,88	0,78	21,58	2,00	5,00
T2 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.9m..	Textura	30	3,80	0,92	0,86	24,34	2,00	5,00
T2 V. Zumo 500ml V.A.C. 0.9m..	Encuestados	30	15,50	8,80	77,50	56,80	1,00	30,00
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	Olor	30	4,10	1,16	1,33	28,18	1,00	5,00
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	Color	30	3,83	0,79	0,63	20,65	2,00	5,00
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	Sabor	30	3,70	1,32	1,73	35,59	1,00	5,00
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	Textura	30	3,83	0,87	0,76	22,81	2,00	5,00
T3 V. Zumo 500ml V.A.C. 1.3..	Encuestados	30	15,50	8,80	77,50	56,80	1,00	30,00

EstDesc EstDesc EstDesc EstDesc EstDesc

Figura 3. Resumen estadístico
Sesme, 2019

9.7 Anexo 7. Análisis físico-químico y microbiológico

Informe: 19-10/0095-M001		R01-PG23-PO02-7.8		
Datos del Cliente				
Nombre:	SESME VELARDE ANDY BERNALD	Teléfono:	0989024629	
Dirección:	UNION CIVICA MZ. 1602 SL. 21			
Identificación de la muestra / etiqueta				
Nombre:	Zumo de manzana	Código muestra:	19-10/0095-M001	
Marca comercial:	N/A	Lote:	N/A	
Referencia:	Jugo o pulpa de Frutas	Fecha elaboración:	21/10/2019	
Envase:	Botella plástica	Fecha expiración:	21/11/2019	
Conservación de la muestra:	Refrigeración 0°C - 4 °C	Fecha recepción:	24/10/2019	
Fecha análisis:	24/10/2019	Vida útil:	31 Días	
Contenido neto declarado:	500 ml			
Presentaciones:	500 ml			
Cond. climáticas del ensayo:	Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C ± Y Humedad Relativa 55% ± 15%			
Análisis Físico - Químicos				
Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Sólidos Solubles *	%	12.45	—	AOAC 21st 932.14 C *
Análisis Microbiológicos				
Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Coliformes totales	NMP/cm3	<3	<3	BAM 8th (ME08-PG20-PO02-7.2 M)
Coliformes Fecales	NMP/cm3	<3	<3	BAM 8th (ME08-PG20-PO02-7.2 M)
Aerobios mesófilos	UFC/cm3	<10	<10	AOAC 21st 966.23 (ME03-PG20-PO02-7.2 M)
Mohos y levaduras	UFC/cm3	<10	<10	AOAC 21st 997.02 (ME07-PG20-PO02-7.2 M)
Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra proporcionada por el cliente.				
Las opiniones / interpretaciones / etc. que se indican a continuación, están FUERA del alcance de acreditación del SAE.				
* Observaciones:				
La muestra analizada SI cumple con los requisitos microbiológicos solicitados por el cliente para JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES, según la Norma NTE INEN 2337:2008.				
Los resultados microbiológicos se encuentran registrados en el cuaderno interno de trabajo de microbiología, en la página 19-05858.				
Se realizaron los parámetros bromatológicos solicitados por el cliente.				
Los resultados bromatológicos se encuentran registrados en el cuaderno interno de trabajo KH página N° 88.				
Vigente desde 18/09/2019		REV. 01		1 de 2

Figura 4. Análisis bromatológicos según las especificaciones de la norma INEN 2337 Sesme, 2019

9.8 Anexo 8. Análisis de vida útil

R01-PG23-PO02-7.8

Informe de Ficha de Estabilidad: 19-12/0036-M001

Datos del Cliente

Nombre:	SESME VELARDE ANDY BERNALD	Teléfono:	0989024629
Dirección:	UNION CIVICA MZ. 1602 SL. 21		

Identificación de la muestra / etiqueta

Nombre:	Zumo de manzana (pasteurizado)	Código muestra:	19-12/0036-M001
Marca comercial:	N/A	Lote:	N/A
Normativa de Referencia:	NTE INEN 2337:2008 JUGOS O PULPAS PASTEURIZADO: GENERAL	Fecha elaboración:	07/12/2019
Envase:	N/A	Fecha expiración:	22/12/2019
Conservación de la muestra:	Refrigeración 0°C - 4 °C	Fecha recepción:	09/12/2019
Fecha análisis:	09/12/2019	Fecha inicio prueba:	09/12/2019
Contenido neto declarado:	500 ml	Fecha término prueba:	07/01/2020
Presentaciones:	500 ml		
Cond. climáticas del ensayo:	Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C± Y Humedad Relativa 65% ± 15%		

Análisis Inicial

Análisis Microbiológicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aerobios mesófilos	UFC/cm3	1.0 x 10 ^{^1}	<10	AOAC 21st 966.23 (ME03-PG20- PO02-7.2 M)
Mohos y levaduras	UFC/cm3	1.0 x 10 ^{^1}	<10	AOAC 21st 997.02 (ME07-PG20- PO02-7.2 M)

Control #1 - 13/12/2019

Análisis Microbiológicos

Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aerobios mesófilos *	UFC/cm3	1.0 x 10 ^{^1}	<10	AOAC 21st 966.23 (ME03-PG20- PO02-7.2 M) *
Mohos y levaduras *	UFC/cm3	1.0 x 10 ^{^1}	<10	AOAC 21st 997.02 (ME07-PG20- PO02-7.2 M) *

Vigente desde 19/12/2019

REV. 02

1 de 3

Figura 5. Análisis de vida útil, primera hoja
Sesme, 2019

R01-PG23-PO02-7.8				
Informe de Ficha de Estabilidad: 19-12/0036-M001				
Control #2 - 23/12/2019				
Análisis Microbiológicos				
Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Aerobios mesófilos *	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁰ 1	<10	AOAC 21st 968.23 (ME03-PG20- PO02-7.2 M) *
Mohos y levaduras *	UFC/cm ³	1.0 x 10 ⁰ 1	<10	AOAC 21st 987.02 (ME07-PG20- PO02-7.2 M) *

Las opiniones / interpretaciones / etc. que se indican a continuación, están FUERA del alcance de acreditación del SAE.

*** Observaciones:**

Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra y a la información proporcionada por el cliente.

Dado el comportamiento microbiológico del producto Zumo de manzana (pasteurizado), el tiempo de vida útil es de 15 días en condiciones de refrigeración estable.

Los resultados microbiológicos se encuentran registrados en el cuaderno interno de trabajo de microbiología, en la página 19.07068, 19.07212, 19.07449.

1.- * Parámetros No Acreditados

2.- ^o Parámetros Subcontratados

3.- En microbiología los valores expresados como < 1.0, < 1.1, < 1.8, < 2, < 3, y < 10 se estiman ausencia de acuerdo al método.

4.- Las contra muestras se almacenan en el laboratorio considerando su tiempo de vida útil y se desechan en un tiempo máximo de 1 mes posterior a la entrega del informe de resultados.

5.- Los resultados corresponden exclusivamente a la muestra analizada y proporcionada por el cliente.

6.- Reimpresión de informes de resultados se realizan con un plazo máximo de 5 años a partir de su emisión.

7.- Solicitud de cambios o revisiones del informe de resultados se aceptan con un plazo máximo de 6 meses posteriores a la entrega del mismo. La solicitud debe estar técnicamente justificada a criterio del laboratorio.

8.- Válido únicamente en el documento original.

9.- Prohibida la reproducción total o parcial de este documento por cualquier medio sin permiso escrito de Laboratorio PROTAL.

Regla de Decisión para la declaración de conformidad: El laboratorio documenta la regla de decisión con el cliente antes del ingreso del ítem de ensayo y por ninguna circunstancia se podrá realizar modificaciones por supresión del valor de incertidumbre, cambio de normativa, cambio de requisitos, etc.

Para esto se considerará los siguientes criterios:

- Para parámetros que tengan requisito máximo de cumplimiento, si el resultado de la medición más la incertidumbre expandida no supera el requisito máximo, se declarará CUMPLIMIENTO.
- Para parámetros que tengan requisito máximo de cumplimiento, si el resultado del ensayo más la incertidumbre expandida supera el requisito máximo, se declarará NO CUMPLIMIENTO.
- Para parámetros que tengan requisito mínimo de cumplimiento, si el resultado del ensayo menos la incertidumbre expandida supera el requisito mínimo, se declarará CUMPLIMIENTO.
- Para parámetros que tengan requisito mínimo de cumplimiento, si el resultado del ensayo menos la incertidumbre expandida es inferior al requisito mínimo, se declarará NO CUMPLIMIENTO.

Vigente desde 19/12/2019	REV. 02	2 de 3
--------------------------	---------	--------

Figura 6. Análisis de vida útil, segunda hoja
Sesme, 2019

9.9 Anexo 9. Elaboración de tratamientos



Figura 7. Recepción de la materia prima
Sesme, 2019



Figura 8. Lavado de la manzana
Sesme, 2019



Figura 9. Pelado de la manzana
Sesme, 2019



Figura 10. Balanza, pesado de los ingredientes
Sesme, 2019



Figura 11. Balanza, pesado de los ingredientes
Sesme, 2019



Figura 12. Balanza, pesado de los ingredientes
Sesme, 2019



Figura 13. Balanza, pesado de los ingredientes
Sesme, 2019

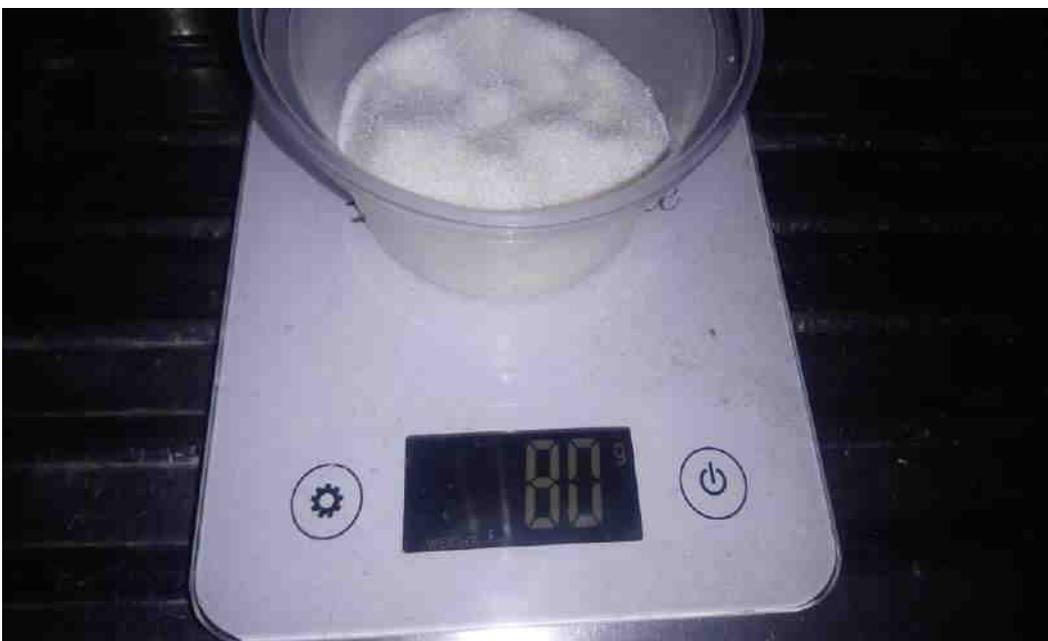


Figura 14. Balanza, pesado de los ingredientes
Sesme, 2019



Figura 15. Elaboración del zumo de manzana
Sesme, 2019



Figura 16. Adición de extracto de canela
Sesme, 2019



Figura 17. Envasado
Sesme, 2019



Figura 18. Tratamientos de jugo de manzana con extracto de canela
Sesme, 2019



Figura 19. Evaluación sensorial
Sesme, 2019



Figura 20. Panel sensorial
Sesme, 2019

9.10 Anexo 10. Normativas para el control microbiológico de alimentos

INEN

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1 529-5:2006
Primera revisión

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.**

Primera Edición

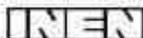
MICROBIOLOGICAL CONTROL IN FOODS. DETERMINATION OF THE QUANTITY OF AEROBIC MESOPHILIC MICROORGANISMS. PCA.

First Edition

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.
AL 01.05-303
CDU: 579.67
CIIU: 9320
ICS: 07.100.30:67.050

Figura 21. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529 5:2006
INEN, 2006

CDU: 579.67
ICS: 07.100.30-67.050



CIU: 6320
AL 01.05-363

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.	NTE INEN 1 529-5:2006 Primera revisión 2006-01
--	--	---

1. OBJETIVO

1.1 Esta norma establece el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.

2. ALCANCE

2.1 Este método de ensayo solo permitirá cuantificar la presencia de grupos de microorganismos aerobios mesófilos.

3. DEFINICIONES

3.1 Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C.

3.2 REP es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos por gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento.

4. RESUMEN

4.1 Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento.

4.2 Limitaciones del método: Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos vitales (viables) en la muestra debido a las siguientes condiciones:

4.2.1 Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.

4.2.2 Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse;

4.2.3 Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura; la presencia de inhibidores y el uso incorrecto.

5. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 Todo el material a utilizarse en la determinación debe estar perfectamente limpio y estéril.

5.2 El área de trabajo debe estar constituida por una mesa nivelada, de superficie amplia, limpia, desinfectada, bien iluminada, situada en una sala de aire limpio, libre de polvo y corrientes de aire.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.

5.3 La carga microbiana del aire debe ser controlada durante el ensayo y, para una exposición del medio de cultivo a él por 15 min, no debe exceder de 15ufc/placa; de superarse este valor los ensayos deben ser anulados.

5.4 Todas las demás áreas del laboratorio deben estar libres de polvo, de insectos y guardar protegidos el material y suministros.

6. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Materiales

- 6.1.1** Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 cm³ y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.
- 6.1.2** Cajas Petri de 90 mm x 15 mm.
- 6.1.3** Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ y 1.000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.
- 6.1.4** Tubos de 150 mm x 16 mm.
- 6.1.5** Gradillas.
- 6.1.6** Contador de colonias.
- 6.1.7** Balanza de capacidad no superior a 2.500 g y de 0,1 g de sensibilidad.
- 6.1.8** Baño de agua regulado a 45°C ± 1°C.
- 6.1.9** Incubador regulable (25°C - 60°C)
- 6.1.10** Autoclava.
- 6.1.11** Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo.
- 6.1.12** Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15°C a -20°C.

6.2 Medios de cultivo

- 6.2.1** Agar para recuento en placa (Plate Count Agar). Preparación (ver Agares en la NTE INEN 1529-1)
- 6.2.2** Agua peptonada al 0,1 % (diluyente). Preparación (ver diluyentes en la NTE INEN 1 529-1)

7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- 7.1** Preparar la muestra según uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Para cada dilución el ensayo se hará por duplicado. En cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositará 1 cm³ de cada dilución. Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.

8.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar para recuento en placa-PCA, fundido y templado a 45°C ± 2°C. La adición del medio no debe pasar de más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución.

(Continúa)

8.3 Cuidadosamente, mezclar el inoculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.

8.4 Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.

8.5 Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar.

8.6 Invertir las cajas e incubarlas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas.

8.7 No apilar más de 6 placas. Las piletas de placas deben estar separadas entre sí, de las paredes y del techo de la incubadora.

8.8 Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias y utilizando un contador de colonias, contar todas las colonias que hayan crecido en el medio, incluso las pequeñas, pero, se debe tener cuidado para no confundirlas con partículas de alimentos o precipitados, para esto, utilizar lupas de mayor aumento.

8.9 Las colonias de crecimiento difuso deben considerarse como una sola colonia si el crecimiento de este tipo de colonias cubre menos de un cuarto de la placa; si cubre más la caja no será tomada en cuenta en el ensayo.

8.10 Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.

9. CALCULOS

9.1 Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias).

9.1.1 Calcular el número N de microorganismo por gramo o cm^3 de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

En donde:

- $\sum c$ = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas;
- V = Volumen inoculado en cada caja Petri;
- n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada;
- n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada;
- d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

9.1.2 Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la correspondiente potencia de 10.

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados (dos placas por dilución):
 primera dilución seleccionada (10- 2): 225 y 178 colonias,
 segunda dilución seleccionada (10- 3): 25 y 15 colonias.

(Continúa)

$$N = \frac{225 + 178 + 25 + 15}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-1}}$$

$$N = \frac{443}{0,022}$$

$$N = 20136$$

Redondeando:

$$20\ 000 = 2,0 \times 10^4$$

9.2 Recuentos estimados

9.2.1 Si dos placas inoculadas con muestra no diluida (productos líquidos), o con la suspensión inicial (otros productos) o con la primera dilución inoculada o retenida contienen menos de 15 colonias, calcular el número estimado N_E de microorganismos presentes por gramo o cm^3 de producto como una media aritmética m de las colonias contadas en las dos placas utilizando la siguiente ecuación:

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times n \times d}$$

$\sum c$ = suma de las colonias contadas en las dos placas;

V = volumen inoculado en cada placa;

n = número de placas seleccionadas (en este caso, $n = 2$);

d = factor de dilución de la suspensión inicial o de la primera dilución inoculada o seleccionada ($d = 1$ cuando se inocula un producto líquido sin diluir).

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados:

Primera dilución retenida (10-2): 12 y 13 colonias.

$$N_E = \frac{12 + 13}{1 \times 2 \times 10^{-2}}$$

$$N_E = \frac{25}{0,02}$$

$$N_E = 1250$$

Redondeando:

$$N_E = 1300$$

$$N_E = 1,3 \times 10^3$$

(Continúa)

NTE INEN 1 529-5 2006-01

En los productos líquidos, $N_E = m$

9.2.2 Si las dos placas inoculadas con la muestra sin diluir (productos líquidos), o con la primera dilución o con la suspensión inicial (otros productos) no presentan colonias, expresar los resultados de la siguiente manera:

$$N_E \leq 1/d$$

En donde:

N_E = cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico
 d = factor de dilución (ver numeral 9.2.1)

10. INFORME DE RESULTADOS

10.1 Informar como número N de microorganismos por gramo o cm^3 de muestra utilizando solo dos cifras significativas, según lo indicado en el numeral 9.1.

10.1.1 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.1.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N de microorganismos/g o $cm^3 = 2,0 \times 10^6$

10.1.2 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.1, se expresaría de la siguiente manera:

- N_E de microorganismos/g o $cm^3 = 1,3 \times 10^3$

10.1.3 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N_E de microorganismos/g o $cm^3 \leq 1,0/d$

(Continúa)

-5-

2005-051

Figura 22. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529 5:2006 para aerobios mesófilos
 INEN, 2006

CDU: 683.1



AL 01-05-306

**Norma Técnica
Ecuatoriana
Obligatoria**

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES Y E. coli**

INEN 1 529-8

1990-02

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de coliformes fecales y las pruebas confirmatorias de Escherichia coli e identificación de las especies del grupo coliforme fecal.

2. TERMINOLOGIA

2.1 **Coliformes fecales.** Es un grupo de coliformes que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermenta la lactosa con producción de ácido y gas a temperatura entre 44 y 45,5 C. Este grupo contiene una alta proporción de E. coli, tipo I y II y que en general puede considerarse como equivalente a E. coli, siendo por ello útiles como indicadores de contaminación fecal en los alimentos.

2.2 **E. coli.** Es una especie bacteriana que a más de presentar las características del grupo coliforme fecal, produce indol a partir del triptófano; es positivo a la prueba del rojo de metilo y negativo a la de Voges Proskauer; no utiliza el citrato como única fuente de carbono. Las capas indol positivas se llaman E. coli Tipo I y se supone que su hábitat natural primario es el intestino.

2.3 **Recuento de coliformes fecales.** Es la determinación del número de coliformes fecales por gramo ó cm³ de muestra de alimento.

2.4 **Diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal.** Es el proceso realizado para confirmar la presencia de E. coli y diferenciar las especies y variedades del grupo coliforme fecal mediante el conjunto de pruebas bioquímicas conocidas como "IMVEC".

2.5 **IMVEC.** Es una designación mnemónica de un grupo de cinco pruebas bioquímicas que consiste en:

- I = Verificación de la producción de indol a partir del triptófano.
- M = Reacción del RM (rojo de metilo) para comprobar el descenso del pH del caldo glucosa tamponado.
- V = Reacción de VP (Voges-Proskauer); para comprobar la producción de acetoina a partir de glucosa.
- E = Prueba de Eijkman, para comprobar la termotolerancia o crecimiento a 44 - 45,5 ± 0,2 C.
- C = Utilización del citrato como fuente de carbono.

3. RESUMEN

3.1 Este método se basa en la prueba de Eijkman modificada para detectar la fermentación de la lactosa con producción de gas a 44 - 45,5 ± 0,2 C y complementada con la prueba de indol a esta temperatura, estos ensayos se realizan en caldo brillante-bilis lactosa y en caldo triptona partiendo de un inóculo tomado de cada tubo gas positivo del cultivo para coliformes totales, (ver INEN 1 529-8) e incubados a 45,5 ± 0,2 C. La confirmación de E. coli y la diferenciación de las especies y variedades del grupo coliforme fecal, se realizan mediante los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico.

(Continúa)

4. EQUIPO Y MATERIALES DE VIDRIO

4.1 Equipo usual en un laboratorio microbiológico en particular.

4.1.1 Citados en numeral 4 de la Norma INEN 1 529-6.

4.1.2 Placas porta objetos.

4.1.3 Baño de agua regulable a $44 - 45,5 \pm 0,2$ °C.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL) o similar; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.2 Caldo triptona; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.3 Agar eosina azul metileno (EMB); ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.4 Agar de contagio en placa (PCA); ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.5 Caldo MR-VP; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.6 Reactivos de Kovacs; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.7 Solución de Rojo de metilo; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.8 Solución de Creatina al 0,5%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.9 Solución alcohólica de α -naftol al 6%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.10 Solución de hidróxido de Potasio al 40%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.11 Agar citrato de Simons; ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.12 Solución alcohol-acetona; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.13 Solución fenicada de cristal violeta al 1%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

5.14 Solución fenicada de fucsina básica al 1%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

5.15 Solución de lugol; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

(Continua)

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Coliformes fecales

6.1.1 Simultáneamente con el ensayo confirmatorio de la Norma INEN 1 529-6 inocular dos o tres asas de cada uno de los tubos presuntamente positivos en un tubo conteniendo 10 cm³ de caldo BGBL (5.1) y en otro que contenga aproximadamente 3 cm³ de caldo triptona (5.2) (ver esquema 1).

6.1.2 Incubar estos tubos a 45,5 ± 0,2°C (baño María) por 48 horas.

6.1.3 al cabo de este tiempo anotar la presencia de gas en los tubos de BGBL y añadir dos o tres gotas del reactivo de Kovacs a los tubos de agua triptona. La reacción es positiva para el indol si en cinco minutos se forma un anillo rojo en la superficie de la capa de alcohol amílico; en la prueba negativa el reactivo de Kovacs conserva el color original.

6.1.4 Los cultivos gas positivos en caldo verde brillante bilis-lactosa incubados a 30 ó 35°C y a 45,5°C y que producen indol a 45,5°C son considerados coliformes fecales positivos.

6.2 Confirmación de *E. coli* y diferenciación de las especies del grupo mediante las pruebas IMVIC. En situaciones que justifiquen el esfuerzo y sean necesarias la conformación de *E. coli* y la diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal, realizar los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges Praskauer y citrato sódico (Pruebas IMVIC), de la siguiente forma:

6.2.1 De cada tubo de caldo BGBL que sea positivo para coliformes fecales (6.1), sembrar por estría un asa en una placa individual de agar eosina azul de metilo o agar VRB previamente seca e identificada.

6.2.2 Incubar las placas invertidas a 35 - 37°C por 24 horas.

6.2.3 Para confirmar la presencia de *E. coli*, de cada placa escoger 2 - 3 colonias bien aisladas y típicas (negra o nucleada con brillo verde metálico de 2 - 3 mm de diámetro) y sembrar en estría en tubos de agar PCA o agar nutritivo inclinado e incubar los cultivos a 35 - 37°C por 24 horas.

6.2.4 Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar PCA o nutritivo inclinado y teñirlos por el método de Gram, si se comprueba la pureza de los cultivos de sólo bacilos Gram. negativos no esporulados, utilizar éstos para la prueba IMVIC.

6.2.5 Prueba para indol Sembrar en un tubo de agua triptona un asa de cultivo puro (6.2.4), incubar 24 horas a 35 - 37°C. Añadir al tubo 0,5 cm³ del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo oscuro en la superficie del reactivo, indica una prueba positiva. En la prueba negativa el reactivo conserva el color original.

6.2.6 Prueba del rojo de metilo (RM). Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro (6.2.4) incubar 24 horas a 35 - 37°C, añadir a cada tubo aproximadamente 3 gotas de la solución de rojo de metilo, agitar; si el cultivo se torna rojo la prueba es positiva y negativa si hay viraje a amarillo.

(Continúa)

6.2.7 Prueba de Voges-Proskauer (VP). Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro (6.2.4) e incubar 24 horas a 35 - 37°C.

6.2.7.1 Luego de este periodo; añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:

- solución de creatina al 0,5% : 2 gotas
- solución alcohólica de α -naftol al 6% 3 gotas
- solución de hidróxido de potasio al 40% : 2 gotas.

6.2.7.2 Observar dentro de 15 minutos. La aparición de un color rosado o rojo brillante, generalmente al cabo de cinco minutos el resultado es positivo.

6.2.8 Prueba para la utilización del citrato. Un asa del cultivo puro (6.2.4) sembrar por estria en la superficie de la lengüeta de agar citrato inclinado e incubar 24 horas a 35 - 37°C. La reacción es positiva si hay crecimiento visible que se manifiesta por lo general en el cambio de color del medio, de verde a azul.

6.2.9 Considerar como E. coli a los microorganismos que presentan las siguientes características: bacilos Gram. negativos no esporulados que producen gas de la lactosa y reacción IMVEC ver Tabla 1.

7. CALCULOS

7.1 Coliformes fecales

7.1.1 Calcular la densidad de coliformes fecales sólo en base del número de tubos que a 45,5°C presentan gas en el caldo BEGL e Indol en el caldo triptona, seguir las instrucciones de los numerales 8, 9 y 10 de la Norma INEN 1 529-6

7.2 E. coli. Para determinar el NMP de E. coli proceder según las instrucciones de los numerales 8, 9 y 10 de la Norma INEN 1 529-6 basándose únicamente en todos los tubos que presentan bacilos con las características indicadas en el numeral 6.2.9.

8. INFORME DE RESULTADOS

8.1 Coliformes fecales. Reportar NMP de coliformes fecales/g ó cm³ de muestra.

8.2 E. coli

8.2.1 Reportar NMP de E. coli/g ó cm³ de muestra

(Continúa)

TABLA 1

CLASIFICACION DE LOS COLIFORMES POR LAS PRUEBAS "IMVIC"					
	Gas en caldo S.G.B.L. 44 - 45,5 C	Prueba del indol 44 - 45,5 C	MR	VP	Crecimiento en Citrato
E. coli					
- Tipico (tipo I)	+	+	+	+	+
-Atipico (tipo II)	-	-	+	+	+
Intermedios					
Tipicos (tipo II)	-	+	+	+	+
Atipicos (tipo I)	+	-	+	+	+
Enterobacter-ae rógenes:					
Tipico (tipo I)	-	+	+	+	+
Atipico (tipo II)	+	-	+	+	+
Enterobacter- cloacae					
Irregulares:					
- Tipo I	-	+	+	+	+
- Tipo II	+	-	+	+	+
- Tipo V.I	+	+	+	+	+
Irregulares, otros tipos:	V*	V*	V*	V*	V*

(Continua)

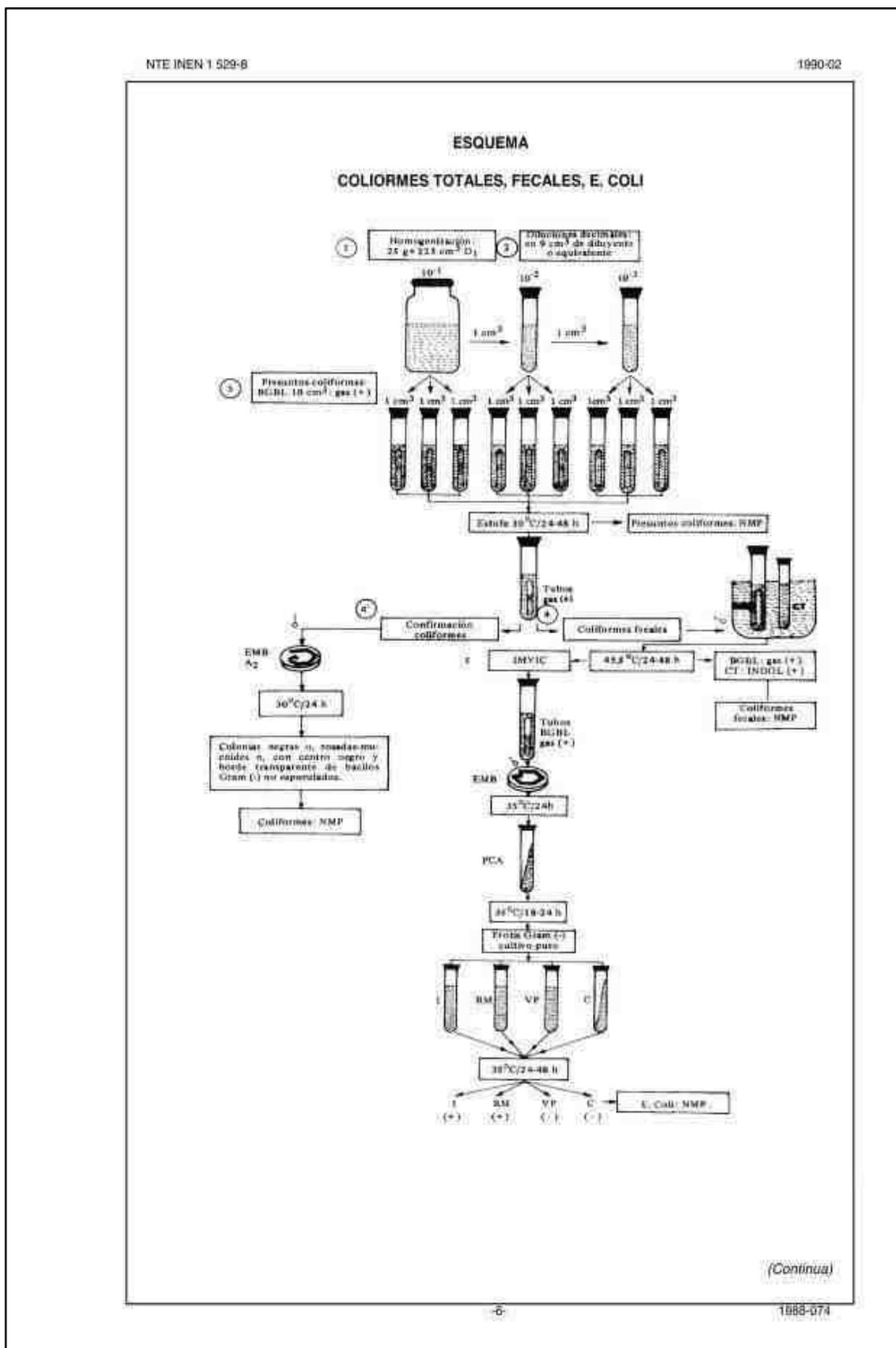


Figura 23. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529-8:1990

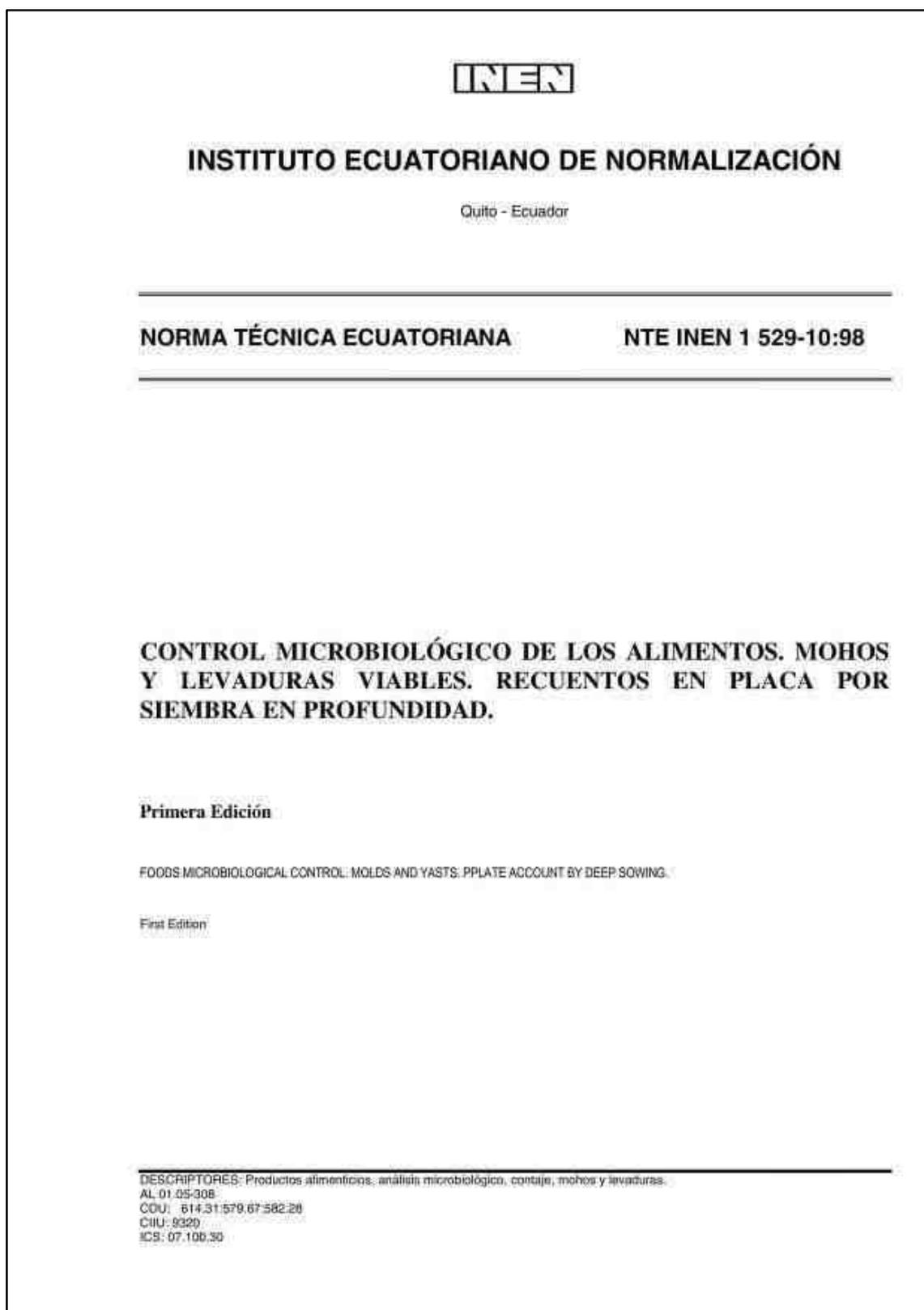
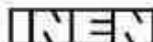


Figura 24. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529-10:1998 para mohos y levaduras
INEN, 1998

CDU: 614.31.579.67:582.28
ICS: 07.100.30



CIR: 6920
AL 01.05-308

Norma Técnica
Ecuatoriana
Opcional

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y
LEVADURAS VIABLES. RECUENTO EN PLACA POR SIEMBRA
EN PROFUNDIDAD**

**NTE INEN
1 529-10:98
1998-01**

1. OBJETO

1.1 Esta norma describe el método para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo o centímetro cúbico de muestra.

2. ALCANCE

2.1 Esta norma especifica el método de recuento, en placa, por siembra en profundidad, para el recuento de mohos y levaduras.

3. DEFINICIONES

3.1 Mohos. Son ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc., o los de presión osmótica elevada: productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.

3.2 Levaduras. Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovóidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. Al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.

3.3 Recuento de mohos y levaduras viables. Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22 C y 25 C.

4. RESUMEN

4.1 Este método se basa en el cultivo entre 22 C y 25 C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales.

5. MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO

5.1 Materiales. La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, Análisis microbiológicos, conteo, mohos y levaduras

5.1.1 Placas Petri

5.1.2 Pipetas serológicas de boca ancha de 1; 5 y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

5.2 Medio de cultivo

5.2.1 Agar sal-levadura de Davis o similar. Ver NTE INEN 1 529-1.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 Preparar la muestra según su naturaleza, utilizando uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Utilizando una sola pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. Iniciar por la dilución de menor concentración.

7.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm³ de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45 ± 2 C. La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.

7.3 Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de valvén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas del reloj. Volver a imprimir movimientos de valvén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y hacerla girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.

7.4 Utilizar una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debe exceder de 15 colonias/placa, durante 15 minutos de exposición. Este límite es mantenido mediante prácticas adecuadas de limpieza y desinfección.

7.5 Como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo verter aproximadamente 20 cm³ del agar.

7.6 Dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar.

7.7 Invertir las placas e incubarlas entre 22 C y 25 C, por cinco días.

7.8 Examinarlas a los dos días de incubación y comprobar si se ha formado micelio aéreo. Las primeras colonias que se desarrollan son las de levaduras, que suelen ser redondas, cóncavas, estrelladas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas. En ciertos casos, apenas cambian al envejecer, otras veces se desecan y encogen. Las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico.

7.9 Cuando el micelio aéreo de los mohos amenace cubrir la superficie de la placa, dificultando las lecturas posteriores; pasados dos días, realizar recuentos preliminares en cualquier placa que se pueda distinguir las colonias.

(Continúa)

7.10 A los cinco días, seleccionar las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y contarlas sin el auxilio de lupas. A veces pueden desarrollarse colonias pequeñas, estas son de bacterias acidófilas y, por tanto, deben excluirse del recuento. Las colonias de levaduras deben ser comprobadas por examen microscópico.

7.11 Contar las colonias de mohos y levaduras en conjunto o separadamente. Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra.

7.12 Cálculos

7.12.1 Cálculo del número (N) de unidades propagadoras (UP) de mohos y/o levaduras por centímetro cúbico ó gramo de muestra. Calcular según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde:

$\sum C$ = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo 10^{-2} ;

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa.

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{Volumen sembrado} &= 1 \text{ cm}^3 \\ \text{Dilución } 10^{-2} &= 83 \text{ y } 97 \text{ colonias} \\ \text{Dilución } 10^{-3} &= 33 \text{ y } 28 \text{ colonias} \\ \text{Número} &= \frac{83 + 97 + 33 + 28}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \end{aligned}$$

$$= \frac{241}{0,022}$$

$$= 10\ 954 \text{ expresado como } 1,1 \times 10^4$$

7.12.2 Redondeo. El valor obtenido redondear a dos cifras significativas de la siguiente manera (NTE INEN 52):

7.12.2.1 Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 553 000, redondeado a 550 000 y expresar como $5,5 \times 10^5$. Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor obtenido fue 10 954, redondearlo a 11 000 y expresar $1,1 \times 10^4$.

(Continua)

7.12.2.2 Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es seguido de, por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros a los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fue 31 554, redondearlo a 32 000 y expresar como $3,2 \times 10^4$. Si el tercer dígito es cinco y no es seguido de otro (s) dígito (s) ó lo es únicamente por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero conservarlo inalterado, ejemplo: 235 redondear a 240 y expresar como $2,4 \times 10^2$, 24 500 redondear a 24 000 y expresar como $2,4 \times 10^4$.

7.12.3 Presentación de resultados

7.12.3.1 Presentar el resultado como número, N, de unidades propagadoras UP de mohos y/o levaduras /cm³ ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^x (x es la respectiva potencia de 10). Las cifras significativas corresponden al primero y segundo dígitos (empezando por la izquierda) del número de las colonias calculadas (7.12.1).

7.12.3.2 Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la suspensión 10¹, presentar como número estimado (N_E), de la siguiente forma:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = < 1,0 \times 10^1$$

7.12.3.3 Si no hay desarrollo de colonias en las placas sembradas con 1 cm³ de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 = < 1,0 \times 10^0$$

7.12.3.4 Si todas las placas sembradas presentan más de 150 colonias, calcular el resultado a partir de las placas sembradas con la dilución más alta y expresar de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = > \text{ al valor obtenido } \times f$$

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra).

Indicar entre paréntesis la dilución utilizada. Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores N.

8. PRECISIÓN DEL MÉTODO

8.1 Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.

8.1.1 Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y del 10% cuando es realizado por otra persona.

8.1.2 Por razones estadísticas, el intervalo de confianza para este método varía, en el 95% de los casos, desde $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$. En la práctica, es posible observar variaciones mayores, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas.

(Continúa)

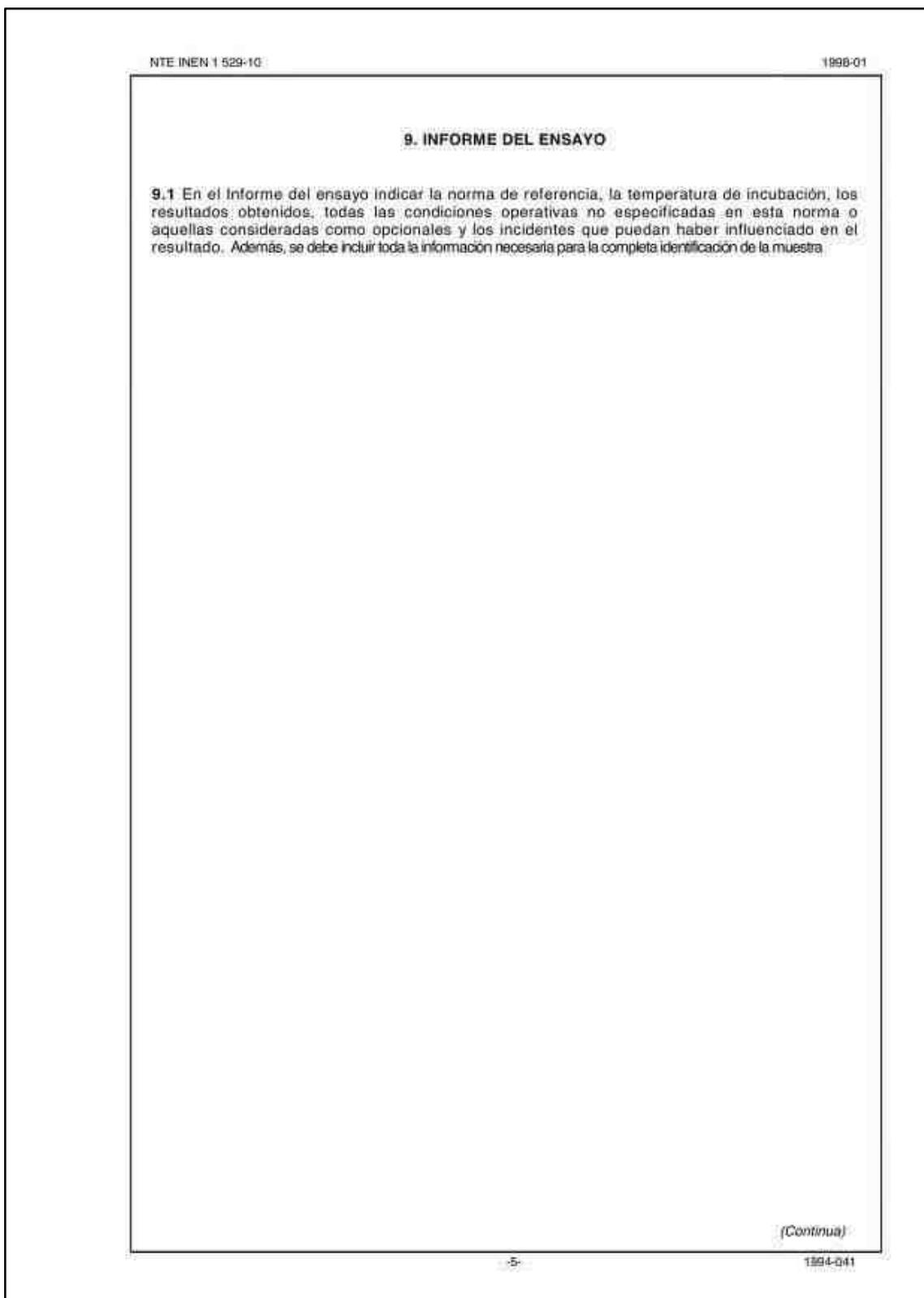


Figura 25. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 1 529-10:1998 para mohos y levaduras – recuento en placas
INEN, 1998

9.11 Anexo 11. Norma técnica ecuatoriana - NTE INEN 2 337:2008

NTE INEN 2 337

2008-12

TABLA 1. Especificaciones para los jugos o pulpas de fruta

FRUTA	Nombre Botánico	Sólidos Solubles ⁸¹ Mínimo NTE INEN 380
Acerola	<i>Malpighia sp</i>	6,0
Albaricoque (Damasco)	<i>Prunus armeniaca</i> L.	11,5
Aarándano (mirtilo)	<i>Vaccinium myrtillus</i> L. <i>Vaccinium corymbosum</i> L. <i>Vaccinium angustifolium</i>	10,0
Arazá	<i>Eugenia stipitata</i>	4,8
Bábaco	<i>Carica pentagonia</i> Heilb	5,0
Banano	<i>Musa</i> , spp	21,0
Borojo	<i>Borojia</i> spp	7,0
Carambola (Grosella china)	<i>Averrhoa carambola</i>	5,0
Claudia ciruela	<i>Prunus domestica</i> L.	12,0
Coco (1)	<i>Cocos nucifera</i> L.	5,0
Coco (2)	<i>Cocos nucifera</i> L.	4,0
Durazno (Melocotón)	<i>Prunus persica</i> L.	9,0
Frutilla	<i>Fragaria</i> spp	6,0
Frambuesa roja	<i>Rubus idaeus</i> L.	7,0
Frambuesa negra	<i>Rubus occidentalis</i> L.	11,0
Guanábana	<i>Anona muricata</i> L.	11,0
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	5,0
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	8,0
Litchi	<i>Litchi chinensis</i>	11,0
Lima	<i>Citrus aurantifolia</i>	4,5
Limón	<i>Citrus limon</i> L.	4,5
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	10,0
Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	11,0
Manzana	<i>Malus domestica</i> Borkh	6,0
Maracuyá (Parchita)	<i>Passiflora edulis</i> Sims	12,0
Marañón	<i>Anacardium occidentale</i> L.	11,5
Melón	<i>Cucumis melo</i> L.	5,0
Mora	<i>Rubus</i> spp.	6,0
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	9,0
Naranjailla (Lulo)	<i>Solanum quitoense</i>	6,0
Papaya (Lechosa)	<i>Carica papaya</i>	8,0
Pera	<i>Pyrus communis</i> L.	10,0
Piña	<i>Ananas comosus</i> L.	10,0
Sandia	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb	6,0
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i> L.	18,0*
Tomate de árbol	<i>Cyphomandra betacea</i>	8,0
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	4,5
Toronja (Pomelo)	<i>Citrus paradisi</i>	8,0
Uva	<i>Vitis</i> spp.	11,0

⁸¹ En grados Brix a 20 °C (con exclusión de azúcar)

(1) Este producto se conoce como "agua de coco" el cual se extrae directamente del fruto sin exprimir la pulpa.

(2) Es la emulsión extraída del endosperma (almendra) maduro del coco, con o sin adición de agua de coco.

* Para extraer el jugo del tamarindo debe hacerse en extracción acuosa, lo cual baja el contenido de sólidos solubles desde 60 °Brix, que es su Brix natural, hasta los 18 °Brix en el extracto.

NOTA 1: Para las frutas que no se encuentran en la tabla el mínimo de grados Brix será el Brix del jugo o pulpa obtenido directamente de la fruta.

(Continúa)

NTE INEN 2 337

2008-12

TABLA 4. Requisitos microbiológicos para los productos pasteurizados

	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes NMP/cm ³	3	< 3	—	0	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm ³	3	< 3	—	0	NTE INEN 1529-8
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UP/cm ³	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-10

En donde:

- NMP = número más probable
 UFC = unidades formadoras de colonias
 UP = unidades propagadoras
 n = número de unidades
 m = nivel de aceptación
 M = nivel de rechazo
 c = número de unidades permitidas entre m y M

5.5.4 Los productos envasados asepticamente deben cumplir con esterilidad comercial de acuerdo a la NTE INEN 2 335

5.6 Contaminantes

5.6.1 Los límites máximos de contaminantes no deben superar lo establecido en la tabla 5

TABLA 5. Límites máximos de contaminantes

	Límite máximo	Método de ensayo
Arsénico, As mg/kg	0,2	NTE INEN 269
Cobre, Cu mg/kg	5,0	NTE INEN 270
Estaño, Sn mg/kg *	200	NTE INEN 385
Zinc, Zn mg/kg	5,0	NTE INEN 399
Hierro, Fe mg/kg	15,0	NTE INEN 400
Plomo, Pb mg/kg	0,05	NTE INEN 271
Patulina (en jugo de manzana)**, mg/kg	50	AOAC 49.7.01
Suma de Cu, Zn, Fe mg/kg	20	

* En el producto envasado en recipientes estañados
 ** La patulina es una micotoxina formada por una lactona hemiacetálica, producida por especies del género *Aspergillus*, *Pericillium* y *Byssoclamys*.

5.7 Requisitos Complementarios

5.7.1 El espacio libre tendrá como valor máximo el 10 % del volumen total del envase (ver NTE INEN 394).

5.7.2 El vacío referido a la presión atmosférica normal, medido a 20 °C, no debe ser menor de 320 hPa (250 mm Hg) en los envases de vidrio, ni menor de 160 hPa (125 mm Hg) en los envases metálicos. (ver NTE INEN 392).

(Continúa)

Figura 26. NTE INEN 2 337:2008
INEN, 2008