



*Evaluación de propóleo como conservante natural en la leche  
chocolatada*

Xavier Andrés Cedeño Carpio

2018



*Evaluación de propóleo como conservante natural en la leche  
chocolatada*

Disertación para la obtención de Grado de Máster en Gestión de Calidad y Seguridad  
Alimentaria

Xavier Andrés Cedeño Carpio

Trabajo realizado bajo la orientación de:

Clélia Neves Afonso, Professora Adjunta da ESTM-IPLeiria.

Alex Dueñas Rivadeneira, Professor da Universidad Técnica de Manabí.

2018

**Título:** “Evaluación de propóleo como conservante natural en la leche chocolatada”

Copyright © Xavier Andrés Cedeño Carpio

Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação /trabalho de projeto/relatório de estagio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repósitorios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição como objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja crédito ao autor e editor.

### **Agradecimiento**

Este agradecimiento va dirigido en primer lugar a Dios, por haberme dado la bendición de la vida y salud durante el tiempo que me encontré fuera de mi hogar, sobre todo el don de la inteligencia que me permitió asimilar los conocimientos impartidos por los docentes. En segundo lugar agradezco a la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología, Innovación (SENESCYT), por la oportunidad brindada al otorgarme una beca para cursar estudios de cuarto nivel en un país europeo. En tercer lugar agradezco a mi familia por el apoyo integral a lo largo de las diversas etapas de mi formación tanto personal como profesional; de manera especial agradezco a mi abuelito Carlos Carpio por todo los aprendizajes que adquirí en base a su experiencia profesional. A mi mamá, Shirley Carpio por estar pendiente de mí, por su paciencia y estímulo para seguir avanzando en cada una de las fases de mi trabajo de disertación.

Dentro de estas líneas merece un reconocimiento también el personal docente de la maestría de Gestión de Calidad y Seguridad Alimentaria, por la enseñanza de procedimientos e implementación de técnicas innovadoras que fomentaron mi enriquecimiento profesional; menciono aquí la labor de la Dra. Clélia Neves Afonso, que se desempeñó como mi tutora. Así mismo, destaco al Dr. Alex Dueñas Rivadeneira, docente de la Universidad Técnica de Manabí, quien se desempeñó como mi tutor, él estuvo al pendiente de cada uno de los procesos de pesquisa y se constituyó en el nexo establecido con otros profesionales como la Dra. Dania Feraud y el Dr. Jorge Alpízar, que aportaron con sus respectivas especialidades en mi investigación.

## Resumen

El propóleo es una sustancia producida por abejas con la finalidad de mantener las condiciones ideales del ambiente interno de la colmena, evita el crecimiento de microorganismos que provocan alteraciones en la miel. Sus propiedades pueden ser exploradas como aditivo alimentario natural, en cuyo caso se ha probado su uso como conservante natural en la leche con chocolate. El objetivo del trabajo fue utilizar un extracto etanólico de propóleo para prolongar la vida útil de la leche chocolatada, sin afectar sus características físicas, químicas y organolépticas. Se utilizaron tres concentraciones: 0,5 ml.L<sup>-1</sup>, 1 ml.L<sup>-1</sup>, 1,5 ml.L<sup>-1</sup>, de extracto etanólico de propóleo en leche chocolatada, conservado durante cinco semanas, evaluando la eficacia del extracto en comparación con el control sin conservante, y en presencia del sorbato de potasio. Se registraron los valores de pH, características físico-químicas, acidez titulable y parámetros biológicos establecidos por los reglamentos aplicables (con determinación de mesófilos aerobios, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*). Además, la aceptación de la leche chocolatada fue evaluada por medio de un panel sensorial validado. Los resultados indicaron que en cinco semanas de tratamiento, el extracto etanólico de propóleo tiene un efecto inhibitor sobre las bacterias aerobias mesófilas y coliformes totales en concentraciones de 0,5 ml.L<sup>-1</sup> de extracto etanólico de propóleo, no se registró alteraciones de las características físico-químico. En el panel sensorial, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero los datos mostraron una tendencia a una mejor aceptación organoléptica en los tratamientos con 1 ml.L<sup>-1</sup> de extracto etanólico de propóleo.

**Palabras claves:** bioconservador, extracto etanólico de propóleo, leche chocolatada, inhibitor, análisis sensorial.

## Resumo

O própolis é uma substância produzida por abelhas com a finalidade de manter as condições ideais do ambiente interno da colmeia, evita o crescimento de microrganismos que provocam alterações do mel. Suas propriedades podem ser exploradas como um aditivo alimentar natural, sendo neste caso testada a sua utilização com conservante natural no leite com chocolate. O objetivo do presente trabalho é utilizar um extrato etanólico de própolis para prolongar a vida útil do leite achocolatado, sem afetar as suas características físicas, químicas e organolépticas. Foram utilizadas três concentrações: 0,5 ml.L<sup>-1</sup>, 1 ml.L<sup>-1</sup> e 1,5 ml.L<sup>-1</sup> de extrato etanólico de própolis em leite achocolatado, conservado durante 5 semanas, avaliando-se a eficácia do extrato comparativamente ao controle sem conservante e na presença de sorbato de potássio. Foram registrados os valores de pH, características físico-químicas, acidez titulável e parâmetros biológicos estabelecidos pelos regulamentos aplicáveis (com determinação de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*). Além disso, a aceitação foi avaliada por meio de um painel sensorial validado. Os resultados indicam que em cinco semanas de tratamento, o extrato de própolis tem um efeito inibidor sobre as bactérias aeróbias mesófilas e coliformes totais em concentrações de 0,5 ml.L<sup>-1</sup> de extrato de própolis, não se registrando alteração das características físico-químicas. No painel sensorial, não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas os dados mostram uma tendência para uma melhor aceitação organoléptica nos tratamentos com 1 ml.L<sup>-1</sup> de extrato etanólico de própolis.

**Palavras-chave:** bioconservante, extrato etanólico de própolis, leite achocolatado, inibição, análise sensorial.

## Índice de contenido

Derecho de autor .....	iii
Agradecimiento .....	iv
Resumen .....	v
Resumo .....	vi
Índice de contenido .....	vii
Índice de tablas .....	ix
Índice de anexos.....	ix
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1. Objetivo General .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 2 - REVISIÓN DE LA LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. La industria láctea.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Leche.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.1. Composición de la leche.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Características esenciales de la leche.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Productos lácteos .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Cacao .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.1. Composición química.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.2. Cacao en polvo.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Leche chocolatada .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6. Propóleo .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6.1. Características fisicoquímicas y organolépticas del propóleo .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6.2. Propiedades del propóleo.....</b>	<b>16</b>
<b>2.7. Propiedades farmacológicas .....</b>	<b>16</b>
<b>2.9. Calidad del propóleo .....</b>	<b>17</b>
<b>2.10.1. ¿Cómo conservante natural?.....</b>	<b>19</b>
<b>2.11. Aditivos alimentarios .....</b>	<b>20</b>
<b>2.11.1. Sorbato de potasio y benzoato de sodio .....</b>	<b>22</b>
<b>2.11.2. Gelificantes, espesantes y estabilizantes .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 3 – METODOLOGÍA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Materiales y métodos .....</b>	<b>25</b>

3.2.	Ubicación geográfica del ensayo .....	25
3.2.	Equipos, materiales, implementos, herramientas y materia prima .....	25
3.2.1.	Equipos.....	25
3.2.2.	Materiales de Laboratorio .....	25
3.2.3.	Implemento y Herramientas.....	26
3.2.4.	Reactivos .....	26
3.2.5.	Materia Prima .....	27
3.2.6.	Aditivos.....	27
3.2.7.	Conservantes.....	27
3.3.	Estandarización del proceso.....	27
3.3.1.	Obtención del extracto etanólico del propóleo (EEP) .....	29
3.3.2.	Elaboración de la leche chocolatada con extracto etanólico de propóleo (EEP) 30	
3.4.	Diseño experimental.....	32
3.4.1.	Análisis estadísticos .....	32
3.5.	Análisis microbiológico .....	33
3.5.1.	Recuento total <i>Aerobios Mesófilos</i> .....	33
3.5.2.	Recuento de <i>coliformes</i> .....	33
3.5.3.	Aislamiento de <i>Salmonella spp</i> .....	33
3.5.4.	Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
3.6.	Análisis físico-químico .....	34
3.6.1.	pH .....	34
3.6.2.	Acidez titulable .....	34
3.7.	Análisis sensorial .....	35
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>36</b>
4.1.	Resultados de la estandarización del proceso .....	37
4.2.	Resultado de análisis microbiológicos .....	38
4.3.	Resultados de los análisis físico-químicos .....	45
4.4.	Resultado del análisis del panel sensorial.....	50
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSIONES .....</b>		<b>56</b>
5.1.	Conclusiones .....	57
<b>CAPÍTULO 6 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>58</b>
6.1.	Bibliografía .....	59
<b>CAPÍTULO 7 - ANEXOS.....</b>		<b>63</b>

## Índice de tablas

Tabla 2. 1. Composición de la leche de diferentes especies por cada (100 gramos).....	9
Tabla 2. 2. Concentraciones minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml) .....	9
Tabla 2. 3. Productos lácteos y derivados .....	11
Tabla 2. 4. Valor nutricional del cacao en polvo (100g).....	14
Tabla 2.5. Características generales para la evaluación de la calidad del propóleo. ....	18
Tabla 2. 6. Aditivos con actividad conservantes más utilizados en la Unión Europea (UE) .....	21
Tabla 2. 7. Comparación de gelificantes, espesantes y estabilizantes.....	22
Tabla 3. 1. Resultados de las muestras preliminares de estandarización de proceso.....	27
Tabla 3. 2. Descripción de los tratamientos en estudio .....	32
Tabla 4. 1. Resultados de la estandarización del proceso .....	37
Tabla 4. 2. Resultados de los análisis microbiológicos en la leche chocolatada.....	44
Tabla 4. 3. Resultados de análisis físico-químico de tratamiento pH y acidez titulable .....	45
Tabla 4. 4. Resultado de análisis físico-químicos de semana de pH y acidez titulable.....	48
Tabla 4. 5 Resultado de las medias del anova de un factor para la prueba sensorial .....	51

## Índice de figuras

Figura 3. 1. Flujograma de obtención del extracto etanólico de propóleo. ....	30
Figura 3. 2. Flujograma de elaboración de leche chocolatada con extracto etanólico. ....	31
Figura 4. 1. Análisis de tratamiento de tratamiento de pH.....	47
Figura 4. 2. Análisis de tratamiento de acidez titulable. ....	46
Figura 4. 3. Análisis de semana de acidez titulable.....	49
Figura 4. 4. Análisis de semana de pH.....	50
Figura 4. 5. Media de Apariencia.....	51
Figura 4. 6. Media de Color .....	52
Figura 4. 7. Media de olor .....	53
Figura 4. 8. Media de Sabor .....	54
Figura 4. 9. Media de Textura.....	55

## Índice de anexos

Anexo 7. 1. Formato de test sensorial realizada en la metodología que fue evaluado por los panelistas.....	64
Anexo 7. 2. Placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) .....	67
Anexo 7. 3. Test sensorial realizado a los jueces afectivos.....	69

# **CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Introducción**

La ciencia y tecnología de los alimentos comprende desde la salud hasta el vínculo del bienestar en el consumo de los alimentos. El desarrollo en formas considerables permite cumplir grandes objetivos en la industria alimenticia con parámetros diversos como la higiene, seguridad y producción. Al conocer que la leche y los productos lácteos al ser transformados necesitan de técnicas y envases adecuados que prolonguen la duración del producto, es necesario agregar conservantes de origen químicos y/o naturales, donde el propóleo puede ser empleado como un conservante de origen natural. La leche con sabores es una bebida láctea que se elabora con saborizantes y azúcar, normalmente es enriquecida con vitaminas y calcio; tradicionalmente su consumo se direcciona hacia la población infantil.

La innovación del consumo es bajo en comparación con otros productos como las bebidas gaseosas sin alcohol, para los consumidores que no desean desistir del sabor, la salud o la practicidad, la leche chocolatada está demostrando ser una alternativa popular, recientemente se ha centrado en sabores para los adultos, el deleite irresistible y la regeneración del envasado hace ampliar las expectativas de los consumidores. “La leche chocolatada es un alimento de sabor dulce que se consume en estado de refrigeración, se prepara y constituye exclusivamente por leche entera o semidescremada, y con la adición de sustancias aromatizadas naturales” (Cando, 2010).

La leche modificada se puede elaborar a partir de la leche entera, parcialmente descremada o descremada, pasteurizada o sometida a tratamiento UHT, o a esterilización comercial. Muchas veces se puede agregar en la formulación suero de leche en polvo que va a depender de los niveles de grasas iniciales a estos se le ha adicionado saborizantes, aromatizantes, estabilizantes y conservantes autorizados, con el objetivo de lograr un producto con características organolépticas diferentes a la leche natural. Los aditivos alimentarios son agregados de forma deliberada a los alimentos en pequeñas cantidades, con el fin de modificar sus características organolépticas, sus técnicas de elaboración y preservación, o para mejorar la adaptación del uso al que son destinados.

Cualquier sustancia que no se consuma normalmente, ni tampoco se utilice como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutricional, y cuya adición intencionada al alimento con

finos 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) para si, o para sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. (Codex Alimentarius, 1995)

Los aditivos tienen un papel fundamental a la hora de mejorar las propiedades físicas de los alimentos, su objetivo es aportar aroma, color, sabor, y a su vez, vida útil al producto para alargar la conservación, esto hace que los alimentos continúen siendo seguros, nutritivos y apetecibles hasta su consumo. Los conservantes tienen un rol dentro de la preservación de las leches saborizadas, son la parte funcional para ampliar la variedad de los compuestos que ayudan a retrasar o prevenir la proliferación bacteriana y proteger los productos del deterioro. “El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores” (Calvo, 2002).

Entre el 2012 y el 2015 se declaró que las leches saborizadas son el segundo producto lácteo líquido de mayor proporción, con un 13% de consumo en el mundo después de la leche blanca, lo cual demandó oportunidades para las empresas lácteas, para estimular el aumento de ingresos y ganancias. “El aumento de  $4,1 \text{ ml.L}^{-1}$  tasa de crecimiento anual compuesto (TCAC), ha superado el crecimiento previsto de 1,7% para la leche blanca y del 2,4 % para los productos lácteos líquidos en conjuntos durante el mismo período” (Jönsson, 2013).

Las estadísticas reflejadas en el párrafo anterior permiten conocer el consumo anual de leche a nivel mundial. Existen, tres impulsores que promueven el crecimiento del consumo de la leche saborizada: en primer lugar, se encuentra la tendencia de que los consumidores de los países en vías de desarrollo, buscan en el mercado productos ricos en nutrientes y que no incidan negativamente en su salud. Como segundo punto se halla la modernidad que ha motivado a la población a adquirir un estilo de vida urbano; por este motivo los consumidores escogen los productos más innovadores respecto al diseño del envase, debido a que este permitirá dejar su sello personalizado en relación a las otras marcas. A este segundo punto se puede anexar el tercero, ya que los consumidores a más

de tomar en cuenta la presentación, también condicionan su decisión por la curiosidad de ingerir bebidas lácteas y saborizadas que son nuevas en el mercado.

En el Ecuador los principales consumidores de bebidas lácteas y saborizadas, son los habitantes con edades que oscilan entre los 3 y 12 años, ellos representan el 10% del consumo en el Ecuador. “El consumidor ecuatoriano antes de comprar un producto lácteo, se preocupa por factores como la salud y la economía, porque se siente atraído por un sabor diferente ante la leche común” (Edairynews, 2013).

Los conservantes que se emplean en el Ecuador son en su mayoría sustancias naturales y artificiales, éstas se utilizan en la preservación de los alimentos ante la eminente acción de los microorganismos, para reducir el deterioro por un lapso de tiempo determinado, bajo las condiciones de almacenamiento adecuadas; esto depende del tipo de sustancia, el tiempo de exposición y la cantidad que se adicionará, de lo cual podría resultar carcinogénico (nitrocompuestos), mutagénicos (nitrosaminas), o producir disturbios metabólicos (anhídrido sulfuroso, ácido benzoico y otros).

El propóleo es un conservante natural que posee una condición semejante a los conservantes químicos, los cuales son utilizados actualmente en la industria alimentaria; las biomoléculas del propóleo se presentan como una técnica que permite reemplazar dichos conservantes tradicionales. “El propóleo hasta el momento no presenta efectos indeseables o perjudiciales para la salud del consumidor” (Suárez H., 2012). Utilizar estos efectos positivos del propóleo en productos lácteos saborizados permitirá la generación de una producción con mayores índices de durabilidad. El enfoque de la investigación fue la obtención de una alternativa bioconservadora con el extracto etanólico de propóleo (EEP), siendo éste adicionado a varias muestras, con la finalidad de reducir el crecimiento de microorganismos, así se extenderá la vida útil de la leche chocolatada, *cumpliendo con los objetivos del buen vivir de los ecuatorianos*. Con la implementación del extracto etanólico de propóleo como bioconservador será factible mejorar la calidad de la leche chocolatada, y que conserven las características organolépticas deseables al consumidor.

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca en el Ecuador la producción diaria de leche es de 5,4 millones de litros, de los cuales 4 millones son

distribuidos en los diferentes mercados, éstos se desglosan en: 2,8 millones que se procesan en las industrias formales; y los 1,2 millones de litros restantes son vendidos informalmente para elaborar quesos artesanales. Además, se conoce que “1,4 millones de litros quedarían en las haciendas para autoconsumo y para alimentación de terneros” (MAGAP, 2016).

El Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), el 18% del ganado vacuno del país está en Manabí. Según cifras del 2012, de las 5,2 millones de reses que se contabilizaron en el país, 977.000 son de la provincia antes mencionada, por esta razón Manabí es considerada la provincia con mayor producción nacional.

Considerando el principio de conservación de los alimentos, se considera que para prolongar su vida útil se debe emplear tratamientos térmicos, envases adecuados y/o conservantes; los mismos que en las líneas de producción de mercadeo garantizarán la salida de alimentos seguros, inocuos e higienizados. El cumplimiento de los parámetros referidos, permitirá hacer frente a las eminentes amenazas procedentes del deterioro o hasta de la toxicidad del alimento; y de la acción desfavorable de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos. La eficacia y eficiencia de los procedimientos se demuestra mediante los análisis físicos, químicos y microbiológicos que aseguran la calidad del producto.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Evaluar el propóleo como conservante natural en leche chocolatada y su incidencia en las características organolépticas.

### **1.2.2. Objetivos Específicos.**

- Estandarizar el proceso de la leche con extracto etanólico de propóleo.
- Evaluar diferentes porcentajes de propóleo como conservante de leche chocolatada.
- Determinar la aceptación de los tratamientos mediante un panel sensorial.

# **CAPÍTULO 2 - REVISIÓN DE LA LITERATURA**

## **2.1. La industria láctea**

El desarrollo de las industrias lecheras ha generado una incidencia en la alimentación cotidiana, la cual se evidencia en el incremento de productos lácteos disponibles en la dieta diaria de niños, adolescentes y ancianos. Existe en el mercado una alta gama de productos que utilizan la leche como materia prima, entre ellos, los de mayor consumo son: bebidas lácteas, yogures, quesos, manjar de leche, cremas, mantequillas y otros. “La leche se utiliza en la elaboración de productos fermentados y no-fermentados” (Rouco & Martínez, 2010).

En el contexto ecuatoriano, puede señalarse que esta nación ubicada al noroeste de América del Sur, cuenta con una población aproximada es de 14 millones de habitantes. A pesar de su reducida extensión geográfica Ecuador se destaca por su desarrollo cultural, amplia biodiversidad y abundancia de recursos naturales; características que lo han situado en el lugar 17 del grupo de países considerados mega diversos a nivel mundial (Rubio N., 2011). Dentro de esta descripción se encuentran inmersas las actividades ganaderas, que para efectos de esta investigación se centran la leche, misma que como indica el acápite anterior ha logrado un desarrollo a nivel del tratamiento que le ha proporcionado la industria láctea.

### **2.1. Leche**

En referencia al tema de la leche son diversos los autores que han realizado la descripción de este vocablo; una de las conceptualizaciones establece que la leche es “el producto íntegro y fresco que proviene del ordeño de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo; exenta de calostro y que cumpla con las características físicas y microbiológicas establecidas” (Leyva, 1996). Mientras que, otra reseña menciona que ésta es “un líquido de composición compleja, blanco y opaco de sabor ligeramente dulce y de pH cercano a la neutralidad” (Ludueñas & Valdivia, 1997). Y una tercera definición establece que, “la leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión verdadera, y presenta sustancias definidas como: agua grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales.” (Agudelo Gómez & Bedoya Mejía, 2005)

### 2.1.1. Composición de la leche

La composición de la leche varía considerablemente de acuerdo a la especie, estado de lactancia, alimento, época del año y otros factores que inciden en el espécimen. Algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizadas para indicar si ha ocurrido alguna adulteración en la composición de la leche. A continuación la tabla 2.1 muestra los nutrientes que se encuentran en cada 100 gramos de leche producida por diferentes especies.

**Tabla 2. 1. Composición de la leche de diferentes especies por cada (100 gramos)**

Nutriente	Vaca	Búfalo	Mujer
Agua, g	88,00	84,0	87,5
Energía, kcal	61,0	97,0	70,0
Proteínas, g	3,2	3,7	1,0
Grasa, g	3,4	6,9	4,4
Lactosa, g	4,7	5,2	6,9
Minerales, g	0,72	0,79	0,20

**Fuente:** (Agudelo Gómez & Bedoya Mejía, 2005)

La leche es una excelente fuente de minerales para el crecimiento del lactante. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte, debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. La tabla 2.2 muestra las concentraciones de minerales y vitaminas en la leche (mg/100ml).

**Tabla 2. 2. Concentraciones de minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml)**

Minerales	Mg/100ml	Vitaminas	µg/100ml <sup>1</sup>
Potasio	138	Vit A	30,0
Calcio	125	Vit D	0,06
Cloro	103	Vit. E	88,0
Fósforo	96	Vit. K	17,0
Sodio	8	Vit. B1	37,0
Magnesio	12	Vit B12	0,42
Minerales trazas <sup>2</sup>	< 0,1	Vit. C	1,7

**Fuente:** (Agudelo Gómez & Bedoya Mejía, 2005)

<sup>1</sup> µg/100ml = 0,001 gramo

<sup>2</sup> Incluyendo cobalto, cobre, hierro manganeso, molibdeno, zinc, selenio, yodo y otros.

## **2.2. Características esenciales de la leche**

La leche es un líquido que se constituye de materia grasa de forma globular, muestra analogías con el plasma sanguíneo; contiene una suspensión de materias protéicas en un suero constituido por “una solución neutra que contiene principalmente, lactosa y sales minerales” (Alais, 2003).

La alteración y variabilidad de la leche se condiciona por factores ambientales como el espacio de desarrollo, el clima, la alimentación del espécimen; a esto se suma la inadecuada asepsia que tiene el personal que se dedica al ordeño del ganado vacuno. Estos aspectos proliferan numerosos microorganismos que degradan la lactosa, produciendo ácido láctico, ocasionando así, la floculación de una parte de las proteínas.

Además, la producción de leche está condicionada por la transición del ciclo de lactación “época del nacimiento, la mama segrega el calostro, líquido que se diferencia principalmente de la leche en sus partes proteicas y salina” (Alais, 2003).

## **2.3. Productos lácteos**

El inicio de la industria láctea por satisfacer las demandas del consumidor, se centró en la elaboración de productos de primera necesidad, procedentes de la leche como: quesos, mantequillas, requesones, entre otros. Éstos dejaban como residuo el suero lácteo, el cual presentaba propiedades mínimas en proteínas y caseínas que no eran aprovechadas; y se desechaban en los afluentes aledaños donde se elaboraban dichos productos, convirtiéndose en contaminantes de las aguas fluviales y de los suelos porque los desmineralizaban. Se conoce que desde la antigüedad, uno de los usos que se daba al suero lácteo era para la alimentación del ganado porcino; aunque en la actualidad en algunos contextos como el de Ecuador esta práctica todavía prevalece.

Sin embargo, con el paso de los años, estudios han determinado que dicho suero posee propiedades que han sido aprovechadas, siendo una de éstas la de preservante atomizador para las carnes frescas y embutidos. Así como también se emplea, para la elaboración de bebidas lácteas, helados, cuya implementación se realiza en cantidades proporcionales. En relación a la leche se debe considerar que, “la leche fresca es preciso someterla a algún proceso que garantice su conservación y valor nutritivo” (Suárez M., 2011).

Referencias bibliográficas concuerdan con lo descritos en los acápite anteriores, al respecto se señala:

Antes de la moderna era industrial existían pocos productos lácteos; esencialmente estaban constituidos por la leche entera y desnatada, la nata, la mantequilla y los quesos (maduros y duros). Se desconocían los métodos para conservar la totalidad de los componentes de la leche y solamente los elementos insolubles (caseína y grasa) podían conservarse durante bastante tiempo en forma de queso o mantequilla, pero la parte soluble se despreciaba o se utilizaba de manera errónea. (Alais, 2003)

A continuación la tabla 2.3 presenta una descripción de productos lácteos y sus derivados.

**Tabla 2. 3. Productos lácteos y derivados**

	<b>Definición</b>	<b>Productos</b>
<b>Leche líquida</b>	Producto lácteo más consumido, elaborado y comercializado.	Leche pasteurizada, leche desnatada, leche normalizada, <i>leche saborizada</i> , leche de larga conservación (UHT).
<b>Leche fermentada</b>	Se obtiene de la fermentación de la leche, utilizando microorganismos adecuados para llegar a un nivel deseado de acidez.	Yogur, kumys, dahi, laban, ergo, tarag, ayran, kurut y kefir.
<b>Leche en polvo</b>	Se obtiene de la deshidratación de la leche.	Leche en polvo o gránulos.
<b>Queso</b>	Se obtiene mediante la coagulación de la proteína de la leche (caseína), que se separa del suero. Existen duros, semiduros, blandos madurados o no madurados.	Ayib, gibna, bayda, chanco, queso fresco, akawieh, mozzarella, cheddar y otros.
<b>Suero</b>	Se obtiene de la leche desnatada mediante precipitación con el cuajo o mediante bacterias inocuas productoras de ácido láctico.	Bebidas con sueros

**Fuente:** (FAO, 2016)

## 2.4. Cacao

Etimológicamente el cacao es conocido como *Theobroma cacao*, “Theobroma es un término genérico que significa “comida” (del griego broma=comida y The=Dios) “comida de los dioses; el cacao se deriva del náhuatl (lengua azteca) palabra “xocolatl”, de “Xococ” (amargo) y “atl” (agua)” (Conti, Poli, Paoletti, & Visioli, 2012).

Una vez consideradas las raíces etimológicas del cacao, resulta importante realizar una referencia conceptual de esta materia prima. Al respecto, puede indicarse que el cacao “es una planta tropical que crece en climas cálidos y húmedos, existen cuatro productos que se derivan del cacao en grano: licor de cacao, manteca de cacao, torta de cacao, y cacao en polvo” (Cando, 2010).

### 2.4.1. Composición química

La complejidad del grano de cacao se encuentra en la composición química del mismo, la cual depende del crecimiento del grano. La semilla tiene dos cotiledones y el embrión de la planta, éstos están cubiertos por la cáscara, se encargan del almacenamiento del alimento que permite el desarrollo y da lugar a las hojas de la semilla, cuando ésta germina. La manteca de cacao es conocida como el almacén de alimentos del cacao, porque representa más del 50% del peso seco de la semilla. Es así que las propiedades de este producto dependen de las condiciones ambientales, el punto de fusión, la cantidad de grasa y la dureza. Por intermedio de la fermentación se desarrollan cambios químicos en el sabor del chocolate.

Según Conti, et al. (2012) la composición química de los granos de cacao es:

**Lípidos:** Los granos de cacao contienen manteca entre un 50 a 57% en peso seco; ésta es responsable de las propiedades de fusión del chocolate. Los ácidos grasos predominantes en la manteca de cacao están en estado saturado (35% esteárico y 25% palmítico), monoinsaturadas (35% oleico) y 3% de ácido graso saturado que posee el cacao. A menudo es visto como un alimento negativo con respecto al sistema vascular.

**Esteroles:** Los esteroides y estanoles vegetales pueden contribuir al mejoramiento de los perfiles de lípidos en la sangre, mediante la inhibición competitiva de la absorción de colesterol de la dieta en el intestino. Una pequeña cantidad de esteroides vegetales incluyendo sitosterol y estigmasterol están presentes en la manteca de cacao.

**Fibra:** El grano de cacao sin procesar tiene una cubierta en la semilla, que también se conoce como salvado, representa el 15% del peso total de la almendra. El salvado es una buena fuente de fibra insoluble (44%) y también tiene algo de fibra soluble 11 ml.L que podría contribuir a la disminución de los lípidos séricos. Por su parte, el cacao en polvo contiene menos del 2% de salvado, y en productos acabados como el chocolate, el valor es muy pequeño. Por lo tanto, el consumo de chocolate no contribuye significativamente a la ingesta de fibra dietética.

**Minerales:** El cacao es una fuente muy rica de minerales esenciales; como cualquier planta alimenticia, el contenido de minerales se determinará según el tipo de suelo en que se cultive el mismo, es decir, las cifras de los minerales serán variables.

**Los péptidos:** Los granos de cacao contienen cuatro tipos de proteínas, éstas son: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelina. Fracciones de albúminas y globulina representan el 52% y el 43 % respectivamente, de la proteína total de la almendra. La actividad antioxidante del cacao se atribuye a la histidina, tirosina, metionina y cisteína.

**Polifenoles:** La investigación se refiere a que, el cacao contiene una mayor proporción de flavonoides en relación al té o vino tinto, la epicatequina ha sido reportada como el principal flavanol monomérico en el cacao, lo que representa aproximadamente el 35% del contenido fenólico total (Lee, et al. 2003). Además, en otro estudio se expresa que la catequina y la epicatequina se han encontrado en concentraciones de 150-1580mg/kg en chocolate y 2530mg/kg a 3170 mg/kg en licor de cacao. Las procianidinas se han reportado en concentraciones de 2200 mg/kg a 13230 mg/kg en licores de cacao (Conti, Poli, Paoletti, & Visioli, 2012).

#### **2.4.2. Cacao en polvo**

El cacao en polvo conocido en ocasiones como chocolate en polvo, proviene de la parte del cacao que se encuentra desprovista de su manteca. Su procesamiento se realiza con prensas hidráulicas y disolventes alimentarios, que tienen como objetivo reducir la manteca hasta que ésta adquiera una textura pulverulenta. “El cacao en polvo suele tener contenidos grasos por debajo del 20% de manteca de cacao, partiendo de este cacao se puede elaborar los cacaos solubles (menor al 5% de grasas) que se beben disueltas en leche o en agua” (Acosta & Téran, 2014). A continuación, en la tabla 2.4 se presenta el valor nutricional del cacao en polvo por cada 100 gramos.

**Tabla 2. 4. Valor nutricional del cacao en polvo (100g)**

Contenido por 100 g	Cacao polvo desgrasado	Chocolate	Chocolate con leche	Chocolate blanco	Soluble de cacao
Energía (kcal)	255	449-534	511-542	529	360-375
Proteínas (g)	23	4,2-7,8	6,1-9,2	8	4-7
Hidratos de Carbono (g)	16	58,3	47-65	54,1-60	78-82
Almidón (g)	13	3,1	1,1	-	2-8
Azúcares (g)	3	50,1-60	54,1-56,9	58,3	70-78
Grasas (g)	11	29-30,6	30-31,8	30,9	2,5-3,5
AGS (g)	6,5	15,1-18,2	17,6-19,9	18,2	1,5-2,1
AGM (g)	3,6	8,1-10	9,6-10,7	9,9	0,8-1,1
AGP (g)	0,3	0,7-1,2	1,0-1,2	1,1	0,1
Sodio (g)	0,2	0,7-1,2	1,0-1,2	1,1	0,1
Potasio (g)	2	0,4	0,34-0,47	0,35	0,44-0,9
Calcio (mg)	150	35-63	190-214	270	30-300
Fósforo (mg)	600	167-287	199-242	230	140-320
Hierro (mg)	20	2,2-3,2	0,8-2,3	0,2	4-9
Magnesio (mg)	500	100-113	45-86	26	100-125
Zinc (mg)	9	3	150-165	180	1
Vit A (UI)	1	0,25-0,3	0,4-0,6	1,14	0,2
Vit E (mg)	1	0,25-0,3	0,4-0,6	1,14	0,2
Vit B1 (mg)	0,37	0,04-0,07	0,05-0,1	0,08	0,07
Vit B6 (mg)	0,16	0,04-0,05	0,05-0,1	0,08	0,03
Ac. Fólico (mc)	38	6-10	5-10	10	7,6

Fuente: (INIAP, 2009)

## **2.5. Leche chocolatada**

La conceptualización de la leche chocolatada establece que este “tipo de bebida pertenece al grupo denominado leche compuesta o aromatizada; y es aquella a la que se agrega algún producto para dar un sabor determinado” (Revilla, 1996). La leche compuesta se conoce como leche con esencias y sabores de frutas.

## **2.6. Propóleo**

El propóleo o própolis se define como una sustancia natural, con característica resinosa y adhesiva; dicha sustancia es “recolectada por abejas melíferas africanizadas (*Apis mellifera L*) de las yemas, hojas de árboles y plantas mezcladas con polen y enzimas que las abejas secretan” (Popova M, et al., 2007). La función de las abejas es usar el propóleo para sellar las paredes interiores de sus colmenas y formar una barrera protectora contra intrusos externos como los insectos y demás animales, considerados responsables de la baja incidencia de bacterias y hongos en las colmenas. “La actividad biológica antimicrobiana es debido a la presencia de compuestos de flavonoides y fenol” (Castaldo S, & Capasso F, 2002). “Los propóleos son compuestos de bálsamo y resina vegetal (50% v/v), cera (30% v/v), aceites esenciales de hierbas (10% v/v), incluyendo restos orgánico” (Bankova , 2005).

Otro estudio investigativo señala que, desde la antigüedad el própolis era conocido por ser utilizado en diversos fines, entre los que se destaca el medicinal. El própolis puede variar según “las especies de plantas frecuentadas por las abejas y de la vegetación que rodea el lugar de emplazamiento del colmenar, las técnicas de recolección también influyen en las características macroscópicas y organolépticas del propóleo” (Romaní & Humire, 2009).

### **2.6.1. Características fisicoquímicas y organolépticas del propóleo**

Los aceites esenciales le otorgan características aromáticas y según el origen de la resina, tiempo de recolección y edad, puede ser de un color amarillo claro a castaño oscuro; adquirir un sabor amargo, levemente picante o insípido; y consistencia, “ya que a temperaturas de 45 a 250°C el propóleo es una sustancia suave, flexible y muy pegajosa; mientras que, por debajo de los 15°C, se vuelve duro y quebradizo” (Peña, 2008).

## 2.6.2. Propiedades del propóleo

Es importante destacar que el propóleo es una mezcla de varios componentes, en cantidades distintas, contiene entre 50 a 60% de resinas y bálsamos, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de polen, y 8 a 10% de aceites esenciales. Se han aislado 180 compuestos en el propolis, sus principales componentes flavonoides y ácidos fenólicos o ésteres (50%), contienen muy variables de ceras (7,5% a 35%) que afectarán a los respectivos componentes restantes, aceites volátiles (10%), polen (5%) e impurezas (4,4 a 19,5%). Además, pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivales de las abejas y posibles contaminantes (Romaní & Humire, 2009).

## 2.7. Propiedades farmacológicas

**Antimicrobiana** se refiere al propolis como activo frente a numerosos microorganismos como: *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, Bacilo de Koch, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces sobrinys*, *S. mutans*, *S. cricetus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Giardia lamblia*, *Bacteroides nodosos*, *Klebsiella pneumoniae*, e incluso contra algunos resistentes a los antibióticos como, el *Streptococcus piogenes*. El propolis es más activo frente a los cocos gram-positivos.

**Antifúngica:** El propolis muestra, en distintos grados efectos fungicidas frente a numerosas especies como: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascospaera apis* y *Plasmopara viticola*. La mayor inhibición observada corresponde a una concentración de propolis del 4%. Sin embargo, independientemente de su efecto intrínseco, parece ser que el propolis estimula la actividad antifúngica de los macrófagos.

**Antiviral:** El propolis ejerce efectos inhibidores frente a los virus de la viruela vacuna, la influenza, la enfermedad de Newcastle, el herpesvirus, la fiebre del valle de Rift, la gripe aviaria, la infección vírica bursal, el reovirus y el virus de la gripe Hong Kong. En un estudio clínico se ha comprobado que una pomada de propolis canadiense, rica en flavonoides, es más efectiva que el Aciclovir en el tratamiento del herpes genital.

**Antiprotozoaria:** Se ha aislado cuatro componentes del propolis brasileño con una moderada actividad frente al *Trypanosoma cruzi*. El máximo efecto se obtiene contra los tripomastigotas, que desaparecen de la sangre en 24 horas. También inhibe la infección protozoaria de los macrófagos peritoneales y de las células miocárdicas. Frente a la *Acanthamoeba castellanii*, el extracto etanólico del propolis es amebicida en concentraciones del orden de los 8 mg/ml.

**Inmunoestimulantes:** Se ha comprobado la eficacia inmunoestimulante del própolis en diez voluntarios sanos, en los que se determinaron los niveles de citoquinas antes y después de administrar 500 mg diarios de própolis por vía oral durante trece días.

**Antiinflamatoria:** Algunos de los componentes del própolis como el ácido cafeico y el éster del ácido fenil etil cafeico, la quercetina y la naringenina poseen efectos antiinflamatorios al actuar sobre la producción de eicosanoides, tanto *in vitro*, suprimiendo la generación de prostaglandinas y de leucotrienos en macrófagos peritoneales como *in vivo*, antagonizando la respuesta inflamatoria peritoneal aguda inducida por la zimosina. (Romaní & Humire, 2009, p. 13)

## 2.9. Calidad del propóleo

“Las propiedades biológicas que los propóleos poseen y pueden ser aprovechadas en la industria alimentaria, cosmética o químicas; son dependientes de su composición química” (Peña, 2008). Por ello, resulta necesario el establecimiento de una normativa que permita evaluar la calidad, características, propiedades y límites de seguridad del propóleo.

Actualmente, en Ecuador no existe una normativa que indique los requerimientos necesarios para establecer el uso de propóleos en alimentos. Sin embargo, a nivel internacional existen normas, tales como: la (Norma Russa, 1977), (Norma Cubana, 1994), (Norma Salvadoreña, 2003) y (Norma Argentina, 2004); las cuales establecen los requisitos mínimos de calidad que debe cumplir el propóleo crudo para su comercialización, con la finalidad de que los productores adopten medidas distintas de protección de la salud de la población. La tabla 2.5 presenta las características organolépticas para la evaluación de la calidad del propóleo.

**Tabla 2.5. Características generales para la evaluación de la calidad del propóleo**

<b>Características organolépticas</b>	<b>Consideraciones</b>
Aroma	Inodoro, resinoso suave, aromático o balsámico.
Color	Amarillo, café, verde, rojo, gris y sus tonalidades.
Sabor	Picante, dulce, amargo e insípido.
Consistencia a temperatura ambiente	Muy blanda, blanda, dura, poco dura, pegajosa y porosa.
Aspecto	Homogéneo o heterogéneo.
<b>Características físicas y químicas</b>	
Extracto seco	Mínimo 10%
Índice de oxidación	Máximo 22 segundos
Compuestos fenólicos (mg AG/ml)	Mínimo 0.25-5%
Flavonoides	Mínimo 0.22-0.5 ml.L
Espectrograma UV-VIS	Máximo de absorción entre 270 y 315nm
Metales pesados: plomo y arsénico	Máximo $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente
Residuos de plaguicidas y antibióticos	Ausente
Humedad	Máximo 8%
Cenizas	Máximo 5%
Cera	Máximo 30%
Impureza mecánicas	25-30%
Índice de yodo	Mínimo 35%
Solubilidad en etanol	30-35%
<b>Características microbiológicas</b>	
Bacterias mesófilas (UFC/g)	<10,000
Coliformes fecales (UFC/g)	0
Coliformes totales (UFC/g)	<100
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	100
Hongos (UFC/g)	1-1000

**Fuente:** (Norma Russa, 1977), (Norma Cubana, 1994), (Norma Salvadoreña, 2003) y (Norma Argentina, 2004).

Para garantizar la calidad del producto se debe tomar en cuenta las consideraciones de las tres normativas, las cuales han permitido conocer estratégicamente los beneficios en las características organolépticas, físicas-químicas y microbiológicas del propóleo.

### **2.10.1. ¿Cómo conservante natural?**

Los diversos estudios han demostrado que el propóleo posee “propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, mismas que dependen del origen botánico, composición química, estación climática, método de extracción, edad y zona geográfica de recolección. El própolis por ser un producto natural recibe la denominación GRAS (generalmente reconocido como seguro)” (Vargas, Torrescano, & Sánchez, 2013). Los efectos de los extractos de propóleo sobre bacterias y hongos, así como los patógenos de interés sobre los alimentos, tienen la capacidad para ralentizar o prevenir reacciones de oxidación, lo cual los convierte en productos naturales potencialmente atractivos para ser usados como conservantes alimentarios sustituyendo los aditivos sintéticos.

Una investigación sobre los extractos etanólicos de propóleo (EEP) a películas comestibles, para su aplicación en alimentos a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC); y los extractos etanólicos de propóleo (EEP) en uvas de variedad *Moscatel*, considerando que los recubrimientos mejoraron la apariencia de la uva y pueden ser buenos revestimientos para obtener productos más saludables, “reduciendo la pérdida de peso y controlando la producción de CO<sub>2</sub>; estas películas revelaron una notable actividad antifúngica contra los hongos probados, mostrando un mayor efecto inhibitorio sobre *Aspergillus niger*” (Pastor, et al., 2010).

Por otro lado, un estudio desarrollado con salchichas frescas refrigeradas tuvo como objetivos adicionar e incrementar la vida útil de las mismas, con la incorporación del extracto etanólico de propóleo, mediante el análisis fisico-químico, microbiológico y sensorial. Los resultados obtenidos fueron que los panelistas aprobaron las salchichas de 9 días más de control; mientras que, la oxidación lipídica fue menor al contenido flavonoides y compuestos fenólicos que ralentizaron la oxidación a los 21 días. Así mismo, se percibió un efecto bactericida contra lipolíticas, lo que comprobó que el tratamiento con extractos etanólicos de propóleo con respecto al control, suspende las bases volátiles de las bacterias proteolíticas deteniendo su descomposición. “Los conteos

microbianos fueron altos a partir del día 18, por lo que concluyeron que el tratamiento si generó un aumento en la vida útil de las salchichas” (Ali, et al., 2010).

### **2.11. Aditivos alimentarios**

Se considera aditivo alimentario a una sustancia que se consuma o no como alimento, se pueden usar insumos, que modifiquen o no el valor nutricional, y se incorpore intencionalmente al alimento con soluciones tecnológicas, comprendiendo las características organolépticas en las fases de elaboración hasta el almacenamiento del producto, que resulte directa o indirectamente, los componentes del alimento y no afecte a sus características; que deben ser admitidas o caracterizadas químicamente, con el aval de controles toxicológicos establecidos por los organismos sanitarios, para “conservar la calidad de nutrientes del alimento, destinados a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales, que aumente la estabilidad, para establecer la cantidad máxima de un compuesto que puede consumirse diariamente durante toda la vida” (Codex Alimentarius, 1995). Estos aditivos no deben causar un riesgo a la salud humana, dentro de los parámetros establecidos se encuentra la Ingesta Diaria Aceptable (IDA), expresada en miligramo de aditivo por kilogramo de peso corporal. La actividad de los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) es la principal razón del deterioro de los conservantes alimentarios.

Los fabricantes de alimentos, sufren pérdidas en sus ganancias cuando por las alteraciones microbianas, sus materias primas y elaboradas se deterioran, incidiendo de esta manera en la proyección de una imagen negativa de la marca que los empresarios de estos productos ofertan en el mercado. Los métodos físicos como “el calentamiento, deshidratación, irradiación o congelación, pueden asociarse métodos químicos que causen la muerte de los microorganismos o que al menos eviten su crecimiento” (Cubero, 2002).

La tabla 2.6 aborda el tema de los aditivos con actividad conservante más utilizados por la Unión Europea, con la respectiva caracterización, aplicación, efectos y límites de los mismos.

**Tabla 2. 6. Aditivos con actividad conservantes más utilizados en la Unión Europea (UE)**

Nombre	Característica	Aplicación	Efectos y límites
<b>Ácido sórbico</b>	Ácido graso insaturado muy poco soluble en agua y presente en algunos vegetales.	Pan envasado y bollería.	Metabólicamente se comporta como los demás ácidos grasos, es decir, se absorbe y se utiliza como una fuente de energía. IDA: 25mg/kg peso.
		Concentrados de zumos.	
		Postres a base de leche.	
		Queso fundido, en lonchas, etc.	
		Aperitivos a base de cereales.	
<b>Ácido benzoico</b>	Actividad antimicrobiana descubierta en 1875. Presente de forma natural en canela o ciruelas.	Bebidas aromatizadas.	Se absorbe rápidamente en el intestino, eliminándose también con rapidez en la orina. No tiene efectos acumulativos. IDA: 5mg/kg peso.
		Cervezas sin alcohol.	
		Mermeladas y confituras.	
		Salsas de tomate o pimiento.	
<b>Anhídrido sulfuroso</b>	Uno de los más antiguos conservantes. Eficaz en medio ácido, contra bacterias, mohos y levaduras.	Zumo de uva, mostos, vinos, sidra y vinagre.	Destruye la tiamina (vitamina B <sub>1</sub> ). El 3-8 de los enfermos de asma son sensibles a los sulfitos. IDA: 0,7mg/Kg peso.
		Cefalópodos y crustáceos frescos y congelados.	
<b>Nitratos y nitritos</b>	Impide el crecimiento de microorganismos patógenos como <i>Clostridium botulinum</i> . Forma un compuesto rosa brillante con el pigmento de la carne.	Productos cárnicos adobados.	El nitrito se une a la hemoglobina, e impide el transporte de oxígeno. IDA nitritos: 0,06 mg/kg peso. IDA nitratos: 3,7 mg/kg peso.
		Productos cárnicos embutidos.	

**Fuente:** Elaborado por (Cubero, 2002, p. 5)

De esta manera, en la actualidad se pretende minimizar la adición de conservantes, sustituyéndolos por medios físicos, pasteurización, esterilización, presión controlada en embalajes adecuados, o el debido mantenimiento de cadenas de frío entre la producción y el consumo.

### **2.11.1. Sorbato de potasio y benzoato de sodio**

El sorbato de potasio es un compuesto que tiene consistencia pulverulenta, su coloración tiende a ser de blanco a crema, posee un olor característico, se ha comprobado su eficacia contra mohos, levaduras e infinidad de bacterias, inhibiendo la formación de micotoxinas. Tiene un alcance de acción de 6.5 en el pH, es soluble en agua, alcohol, se conserva en recipientes cerrados, en un lugar frío y seco. Se puede emplear como conservante de jugos de frutas, pulpas, vinos, cereales, mantequillas, margarinas, crema, quesos, repostería, refrescos embotellados, productos cárnicos curados y cocidos.

Por su parte, el benzoato de sodio es un “polvo o son gránulos de color blanco, inodoros o con olor ligero; su sabor es astringente y dulce, soluble en agua, es un conservador que inhibe la actividad de los microorganismos tales como levaduras, bacterias y mohos” (Rubio & Pozo, 2012). Su pH es menor o igual a 4.5; esta sustancia se adiciona en los primeros pasos de elaboración con la finalidad de conservar el producto, se garantiza su almacenamiento en lugares frescos y secos.

### **2.11.2. Gelificantes, espesantes y estabilizantes**

Las sustancias gelificantes, espesantes y estabilizantes, son consideradas complejas, en agua son insolubles en dosis superiores al 5%, modifican las texturas de los alimentos; son fuentes vegetales o de microorganismos. Las gomas extraídas de los vegetales y las semillas son conocidas como exudados o resinas; o producidas por microorganismos. La capacidad de retención de agua permite estabilizar los productos alimentarios como las suspensiones de pulpa de frutas en bebidas o postres, en la cervecería para fijar el nivel de espumado entre otros. “Asimilables metabólicamente a la fibra dietética, pueden producir efectos beneficiosos reduciendo los niveles de colesterol del organismos” (Cubero, 2002). La comparación de gelificantes, espesantes y estabilizantes se exhibe en la tabla 2.7.

**Tabla 2. 7. Comparación de gelificantes, espesantes y estabilizantes**

Nombre	Fuentes	Característica	Aplicación	Efectos y límites
<b>Carboximetilcelulosa (CMC)</b>	Tratamiento de la pulpa de madera purificada con una solución al 18% de hidróxido sódico y sal sódica del ácido cloroacético.	Polímero aniónico soluble en agua.	Bebidas lácteas, cárnicos, quesos, entre otros.	No se ha registrado casos de lesiones por consumo, dosis de 0,20 gramos por Litros.
<b>Carragenanos</b>	Algas rojas de la familia <i>Rhodophyceae</i> : <i>Gigartina</i> , <i>Chondrus</i> , <i>Furellariay</i> .	Geles térmicamente reversibles con textura similar a la de la gelatina. Concentraciones superiores al 0,15% proporcionan texturas sólidas.	Postres lácteos, conservas vegetales, sopa y salsas. Cobertura de derivados cárnicos y de pescados enlatados.	Baja absorción intestinal. No se ha registrado casos de lesiones por su consumo. IDA: hasta 50 mg/Kg.
<b>Goma xantana</b>	Fermentación de sustrato conteniendo D-glucosa con Exopolisacáridos por <i>Xanthomonas campestris</i> .	Es soluble tanto en agua fría como en caliente, su viscosidad depende poco de la temperatura o del pH y no se ve influida por la presencia de concentraciones elevadas de sales.	Leches fermentadas (naturales/simples) sin tratamientos térmicos después de la fermentación. Bebidas, lácteos, salsas y aderezos, jarabes, coberturas, condimentos y salsas.	Inhibe la retrogradación del almidón y la sinéresis de otros geles, estabiliza, espuma, retrasa el crecimiento de cristales de hielo. IDA: 0.3-3 g/kg.

**Fuente:** Elaborado por (Cubero, 2002), (Pasquel, 2001) y (Codex Alimentarius, 1995).

# **CAPÍTULO 3 – METODOLOGÍA**

### **3.1. Materiales y métodos**

En el presente capítulo se detallan los aspectos que engloban los materiales utilizados durante la investigación: ubicación geográfica; equipos, materiales de laboratorio, implementos y herramientas; estandarización del proceso; y proceso de obtención del extracto etanólico de propóleo y la leche chocolatada.

### **3.2. Ubicación geográfica del ensayo**

El propóleo utilizado para la ejecución del trabajo investigativo procede de la finca Delfín Carlozama de la provincia de Imbabura, Ecuador; con este los estudios se realizaron en el laboratorio de lácteos de la Facultad de Ciencias Zootécnicas de la Universidad Técnica de Manabí, ubicado en la vía Boyacá kilómetro 1.5 del cantón Chone, provincia de Manabí; y los análisis microbiológicos se ejecutaron en la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, de la misma institución.

### **3.2. Equipos, materiales, implementos, herramientas y materia prima**

#### **3.2.1. Equipos**

- Generador de calor.
- Agitador.
- Filtros.
- Balanza analítica de 0.005 a 250 g.
- Cuarto frío.
- Rotavapor (Büchi + Bomba V700).
- Cabina de flujo laminar horizontal.
- Incubadora.
- Autoclave.

#### **3.2.2. Materiales de Laboratorio**

- Mechero de bunsen.
- Termómetro digital.
- Refractómetro 0 – 32 ° Brix.
- Potenciómetro de acidez.
- Probeta de 500 ml.
- Probeta de 250 ml.

- Papel filtro.
- Embudo.
- Malla.
- Pipetas de 2 ml.
- Pipetas de 1 ml.
- Cajas Petri.
- Bastones de drigalski.

### **3.2.3. Implemento y Herramientas**

- Toallas desechables.
- Jabón líquido.
- Lavabo.
- Libreta.
- Esferográficos.
- Cámara digital.
- Computadora.
- Flash memory.
- Calculadora.
- Impresora.
- Hojas de papel boom.

### **3.2.4. Reactivos**

- Alcohol etílico de 96° GL.
- Alcohol etílico de 70° GL.
- Agua Peptona Tamponada.
- BD Palcam Listeria Agar.
- Placas de recuento rápido petrifilm para *Aerobios Mesófilos* (AC), *Coliformes Totales* (CC), *Escherichia coli* (EC) y *Salmonella* (SALX).
- Agua peptonada tamponada (APT).
- Agua destilada.

### 3.2.5. Materia Prima

- Leche.
- Cacao en polvo.

### 3.2.6. Aditivos

- Edulcorante (Azúcar de caña).
- Estabilizante (Goma Xantan, Carragenina).
- Emulsionante (Carragenina).

### 3.2.7. Conservantes

- Extracto etanólico de propóleo.
- Sorbato de sodio.

## 3.3. Estandarización del proceso

Se realizaron seis pruebas preliminares para estandarización de la leche chocolatada con el extracto etanólico de propóleo:

**Tabla 3. 1. Resultados de las muestras preliminares de estandarización de proceso**

Fórmula	Descripción
<b>Muestra 1:</b> Cacao puro 76,1 g Leche entera 500 ml Azúcar 50 g Goma xantán 0,09g	La leche inicialmente tenía 10°Brix (Bx) al momento de terminar el producto constó con 19°Bx. Para este caso se efectuaron 5 muestras de 100 ml. Se usó goma xantán lo cual permitió una corta estabilidad dentro del producto.
<b>Muestra 2:</b> Leche entera 650 ml Azúcar 25g Cacao sin grasa 25g Goma xantán 0.11g	Se tomó a la leche los sólidos solubles los cuales estaban en 10°Brix y al término de la elaboración de la leche chocolatada se volvió tomar la lectura siendo de 18°Bx. Se elaboraron 5 unidades por 130 ml de producto y se sometió a mínima cantidad de goma xantán.

<p><b>Muestra 3:</b>  Leche entera 950 ml  Azúcar 35g  Cacao sin grasa 35g  Goma xantán 0.13 g  Carboximetilcelulosa (CMC) 0,19 g</p>	<p>Se tomó la referencia de los sólidos solubles de la leche entera de 10°Bx y al finalizar el producto obtuvo 20°Bx. Esta proporción de leche era para 7 unidades con un contenido de 130 ml. La adición del componente estabilizante permitiría la persistencia del producto.</p>
<p><b>Muestra 4:</b>  Leche entera 950 ml  Azúcar 20 g  Cocoa sin grasa 25 g  Goma xantán 0.28 g  Carragenina 0.13 g</p>	<p>Se realizó la toman de sólidos solubles que fue de 10°Bx y al término de la elaboración del producto la cifra fue de 19°Bx. Con una proporción de 130ml de leche chocolatada para 7 unidades envasadas y con estabilizante de Carragenina.</p>
<p><b>Muestra 5:</b>  Leche entera 950 ml  Azúcar 20 g  Cacao sin grasa 12 g  CMC 0,19 g  Carragenina 0.13 g</p>	<p>Se inició con la toma de sólidos solubles en 10°Bx de la leche entera, y al finalizar la elaboración se obtuvo 19°Bx. Con una proporción de 130 ml de leche chocolatada en 7 envases con la adición de CMC y Carragenina.</p>
<p><b>Muestra 6:</b>  Leche entera 950 ml  Azúcar 20g  Cacao sin grasa 7.7  Goma xantán 0.28 g  CMC 0.19 g  Carragenina 0.13 g</p>	<p>En el primero la toma de los grados Brix en la leche fue de 10°Bx, y finalizando el proceso fue de 19°Bx. Esta formulación permitió elaborar 7 unidades de chocolatada con 130 ml en cada envase, la adición fue de tres estabilizantes.</p>

---

<b>Muestra 7:</b>	Al tener la referencia de que los estabilizantes
Leche entera 1000 ml	funcionaron en la muestra #6, se la escogió para ser
Azúcar 25 g	usada con la interacción de los extractos etanólicos de
Cacao sin grasa 10 g	propóleo en diferentes concentraciones al 0,5 ml.L <sup>-1</sup> , 1
Goma xantán 0.15 g	ml.L <sup>-1</sup> , 1,5 ml.L <sup>-1</sup> el que anteriormente fue
CMC 0.20 g	rotaevaporado para la eliminación del solvente.
Carragenina 0.30	
Extracto etanólico de	
propóleo con 0,5 ml.L <sup>-1</sup> , 1	
ml.L <sup>-1</sup> , 1,5 ml.L <sup>-1</sup>	

---

### 3.3.1. Obtención del extracto etanólico del propóleo (EEP)

**Recepción de la materia prima:** En esta primera fase se procedió a la limpieza del propóleo con la eliminación de impurezas adheridas en el momento de la recolección y en este caso fue fundamental observar ciertas características organolépticas de la materia prima.

**Congelación:** El propóleo fue llevado al congelador a una temperatura de < 5°C por 6 horas, para que los cristales de hielo atravesaran el mismo y fuera más fácil trocearlo.

**Troceado:** Se dividió el propóleo en partes diminutas con el objetivo de que pueda diluirse en alcohol en menor tiempo.

**Disolución del alcohol:** Se calculó la cantidad de agua destilada en un alcohol etílico de 96° para que este contenga 70° GL.

**Preparación del propóleo y el alcohol:** Se pesaron 100 gramos de propóleo en 200 cc de alcohol etílico de 70° GL.

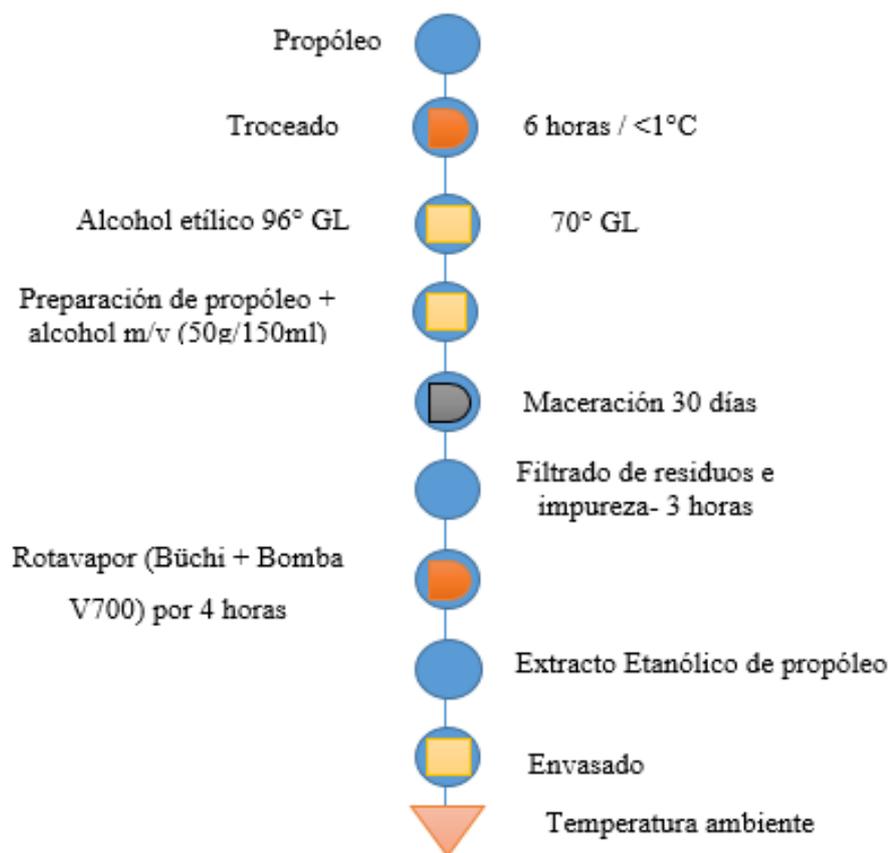
**Maceración:** Se realizaron constantes movimientos diarios para disolver las partículas de propóleo en el alcohol, al cabo de 30 días se obtuvo el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).

**Filtrado:** Se empleó papel whatman#41 con un estimado de 3 horas para la decantación del extracto y la eliminación de impurezas.

**Rotavaporador V 700:** El uso del equipo permitió la extracción del solvente del compuesto logrando concentrar el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), mediante la bomba de vacío, se redujo la presión sin que sea necesario aplicar tanto calor al sistema, ni tampoco la reducción de la cantidad de alcohol etílico presente en el mismo, el proceso tuvo una duración de 4 horas.

**Envasado:** Se envasó en frasco oscuro para evitar que la luz ingrese al frasco y deteriore el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), a través de reacciones fotoquímicas, de esta manera se preservó el producto.

**Almacenado:** Una vez envasado, no fue necesario introducir el producto en medios fríos, y por el contenido en alcohol etílico pudo mantenerse a temperatura ambiente.



**Figura 3. 1. Flujograma de obtención del extracto etanólico de propóleo**

### 3.3.2. Elaboración de la leche chocolatada con extracto etanólico de propóleo (EEP)

**Recepción de materia prima:** En esta primera fase se verificó las características organolépticas, el estado sanitario, y la composición física química (pH, densidad, acidez) de la leche entera recién ordeñada.

**Filtrado y enfriamiento:** Se elaboraron registros de hallazgos de residuos físicos (impurezas, piedras, etc.) en la leche, al finalizar este procedimiento se sometió a enfriamiento <7°C.

**Estandarización:** El contenido de materia grasa fue de 3,8 % para la leche entera.

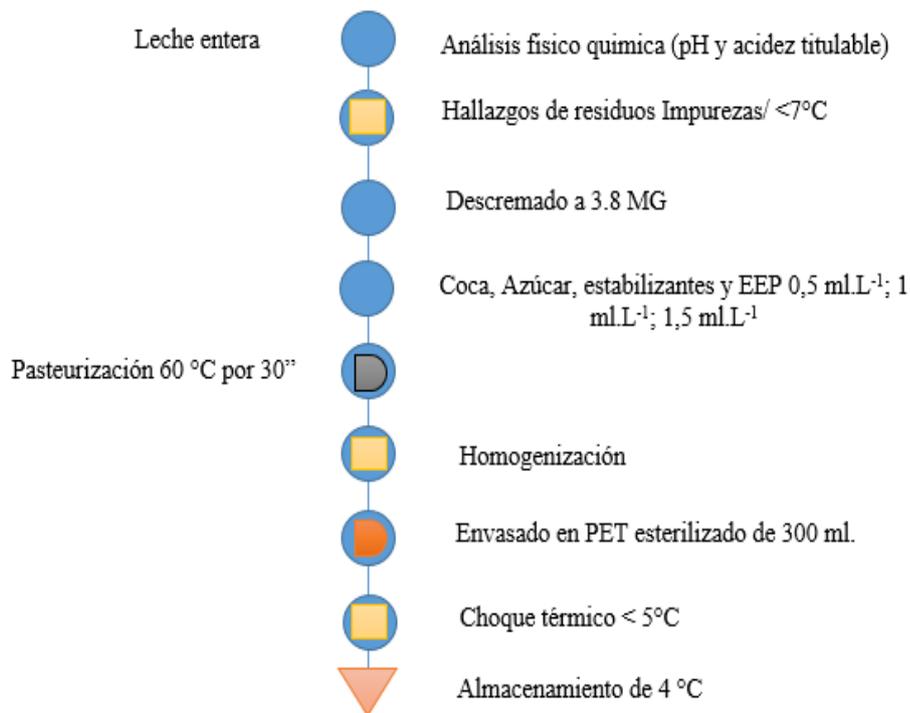
**Dosificación:** Se adicionó los siguientes aditivos: azúcar, estabilizantes y Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) en diferentes concentraciones con el fin de obtener un producto homogéneo.

**Pasteurización:** Se procedió a calentar la leche chocolatada a una temperatura de 60°C por 30 minutos.

**Homogenización:** Se redujo de tamaños de los glóbulos grasos y otras partículas de los aditivos con el fin de mejorar las características organolépticas de la leche chocolatada.

**Envasado:** Se utilizó envases de plástico (polietileno), apropiado para resistir altas temperaturas, en presentaciones de 300 ml.

**Almacenamiento:** Una vez terminado el producto fue almacenado en un cuarto frío manteniendo una temperatura de 4°C; ya que así se logró evitar la proliferación de agentes patógenos.



**Figura 3. 2. Flujograma de elaboración de leche chocolatada con extracto etanólico**

### 3.4. Diseño experimental

Para las tres concentraciones de extracto etanólico de propóleo de 0,5 ml.L<sup>-1</sup>, 1 ml.L<sup>-1</sup>, 1,5 ml.L<sup>-1</sup>, la muestra testigo sin conservante y el control químico sorbato de potasio, se evaluaron las características físico químicas (pH y acidez titulable). Las evaluaciones fueron cada siete días durante un periodo de cinco semanas, éstas se llevaron a cabo a través de un diseño bifactorial de clasificación simple univariado y para el análisis sensorial del producto se realizó un análisis de clasificación simple. En la tabla 3.1 se presenta la descripción de los tratamientos en estudios, la segunda columna estipula los códigos que se le otorgó al test sensorial que fue llenado por los jueces afectivos.

**Tabla 3. 2. Descripción de los tratamientos en estudio**

N°	TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	NORMAS INEN
Químico sintético		3 Réplicas con Sorbato de potasio.	
Testigo		3 Réplicas con leche sin conservante.	
T1	516	3 Réplicas con EEP 0,5 ml.L <sup>-1</sup>	Referencia de la norma 2395:2011
T2	408	3 Réplicas con EEP 1,0 ml.L <sup>-1</sup>	para leches fermentadas de
T3	315	3 Réplicas con EEP 1,5 ml.L <sup>-1</sup>	kumis.

#### 3.4.1. Análisis estadísticos

El estudio que se aplicó fue un ANOVA multifactorial entre grupos, procedimiento indicado por el programa SPSS en la opción *Modelo lineal general univariante*, este MLG Factorial proporcionó un análisis de regresión y un ANOVA para una variable dependiente (respuesta). Para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Tukey, todos los ensayos se realizaron por triplicado analizando sus resultados correspondientes para las características organolépticas, con los tres tratamientos de extracto etanólico de propóleo.

### **3.5. Análisis microbiológico**

Se procedió a la realización de los diferentes análisis microbiológicos que fueron necesario aplicarse para cada uno de los tratamientos y sus réplicas, mediante las técnicas y procedimientos adecuados. A continuación se los describe:

#### **3.5.1. Recuento total *Aerobios Mesófilos***

Se preparó una dilución de 1:10 de la muestra, envasándola en una botella de dilución se adicionó la cantidad apropiada de agua peptonada tamponada estéril con la muestra de leche chocolatada, se mezcló homogéneamente hasta ajustar su pH entre 6.6 y 7.2; volumétricamente 1ml de leche en 9ml de agua peptonada tamponada; de lo cual se tomó un 1ml de las disoluciones para ser adicionadas en placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) de aerobios mesófilos (*aerobic plate count AC*). Estas muestras se replicaron para los demás tratamientos, así mismo las “disoluciones se inocularon a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas en atmósfera aerobia y posteriormente se leyeron los resultados en un contador de colonias estándar” (AOAC, 1990).

#### **3.5.2. Recuento de *coliformes***

A partir de una dilución de 1:10 para cada una de las réplicas con sus respectivos tratamientos, se procedió a adicionar la cantidad apropiada del siguiente diluyente agua peptonada tamponada estéril y con pH ajustado a 7.2; se mezcló bien la muestra mediante los métodos usuales de los cuales se tomó 1ml de cada uno en placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) para “*coliformes totales (Coliform counts CC)* que fueron incubadas por 24 h  $\pm 2$  h a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y por 24 h a 48h  $\pm 2$  h a  $35^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$  para determinar *Escherichia coli*” (AOAC, 1991).

#### **3.5.3. Aislamiento de *Salmonella spp***

Con la dilución de 1:10 para cada una de las réplicas con sus respectivos tratamientos, se procedió a adicionar la cantidad sugerida con un diluyente estéril de agua peptonada tamponada y con el ajuste de pH entre 6.6 y 7.2; se aplicó 1ml de la dilución a la placa placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) de *Salmonella* (Salx) y se dispersó para luego ser sometida a la “incubadora por 24  $\pm 2$ h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para determinar la presencia de *Salmonella*” (AOAC, 1998).

### **3.5.4. Aislamiento de *Listeria monocytogenes***

Este procedimiento se realizó mediante Becton Dickinson Palcam *Listeria* Agar en el cual se pesaron 18g en 250ml de agua destilada estéril, el medio fue llevado a autoclavar 121°C por 15 minutos y se procedió a aplicar el medio en las placas petri alrededor de 15ml, dejando enfriar hasta que se formó un gel, la muestra permitió adicionar la mezcla de las diluciones de 1:10 de agua peptonada tamponada y leche chocolatada. Después de este proceso con el bastón de drigalski se esparció la muestra, una vez terminado este proceso, con la adición de cada uno de los tratamientos y sus respectivas réplicas se llevó a la “incubadora por 37°C ± 1°C durante 24 h ± 2h, después de dicho tiempo se procede a la lectura de colonia en caso que lo hubiera y se acepta o descarta mediante tinción de Gram” (ISO 11290-1, 2017).

### **3.6. Análisis físico-químico**

Para el debido control de la leche chocolatada se le efectuó análisis físico – químicos, mediante los cuales se determinaron a las muestras evaluadas en el pH y acidez titulable.

#### **3.6.1. pH**

La medición se realizó por el método cuantitativo, por potenciometría que es medida precisa, se utilizaron soluciones buffer de pH 7 alcalino y otra de pH 4 ácidos, se midió a las tres repeticiones por cada tratamiento desde el día 0 hasta los 35 días (quinta semana) que duró la investigación. “Las leche fluidas con ingredientes deben estar con un mínimos 6.4 y 6.85 para las leches enteras, semidescremadas y descremadas” (INEN, 2010).

#### **3.6.2. Acidez titulable**

La acidez se mide por titulación y corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio que se va a emplear para neutralizar los grupos ácidos. La determinación se realizó por triplicado sobre las muestras de cada tratamiento. Se lavó y se secó el matraz Erlenmeyer en la estufa a 103° ± 2°C durante 30 minutos. De este modo, en el matraz se pesaron 10ml de leche y se diluyó el contenido de la muestra con la adición de 1cm<sup>3</sup> de solución indicadora de fenolftaleína, a su vez se agregó lentamente y con agitación, la solución de 0,1N de hidróxido de sodio, hasta que se obtuvo un color rosado persistente por 30 segundos y al final se leyó el contenido gastado de la bureta con aproximación a 0,05 cm<sup>3</sup> (INEN, 1984).

Este resultado se expresa el contenido en ácido láctico. “Un grado Dornic equivale a 0,1g/l de ácido láctico ó 0,01mL/L en gramos de ácido láctico por litro o kilogramo. NaOH (0.1N) libre de carbonatos (cada mililitro equivale a 0.009g de ácido láctico)” (Rodríguez, 2005).

La acidez se calcula mediante la ecuación siguiente:

Siendo:

$$A = 0,09 \frac{V \times N}{M} \times 100$$

A = acidez titulable de la leche, en porcentaje de masa de ácido láctico.

V = Volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, cm<sup>3</sup>.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

M= muestra de leche chocolatada.

$$A = 0,09 \frac{15,97 \text{ ml} \times 0,009}{10 \text{ ml}} \times 100 = 0,129$$

Ejemplo de acidez titulable de una réplica de la leche chocolatada sin conservante fue de 0.13°D.

### 3.7. Análisis sensorial

El procedimiento del test sensorial se efectuó con jueces afectivos que son “individuos que no tiene que ser seleccionados ni adiestrados, son consumidores escogidos al azar, representativos de la población a la cual se estima está dirigido el producto que se evalúa” (Manfugás, 2007, p. 32). Estas pruebas se emplearon en condiciones similares a las que normalmente se utilizan al consumir el producto. Para este análisis afectivo se detallaron las tres escalas que se tomaron en consideración. En primera instancia, se buscó la presentación de las muestras, los jueces afectivos procedieron a degustarlas; en segundo lugar, se añadió un código que no le permitió a los jueces afectivos el reconocimiento de las muestras; sin embargo, el investigador tenía conocimiento de que código correspondía a cada una. Luego los jueces afectivos tuvieron que adicionar una X en los valores de cada parámetro a evaluar en el test sensorial.

# **CAPÍTULO 4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Resultados de la estandarización del proceso

Los estabilizantes CMC, Goma Xantán y el emulsificante Carragenina, se deben mezclar con un aditivo como el azúcar para garantizar la homogeneidad del producto; así mismo el extracto etanólico de propóleo debe ser rotaevaporado para la eliminación del solvente (etanol), debido a que este producto es de primera necesidad para niños, jóvenes y adultos. La tabla 4.1 que se muestra a continuación, hace referencia a los procesos previos a elaboración de la leche chocolatada, misma que se aplicó con la finalidad de comprobar si los estabilizantes y el emulsificador reaccionaban a la bebida, para esto se evaluó las características físicas como la sinéresis, presencia de flóculos y sedimentación, para evidenciar la existencia de estas características en el producto se les asignó un signo positivo de presencia.

**Tabla 4. 1. Resultados de la estandarización del proceso**

<b>Fórmula</b>	<b>Sinéresis</b>	<b>Presencia de flóculos</b>	<b>Sedimentación</b>
<b>Muestra 1:</b> Goma Xantán 0,09 g	+	+	+
<b>Muestra 2:</b> Goma Xantán 0,11 g	+	+	+
<b>Muestra 3:</b> Goma Xantán 0,13 g + CMC		+	+
<b>Muestra 4:</b> Goma Xantán + Carragenina		+	+
<b>Muestra 5:</b> CMC + Carragenina	+		+
<b>Muestra 6:</b> Goma Xantán + CMC + Carragenina			
<b>Muestra 7:</b> Goma Xantán + CMC + Carragenina + EEP (0,5 ml.L <sup>-1</sup> , 1 ml.L <sup>-1</sup> , 1,5 ml.L <sup>-1</sup> )			

En la tabla 4.1 de resultados de estandarización del proceso se pudo apreciar que en las muestras 1 y 2, solo con la utilización de Goma Xantán de menor y mayor proporción existió una sinéresis, presencia de flóculos y sedimentación en la leche chocolatada lo que hizo que sea un estabilizante inadecuado para este producto.

En la muestra 3, con el empleo de Goma Xantán y CMC se apreció la presencia de flóculos y sedimentación, la sinéresis que ejerció anteriormente fue descartada, para esto se controló los niveles de proporción en gramos de cada uno de los estabilizantes.

La muestra 4, con el empleo de Goma Xantán y Carragenina, uno que es estabilizante y el otro emulsificador, permitió desaparecer la sinéresis que ejercía en el producto, además corroboró la permanencia de flóculos y sedimentación en el producto.

La muestra 5, tuvo presencia de sinéresis y sedimentación por lo tanto, no existió presencia de flóculos en la leche chocolatada.

La muestra 6, fue la única con dos estabilizantes y un emulsificador, lo que permitió conocer que se necesita un emulsionante en la leche chocolatada para que homogenice el producto y lo preserve sin contar los parámetros que fueron evaluados.

Teniendo un precedente que fue la muestra 6 con los estabilizantes más el emulsificador, se procedió a adicionar a la muestra 7 el extracto etanólico de propóleo rotaevaporado, ante lo cual no existió sinéresis, presencia de flóculos, ni sedimentación durante el tiempo de prueba. Además cumplió con lo establecido en la norma ecuatoriana 2395:2011 al presenciar una cifra inferior a  $0,5 \text{ mL}^{-1}$  cantidad de alcohol en la leche saborizada.

#### **4.2. Resultado de análisis microbiológicos**

En la tabla 4.2. se representa el crecimiento esporádico de dos bacterias aerobios mesófilos (AC) y coliformes totales (CC) de todos los tratamientos que se hicieron desde el día 0 hasta la quinta semana, es decir, que los microorganismos de leche chocolatada (LCH) para AC demostraron un crecimiento desde la segunda semana con alrededor de  $34,3 \text{ ufc/ml}^{-1}$  hasta alcanzar la quinta semana con niveles elevados sobre los  $73 \text{ ufc/ml}^{-1}$ ; mientras que, los coliformes totales tuvieron un crecimiento desde la segunda semana de  $23,3 \text{ ufc/ml}^{-1}$  con presencia hasta la quinta semana de  $71,3 \text{ ufc/ml}^{-1}$ .

Para el tratamiento de sorbato de potasio (SP) en AC, comenzaron a crecer desde la cuarta semana con niveles bajos de  $6 \text{ ufc/ml}^{-1}$  hasta la quinta semana con  $9,3 \text{ ufc/ml}^{-1}$ . Así mismo, para los CC se obtuvieron en la cuarta semana niveles bajos sobre los  $6,3 \text{ ufc/ml}^{-1}$  y alcanzando  $13 \text{ ufc/ml}^{-1}$  en la quinta semana.

En el tratamiento de extracto etanólico de propóleo de  $0,5\text{ml.L}^{-1}$  tuvieron crecimiento en la cuarta semana con niveles de  $1,7\text{ufc/ml}^{-1}$  y en la quinta semana con  $4,3\text{ ufc/ml}^{-1}$ , en coliformes totales solo se obtuvo en la quinta semana  $5\text{ ufc/ml}^{-1}$ . Los datos obtenidos fueron similares a los de Fatma, Kassem, & Atta-Alla, (2010) quienes evaluaron el extracto etanólico de propóleo como conservante natural para pescado fresco, en la cual no se presentaron coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus coagulosa* positiva ni esporas de *Clostridium sp*, entonces se reportó actividad bactericida y bacteriostática de extracto etanólico de propóleo a  $0,6\text{ mg/ml}$ . Además, Suarez, Jiménez, & Díaz, (2013) determinaron los parámetros microbiológicos y sensoriales de filetes de pescado preservado con propóleo bajo refrigeración que, revelaron carga microbiana inicial representados por *mesófilos aerobios* y *psicrofilos*, y *coliformes totales* pero no se encontró diferencias significativas ( $p>0.05$ ) para las diferentes concentraciones ( $0.8, 1.2\text{mg/ml}$ ). La técnica de difusión se usó para probar el antagonismo entre el extracto de etanol de propóleo, pero no existió presencia de *Salmonella*, *E. Coli*, *S. aureus* y *Clostridium sp*, concordando con los resultados de este trabajo.

El extracto etanólico de propóleo de  $1\text{ ml.L}^{-1}$  se obtuvo a partir de la cuarta semana con niveles muy bajos de AC  $1,3\text{ufc/ml}^{-1}$  y para la quinta semana  $3,5\text{ufc/ml}^{-1}$  no se obtuvo presencia de coliformes totales.

Para el tratamiento con extracto etanólico de propóleo de  $1,5\text{ml.L}^{-1}$ , se obtuvo en la quinta semana un  $<3\text{ufc/ml}^{-1}$ , no hubo presencia en la quinta semana de CC. Cabe recalcar que el extracto etanólico de propóleo hizo efecto de preservante natural en la leche chocolatada, siendo un inhibidor que ayudó a eliminar este tipo de bacterias con mejores resultados que un preservante químico durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones.

En la siguiente tabla se presenta el resultado de los análisis microbiológicos en la leche chocolatada y se observa la presencia en  $\text{ufc/ml}^{-1}$  de crecimiento de aerobios mesófilos y coliformes totales, lo cual se encuentra mencionado en el texto ya descrito.

**Tabla 4. 2. Resultados de los análisis microbiológicos en la leche chocolatada en ufc/ml<sup>-1</sup>**

	<i>Aerobios Mesófilos (ufc/ml<sup>-1</sup>)</i>						<i>Coliformes Totales (ufc/ml<sup>-1</sup>)</i>						<i>Escherichia coli (ufc/ml<sup>-1</sup>)</i>	<i>Salmonella (ufc/ml<sup>-1</sup>)</i>	<i>Listeria monocytogenes (ufc/ml<sup>-1</sup>)</i>
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5			
<b>Semanas</b>	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	No presencia en ninguna de las semanas para cada uno de los tratamientos.		
<b>Testigo</b>		34,3	51,7	62,2	69,6	73,3			23,3	35,7	65,0	71,3			
<b>Químico</b>					6	9,3					6,3	9			
<b>EEP 0,5 ml.L<sup>-1</sup></b>					1,7	4,3						5			
<b>EEP 1,0 ml.L<sup>-1</sup></b>					1,3	3,5									
<b>EEP 1,5 ml.L<sup>-1</sup></b>						< 3									

### 4.3. Resultados de los análisis físico-químicos

Los análisis físico-químicos realizados continuamente a la bebida chocolatada durante las cinco semanas de estudios fueron de acidez titulable y pH para cada uno de los tratamientos por semana, con esto se comprobó la variabilidad del producto. A continuación se presenta la tabla de resultados de los análisis físico-químicos por tratamiento.

**Tabla 4. 3. Resultados de análisis físico-químico de tratamiento pH y acidez titulable**

		TRATAMIENTOS					Sig.	Error estándar
		Testigo	Químico	EEP 0,5 ml.L <sup>-1</sup>	EEP 1 ml.L <sup>-1</sup>	EEP 1,5 ml.L <sup>-1</sup>		
VARIABLES	Acidez titulable (grados dornic)	0,157 <sup>c</sup>	0,150 <sup>bc</sup>	0,136 <sup>a</sup>	0,143 <sup>ab</sup>	0,138 <sup>a</sup>	0,000	0,0028
	pH	5,70 <sup>a</sup>	6,15 <sup>b</sup>	6,13 <sup>b</sup>	6,25 <sup>b</sup>	6,26 <sup>b</sup>	0,000	0,067

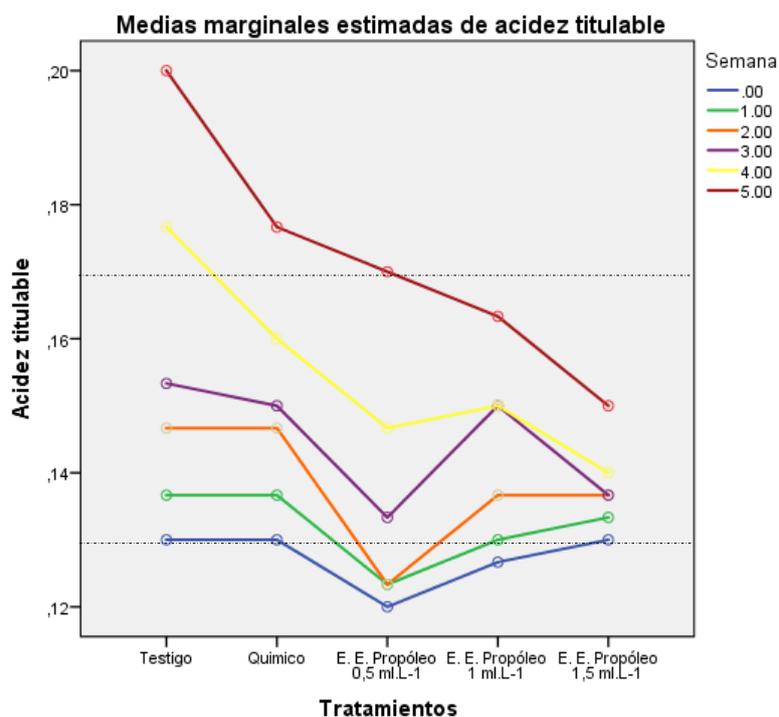
a, b, c. Medias con diferentes subíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Para el pH existió diferencia significativa para el testigo con respecto a los otros tratamientos. En la acidez titulable no existió diferencia significativa entre los tratamientos con extractos etanólicos de propóleo, pero son diferentes con los tratamientos testigos y químicos que presentaron resultados iguales entre ellos, lo cual indica que los tratamientos con extractos etanólicos de propóleo obtuvieron menor acidez titulable en comparación a los tratamientos antes descritos.

#### Acidez Titulable

Para la lectura de la figura 4.2. se narra la siguiente leyenda, sobre el lado derecho se encuentran los respectivos colores comenzando desde el 0.00 hasta el 5.00 que representan las semana de inicio y final de la investigación, del lado izquierdo se puede visualizar la respectivas cantidades proximales de acidez titulable, y por último en la parte inferior los tratamientos que fueron evaluados, las barras que se encuentran dentro de la figura tienen un círculo que simboliza cada tratamiento, que con el pasar del tiempo

fueron ascendiendo, esta figura se lee desde la parte inferior con el color azul denominado día cero que representa la toma de acidez titulable para todas las muestras.

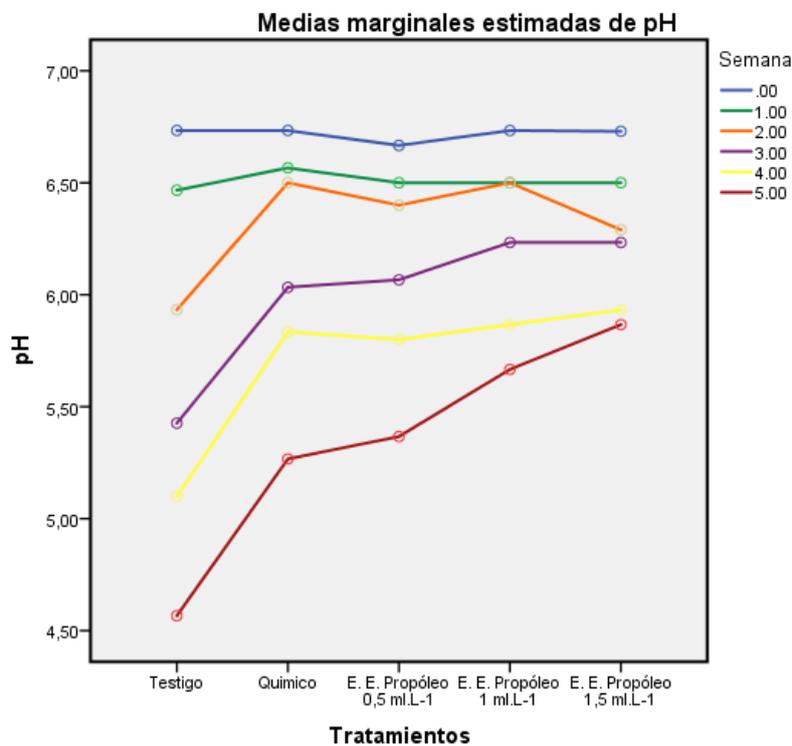


**Figura 4. 1. Análisis de tratamiento de acidez titulable**

La figura 4.2 representa el análisis por tratamiento de acidez titulable durante los periodos de tiempo que fueron evaluados, desde el día cero hasta la quinta semana, luego de esto se presencié el comportamiento de los extractos etanólicos de propóleo en la segunda y tercera semana para el extracto etanólico de propóleo 0.5ml.L<sup>-1</sup> con 0.12 grados dornic (°D); por ende en la última semana la leche chocolatada sin conservante denominado testigo supera los 0,20°D y no es una leche apta para el consumo. Para el químico sintético sorbato de potasio supera los límites normales de 0,17°D, EEP 0,5 ml.L<sup>-1</sup> tiene 0,17°D, ligeramente sobrepasa el rango normal para la aceptabilidad de la bebida, por otra parte el extracto etanólico de propóleo de 1 ml.L<sup>-1</sup> se encuentra sobre los 0,16°D y para el extracto etanólico de propoleo (EEP) 1,5 ml.L<sup>-1</sup> con 0,15°D.

## pH

Para la comprensión de la figura 4.1. se describe la siguiente leyenda, sobre el lado derecho se encuentran los respectivos colores comenzando desde el 0,00 hasta el 5,00 que representan las semanas de inicio y final de la investigación, del lado izquierdo se puede visualizar la respectivas cantidades proximales de pH, y por último en la parte inferior los tratamientos que fueron evaluados, las barras que se encuentran dentro de la figura tienen un círculo que simboliza cada tratamiento y que durante el pasar del tiempo de evaluación van decreciendo los diferentes tratamientos.



**Figura 4. 2. Análisis de tratamiento de tratamiento de pH**

Durante el día cero y la primera semana la mayoría de los tratamientos de pH se mantienen a excepción del testigo que es la leche chocolatada sin conservante denominado (LCH), durante la segunda semana el (LCH) tiene una variación de descenso que se prolonga durante las cinco semanas siendo 4,5 el pH más bajo. Durante las cinco semanas que se evaluó al tratamiento químico sintético sorbato de potasio (SP) se observa un descenso progresivo del preservante, para el parámetro de extracto etanólico de propóleo de 0.5ml.L<sup>-1</sup> está cercano a 5,5 pH; mientras que, los de 1ml.L<sup>-1</sup> y 1.5ml.L<sup>-1</sup>

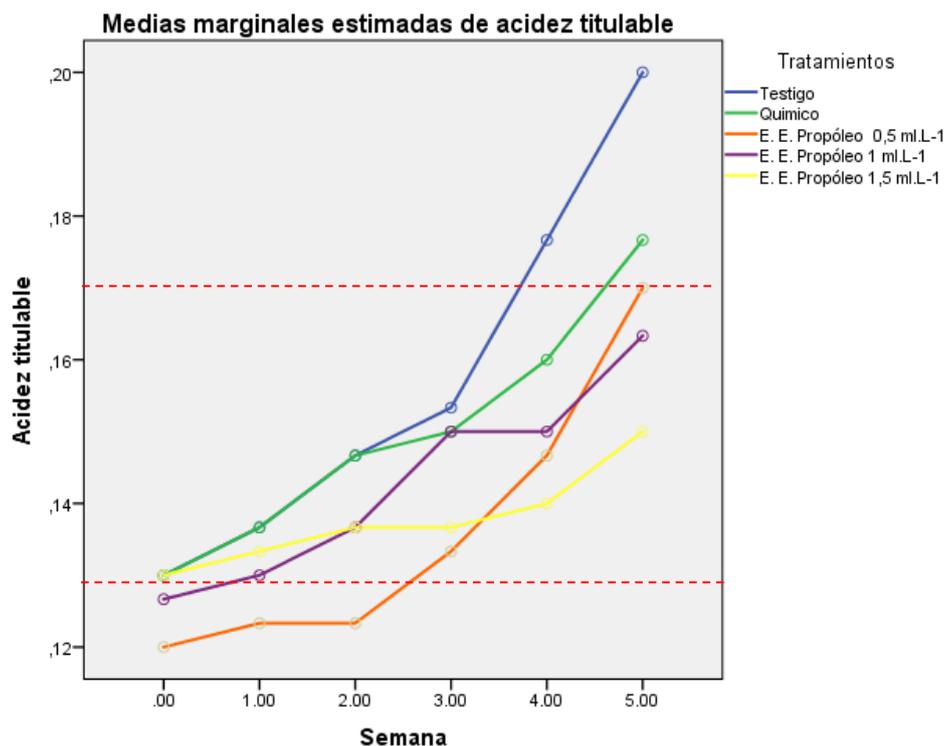
tienen niveles de 5,7 y 5,9 pH, éstos son los que mayor estabilidad obtienen durante las cinco semanas.

**Tabla 4. 4. Resultado de análisis físico-químicos de semana de pH y acidez titulable**

		SEMANAS						Sig.	Error estándar
		0	1	2	3	4	5		
Variables	Acidez Titulable (grados dornic °D)	0,127 <sub>a</sub>	0,132 <sup>ab</sup>	0,138 <sup>bc</sup>	0,144 <sup>c</sup>	0,155 <sup>d</sup>	0,172 <sup>e</sup>	0,000	0,00288
	pH	6,72 <sup>e</sup>	6,50 <sup>d</sup>	6,32 <sup>d</sup>	5,99 <sup>c</sup>	5,70 <sup>b</sup>	5,34 <sup>a</sup>	0,000	0,0656

a, b, c, d, e. Media con diferencias subíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

Existieron diferencias significativas sobre la cuarta y quinta semana de acidez titulable, pero también son diferentes con las otras semanas. Entre la primera y segunda semana para el pH, no existió diferencia significativa pero este baja considerablemente desde la tercera hasta la quinta semana, para este último puede que los extractos etanólicos de propóleo hayan incidido en la reducción de pH debido al efecto inhibitorio que existió en las muestras de la bebida chocolatada.

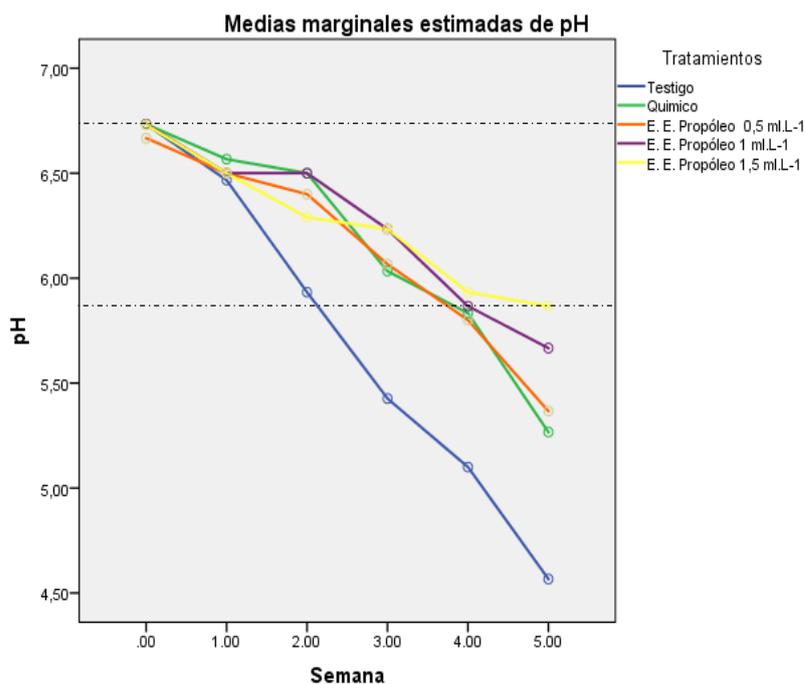


**Figura 4. 3. Análisis de semana de acidez titulable**

La figura 4.3 representa los niveles de acidez titulable durante las cinco semanas, el comportamiento del testigo y químico señalan que hasta la segunda semana siguen la misma línea de acidez sobre los  $0,14^{\circ}\text{D}$ ; mientras que, en la última semana este alcanzó niveles elevado superiores a  $0,20^{\circ}\text{D}$ , y el químico en  $0,17^{\circ}\text{D}$ . Por lo tanto, el comportamiento de los extracto etanólico de propóleo son diferentes en proporción al  $0,5$  y  $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$ , respectivamente tienen valores de  $0,17$  a  $0,16^{\circ}\text{D}$ . El de mayor concentración de extracto etanólico de propóleo conservó la acidez titulable en la última semana de investigación en  $0,15^{\circ}\text{D}$ .

Durante el periodo de evaluación los tres parámetros de extracto etanólico de propóleo tuvieron eficacia y se mantuvieron estables durante 5 semanas, amparados en las normas técnicas ecuatorianas INEN, (2010) para leches fluidas con ingredientes, donde los tres tratamientos estuvieron por debajo de los  $0.17^{\circ}\text{D}$ .

A continuación la figura 4.4. de medias marginales estimadas de pH por semana.



**Figura 4. 4. Análisis de semana de pH**

Los parámetros de pH en cada uno de los grupos se comportaron normales hasta la primera semana, luego el comportamiento por deterioro de la leche chocolatada sin conservante dio lugar a una leche ácida en la quinta semana; mientras que, el químico sintético sorbato de potasio se asemejaría con el extracto etanólico de propóleo de 0,5 ml.L<sup>-1</sup> inferior a 5,5 de pH; la conducta de extracto etanólico de propóleo 1 ml.L<sup>-1</sup> y 1,5 ml.L<sup>-1</sup> son muy particulares, se mantienen ligeramente estables en el producto durante las cinco semanas con 5.8 de pH.

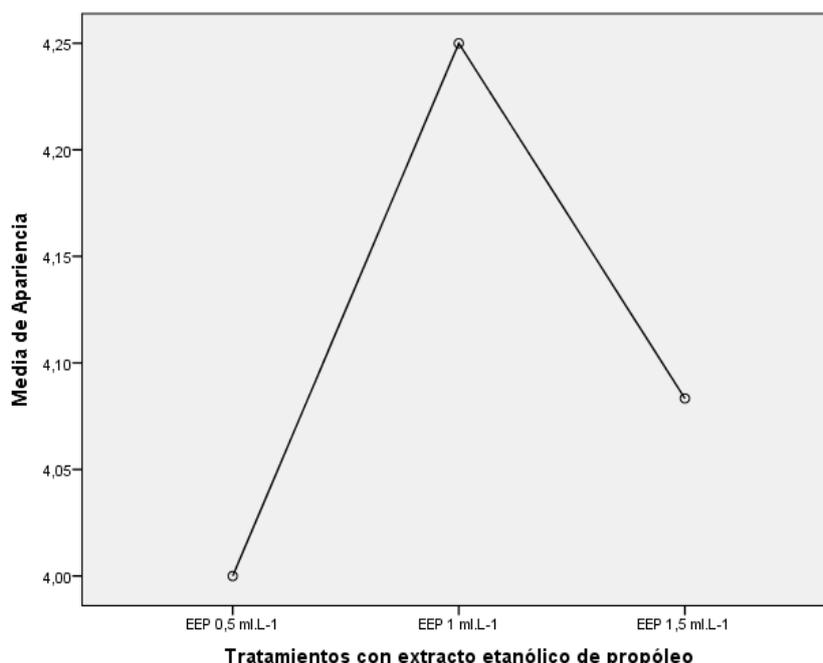
#### 4.4. Resultado del análisis del panel sensorial

El resultado del panel sensorial fue mediante la aplicación de un test sensorial dirigido a un selecto grupo de individuos, denominados técnicamente jueces afectivos. La finalidad del test sensorial era conocer la aceptación de los encuestados, en el anexo I se encuentra el formato de test sensorial que fue aplicado a los panelistas. A continuación se presenta la tabla 4.5 de las medias de ANOVA, un factor para la prueba sensorial, en donde se evaluaron los tratamientos con extracto etanólico de propóleo y la incidencia en sus características organolépticas.

**Tabla 4. 5 Resultado de las medias del ANOVA de un factor para la prueba sensorial**

Tratamiento	Extracto etanólico de propóleo 0,5 ml.L <sup>-1</sup>	Extracto etanólico de propóleo 1,0 ml.L <sup>-1</sup>	Extracto etanólico de propóleo 1,5 ml.L <sup>-1</sup>	Sig.	Error típico
<b>Apariencia</b>	4	4,25	4,08	No existe significancia	0,342
<b>Color</b>	4,08	4,17	4,08		0,279
<b>Olor</b>	4,33	4,42	4,36		0,335
<b>Sabor</b>	3,67	4,5	4,17		0,358
<b>Textura</b>	3,83	4,58	4,08		0,359

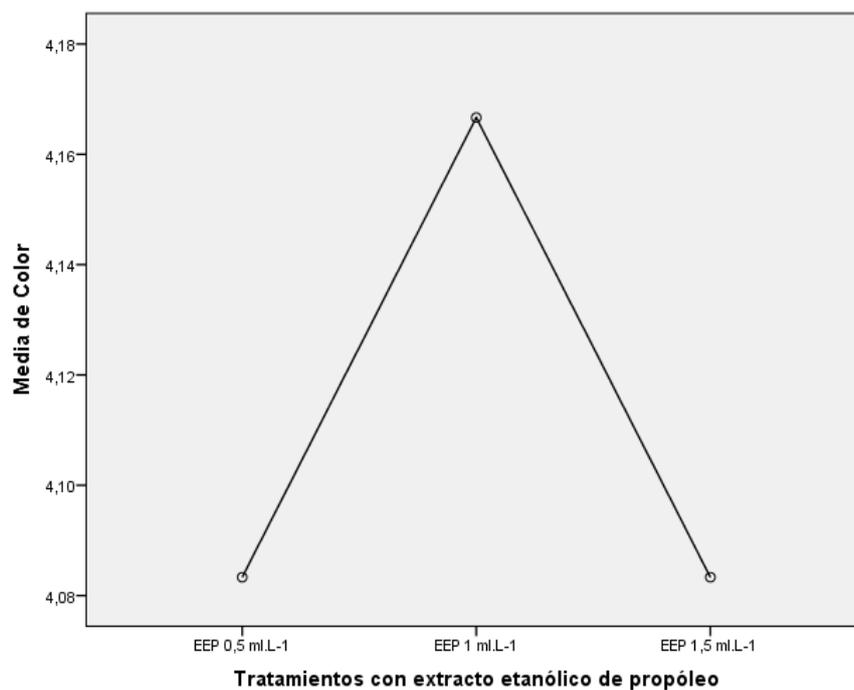
En esta tabla se compara los resultados de las medias de un factor, para cada uno de los tratamientos y su incidencia en las características organolépticas.



**Figura 4. 5. Media de Apariencia**

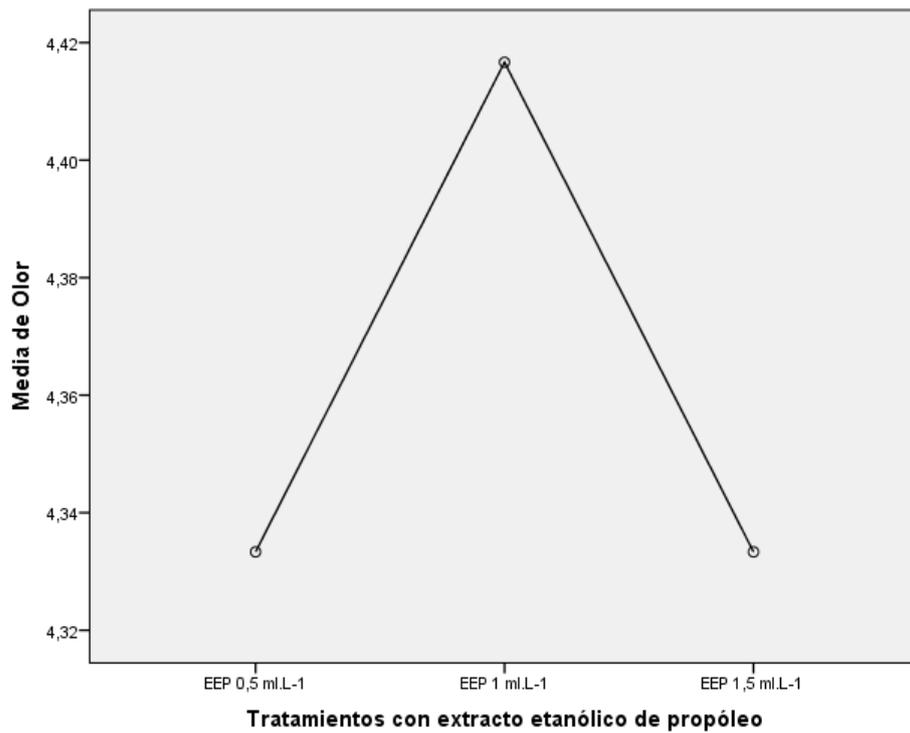
La figura 4.5 de media de apariencia indica el nivel de aceptación dentro de los tres tratamientos de extracto etanólico de propóleo de 0,5 ml.L<sup>-1</sup>, 1 ml.L<sup>-1</sup> y 1,5 ml.L<sup>-1</sup> con una escala mayor a 4,25 para el extracto etanólico de propóleo 1 ml.L<sup>-1</sup>; mientras que, el de 1,5 ml.L<sup>-1</sup> tiene 4,08 y por último el de 0,5 ml.L<sup>-1</sup> es de 4,0; no existe significancia para ninguno de los tratamientos con un error típico de 0,342.

En la literatura no se reportan investigaciones de leche chocolatada en análisis sensoriales con extracto etanólico de propóleo, por lo tanto no existió discusión sobre los análisis sensoriales.



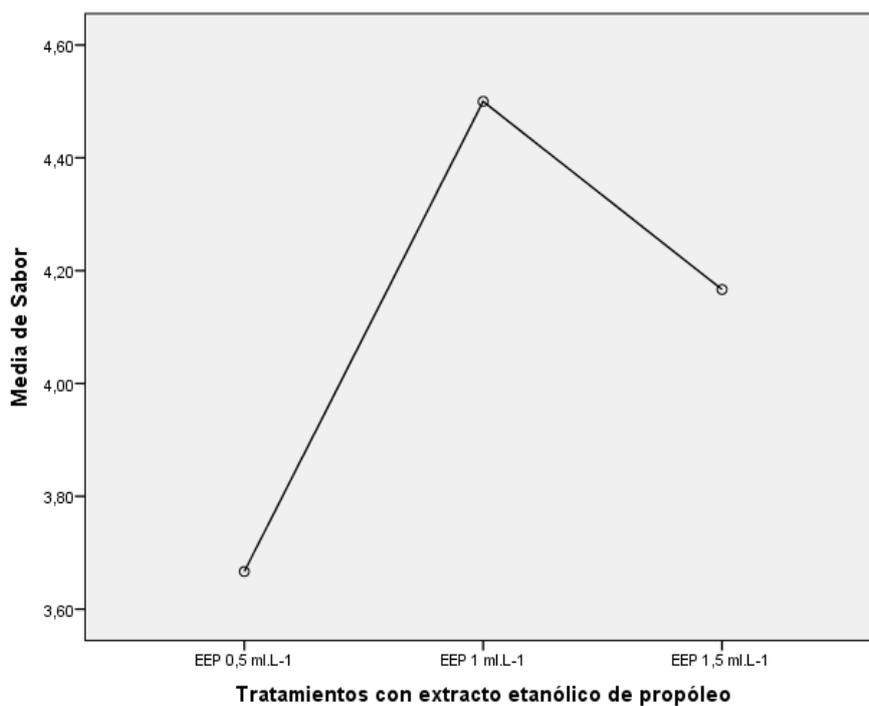
**Figura 4. 6. Media de Color**

La figura 4.6 de la media de color indica que el de mejor tratamiento fue el extracto etanólico de propóleo (EEP) de 1 mL.L<sup>-1</sup> con 4.17; mientras los dos últimos factores evaluados están en 4,08 que son los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de 0,5 y 1,5 mL.L<sup>-1</sup>; no existe significancia pero persiste un error típico de 0,279.



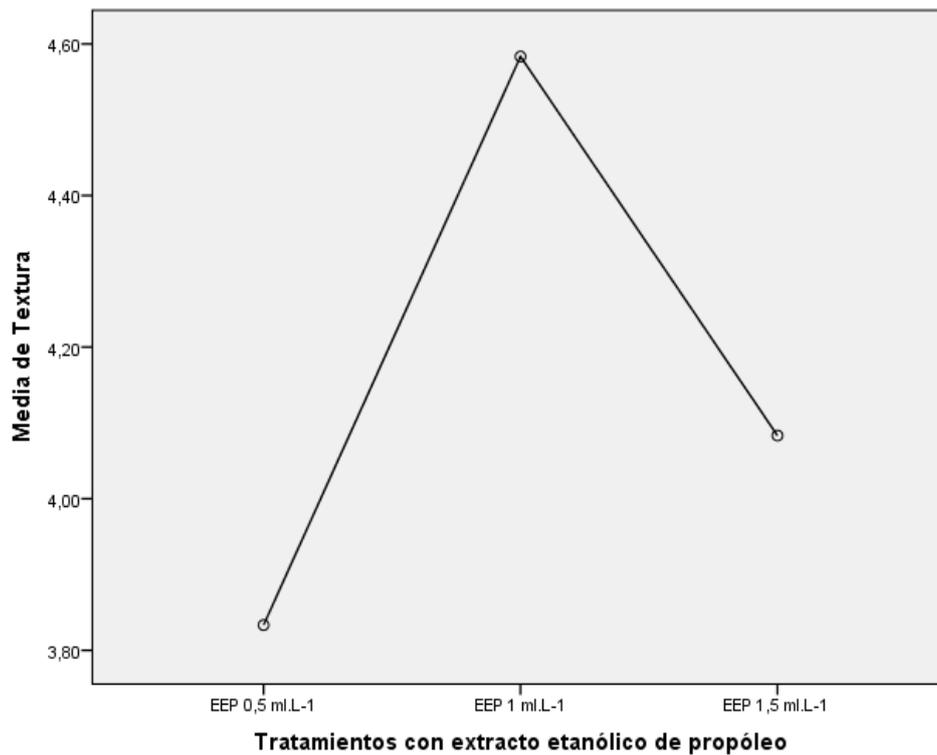
**Figura 4. 7. Media de olor**

En la figura 4.7 en la media de olor el extracto etanólico de propóleo (EEP) 1 mL.L<sup>-1</sup> tiene mayor aceptación con 4,42 con una diferencia de 4,33 para el extracto etanólico de propóleo (EEP) de 0,5 mL.L<sup>-1</sup> y de 4,36 para extracto etanólico de propóleo (EEP) de 1.5mL.L<sup>-1</sup>, no existe diferencia significativa y el error típico fue de 0,335.



**Figura 4. 8. Media de Sabor**

En la figura 4.8 media de sabor asemeja una mayor aceptación a extracto etanólico de propóleo (EEP) 1 ml.L<sup>-1</sup> con 4,0; mientras que, el extracto etanólico de propóleo (EEP) 0,5 ml.L<sup>-1</sup> tuvo 3,67 y el extracto etanólico de propóleo (EEP) 1,5 ml.L<sup>-1</sup> con 4,17; no existe diferencias significativas con un error típico de 0,358.



**Figura 4. 9. Media de Textura**

En la figura 4.9 media de textura se representa con 4,58 el extracto etanólico de propoleo de 1 ml.L<sup>-1</sup> es el de mayor aceptación; mientras que, el de 1,5 ml.L<sup>-1</sup> tuvo 4,08 y por último el de 0,5 ml.L<sup>-1</sup> estuvo en 3,83; no existió diferencias significativas inmersas en el parámetro de textura, se obtuvo un error típico de 0,359. Para la situación del parámetro de textura al utilizar el extracto etanólico de propóleo incidió de manera favorable, y en este caso la elección de los jueces afectivos fue por la tendencia en la características organolépticas.

# **CAPÍTULO 5 - CONCLUSIONES**

## 5.1. Conclusiones

Los resultados mostrados indican que, para la elaboración de una bebida láctea chocolatada con extracto etanólico de propóleo, se debe eliminar el solvente mediante rotoevaporación y utilizar estabilizantes como la goma xantán y CMC que se añadieron en frío y caliente, sin que estas alteraran la fluidez del producto; y la participación del emulsificador en este caso la carragenina impidió el asentamiento de grumos. Con estas sustancias se garantizó la calidad de la bebida chocolatada, evitando la sedimentación, sinéresis y floculación, que de no ser empleados hubiesen alterado los sólidos presentes en la chocolatada con las diferentes dosificaciones que se utilizaron, entre ellos el extracto etanólico de propóleo.

El estudio sobre las propiedades conservadoras del extracto etanólico de propóleo en la leche chocolatada envasada en botellas plásticas, reveló mediante las muestras evaluadas que la dosis de  $1\text{ml.L}^{-1}$  presentó efectos inhibitorios, que incidieron en la preservación de las características física-químicas durante el periodo indagatorio. Mientras que la dosis del sorbato de potasio, presentó un decrecimiento en la acción conservante a partir de la cuarta semana, donde se presenció aerobios mesófilos de  $6\text{ufc/ml}^{-1}$  y coliformes totales  $6.3\text{ufc/ml}^{-1}$ .

Se establece que de las concentraciones evaluadas la que tuvo mayor aceptación por parte de los jueces afectivos fue la de  $1\text{ml.L}^{-1}$  de extracto etanólico de propóleo en una leche saborizada, esto se determinó mediante la media de resultados, que evidenció una incidencia en las características organolépticas.

Las acotaciones referidas en los acápite anteriores reflejan que la utilización del extracto etanólico de propóleo en las bebidas lácteas pueden ser aplicadas sin riesgo alguno de contaminación por los microorganismos.

# **CAPÍTULO 6 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6.1. Bibliografía

- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). (Abril de 2016). 5,4 millones de litros de leche se producen al día. pág. 2.
- Acosta, O., & Téran, W. (2014). Elaboración de una bebida funcional a base de cebada (*Hordeum vulgare*) y cacao en polvo (*Theobroma cacao* L), edulcorado con Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Ibarra: Universidad Técnica del Norte.
- Agudelo Gómez, D. A., & Bedoya Mejía, O. (2005). Composición nutricional de la leche vacuno. *Lasallista de Investigación*, 2, 39.
- Alais, C. (2003). Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Paris: Société d'Édition et de Promotion Agro-alimentaires,.
- Ali, F, H., Kassem, G, M., Atta-Alla, & O, A. (2010). Propolis as natural decontaminant an antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria Italiana*, 46(2).
- AOAC. (1990). *Petrifilm TM Aerobic plate count in foods*. Obtenido de [https://www.edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food\\_AOAC-990.12.pdf](https://www.edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-990.12.pdf)
- AOAC. (1991). *Petrifilm Tm Coliform Count Plate TM*. Obtenido de [http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food\\_AOAC-991.14.pdf](http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-991.14.pdf)
- AOAC. (1998). *Petrifilm Tm Salmonella in Foods*. Obtenido de <http://down.40777.cn/stardard/8/17.9.24%20AOAC%20Official%20Method%200998.09%20Salmonella%20in%20Foods.pdf>
- Bankova , V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2 (1).
- Calvo, M. (2002). *Aditivos Alimentarios: Propiedades, Aplicaciones y Efectos sobre la salud*. Zaragoza: Instituto Fernando el Católico.
- Cando, M. d. (2010). El empleo de cmc y carragenina en leche saborizada de cocoa (*Theobroma cacao* L). Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Castaldo S, , & Capasso F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(1), 1-6.
- Codex Alimentarius. (1995). Norma general para los aditivos alimentarios Codex Stan 192-1995. *Normas Internacionales de los Alimentos*.

- Conti, A., Poli, A., Paoletti, R., & Visioli, F. (2012). *Chocolate and Health*. Milán, Italy: Springer. doi:10.1007/978-88-470-2038-2
- Cubero, N. M. (2002). *Aditivos alimentarios* (Vol. 1). Madrid: Mundi-Prensa S.A.
- Edairynews. (10 de Junio de 2013). *Ecuador la leche saborizada gana terreno en el mercado de las bebidas*. Obtenido de <http://edairynews.com/es/ecuador-la-leche-saborizada-gana-terreno-en-el-mercado-de-las-bebidas-25842/>
- FAO. (2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Recuperado el 1 de Noviembre de 2017, de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/tipos-y-caracteristicas/es/>
- Fatma, A., Kassem, G., & Atta-Alla, O. (2010). *Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage*. Egypt: Vet\_ital.
- INEN. (1984). *NTE 13*. Obtenido de <https://ia801906.us.archive.org/30/items/ec.nte.0013.1984/ec.nte.0013.1984.pdf>
- INEN. (08 de Marzo de 2010). *NTE 708, Leche fluida con ingredientes*. Obtenido de [http://apps.normalizacion.gob.ec/filesserver/2018/nte\\_inen\\_708-2.pdf](http://apps.normalizacion.gob.ec/filesserver/2018/nte_inen_708-2.pdf)
- INIAP, I. (2009). Valor nutricional del cacao. Pichilingue: INIAP.
- ISO 11290-1. (2017). *Detección de L. monocytogenes*. Obtenido de [http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/05/nte\\_inen\\_iso\\_11290-1.pdf](http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/05/nte_inen_iso_11290-1.pdf)
- Jönsson, D. (25 de Junio de 2013). Índice Lácteo de Tetra Pak. (I. Alimentaria, Entrevistador)
- Lee, K., Kim, Y., Lee, H., & Lee, C. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agricultural Food Chem*.
- Leyva. (1996). Elaboración de Productos Lácteos. *Universidad Agraria de la Molina*, 2.
- Ludueñas, F., & Valdivia, J. (1997). Elaboración de Derivados de la Leche. Lima: Planta Piloto de Leche.

- MAGAP, M. d. (Abril de 2016). 5,4 millones de litros de leche se producen al día. pág. 2.
- Manfugás, J. E. (2007). Evaluación sensorial de los alimentos. La Habana, Cuba: Universitaria, EDUNIV.
- Norma Argentina. (2004). Propóleo en Buto. *Instituto Argentino de Normalización, IRAM-INTA 15*, 15935-1.
- Norma Cubana. (1994). *Propóleos Materia Prima. Especificaciones*. . La Habana, Cuba: Ministerio de Agricultura NRAG-1135-94.
- Norma Russa. (1977). *Propóleos. Método analíticos para el control de su calidad*. Norma Ramal Rusa RST-RSFSR-317-77.
- Norma Salvadoreña. (2003). Calidad del Propóleo crudo. *Diario Oficial - Norma NSO 65.19.02:03*, 360.
- Pasquel, A. (2001). *Gomas: Una aproximación a la industria de alimentos* (Vol. 1). Iquitos, Perú: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Cháfer, M., & González-Martínez, C. (2010). Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropyl-methylcellulose edible coatings containing propolis extrac. *Postharvest Biology and Technology*, 60 (1).
- Peña, R. (2008). Propolis standarization a chemical and biological review. *Cienc. Inv. Agr*, 11-20.
- Popova M, P., Bankova V, S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G., & Luigi. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 3:306. Obtenido de *Apidologie*.
- Revilla, A. (1996). *Tecnología de la leche*. México: Escuela Agrícola Panamericana.
- Rodriguez, L. N. (2005). *INTA*. Obtenido de EL pH y la acidez de la leche: <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>
- Romaní, K. M., & Humire, S. G. (2009). Acción antimicrobiana del propolis de *Apis mellifera* L. y de *Solanum mammosum* L (teta de vaca) contra microorganismos

de la cavidad oral (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*). *CIEN DES*, 12,13,14,15.

Rouco, A., & Martinez, A. (2010). *Introducción a la Economía Agraria*. México: L.México.

Rubio, S., & Pozo, M. (2012). Elaboración de leche chocolatada con la utilización de tres edulcorantes (stevia, azúcar y aspartame) en tres formulaciones y con dos conservantes (benzoato de sodio y sorbato de potasio) en la Pasteurizadora "TANILACT", ubicada en Tanicuchi. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi.

Rubio, N. (2011). *Producción, comercialización y rentabilidad de las empresas de lácteos y su relación con la economía del Cantón La Maná, Provincia de Cotopaxi*. La Maná: Universidad Técnica de Cotopaxi.

Suárez, H. (12 de febrero de 2012). Ciencia & Tecnología. *Propóleo, nueva alternativa natural para conservar carne*.

Suarez, H., Jiménez, A., & Díaz, C. (2013). *Determinación de parámetros microbiológico y sensorial de filetes de pescado preservado con propóleo bajo refrigeración*. Bogotá: MVZ Córdoba.

Suárez, M. (2011). Método de conservación y tipos de leche. *Estilo de vida y salud*.

Vargas, R., Torrescano, G. R., & Sánchez, A. (10 de Octubre de 2013). El propóleo: Conservador potencial para la industria alimentaria.

# **CAPÍTULO 7 - ANEXOS**

**Anexo 7. 1. Formato de test sensorial realizada en la metodología que fue evaluado por los panelistas**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS  
ESCUELA DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS**

Ante todo, gracias por aceptar participar en este Test Sensorial con la finalidad de “Evaluar las características organolépticas de la leche chocolatada con extracto etanólico de propóleo en diferentes dosificaciones”

Nombre del Participante: \_\_\_\_\_

Proceda a la degustación de las muestras y valórelas. Actúe sin prisa. Tome tiempo con cada muestra, los siguientes códigos son: Apariencia, Color, Olor, Sabor y Textura. Señale una sola de las opciones para valorar cada muestra.

**MUESTRA 315**

**Apariencia**

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

**Color**

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

**Olor**

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

**Sabor**

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

**Textura**

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente

- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

### MUESTRA 408

#### Apariencia

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

#### Olor

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

#### Textura

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

#### Color

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

#### Sabor

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

## MUESTRA 516

### Apariencia

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

### Olor

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

### Textura

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

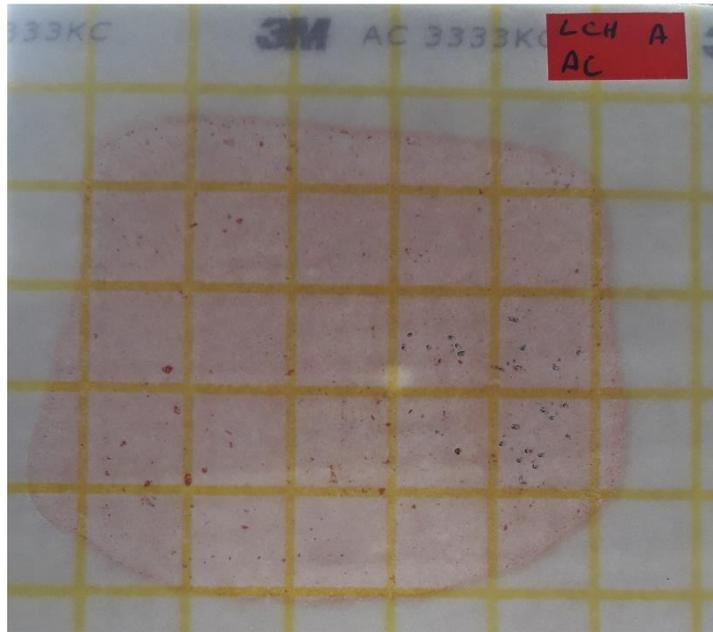
### Color

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

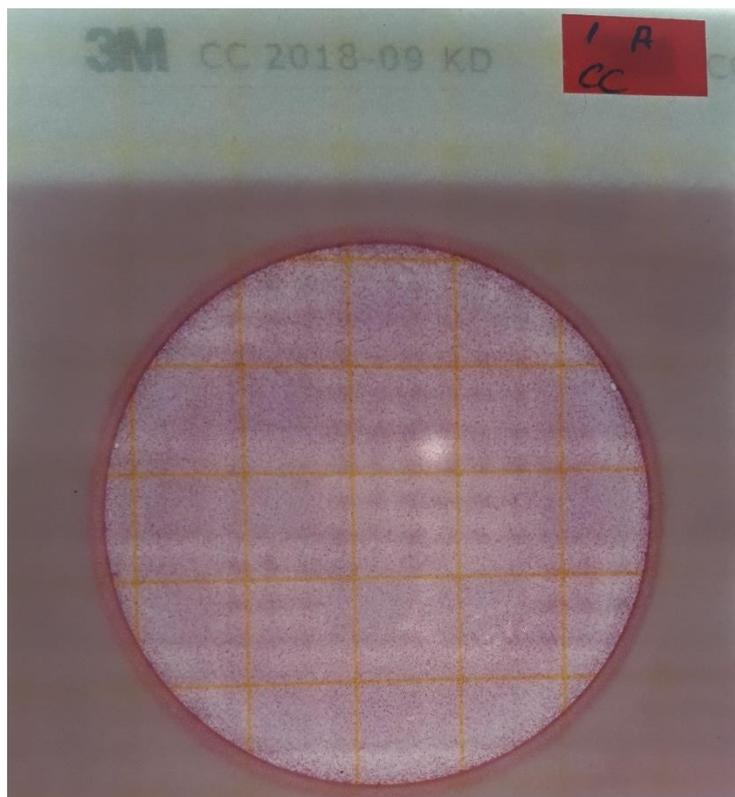
### Sabor

- Me gusta mucho
- Me gusta moderadamente
- Indiferente
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta mucho

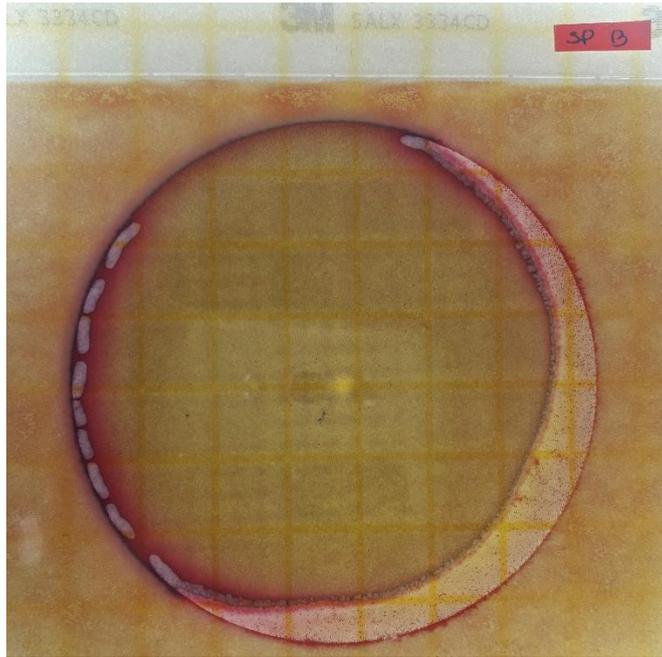
## Anexo 7. 2. Placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M)



Placa de recuento rápido (petrifilm™ 3M) de aerobios mesófilos positivo en la segunda semana de estudio en la leche chocolatada sin conservante (LCH).



Placa de recuento rápido (petrifilm™ 3M) tercera semana de estudio para verificar la existencia de coliformes totales, salió negativa en la leche chocolatada con extracto etanólico de propóleo de 1ml.L<sup>-1</sup>.



Placa de recuento rápido (petrifilm™ 3M) salió negativa en la tercera semana para *Salmonella* en la leche chocolatada con sorbato de potasio.



Placa petri con agar para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* salió negativa en la quinta semana para la leche chocolatada con extracto etanólico de propóleo de 0.5ml.L<sup>-1</sup>.

### Anexo 7. 3. Test sensorial realizado a los jueces afectivos



Organización de las muestras que fueron añadidas a los envases plásticos para ser degustadas por los jueces afectivos.



Entrega de las muestras con el respectivo test sensorial que fue realizado por los jueces afectivos.