



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE PRESERVANTES NATURALES, PARA INCREMENTAR EL  
TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE ANÁLOGOS PROTEICOS ELABORADOS CON  
QUINUA

Trabajo de titulación en conformidad con los requisitos establecidos para optar  
por el título de Ingenieros Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

MsC. Janeth Fabiola Proaño Bastidas

Autores

Andrea Raquel Arellano López

Fernando Paúl Montesdeoca Nuñez

Año

2016

## **DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA**

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Tutulación”

---

Janeth Fabiola Proaño Bastidas  
Magister en Investigación y Planificación  
CI: 1706515564

### **DECLARACIÓN AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

Declaramos que este trabajo es original de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes

---

Andrea Raquel Arellano López  
CI:1719285056

---

Fernando Paúl Montesdeoca Núñez  
CI: 1715495808

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por darnos la vida y permitirnos cumplir nuestros objetivos, a nuestros padres por darnos el apoyo y la confianza para ejecutar este proyecto y a nuestra tutora quien nos ha direccionado en cada uno de los pasos a seguir para culminar nuestra meta.

Andrea y Fernando

## **DEDICATORIA**

A nuestros padres por guiar cada etapa de nuestras vidas, y por darnos el bien más preciado, la educación.

Andrea y Fernando

## RESUMEN

Este proyecto de titulación tiene como finalidad la evaluación de preservantes naturales, para incrementar el tiempo de vida útil de análogos proteicos elaborados en forma de hamburguesas de quinua, motivo por el cual se determinaron las características químicas y cantidades mínimas inhibitorias del ácido ascórbico y aceite esencial de romero y jengibre. El objetivo recae en determinar la aplicabilidad de dichos preservantes para inhibir el crecimiento microbiano y por ende alargar el tiempo de vida en percha hasta los 45 días. Es por esto que se ha propuesto desarrollar en primer lugar la formulación de los análogos proteicos en forma de hamburguesa de quinua con un proceso estandarizado y cumplimiento con todas las normas de inocuidad y buenas prácticas de manufactura. Posterior a esto se realizó las investigaciones pertinentes a cada preservante natural, con el fin de evaluar mediante un diseño experimental la mejor formulación que logre incrementar el tiempo de vida útil de dichos productos en sistemas de frío con método de empacado al vacío. Como resultado se obtuvo la mejor formulación del preservante natural, capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias *Staphilococcus aureus*, *Escheria coli* y *Coliformes* así como de Ergosterol y Fumonisina responsables del deterioro del producto, las evaluaciones pertinentes a este estudio fueron realizadas con análisis microbiológicos independientes. Finalmente se logró determinar un incremento en los días de vida útil hasta 45 días, cumpliendo con el objetivo de alargar su estimado preliminar de 15 días, evidenciando los efectos del preservante natural aplicado. El beneficio económico de esta investigación recae en reducir gastos y pérdidas económicas producidas por el limitado tiempo de estabilidad y tiempo apto de consumo de este tipo de productos en la industria alimentaria.

## ABSTRACT

This graduation project aims the evaluation of natural preservatives to increase the shelf life of protein analogs produced as quinoa burgers, why the chemical characteristics and minimum inhibitory amounts of ascorbic acid and essential oil were determined rosemary and ginger. The objective lies in determining the applicability of such preservatives to inhibit microbial growth and thereby extending the lifetime on hanger to 45 days. That's why it is proposed firstly to develop the formulation of the protein analog as quinoa burger with a standardized process and such compliance with all safety standards and good manufacturing practices process. Following this, the appropriate investigations carried out every natural preservative, in order to be evaluated by an experimental design that achieves the best formulation to increase the shelf life of these products in cold systems with vacuum packing method. As a result the best formulation of natural preservative, capable of inhibiting the growth of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*, *coliforms* and Ergosterol with Fumonisin responsible for the deterioration of the product was obtained relevant evaluations in this study were performed with independent microbiological analysis. Finally it was determined an increase in the days of life up to 45 days, fulfilling the objective of extending its preliminary estimate of 15 days, demonstrating the effects of applied natural preservative. The economic benefits of this research lies in reducing costs and economic losses caused by the limited time stability and suitable for consumption of such products in the food industry time.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Antecedentes.....	1
Alcance .....	3
Justificación.....	3
Objetivos .....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos .....	4
1. MARCO TEÓRICO .....	6
1.1 Análogos proteicos .....	6
1.2 Problemática de conservantes artificiales vs naturales .....	7
1.3 Conservantes naturales aplicados en la industria alimentaria .....	8
1.4 Ácido ascórbico.....	9
1.4.1 Propiedades físicas.....	10
1.4.2 Propiedades químicas .....	10
1.4.3 Usos y aplicaciones del ácido ascórbico en la industria alimentaria .....	11
1.4.4 Ventajas del uso del ácido ascórbico en análogos proteico.....	11
1.4.5 Actividad antiséptica y antibacteriana .....	12
1.5 Aceites esenciales .....	12
1.5.1 Usos y aplicaciones de los aceites esenciales en la industria alimentaria .....	13
1.5.2 Actividad antiséptica y antibacteriana .....	14
2. ESPECIES VEGETALES EMPLEADAS PARA UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES .....	16
2.1 Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	16
2.1.1 Composición química.....	16



2.1.2 Propiedades.....	17
2.1.3 Concentración inhibitoria mínima del romero MIC .....	17
2.1.4 Justificación de la adición de Aceite esencial de romero en alimentos .....	18
2.2 Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> Rosc.).....	19
2.2.1 Composición química.....	19
2.2.2 Propiedades fisicoquímicas .....	20
2.2.3 Concentración inhibitoria mínima, MIC de jengibre .....	21
2.2.4 Justificación del empleo del aceite esencial de jengibre en alimentos .....	21
2.3 Microbiología de <i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Coliformes</i> .....	22
2.3.1 <i>Staphilococcus aureus</i> .....	22
2.3.2 <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.3.3 <i>Coliformes</i> .....	24
<b>3. ELABORACIÓN DE ANÁLOGOS PROTEICOS EN FORMA DE HAMBURGUESA DE QUINUA.....</b>	<b>25</b>
3.1 Análogo proteico escaldado.....	25
3.2 Materias primas utilizadas en la elaboración de análogos proteicos.....	25
3.2.1 Harina de soya.....	26
3.2.2 Quinua .....	26
3.2.3 Aditivos .....	27
3.2.3.1 Sal .....	27
3.2.3.2 Goma Xanthan .....	28
3.2.4 Saborizantes .....	28
3.2.4.1 Saborizante artificial de proteína vegetal hidrolizada .....	28
3.2.5 Especies aromáticas.....	29
3.2.6 Tripa artificial plástica .....	29
3.3 Equipos y materiales.....	30
3.3.1 Equipos.....	30

3.3.2 Materiales .....	30
3.3.3 Equipo de BPM's de seguridad e inocuidad alimentaria .....	31
3.4 Proceso de sanitización previo a la producción de hamburguesas de quinua con Ácido peracético.....	31
3.4.1 Proceso de limpieza con ácido peracético.....	31
3.5 Selección de la materia prima .....	32
3.6 Cocción de quinua .....	32
3.7 Mezclado .....	32
3.8 Embutido .....	33
3.9 Cocción de las tripas .....	33
3.10 Enfriado .....	34
3.11 Rebanado .....	34
3.12 Empacado al vacío .....	34
<b>4. ELABORACIÓN DE HAMBURGUESAS DE QUINUA CON PRESERVANTES NATURALES.....</b>	<b>35</b>
4.1 Materia prima .....	35
4.2 Diagrama de flujo de proceso de elaboración de hamburguesas de quinua.....	36
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>38</b>
5.1 Generalidades del diseño experimental.....	38
5.3 Tratamientos.....	39
5.4 Diseño experimental exploratorio de aceites esenciales.....	40
5.4.1 Factores.....	40
5.4.2 Tratamientos.....	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
6.1 Evaluación 1 .....	42
6.2 Evaluación 2:.....	49
6.3 Evaluación 3:.....	50

6.4 Interpretaciones de Varianza estadística.....	52
6.4.1 Evaluación de <i>Escherichia coli</i> .....	52
6.4.2 <i>Staphilococcus aureus</i> , análisis de Varianza.....	54
6.4.2.1 Análisis día 15 .....	54
6.4.2.2 Análisis día 30 .....	55
6.4.2.2 Análisis día 45 .....	56
6.4.3 <i>Coliformes</i> , Análisis de Varianza .....	58
6.4.3.1 Análisis día 1 .....	58
6.4.3.2 Análisis día 15 .....	59
6.4.3.3 Análisis día 30 .....	60
6.4.3.4 Análisis día 45 .....	61
6.5 Determinación de vida útil de las hamburguesas de quinua...	63
6.5.1 Requisitos microbiológicos para la carne molida .....	63
6.5.2 Resultados microbiológicos para las hamburguesas de quinua (T5) .....	64
<b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>65</b>
7.1 Conclusiones .....	65
7.2 Recomendaciones .....	66
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Estructura del ácido ascórbico. ....	10
<i>Figura 2.</i> Planta de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), en pleno florecimiento....	16
<i>Figura 3.</i> Rizomas de Jengibre.....	19
<i>Figura 4.</i> Diagrama de flujo de proceso de elaboración de hamburguesas de quinua.....	37
<i>Figura 5.</i> Petrifilms. ....	42
<i>Figura 6.</i> Crecimiento microbiano de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> en la cámara de vida útil.....	45
<i>Figura 7.</i> Curva de pH y crecimiento Microbiológico <i>Escherichia coli</i> .....	46
<i>Figura 8.</i> Evaluación de pH y crecimiento microbiano.....	46
<i>Figura 9.</i> Análisis microbiológicos contaminados, diseño experimental preliminar. ....	47
<i>Figura 10.</i> Testigos contaminados de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	47
<i>Figura 11.</i> Comparación testigo vs T10.....	48
<i>Figura 12.</i> Muestras M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 vistas en conjunto. ....	48
<i>Figura 13.</i> Hamburguesa sin ácido ascórbico en pruebas de cámara de vida útil. ....	48
<i>Figura 14.</i> Muestra de Hamburguesa con Hongo <i>Fusarium</i> .....	49
<i>Figura 15.</i> Muestra de hamburguesa con presencia de <i>Aspergillus Niger</i> .....	50
<i>Figura 16.</i> Resultados del análisis microbiológico al día 15 .....	51
<i>Figura 17.</i> Resultados microbiológicos al día 30. ....	51

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Terpenoides ensayados y zonas de inhibición .....	14
Tabla 2. Principales elementos químicos del aceite de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	17
Tabla 3. Composición química del jengibre.....	20
Tabla 4. Parámetros que regulan el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	24
Tabla 5. Cálculo de materias primas .....	35
Tabla 6. Descripción de la Concentración de Ácido ascórbico en las hamburguesas de quinua .....	39
Tabla 7. Factores del diseño experimental de aceites esenciales.....	40
Tabla 8. Tratamientos de Aceites esenciales .....	41
Tabla 9. Número de unidades formadoras de colonia (UFC) de dos bacterias, <i>Staphilococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> , presentes en 9 hamburguesas de quinua contenidas de dosis de Ácido Ascórbico ..	43
Tabla 10. Muestras 1-6 en cámara de estabilidad.....	44
Tabla 11. Evaluación de pH y crecimiento Microbiológico <i>Escherichia coli</i> .....	45
Tabla 12. Evaluación de pH y crecimiento Microbiológico <i>Staphilococcus</i> <i>aureus</i> . .....	46
Tabla 13. Análisis de tratamientos para <i>Escherichia Coli</i> en los días 0, 1, 15, 30 y 45 .....	52
Tabla 14. Análisis de varianza para <i>Staphilococcus aureus</i> en el día 15.....	54
Tabla 15. Ponderación de tratamientos para <i>Staphilococcus aureus</i> en el día 15. ....	54
Tabla 16. Análisis de varianza para <i>Staphilococcus Aureus</i> en el día 30. ....	55
Tabla 17. Ponderación de tratamientos para <i>Staphilococcus aureus</i> en el día 30. ....	55
Tabla 18. Análisis de varianza para <i>Staphilococcus Aureus</i> en el día 45. ....	56
Tabla 19. Ponderación de tratamientos para <i>Staphilococcus aureus</i> en el día 45. ....	56
Tabla 20. Análisis de varianza para Coliformes en el día 1 .....	58
Tabla 21. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 1 .....	58

Tabla 22. Análisis de varianza para Coliformes en el día 15.....	59
Tabla 23. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 15.....	59
Tabla 24. Análisis de varianza para Coliformes en el día 30.....	60
Tabla 25. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 30.....	61
Tabla 26. Análisis de varianza para Coliformes en el día 45.....	62
Tabla 27. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 45.....	62
Tabla 28. Requisitos microbiológicos para la carne molida.....	64
Tabla 29. Requisitos microbiológicos para la hamburguesa de quinua.....	64
Tabla 30. Resultados de diseño experimental con aceite esencial de romero y jengibre. Repetición 1.....	76
Tabla 31. Resultados de diseño experimental con aceite esencial de romero y jengibre. Repetición 2.....	77
Tabla 32. Resultados de diseño experimental con aceite esencial de romero y jengibre. Repetición 3.....	78
Tabla 33. Matriz de diseño experimental con 3 repeticiones.....	79
Tabla 34. Cuadro de raíces (n+1) .....	80

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

Actualmente las nuevas tendencias alimentarias inducen al ser humano a consumir dietas funcionales que mejoren su estilo de vida (Forwest, 2014). Existe un segmento de la población que ha direccionado su alimentación al consumo de análogos proteicos, estos aducen abstenerse de ingerir carne por consideraciones de la salud, otros segmentos lo hacen por preocupación por el medio ambiente, razones éticas, o por motivos de índole religiosa (Ivest, 2014). El análogo cárnico también llamado sustituto de carne o análogo proteico, busca aproximarse a ciertas cualidades estéticas y/o características químicas y bioquímicas de aquellos tipos específicos de carne (Strabenn, 2013). Algunos sustitutos de carne más recientes incluyen en su formulación a la proteína vegetal texturizada, la cual es un ingrediente seco derivado de la soja hecho a base de micoproteínas (Ketznel, 2008).

La ventaja del consumo de análogos proteicos radica en su composición nutricional pues sus grasas son mayormente insaturadas, aportan altas cantidades de energía y fibra, así como un alto contenido de macro y micronutrientes, una de las características que se denotan en la línea de venta de estos productos es que se hallan exentos del efecto cancerígeno de la carne (Pamplona, 1995). Los análogos proteicos se han desarrollado a base de exigencias nutricionales, así mismo se apegan a directrices que incluyen ingredientes con alto contenido proteico y energético (Pamplona, 1995).

En el año 2013 la quinua fue denominada como “Alimento del año” porque puede desempeñar un papel importante en la erradicación de la desnutrición y la pobreza (Da Silva, 2013). El merecimiento de este importante título incurre en que la quinua posee un alto valor biológico y nutricional que se compara o supera a muchos alimentos de origen animal como la carne, leche o huevos. Varios estudios demostraron que su composición nutricional es comparable a la leche materna (Muñoz, 2000). Las investigaciones en cuanto al desarrollo de

análogos proteicos, incluyeron con respaldo científico a la quinua, como ingrediente esencial para la formulación y enriquecimiento nutricional de esta gama de productos. (Muñoz, 2013).

Actualmente el proceso de conservación de alimentos y el incremento de vida útil, conforman ejes temáticos claves para el desarrollo de productos, dichos ejes están destinados a cumplirse a nivel mundial y en la soberanía Alimentaria Ecuatoriana (Marz, 2000). Los consumidores han generado una demanda creciente por alimentos sin preservantes artificiales (Begin, Calsteren V, 1999) y están en búsqueda de alimentos que posean un alto rango de vida útil con la adición de preservantes naturales que además, aporten factores de fortificación y enriquecimiento nutricional (Morales, 2011). En este contexto, a escala mundial, la industria se enfrenta cada vez más, con numerosos retos (Leguerinel y Mafart), dando prioridad al desarrollo de productos alimenticios mínimamente procesados con elevado valor nutritivo y alta calidad organoléptica (Valero, 2000).

Las investigaciones en el diseño y desarrollo de productos han justificado reemplazar los preservantes artificiales por los naturales en las nuevas formulaciones de alimentos funcionales. Las causas principales de los cambios se deben a problemas en la salud de los consumidores, calidad del producto y composición nutricional (Montoya, 2014). Estudios recientes evidencian al ácido ascórbico y sus derivados como un tipo de conservante natural óptimo para incrementar el tiempo de vida de productos de base proteica (Núñez, 2011). El ácido ascórbico también llamado vitamina C, es un ácido hidrosoluble derivado del proceso metabólico de la glucosa (Valdéz, 2006) el cual cumple con funciones antioxidantes y es altamente aplicado en la conservación de alimentos (Rico, 2007). El ácido ascórbico así como sus sales y ésteres son agentes conservadores muy investigados y aplicados en la industria alimentaria (Pérez y Martínez, 2007).



## **Alcance**

El alcance está enfocado a la industria alimentaria, dado por el aporte investigativo de preservantes naturales efectivos para la conservación de análogos proteicos. El alcance recae también en los consumidores de alimentos funcionales del Ecuador, así como al segmento vegetariano el cual busca reducir el consumo de carne.

La investigación se direcciona en beneficio de la planta de procesamiento "Manna" ubicada en la provincia de Pichincha, ciudad de Quito, parroquia Puembo propiedad del Ingeniero Cristian Albán, persona con la cual se ha hecho una alianza Universidad – Industria para la realización de éste proyecto. Esta planta produce análogos proteicos a base de quinua con un tiempo de vida útil muy limitado (15 días), siendo inestables a las condiciones de mantenimiento en sistemas de refrigeración. Los productos de "Manna" no contienen preservantes químicos pues éstos desvalorizan el concepto natural del análogo, por esta razón se requiere aplicar la investigación a sus líneas de producción, para asegurar la estabilidad, calidad y vida útil del producto.

La investigación inicia con la formulación del análogo proteico a base de quinua y una vez obtenida, ésta será sometida a tratamientos experimentales con preservantes naturales previamente investigados, con el fin de poder evaluar el impacto de los mismos en el tiempo de vida útil. El proceso de evaluación se realizará bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura en sistemas de refrigeración y empaçado al vacío.

## **Justificación**

Hoy en día la tendencia del consumo de alimentos reside en la búsqueda de productos funcionales que aporten cualidades benéficas al organismo así como alimentos mínimamente procesados que faciliten la asimilación de su contenido nutricional (Crick, 2012). Los análogos proteicos de quinua que actualmente son elaborados por las industrias alimentarias del Ecuador, tienen un tiempo de vida útil, sin la adición de preservantes químicos de 20 días en sistemas

continuos de frío (Temperatura: 4°C), y de 15 días en percha con sistema de frío circulante (Temperatura: 6°C) dado por la variabilidad de las condiciones de transporte y rotación de producto (Albán, 2015). Este tiempo de vida útil es extremadamente corto para la industria alimentaria, por lo cual cadenas como Supermaxi, El Español, Camari, entre otros, exigen hoy en día solucionar este inconveniente extendiendo el período de días de vida útil, pues conlleva pérdidas económicas tanto para el productor como para las cadenas de distribución. La solución sería fácil si se agregaran preservantes químicos, el problema radica en que dichas sustancias químicas destruyen el contenido nutricional así como la bio-disponibilidad de macro y micro nutrientes del producto, fundamentalmente se rompe el esquema funcional (Watson, 2011).

En base al análisis de las necesidades alimenticias de los consumidores, conjuntamente con la necesidad de la industria alimentaria (estabilidad y vida útil de productos), y enfocada a la planta de producción "Manna", es evidente la oportunidad de crear una solución que beneficie a todos los miembros de la cadena productiva. La factibilidad de la investigación se justifica directamente en generar cambios positivos para los ecuatorianos desde el enfoque de la salud hasta el alimenticio, así como para la planta de producción y las cadenas de distribución.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar preservantes naturales para incrementar el tiempo de vida útil de análogos proteicos elaborados con quinua (Hamburguesas de quinua).

### **Objetivos específicos**

- Crear un análogo proteico en forma de hamburguesa de quinua con preservantes naturales.

- Formular un preservante natural a base de ácido ascórbico, aceite esencial de romero y jengibre, para inhibir la proliferación de microorganismos en hamburguesas de quinua.
- Obtener por medio del preservante natural formulado, inhibición microbiológica de las bacterias *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes*, en las hamburguesas de quinua hasta los 45 días de almacenamiento en sistema de frío.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Análogos proteicos**

La investigación y desarrollo de productos alcanza cada vez mejores estándares de calidad y valor nutricional, el objetivo va más allá del aporte energético, pues se busca facilitar; la forma en la cual el producto será consumido, el tipo de empaque, tiempo de vida útil, target de consumo entre otros. El producto ideal será el que contenga en su formulación elementos con efectos funcionales, sea bajo en grasas y alto en proteínas, de aporte calórico óptimo, bajo en sal o azúcar pero con características organolépticas excepcionales, sin preservantes artificiales, de fácil preparación y óptima asimilación (Sabate y Brown, 2005).

Los análogos proteicos surgen ante la oportunidad de satisfacer las necesidades de los consumidores con alimentos funcionales, efectivamente cumplen las características del producto ideal siendo bajos en grasa, altos en contenido proteico y energético, contienen bajas cantidades de sal o azúcar y satisfacen el carácter organoléptico gracias al aporte de saborizantes de origen vegetal. Son fáciles de consumir pues son pre-cocidos, y esto se debe a que la proteína vegetal requiere un pre-tratamiento de cocción para poder conservar sus propiedades físicas, este tipo de productos son beneficiosos para todo tipo de consumidores, desde niños hasta ancianos. El término análogo proteico se explica en que la mayoría de alimentos contienen diferentes porcentajes de proteínas, y por lo general estas proteínas contienen los 20 diferentes aminoácidos en distintas cantidades, los alimentos que contienen buenas cantidades de los aminoácidos esenciales se denominan alimentos de proteína completa por tanto los análogos proteicos se adhieren a este concepto (Phyllis, 2000).

Las ventajas de consumir este tipo de productos residen en el beneficio gastrointestinal en primer lugar, debido al alto contenido de fibra que mejora los movimientos peristálticos y facilitan la digestión y absorción de nutrientes así

como el tránsito de las masas digeridas retenidas en las vellosidades. La generación de óxido nítrico es otra de las ventajas de consumir este tipo de productos, permitiendo así una mejor recuperación muscular después del ejercicio, de igual manera promueve la pérdida de grasas y es coadyuvante en la satisfacción del apetito (Moore, 2000).

Las dietas a base de análogos proteicos han demostrado ser coadyuvantes benéficos para mejorar el sistema digestivo en pacientes con problemas cancerígenos. Los consumidores de análogos proteicos son menos afectados por el cáncer de colon y padecen de menos problemas digestivos, ya que si se compara estos alimentos con dietas de origen animal casi siempre los embutidos y carnes comunes serán altos en grasa y bajos en fibra (Sánchez, 2005).

## **1.2 Problemática de conservantes artificiales vs naturales**

La conservación de alimentos es la tecnología aplicada para alargar el tiempo de vida útil del producto sin alterar su sabor, calidad o inocuidad siendo uno de los principales objetivos de la seguridad alimentaria. Los conservantes son sustancias de origen natural o artificial que son utilizados para la preservación de alimentos ante la acción de microorganismos, el objetivo es impedir su deterioro en un tiempo definido bajo condiciones de almacenamiento específicas (Barbosa, Tapia y Cano, 2004).

Los conservantes poseen poder bactericida y bacteriostático, y describen especificaciones de dosis permitidas al producto en el cual será utilizado. Los preservantes artificiales no son admitidos universalmente y contienen elementos de toxicidad incierta, dependiendo del tipo de sustancias conformantes, tiempo de exposición o la cantidad utilizada pueden provocar efectos carcinogénicos así como teratogénicos, y concebir trastornos metabólicos en los seres humanos. (Riera, Salcedo y Alegret, 2004)

La industria alimentaria enfrenta nuevos retos, entre ellos la búsqueda del conservante ideal que otorgue un amplio tiempo de vida útil. El objetivo actual es reemplazar conservantes químicos o sintéticos por los de origen natural, las razones refieren a que los clientes se niegan a consumir productos que declaren el contenido de los mismos, las razones se expresan en que son causantes de problemas en la salud y declaran síntomas alérgenos o cancerígenos. (Castaño, Ciro y Zapata, 2010).

Los conservantes naturales han sido utilizados milenariamente, los más comunes y empleados en casi todas las formulaciones son la sal, aceites esenciales, ácidos como jugo de limón y antioxidantes naturales como la vitamina C y el tocoferol. Las hierbas y especias también contienen efectos conservantes sin embargo no existen estudios que validen las cantidades de dosificación en las cuales el efecto será alcanzado.

Las principales causas de pérdida de la calidad y la inocuidad en las formulaciones se debe a la oxidación de lípidos que además alteran las propiedades organolépticas, estas falencias en producción de alimentos también son consecuencia de la cadena de procesamiento, pues a mayor manipulación del producto, mayor es el riesgo de contaminación y alteración del mismo. Las causas secundarias pero no menos importantes, serán las de carácter microbiológico, pues el desarrollo de bacterias, mohos y levaduras destruyen la inocuidad del alimento (Pokorny, Ynishlieva y Gordon, 2001, pp. 1179 – 1181).

### **1.3 Conservantes naturales aplicados en la industria alimentaria**

Durante el tiempo invertido en investigaciones de conservantes naturales efectivos contra el desarrollo de patógenos, han surgido numerosas alternativas naturales antimicrobianas para extender el tiempo de vida útil de los alimentos. Además de la inhibición bacteriana, los conservantes naturales pueden ser añadidos como elementos fortificantes del producto.

El ácido ascórbico conocido como vitamina C ha demostrado su efectividad como conservante alimentario. La exposición al oxígeno, luz, metales y calor impiden su efectividad por lo que es eficiente como estabilizante de la vida útil, siempre y cuando el producto pueda ser almacenado en un lugar frío y con empaques no metálicos.

Varias investigaciones se han destinado al estudio de aceites esenciales ya que confieren propiedades antimicrobianas excepcionales. Los componentes antimicrobianos comprenden a los grupos fenólicos, terpenos e isoflavonoides. Los aceites esenciales son muy efectivos contra bacterias Gram-positivas como son *Bacillus*, *E. coli* y *salmonella*. (Soriano, 2007).

Existen investigaciones que demuestran que los aceites esenciales han favorecido la conservación de formulaciones proteicas y cárnicas, además atribuyen ventajas por ser fáciles de aplicar y ser libres de microorganismos, a medida que son dosificados reducen la oxidación de lípidos especialmente si son respaldados por el almacenamiento con temperaturas entre 2° y 4°C en sistemas de refrigeración. (Preedy, 2015). Además se demostró que los aceites esenciales tienen un efecto letal sobre los microorganismos pues logran inhibir bacterias, *coliformes* totales, mohos y levaduras. Es así que el empleo de aceites esenciales ha ganado interés gracias a sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas aumentando significativamente el tiempo de vida útil de productos (Sellar, 2003).

#### **1.4 Ácido ascórbico**

La vitamina C (ácido ascórbico) es un elemento esencial e indispensable en la dieta del ser humano (Basabe, 2000, pp. 46-54.). Las propiedades del ácido ascórbico lo hacen atractivo para varias industrias entre ellas, la industria cosmética ya que se lo usa como acidulante, por otra parte se encuentra la industria alimentaria donde dicho ácido se dosifica como principal antioxidante y por último está la industria farmacéutica donde es considerado como fuente

de vitamina C. Es en la industria alimentaria donde el ácido ascórbico se destaca por propiedades tales como extender los lineamientos funcionales de las proteínas, así como mantener la consistencia de geles. (Nakai y Molder, 2000).

#### 1.4.1 Propiedades físicas

Como menciona Lorenzo, Moreno y Lizasoain (2008), el ácido ascórbico es una cetolactona de 6 carbonos que posee una relación estructural con la glucosa. Se desnaturaliza aproximadamente a los 57°C, ésta característica lo hace muy sensible al calor que además oscurece gradualmente su color y es muy resistente a la congelación (Moret, 1997).

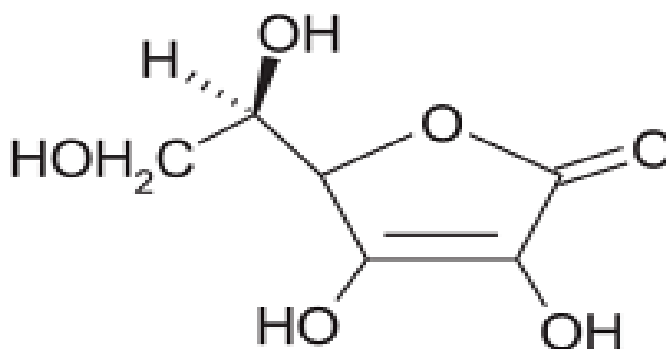


Figura 1. Estructura del ácido ascórbico.

Tomado de: Ocampo, Amalia y Betancourt, 2006

#### 1.4.2 Propiedades químicas

La propiedad química más relevante del ácido ascórbico radica en el poder de óxido – reducción siendo un respaldo básico para los estudios de estabilidad y actividades fisiológicas (Altamirano, 1997).

El ácido ascórbico participa en el metabolismo de varios elementos como la tirosina, carbohidratos, hierro entre otros. Existen procesos que necesitan de su presencia como es la síntesis de lípidos, proteínas y carnitina. Este compuesto



es muy importante en el mantenimiento de los vasos sanguíneos y respiración celular, además, la vitamina C ayuda a regular el almacenamiento y la distribución del hierro en la sangre (Roseberg, 2004).

#### **1.4.3 Usos y aplicaciones del ácido ascórbico en la industria alimentaria**

La vitamina C ha sido por décadas una buena alternativa de conservación puesto que cuenta con funciones antioxidantes las cuales evitan el oscurecimiento o pardeamiento de los alimentos y otro tipo de reacciones oxidativas (Shafiur, 2010). La aplicación del ácido ascórbico y sus derivados en la industria alimentaria, está principalmente enfocada en la conservación de zumos de fruta, bebidas refrescantes, productos cárnicos, y productos de repostería puesto que posee un gran potencial antioxidante, aportando color y reduciendo la actividad microbiana. El ácido ascórbico es frecuentemente usado en la panadería ya que ayuda a mejorar el comportamiento de la masa fortaleciendo la proteína (gluten) además su adición en bebidas fermentadas y vinos contribuye con la reducción de uso de sulfitos. (Astiasarán, Laheras y Lariño, 2003).

#### **1.4.4 Ventajas del uso del ácido ascórbico en análogos proteico**

El efecto antioxidante del ácido ascórbico es empleado en formulaciones proteicas, con el fin de evitar procesos degenerativos por acción del oxígeno el cual deteriora el color del producto haciendo que el aspecto se vuelva desagradable a la vista. El objetivo de la adición también se vincula a la acción antibacteriana puesto que dicho ácido reduce el pH del contenido y por ende el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli* es inhibido. Es importante determinar la fase en la cual el ácido ascórbico debe ser agregado en la cadena de proceso del alimento, ya que no es resistente a las temperaturas altas o tratamientos térmicos, de igual forma no es estable a la exposición de luz, ni en contacto con materiales de metal o aluminio (Asar, May y Smirnof, 2004).

#### **1.4.5 Actividad antiséptica y antibacteriana**

Un estudio realizado por Martínez, Molina y Boucort (1997, pp. 25 – 26.), demostró la reducción en la actividad microbiana de productos cárnicos en cepas de *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* gracias al aporte de ácido ascórbico. Las cualidades antibacterianas del ácido ascórbico también están justificadas con la inhibición de crecimiento en bacterias aeróbicas como *Campylobacter jejuni*, en extractos con contenido de levaduras (Xiong, Ho y Shahidi 2012).

Otra de las propiedades del ácido ascórbico es su poder sinergista dado por el potencial antioxidante cuando se apoya en algunos sistemas. Un ejemplo de esto es que al combinarse con los tocoferoles o vitamina E promueve un fortalecimiento de su poder antioxidante en los lípidos y proteínas de las membranas celulares dando como resultado una mayor protección contra daños oxidativos en los alimentos.

En un estudio realizado por Campos, Ruiz y Diaz (2002, pp. 89 – 95) se demostró la actividad sinergista entre el ácido ascórbico y butil hidroxil tolueno (BHT), siendo este último un compuesto fenólico utilizado como antioxidante de grasas. En este estudio se evaluó el poder antioxidante en un producto hecho a base de cereales, para ser observado durante 10 meses. El resultado reveló que el poder sinérgico de estos dos elementos se mantuvo durante el tiempo de vida útil esperado, evidenciando un incremento del pH que impidió el deterioro de lípidos del producto (Gutierrez, 2000).

#### **1.5 Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son fracciones volátiles y líquidas, que en su mayoría son extraídas por arrastre de vapor de agua como solvente, son las responsables del aroma característico de las plantas y son ampliamente

utilizados en la industria cosmética y alimenticia como potenciadores de aromas y conservantes.

Una de las propiedades más importantes de los aceites esenciales son la volatilidad, y su alta inestabilidad ante la presencia de oxígeno y luz, así como ante la presencia de medios con pH altos, trazas de metales y compuestos acidificantes que causan la descomposición del mismo (Bandoni, 2009).

Muchas investigaciones han atribuido propiedades antisépticas y antibacterianas a los aceites esenciales, se ha demostrado que son efectivos como fungicidas en especial en muestras con presencia de mohos y levaduras, además poseen características expectorantes. (Méndez, 2011). Los aceites esenciales son utilizados de forma real en la industria alimentaria, con efectos extensivos del tiempo de vida útil del producto y como reductores de flora microbiana. Gracias a sus propiedades repelentes también son utilizados en plantaciones para controlar plagas en cultivos de forma amigable con el ambiente.

Los aceites esenciales son ligeramente líquidos en temperaturas ambientales, y tienen una apariencia viscosa, su densidad es menor a la del agua. Son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos, son liposolubles y muy poco soluble en agua (Gil y Saenz, 2000, pp. 15 - 21). Las propiedades químicas de los aceites esenciales varían ya que pertenecen a sustancias muy heterogéneas, el rendimiento de la esencia extraída generalmente es obtenido entre el 1% al 3% del peso de la masa vegetal.

### **1.5.1 Usos y aplicaciones de los aceites esenciales en la industria alimentaria**

Los aceites esenciales experimentan en la actualidad una amplia aplicabilidad en el sector alimenticio y en emulsiones proteicas gracias a sus propiedades antibacterianas, aceites esenciales de orégano, albaca, romero y jengibre han

evidenciado ser efectivos en la reducción de tasas microbiológicas en alimentos procesados. (Cardoso y Sosa, 2012, pp. 54 – 55).

### 1.5.2 Actividad antiséptica y antibacteriana

Dentro de la rama bacteriológica los aceites esenciales han ejemplificado su acción de manera positiva reduciendo tasas de microorganismos, pero su actividad es directamente proporcional a los compuestos activos que se encuentran en el aceite.

Según estudios realizados, los aceites esenciales que contienen más fenoles son: aceite esencial de orégano por sus características reguladoras de pH y alto contenido de carvacol y terpinenol, aceite esencial de jengibre, por sus propiedades fungicidas, y finalmente el aceite esencial de romero gracias a su contenido de carvacol.

Los aceites esenciales extraídos a partir del orégano han demostrado efectividad en cuanto a su actividad antimicrobiana gracias a su efecto inhibitorio frente a bacterias Gram positivas como es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, de igual manera ejerce un sistema inhibitorio sobre bacterias Gram negativas (Plaus, Flores y Ataucusi, 2001, pp. 16-19).

Tabla 1. Terpenoides ensayados y zonas de inhibición

Terpenoides ensayados y Zonas de Inhibición			
Terpenoide	Bacterias Gram Negativas		Bacterias Gram Positivas
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cineole	11	N1	13
$\alpha$ -terpineol	16	28	12
Eugenol	15	NI	11
Isopulegol	12	12	9
Carvacol	27	NI	20
$\alpha$ -terpineno	NI	NI	NI
$\beta$ -Pineno	NI	NI	II

$\alpha$ -pineno	NI	NI	II
Citronenal	11	11	II
Citronelol	8	10	II
Dipenteno	NI	14	NI
Linalool	14	16	II
p-eimeno	NI	NI	NI
acetate de cotronelilo	6	7	II
Miceno	NI	NI	NI

El diámetro de la zona de inhibición está expresado en mm.

II: inhibición irregular.

NI: no produjo inhibición.

Tomado de: UNNE, s.f.

## 2. ESPECIES VEGETALES EMPLEADAS PARA UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

### 2.1 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

#### 2.1.1 Composición química

La variabilidad de los componentes del aceite esencial de romero está en función del origen, variedad y zona geográfica donde se recolecta a la planta o las hojas. Es de densidad ligera, de color verdoso y un intenso sabor amargo. La esencia está conformada de borneol (18%), alcanfor (12%), cineol (32%), cafeno y limoneno (Romeu, 2007, pp. 75-78). Así mismo el romero contiene flavonoides, que es un derivado del compuesto epigenol y a éste se le atribuyen las propiedades antioxidantes, eliminando los radicales libres e impidiendo el desarrollo de procesos degenerativos celulares. El romero contiene una gran cantidad de ácidos fenólicos como el rosmarínico y el clorogénico, así como triperpénicos como es el caso del ursólico. La planta es rica en diterpenos conteniendo el rosmadial y rosmanol. Investigaciones demostraron la presencia de taninos que se enlazan a los flavonoides para potencializar el efecto antioxidante y abrir paso a la efectividad de las saponinas (Wiley, 2010).



Figura 2. Planta de romero (*Rosmarinus officinalis*), en pleno florecimiento.  
Tomado de: PPC, s.f.

Tabla 2. Principales elementos químicos del aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*)

N.	Compuesto	Concentración
1	Triciclono	0.2
2	Canfeno	6.7
3	Mirceno	6.4
4	Limoneno	2.6
5	3-Octanona	1.8
6	Terpinoleno	0.4
7	Fenchona	0.1
8	Alcanfor	31.0
9	Linaol	1.2
10	C6H12O6	0.4

Tomado de: Carceler, Reglero y Sanz, 1989, pp. 519-536

### 2.1.2 Propiedades

El romero posee propiedades coleréticas, antioxidantes, preservantes y antiinflamatorias. El aceite esencial a su vez posee características antimicrobianas, además en la medicina es usado como antiséptico y desinflamante. La planta de romero posee características antibacterianas que han sido probadas por varios autores con el fin de determinar nuevas alternativas de preservantes naturales. Debido a las mencionadas propiedades antisépticas, el romero es un precursor de la reestructuración celular.

### 2.1.3 Concentración inhibitoria mínima del romero MIC

Según un estudio realizado por el grupo COINDE de la universidad de Antioquia, Colombia, el aceite esencial de romero presenta una efectiva actividad bactericida contra bacterias Gram positivas sin embargo es importante mencionar que no existe actividad selectiva del aceite esencial de romero por ningún tipo de bacteria específica. El estudio de COINDE evaluó el efecto del aceite esencial en materias primas de interés alimenticio con el fin de

identificar el MIC (actividad inhibitoria mínima) sobre bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphilococcus aureus* y *Salmonella typhium*. El aceite esencial exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiano tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas. El MIC es la concentración inhibitoria mínima sobre la cual el aceite esencial es efectivo ante los microorganismos de interés, el MIC efectivo estudiado se encuentra dentro del rango 512 ppm – 4096 ppm evidenciando una acción letal sobre bacterias gram positivas y negativas. El aceite esencial con su extracto etanólico muestra de igual forma una efectiva actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con un MIC de 1025 ppm.

Dentro de la investigación mencionada se evidencia la medición del MIC del aceite esencial de romero sobre *E. coli* y *S. aureus* con un valor de 4096 ppm y 1024 ppm respectivamente, inhibiendo el desarrollo de las mismas. El efecto inhibitorio del aceite esencial se explica por los daños generados a nivel de la membrana celular bacteriana dado por el aumento en la permeabilidad y también por la afectación de su sistema estructural. El daño y el efecto bactericida son efectivos ya que la capa bilipídica se desestabiliza por la interacción con el aceite esencial. El magnífico potencial que respalda la utilidad del aceite esencial de romero se explica considerando los cortos valores de CIM determinados (Castaño, Ciro y Zapata, 2010).

#### **2.1.4 Justificación de la adición de Aceite esencial de romero en alimentos**

El aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) posee compuestos con una evidente acción antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos encontrados en emulsiones escaldadas proteicas, como es el caso de *Staphilococcus Aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes*. La justificación del uso de este aceite esencial se evidencia gracias a los mínimos valores de MIC obtenidos del proceso de extracción. El potencial de utilización en productos



alimentarios se respalda en que iguala y supera en muchos casos, la inhibición microbiana siendo comparada con un tratamiento químico. Dependiendo de la naturaleza del producto en donde este aceite esencial sea aplicado, la valoración organoléptica podrá mejorar e incluso intensificarse positivamente (Castaño, Ciro y Zapata, 2010).

## 2.2 Jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.)

### 2.2.1 Composición química

El aceite esencial de jengibre está compuesto principalmente de un 4% a 7.5 % por oleoresina en las que se destacan las sustancias picantes, que corresponden a los gingeroles y sogaoles, el aceite mencionado contiene como principales componentes los sesquiterpenos alfa zingibereno, alfa-farneseno, betabisaboleno, betabisabolona y sesquifelantreno además de los monómeros, linalol entre otros (Sellar, 1992). Otro de sus compuestos son los **ácidos** como el aspártico, linoleico, el oléico y el ascórbico. Y en cuanto a los aminoácidos como la metionina, la niacina, la histidina, la arginina, el triptofano, la leucina entre otros.



Figura 3. Rizomas de Jengibre.  
Tomado de: Ma y Gang, 2006

En la tabla 3 se pueden observar los valores de algunos componentes principales del aceite esencial de jengibre:

Tabla 3. Composición química del jengibre

COMPUESTO	PORCENTAJE
Oleorresina	4-7,5%
Neral	9.7- 10 %
Geranial	11,6-14%
Zingibereno	7.7- 8.4%
Cafeno	5,4-6%
Arcurcumeno	2,8-3,3%
Alfa farneseno	3,2-3,6%
Sesquifelantreno	2,5- 2,8%
Linanol	3.3-3-6%

Tomado de: Sellar, 1992

### 2.2.2 Propiedades fisicoquímicas

El aceite esencial de jengibre contiene propiedades antioxidantes dado por la disminución de la peroxidación lipídica con aumento de la actividad de enzimas antirradicales tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa. (Aguay, 2012).

Sus componentes liposolubles se distribuyen de manera más homogénea ya que sus oleorresinas abarcan mayor superficie y se emulsifican de mejor forma, dando como resultado una mayor absorción. Esta es una característica fundamental cuando se usa éste tipo de aceite como conservante, ya que existe una mejor distribución en el producto. El aceite esencial de jengibre no contiene taninos que puedan alterar las características organolépticas y al ser adicionado conjuntamente con sal, el cumple con una función retardante de la rancidez en la carne precocida. (Astudillo, 2014).

### **2.2.3 Concentración inhibitoria mínima, MIC de jengibre**

En un estudio de Ribeiro, Grespan y Kohiyama (2013, pp. 3147-52) se evaluaron las diferencias de la actividad antifúngica del aceite esencial de jengibre, contra el crecimiento del hongo *Fusarium verticilloides*, el objetivo de este estudio fue analizar la reacción ante el ergosterol y la fumonisina producida por dicho hongo, en un caldo de cultivo de MIC 500 a 4000 ppm. En el estudio se pudo observar que el componente predominante de la solución fue el alfa zingibereno y que con un MIC de 2000 y 3000 ppm hubo una reducción en la producción de fumonisina B1 y fumonisina B2, las cuales son toxinas muy potentes que causan el deterioro de los alimentos mientras que con MIC de 3000 ppm y 4000 ppm se pudo determinar una reducción en la biosíntesis del ergosterol, componente principal involucrado en el crecimiento de las paredes celulares de los hongos, en porcentajes de 57% y 100% respectivamente. Gracias a estos resultados hoy se conoce que el aceite esencial de jengibre es capaz de controlar el crecimiento del hongo *Fusarium verticilloides* así como la producción de fumonisinas.

### **2.2.4 Justificación del empleo del aceite esencial de jengibre en alimentos**

El aceite esencial de jengibre posee un alto contenido de terpenos, que en varias investigaciones ha demostrado tener una eficiente respuesta contra la proliferación de bacterias y hongos, por ejemplo fusarium, por tal motivo se hace cada vez más importante su inclusión en la lista de conservantes naturales. En conjunto las cualidades del aceite esencial de jengibre son de gran interés por parte de la industria alimentaria por tener funciones complementarias de aditivo y conservante.

## 2.3 Microbiología de *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes*

### 2.3.1 *Staphilococcus aureus*

Las bacterias *Staphilococcus aureus*, son cocos Gram positivos pueden llegar a medir entre 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro individualmente (Gordon, 1998, pp. 1179 – 1181). La bacteria *Staphilococcus aureus* crece con gran facilidad en todos los medios existentes, fermentan con cierta dificultad en carbohidratos como es el caso del manitol, sin embargo no produce gas. La actividad proteolítica de la bacteria varía ampliamente de una cepa a otra. La bacteria *Staphilococcus aureus* genera pigmentos que van desde un color blanquecino hasta un amarillo intenso (Gill, 2000, pp. 145-152).

*Staphilococcus aureus* es una bacteria patógena presente en los epitelios de animales y personas, así como en las mucosas de las fosas nasales y la garganta. Los manipuladores de alimentos y los utensilios de la línea de procesamiento, son las vías por las cuales este microorganismo llega al alimento. Pese a que la bacteria no es esporulada resiste las condiciones ambientales con facilidad, se inactiva en condiciones de congelación y se puede eliminar con tratamientos térmicos apropiados.

El responsable de la patogenia es una toxina de tipo termoresistente, esto implica que los alimentos cocinados aún pueden mantener la toxina, aunque no esté presente el microorganismo como tal. En el caso de la hamburguesa de quinua al ser un producto de masa proteica, se constituye como un cultivo óptimo para el crecimiento de la bacteria, así mismo el proceso de escaldado no puede asegurar el 100% de la reducción de la misma, estas son las razones por las que el producto será monitoreado con el objetivo de inhibir el crecimiento de este patógeno.

Un estudio reciente publicado en el *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedical*, y realizado por investigadores de la Universidad Rey Saud y el

Colegio Rangasamy de la India ha demostrado que los aceites esenciales de romero y jengibre logran inhibir efectivamente el desarrollo de *Staphilococcus aureus*, la investigación demostró que el potencial de los antibióticos de estas hierbas se resume en la combinación de productos bioquímicos, siendo taninos, saponina, fenol, flavonoides y contenido de aceite esencial ( Kazakova, Hageman y Matava, 2005).

### **2.3.2 *Escherichia coli***

La bacteria *Escherichia coli* es de naturaleza anaerobia facultativa y está presente en los intestinos de los humanos y animales. En la industria alimentaria son muy comunes los casos de infecciones por contaminación de esta bacteria, dado principalmente por el consumo de carnes y granos poco procesados o alimentos crudos que han sufrido una contaminación de heces fecales como resultado de malas prácticas agrícolas o malas prácticas de manufactura.

En el año 2011 la bacteria *Escherichia coli* fue la responsable de la crisis alimentaria en Alemania que se dio lugar por causa de brotes germinados de soya y reportó más de 30 fallecidos. Por estas razones se hace importante el estudio de esta bacteria en productos proteicos vegetales ya que se conoce que puede haber una contaminación con residuos fecales que desencadenen una infección al momento de consumirlos, de igual manera en cereales o granos envasados al granel (Hurtado, 2013).

La bacteria *Escherichia coli* resiste hasta una temperatura de 46 grados centígrados por consiguiente un correcto proceso de pasterizado o ebullición impedirá la proliferación de dicha bacteria además, se recomienda que en productos elaborados con carne picada o embutidos, la temperatura de centro de masa debe ser mayor a 70 grados centígrados. Si los alimentos están destinados para el consumo al granel como es el caso de los vegetales el tratamiento se sujeta a soluciones cloradas para su desinfección. Un eficiente

empacado al vacío también es considerado como método para impedir el desarrollo de este microorganismo. (Michanie, 2003, pp. 40-42).

Los tratamientos para contrarrestar el crecimiento y la proliferación de la bacteria deben tomar en cuenta ciertos parámetros como se muestra en el siguiente cuadro:

Tabla 4. Parámetros que regulan el crecimiento de *Escherichia coli*

	MÍNIMIA	ÓPTIMA	MÁXIMA
TEMPERATURA T °	7-8	35-40	44-46
PH	4,4	6-7	9
ACTIVIDAD DE AGUA	0,95	0,995	--

Tomado de: Michanie, 2003, pp. 40-42.

### 2.3.3 Coliformes

Las bacterias *coliformes* son bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos que se encuentran generalmente en el suelo, agua, plantas y cultivos. Su presencia en alimentos causa repercusiones negativas en la salud de los consumidores. Algunas especies de *coliformes* son asociadas comúnmente con desperdicios o desechos de plantas.

El grupo *coliformes* no debe ser asociado exclusivamente a organismos de origen fecal, pues su medio de difusión puede deberse a malas prácticas agrícolas o contaminación cruzada externa. Las bacterias pueden descomponer fácilmente alimentos a base de proteínas y carbohidratos, causando malos olores y sabores amargos. El crecimiento de la bacteria en alimentos es rápido y no tiene la necesidad de una contaminación primaria alta. El agua constituye una de las principales fuentes de diseminación cuando son provenientes de heces fecales. Cuando el agua llega a los sistemas de riego de los cultivos, entra en contacto directo con el material vegetal y es así que la quinua se convierte en un cultivo sumamente vulnerable ante la contaminación de esta bacteria (Olivas y Alarcón, 2004).

### **3. ELABORACIÓN DE ANÁLOGOS PROTEICOS EN FORMA DE HAMBURGUESA DE QUINUA**

#### **3.1 Análogo proteico escaldado**

Los productos embutidos escaldados son masas finas o gruesas que son inmersas en tripas resistentes a temperaturas altas con el objetivo de contener, moldear y cocer el producto contenido. Las masas previamente estarán conformadas por polvos proteínicos, materias primas texturizantes, aditivos y saborizantes (Loma, Jené y Castillo, 2000).

Las tripas embutidas son sometidas a tratamientos térmicos de cocción, sea por corrientes de vapor condensado o inmersión en agua en punto de ebullición. El objetivo principal del tratamiento térmico es cocer el producto y aumentar la consistencia del mismo gracias a la ganancia de textura y densidad. El objetivo de desarrollar hamburguesas de quinua en sistemas de embutido es asegurar la cocción del volumen de masa introducido, así como facilitar las operaciones de rebanado de las mismas ya que es la forma correcta para estandarizar el peso y la forma del producto final.

#### **3.2 Materias primas utilizadas en la elaboración de análogos proteicos**

La materia prima refiere a cada uno de los ingredientes o aditivos que se emplean en la formulación de productos. Para el desarrollo de las hamburguesas de quinua se emplea:

- Harina de soya
- Quinua sin saponina
- Retenedores de agua (Gelificante o gomas)
- Antioxidantes
- Aceites esenciales
- Saborizante
- Agua
- Tripa artificial

Bajo la normativa del código de buenas prácticas de manufactura todas las materias primas utilizadas para la formulación del producto deberán ser analizadas y validadas bajo un estricto control de calidad. El procesamiento, manipulación, envasado y almacenamiento del producto deberá apearse rigurosamente a la normativa y cumplir en un 100% los apartados que se incluyen en la misma, para garantizar la calidad e inocuidad del producto final.

### **3.2.1 Harina de soya**

La harina de soya es uno de los principales ingredientes en la formulación de productos vegetarianos gracias a sus propiedades nutricionales, químicas y físicas. Este alimento pertenece a la categoría de derivados de legumbres, y aporta un alto contenido de proteínas. La empleabilidad de la harina de soya como aditivo en la formulación de productos básicos o de la línea vegetariana, resulta en un excelente texturizante y aporta cualidades organolépticas agradables. En las emulsiones proteicas la harina de soya tiene un efecto conglomerante de toda la formulación facilitando operaciones de producción y cocción. Es importante mencionar que la harina de soya no contiene gluten lo cual permite que las personas celiacas puedan consumir productos hechos a base de esa materia prima.

### **3.2.2 Quinua**

La quinua (del quechua kinoa o kinuwa) es un pseudocereal de alto valor nutricional, aporta un valor calórico medio en forma de hidratos de carbono complejos, y un alto valor proteico aproximándose a 17 gramos de proteína y 5.5 gramos de grasa en su mayoría insaturadas, por cada 100 gramos del producto. La quinua no contiene gluten por lo que es ideal para ser consumida por personas celíacas. (Muñoz, 2000).

El aporte lipídico de la quinua es de alta calidad dado por la presencia de los ácidos omega 3 y 6. La contribución de fibra insoluble sobresale ya que puede



aportar más de 16 gramos por cada 100 gramos de producto. Al mencionar el contenido de los micronutrientes la vitamina E prepondera por su acción antioxidante.

La quinua es muy utilizada en formulaciones de productos vegetarianos por ser una excelente fuente de hierro de origen vegetal y se conforma como un aditivo de valor agregado que logra mejorar la textura de las masas. Actualmente la quinua se emplea en la elaboración de hamburguesas vegetales e incluso cárnicas, el objetivo es agregar el factor funcional. La valoración organoléptica de la quinua como aditivo en hamburguesas resalta la textura y forma de la misma, no perjudica la valoración de sabor y es notable en la estimación de color siendo llamativa para el consumidor.

### **3.2.2.1 Categorización de la Quinua**

En el Ecuador las variedades de quinua (del quechua kínua o kinuwa) pueden ser de 3 tipos: INIAP Amarga, INIAP Cochasqui, INIAP Tunkahuan e INIAP Imbaya. La variedad seleccionada para el procesamiento de la hamburguesa es la "INIAP Tunkahuan, siendo un grano de color blanco crema con un contenido bajo de saponina del 0.06%. La norma de calidad respectiva es la INEN 1673:2013. Dentro del proceso de preparación esta variedad no requiere ser lavada, ya que previamente ha sido sometida a lavados industriales para reducir el contenido de saponinas. La materia prima de la quinua se encuentra disponible en la cadena de comercialización Supermaxi, por lo que la validación de proveedores y cumplimiento de BPM's es efectivamente cumplido.

### **3.2.3 Aditivos**

#### **3.2.3.1 Sal**

El cloruro de sodio o también llamado sal común de mesa es un aditivo que actúa como potenciador y generador de sabor. La adición de este ingrediente

también tiene un fin anti-microbiano impidiendo el desarrollo de bacterias perjudiciales para la salud y ampliando el rango de vida útil del producto. En el desarrollo de análogos proteicos se emplea el 1% del peso final del producto por cuestiones organolépticas, sin embargo el límite de adición llega hasta el 2.5% (Vásquez, 2001).

### **3.2.3.2 Goma Xanthan**

La goma xanthan es un polisacárido natural, y es sintetizado por acción de la fermentación de cultivos de microorganismos *Xantomonas campestris*. La aplicabilidad de la goma xanthan en las hamburguesas de quinua tiene el objetivo de estabilizar la emulsión, y dar rigidez a la tripa, sin embargo la adición de este ingrediente requiere del uso de un preservante ya que es un precursor del crecimiento de microorganismos. En la fabricación de masas proteicas se recomienda la utilización del 0.1% al 0.5% para resaltar las propiedades organolépticas y no afectar los niveles de viscosidad del producto. La temperatura no altera las propiedades fisicoquímicas de la goma por lo tanto es resistente a tratamientos térmicos (Pasquel, 2011, pp. 6-8).

### **3.2.4 Saborizantes**

En la industria alimentaria existen dos tipos de saborizantes, los de origen natural y los de origen artificial. En la línea de productos vegetarianos se utilizan saborizantes naturales ya que los artificiales son excluidos pues su origen real es el animal.

#### **3.2.4.1 Saborizante artificial de proteína vegetal hidrolizada**

El saborizante que se emplea en la formulación de la hamburguesa de quinua es de proteína vegetal hidrolizada y tiene el nombre comercial de "Saborizante Hamburguesa", contiene proteína proveniente de maíz con soya, maltodextrina y sal. La composición del saborizante incluye una mezcla con el 3% de

cloruros, extractos de pimienta, ajo comino y humo, así como antioxidantes y estabilizantes. La dosificación recomendada es de 8 a 10 gramos por kilogramo de masa (Alitecno, 2015).

### **3.2.5 Especies aromáticas**

Las especias son ingredientes legendarios que fueron empleados para otorgar características sensoriales agradables al producto, las especias generalmente están deshidratadas o pulverizadas. Una de las principales restricciones para usar especias deshidratadas o pulverizadas es la alta carga microbiana que contienen, las bacterias mohos y levaduras que se contienen en las especias, encuentran medios de cultivo óptimos para desarrollarse y por ende la inocuidad del producto se pierde. La industria desarrollo los aceites esenciales para solventar esta problemática y así asegurar la esterilidad del saborizante.

Los aceites esenciales y las oleorresinas contienen los principios activos de las plantas de las que provienen, es así que aportan características sensoriales de olor e incluso sabor. Las ventajas de dosificar los aceites esenciales se manifiestan en la reducción de pérdida de olor y sabor por mala cadena de comercialización y almacenamiento. Los aceites esenciales se pueden dosificar en medidas exactas, reduciendo así el rango de error de adición en la fórmula. Finalmente la importancia de los aceites esenciales está en su esterilidad bacteriológica.

### **3.2.6 Tripa artificial plástica**

La tripa artificial plástica es utilizada para el empaqueo de embutidos que no requieren del proceso de ahumado, son de características impermeables y son altamente resistentes a tratamientos térmicos. Se emplean mayormente en sistemas de inmersión de agua en punto de ebullición. Las tripas plásticas artificiales tienen características de alta resistencia, poca elasticidad, y alta esterilidad, ideales para contener pastas gruesas o finas de origen animal o

vegetal. Las tripas que se emplean para contener la masa de hamburguesas y deben apegarse al cumplimiento de las características de su respectiva ficha técnica.

### **3.3 Equipos y materiales**

Para el desarrollo de los análogos proteicos en forma de hamburguesas de quinua en sistema de embutido con tratamiento térmico de escaldado, se requiere preparar una masa madre con quinua, harina de soya aditivos, saborizante y antioxidantes

#### **3.3.1 Equipos**

- Balanza
- Ollas de acero inoxidable
- Fuentes plásticas
- Embutidora
- Cutter
- Empacadora al vacío
- Cocina industrial
- Rebanadora
- Cámara de frío

#### **3.3.2 Materiales**

- Cuchara de acero inoxidable
- Fundas termoencogibles para empaado
- Tripas plásticas
- Termómetro de punción

### **3.3.3 Equipo de BPM's de seguridad e inocuidad alimentaria**

- Cofia
- Mascarilla
- Mandil
- Botas
- Guantes
- Desinfectante
- Alcohol 90%

### **3.4 Proceso de sanitización previo a la producción de hamburguesas de quinua con Ácido peracético**

El ácido peracético resulta de la unión de ácido acético y peróxido de hidrógeno en solución acuosa. Es un fluido de color transparente sin capacidad de formar espuma y con un olor dominante a ácido acético. La actividad desinfectante del ácido peracético se refleja en su capacidad oxidante sobre la membrana externa limitante de las bacterias, endosporas y levaduras. El mecanismo de oxidación es resultado de la transferencia de electrones de la forma oxidada a los microorganismos patógenos, provocando así su muerte.

#### **3.4.1 Proceso de limpieza con ácido peracético**

Previamente a la elaboración de las hamburguesas de quinua, el laboratorio de procesamiento de alimentos y cada uno de los utensilios empleados en el proceso, fueron desinfectados con solución de ácido peracético al 0.2%.

El objetivo de la desinfección es reducir al mínimo la contaminación de microorganismos patógenos en especial de *Staphilococcus aureus* procedentes de la línea de producción. Es fundamental realizar esta desinfección para reducir al mínimo las tasas microbiológicas iniciales.

El proceso de elaboración es respaldado por el cumplimiento de la normativa de BPM's que engloba a la materia prima, aditivos, proceso, higiene, procesamiento, manipulación, almacenamiento y comercialización del producto.

### **3.5 Selección de la materia prima**

Para la elaboración de la hamburguesa de quinua se utiliza harina de soya desengrasada, quinua de variedad INIAP Tunkahuan con 0.06% de contenido de saponina que no requiere de lavado antes del proceso de cocción independiente.

La harina de soya es libre de GMO's y alta en contenido proteico, su presentación es un polvo de baja densidad. Los aditivos pertenecen a casas comerciales, por lo que cada uno cuenta con su respectiva ficha técnica que limita la cantidad a usar en la formulación final.

### **3.6 Cocción de quinua**

El proceso de cocción de la quinua inicia con la validación y control de calidad de la misma, evidenciando que cumpla con las características físicas y tiempos de caducidad establecidos. Para efectuar la cocción el agua está a punto de ebullición a 90°C, momento en el cual se agrega la quinua para que el grano se cocine por un tiempo de 15 minutos. Una vez cocida se eliminará el exceso de agua en un 30%.

### **3.7 Mezclado**

El proceso de mezclado requiere la conformación de la masa madre, ésta contiene la quinua previamente cocida, harina de soya, sal, saborizante de hamburguesa, goma xanthan, ácido ascórbico y aceites esenciales. La mezcla de los ingredientes requiere de un proceso de hidratación al 30% con agua,

para así facilitar la emulsión de todos los componentes y aportar la viscosidad necesaria para favorecer su movilidad en la embutidora.

Este proceso consta de dos fases, la primera es la mezcla seca, la cual contiene la harina de soya, sal, ácido ascórbico, goma xanthan y saborizante artificial de hamburguesa. La primera mezcla se adiciona a la quinua previamente escurrida del exceso de agua contenido y se agita manualmente por un tiempo de 10 minutos hasta alcanzar gránulos homogéneos. Cuando los gránulos muestran uniformidad se agrega un 20% de agua respecto al peso de la masa total para hidratar y homogenizar la mezcla la cual debe simular a una masa densa, homogénea, ligeramente gomosa y de textura irregular dada por la quinua. En la última fase de mezcla los aceites esenciales son agregados con las dosificaciones respectivas investigadas.

### **3.8 Embutido**

La masa de la hamburguesa de quinua es introducida en la embutidora previamente higienizada, la tripa se coloca en la boquilla de calibre 24 para ser llenada por la masa evitando generar espacios de aire vacíos. La maquinaria debe ser de acero inoxidable para precautelar la inocuidad y apegarse a la normativa de BPM's. Una vez que las tripas son rellenas en la medida definida deben ser selladas con un efecto de presión para permitir la texturización y adherencia correcta del producto. Las tripas selladas se colocan en una fuente desinfectada y son transportadas hacia el proceso térmico de cocción, por inmersión en agua a punto de ebullición.

### **3.9 Cocción de las tripas**

El proceso de cocción se realiza en una olla o marmita de acero inoxidable con agua a temperatura de 90°C, punto de ebullición. El tiempo de cocción es de 1 hora y será validado cuando el centro térmico del producto alcance los 70°C, este control de calidad es realizado con el termómetro calibrado de punción.

### **3.10 Enfriado**

El proceso de enfriado se realiza cuando las tripas de hamburguesa de quinua han cumplido con el control de calidad, esto implica alcanzar el tiempo de una hora de cocción a 90°C, y una medida de 70°C de centro térmico con termómetro de punción en el producto. El proceso de enfriado es inmediato a la salida de las tripas de la olla de cocción, el producto se pone en contacto con agua helada para permitir que la temperatura baje hasta los 2°C por 7 minutos. El objetivo es reducir el desarrollo de microorganismos dado por el shock térmico. El proceso de refrigeración secundario se efectúa en cámaras de frío a temperatura de 4°C por un tiempo de 20 horas. El fin del enfriamiento es gelificar la emulsión y facilitar el desprendimiento de la tripa plástica para el posterior proceso de rebanado.

### **3.11 Rebanado**

El proceso de rebanado se realiza cuando las tripas han cumplido el tiempo de almacenamiento en refrigeración, es así que la tripa plástica se desprende en la masa moldeada y es rebanada con un espesor de 1 cm y un peso aproximado de 50 gramos.

### **3.12 Empacado al vacío**

Finalmente las hamburguesas rebanadas son almacenadas en las fundas de plásticas transparentes, y sometidas al proceso de empacado al vacío para su conservación en refrigeración como producto terminado.



## 4. ELABORACIÓN DE HAMBURGUESAS DE QUINUA CON PRESERVANTES NATURALES

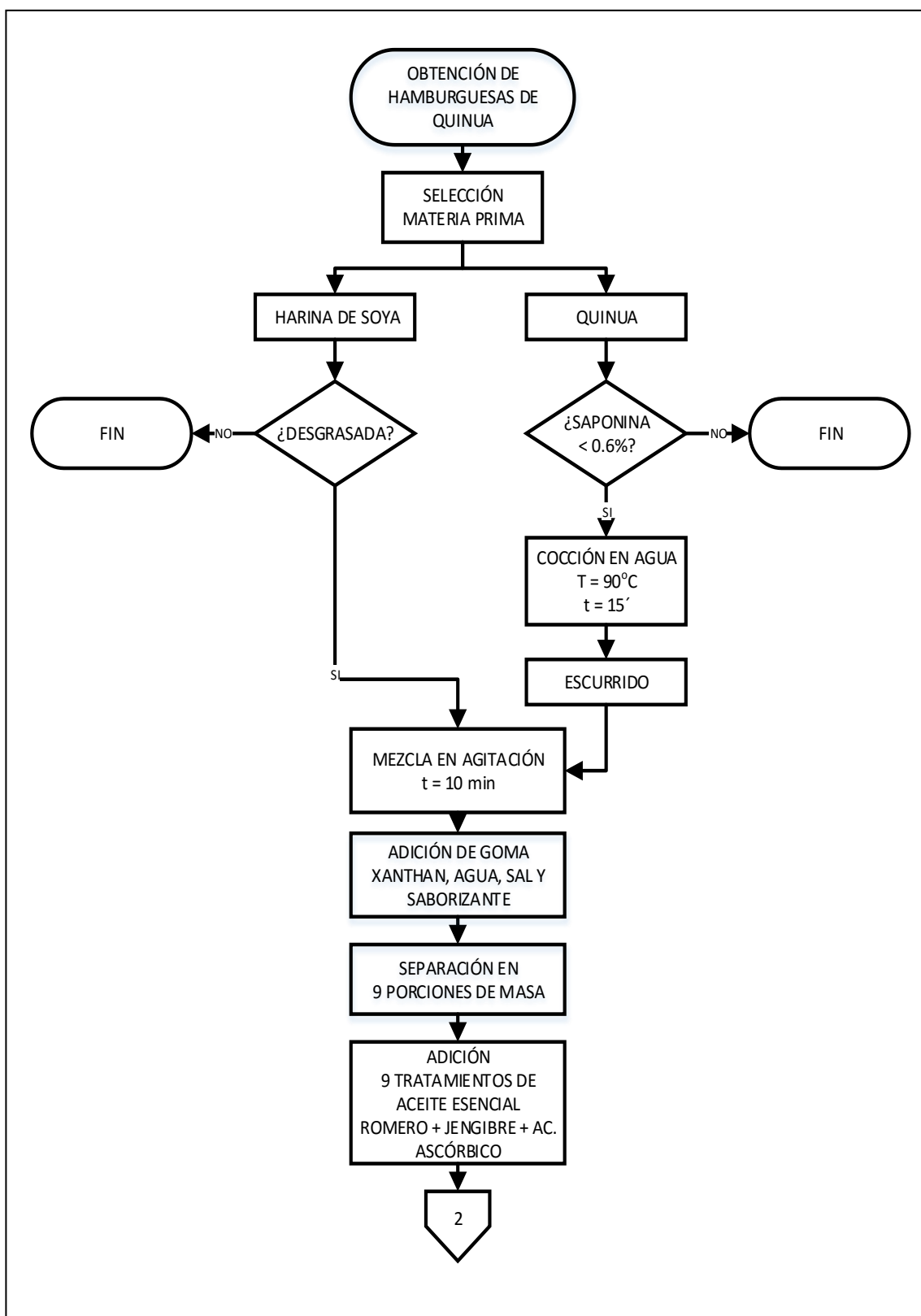
### 4.1 Materia prima

La siguiente tabla muestra la formulación empleada para la elaboración de hamburguesas de quinua, la cual incluye en base a los estudios realizados, los preservantes naturales; ácido ascórbico, aceite esencial de romero y jengibre en sus respectivas dosis efectivas para asegurar los objetivos de esta investigación.

Tabla 5. Cálculo de materias primas

INGREDIENTE	DOSIS %
Quinua	65.8 %
Harina de soya	23.2 %
Goma Xanthan	0.52 %
Agua	7,40 %
Sal	0.88 %
Saborizante hamburguesa	0.88 %
Ácido ascórbico	5000 ppm – 0,49%
Aceite esencial de romero	4100ppm (T5) – 0,40%
Aceite esencial de jengibre	3000ppm (T5) – 0.29%

## 4.2 Diagrama de flujo de proceso de elaboración de hamburguesas de quinua



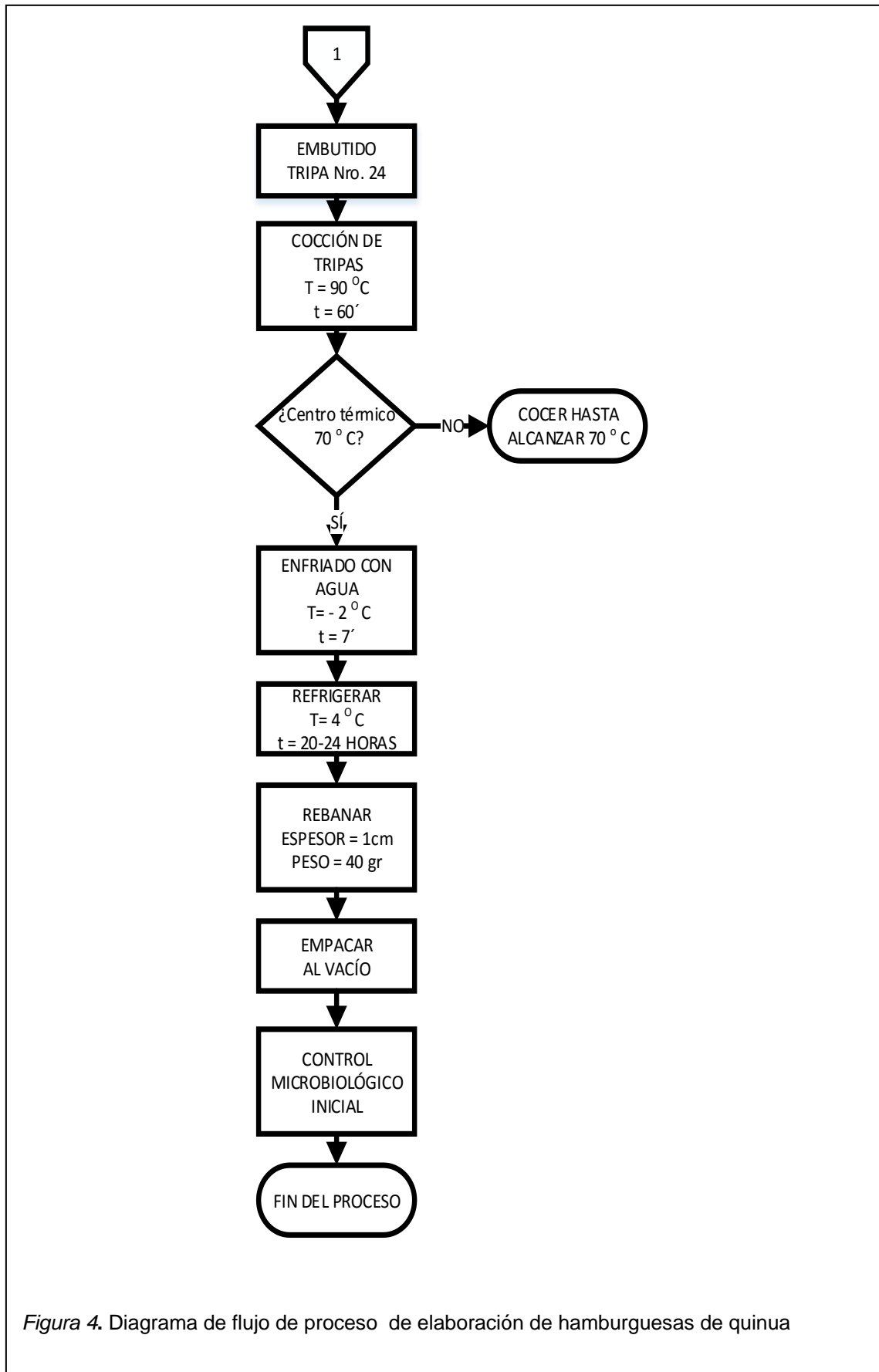


Figura 4. Diagrama de flujo de proceso de elaboración de hamburguesas de quinua

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

- **Hipótesis nula**

Un preservante natural a base de ácido ascórbico, aceite esencial de romero y jengibre no inhibe la proliferación de microorganismos en hamburguesas de quinua.

- **Hipótesis alternativa**

Un preservante natural a base de ácido ascórbico, aceite esencial de romero y jengibre si inhibe la proliferación de microorganismos en hamburguesas de quinua

### 5.1 Generalidades del diseño experimental

El diseño empleado se divide en dos estudios, el primer estudio consiste en una investigación exploratoria para la validación del ácido ascórbico como conservante sinérgico, y su posterior estandarización como variable fija dentro de la formulación del producto. Los tratamientos de la investigación preliminar consisten en soluciones de inmersión para el producto, con el fin de determinar la cantidad ideal de ácido ascórbico que evite la oxidación y reduzca la carga microbiológica de *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus*.

El segundo estudio del diseño experimental consiste en un sistema de tratamientos que valide la efectividad del aceite esencial de romero y jengibre para la inhibición de *Escherichia coli*, *Staphilococcus Aureus* y *Coliformes* en un sistema de empacado al vacío que asegure 30 días de vida útil del producto en unidades independientes.

Adicionalmente se sometió el producto a un proceso de putrefacción natural, para inducir la producción de hongos contenidos, el fin recae en poder identificar su origen y clasificación para poder ser aislados e inhibidos.

## 5.2 Estadísticos a utilizar en la evaluación uno, de tipo exploratorio de ácido ascórbico

En vista de que no se conoce la dosis exacta de ácido ascórbico para controlar el crecimiento de las bacterias *Staphilococcus Aureus* y *Escherichia Coli*, se procede a realizar un estudio exploratorio. En la fase primaria se realiza la elaboración de las hamburguesas sin la adición de ácido ascórbico ni aceites esenciales. Posteriormente se realizan soluciones de diferentes concentraciones de ácido ascórbico, donde se sumergen unidades independientes de hamburguesas. El objetivo es evaluar si el ácido ascórbico cumple una función antioxidante y la cantidad necesaria para ser efectiva en el producto.

## 5.3 Tratamientos

A continuación se detallan concentraciones en ppm de ácido ascórbico contenidas en 10 diferentes hamburguesas de quinua.

Tabla 6. Descripción de la Concentración de Ácido ascórbico en las hamburguesas de quinua

Hamburguesa	Concentración de Ácido Ascórbico en ppm por cada unidad de hamburguesa de quinua
1	80
2	120
3	1400
4	2000
5	2200
6	2600
7	5000
8	6000
9	7000
10	Testigo

## 5.4 Diseño experimental exploratorio de aceites esenciales

El diseño experimental tiene como objetivo, determinar el volumen necesario de aceite esencial de romero y jengibre para inhibir el desarrollo microbiológico de bacterias *Staphilococcus Aureus*, *Coliformes* y *Escherichia coli* así como de hongos *fusarium* y *verticillium* para asegurar un tiempo de vida útil de 30 días en refrigeración bajo condiciones de vacío independiente.

El diseño experimental utilizado es el diseño de bloques completamente al azar, donde se aplica un análisis de varianza con el método de prueba de TUKEY con un 5% de nivel de confianza y su respectiva tabla ANOVA.

### 5.4.1 Factores

En la siguiente tabla se observa la descripción de los dos factores y los niveles pertinentes a cada uno de ellos.

Tabla 7. Factores del diseño experimental de aceites esenciales

FACTORES		Niveles
FACTOR 1	Aceite esencial de romero	3
FACTOR 2	Aceite esencial de jengibre	3
# TRATAMIENTOS		9

- Número de repeticiones: 3
- Numero de tratamientos:  $3 \times 3 = 9$

### 5.4.2 Tratamientos

En la siguiente tabla se pueden observar las concentraciones de los tratamientos de A.E de Romero y A.E de jengibre en ppm.

Tabla 8. Tratamientos de Aceites esenciales

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>A.E ROMERO EN ppm</b>	<b>A.E JENGIBRE EN ppm</b>
T1	4000	2000
T2	4000	3000
T3	4000	4000
T4	4100	2000
T5	4100	3000
T6	4100	4000
T7	4300	2000
T8	4300	3000
T9	4300	4000
T10 (TESTIGO)	0	0

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se describen las evaluaciones realizadas en el diseño experimental preliminar y final, denotando las variantes y resultados obtenidos de los mismos.

Los resultados de los análisis independientes microbiológicos de unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli*, *Coliformes* y *Staphilococcus aureus*, fueron realizados en láminas de petrifilm con solución madre de  $10^{-1}$  en 9 ml de agua de peptona estéril con 1ml de muestra.

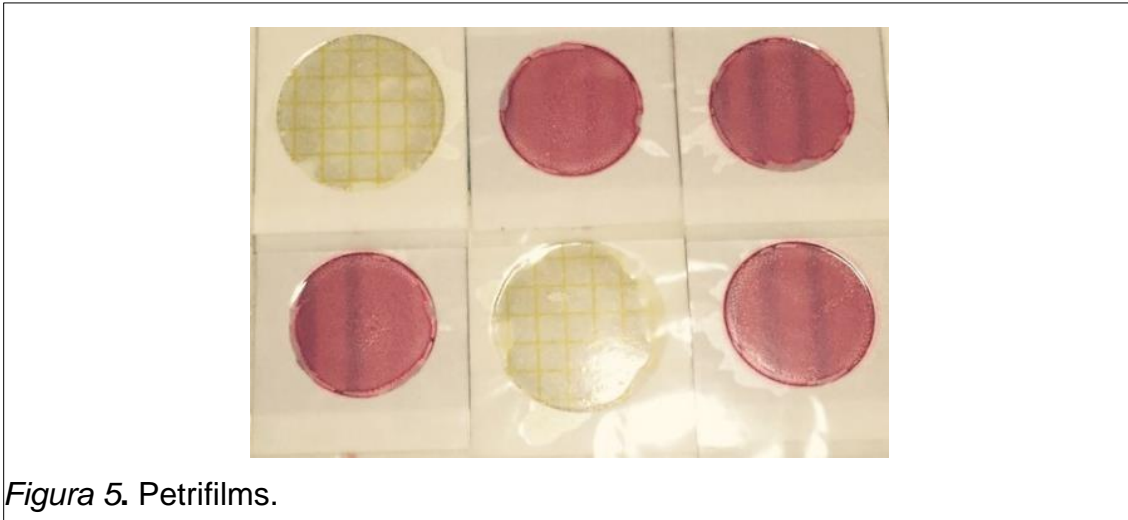


Figura 5. Petrifilms.

**6.1 Evaluación 1:** Soluciones de ácido ascórbico para la inhibición de *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli* a 15 días bajo condiciones de vacío y refrigeración. Las concentraciones varían desde 80 ppm hasta 5000 ppm de ácido ascórbico contenido en las hamburguesas.



Tabla 9. Número de unidades formadoras de colonia (UFC) de dos bacterias, *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli*, presentes en 9 hamburguesas de quinua contenidas de dosis de Ácido Ascórbico

Hamburguesa	Variables	Resultados microbiológicos a los 15 días	
	Ácido Ascórbico ppm	<i>Staphilococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		(UFC)	(UFC)
1	80	140	1500
2	120	140	1200
3	1400	110	1300
4	2000	100	1000
5	2200	80	800
6	2600	70	600
7	5000	30	300
8	6000	25	210
9	7000	40	260
<b>Media</b>		81,66	796,66
<b>Rango</b>		100	1240
<b>Desv. Estándar</b>		44,30	483,42

Se puede observar que las Hamburguesas 1-6, presentan contaminación microbiológica de *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli* con una tendencia decreciente ante el aumento de la dosis de ácido ascórbico. Las hamburguesas 7 y 8 presentan una disminución más representativa en la contaminación microbiológica evidenciando que promedios iguales o superiores a 5000ppm son más efectivos. Sin embargo la muestra 9 nos indica que la curva de crecimiento tiende a aumentar el promedio microbiológico después de las 7000ppm. Esto nos indica que el ácido ascórbico no es suficiente para inhibir completamente el desarrollo de los microorganismos estudiados.

Al considerar el número de UFC en el estudio de *Staphylococcus aureus* se determina una media de 81.66 mientras que para *Escherichia coli* es 796.66 así mismo su desviación estándar es de 44,30 y 483.42 respectivamente. Al realizar una relación entre la media y la desviación estándar de cada una de las bacterias estudiadas, se determina que las mismas guardan una similitud del 55% en cuanto al comportamiento de cada dosis de ácido ascórbico contenido. Esto nos indica que la acción inhibitoria es aplicable para las dos bacterias en estudio.

En un post tratamiento se sometió la hamburguesa 10 (Testigo: sin ácido ascórbico) a un estudio para evaluar el crecimiento de los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en la cámara de vida útil en condiciones controladas de humedad al 50% y temperatura de 25°C, obteniéndose los siguientes resultados. La hamburguesa 10 fue subdividida en 6 muestras (M) separadas y empacadas al vacío independientemente.

Tabla 10. Muestras 1-6 en cámara de estabilidad

MUESTRA	TOMA DE MUESTRA	HORAS TRANSCURRIDAS	pH	UFC/g <i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g <i>Escherichia coli</i>
M1	Mañana	12	6,2	80	130
M2	Tarde	24	6,23	90	250
M3	Mañana	36	6,28	90	600
M4	Tarde	48	6,47	120	900
M5	Mañana	60	6,79	240	1200
M6	Tarde	72	6.9	500	1400

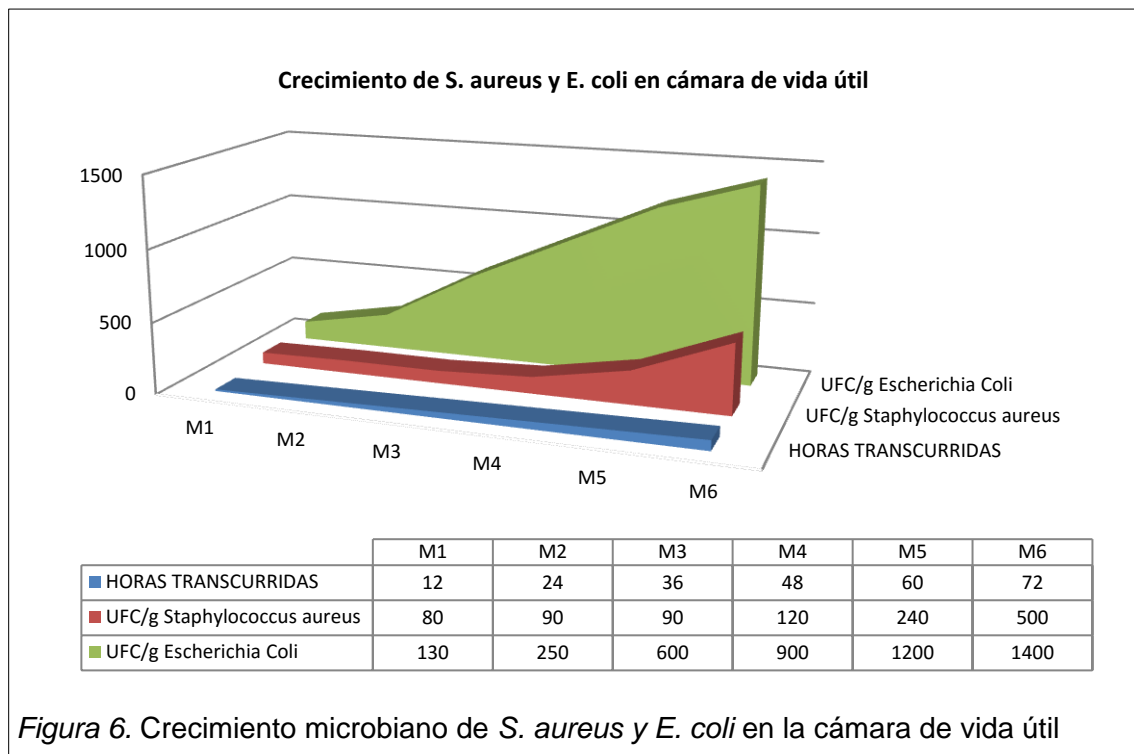


Figura 6. Crecimiento microbiano de *S. aureus* y *E. coli* en la cámara de vida útil

En el gráfico estadístico de la figura 11, se denota el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* conforme al aumento de horas en cámara de estabilidad, simulando 30 días en percha. Podemos observar que el crecimiento de *Escherichia coli* se potencia en el día 10, mientras que el crecimiento de *S. Aureus* se potencia en el día 20. Los resultados obtenidos justifican la adición de un preservante que inhiba el desarrollo microbiológico.

Tabla 11. Evaluación de pH y crecimiento Microbiológico *Escherichia coli*

Muestra	pH	UFC/g <i>Escherichia coli</i>
M1	6,2	130
M2	6,23	250
M3	6,28	600
M4	6,47	900
M5	6,79	1200
M6	6.9	1400

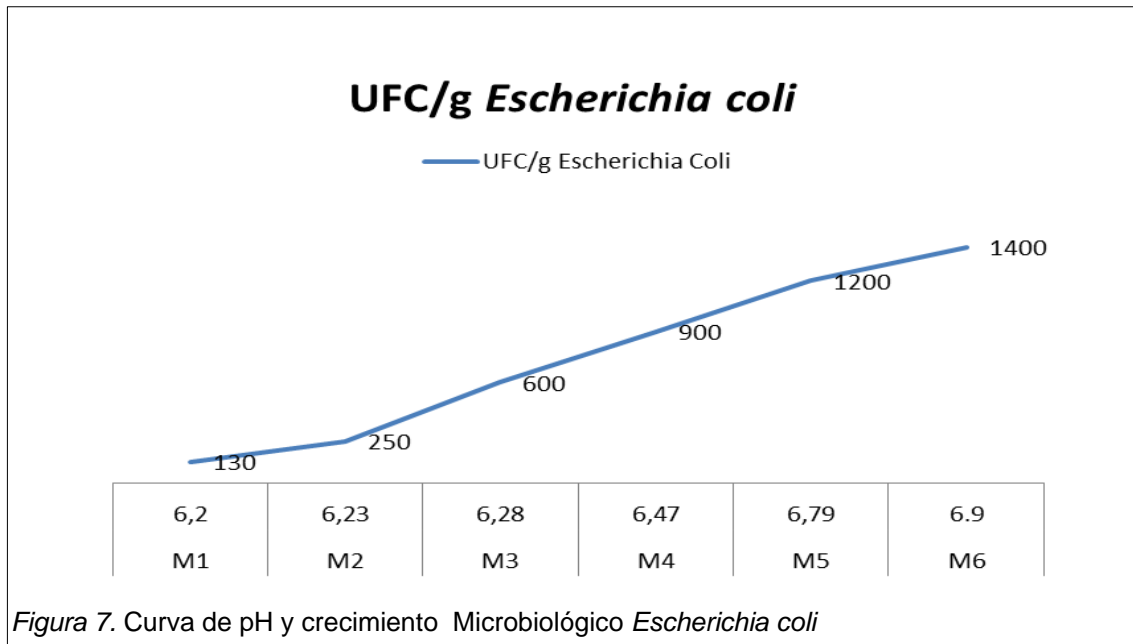
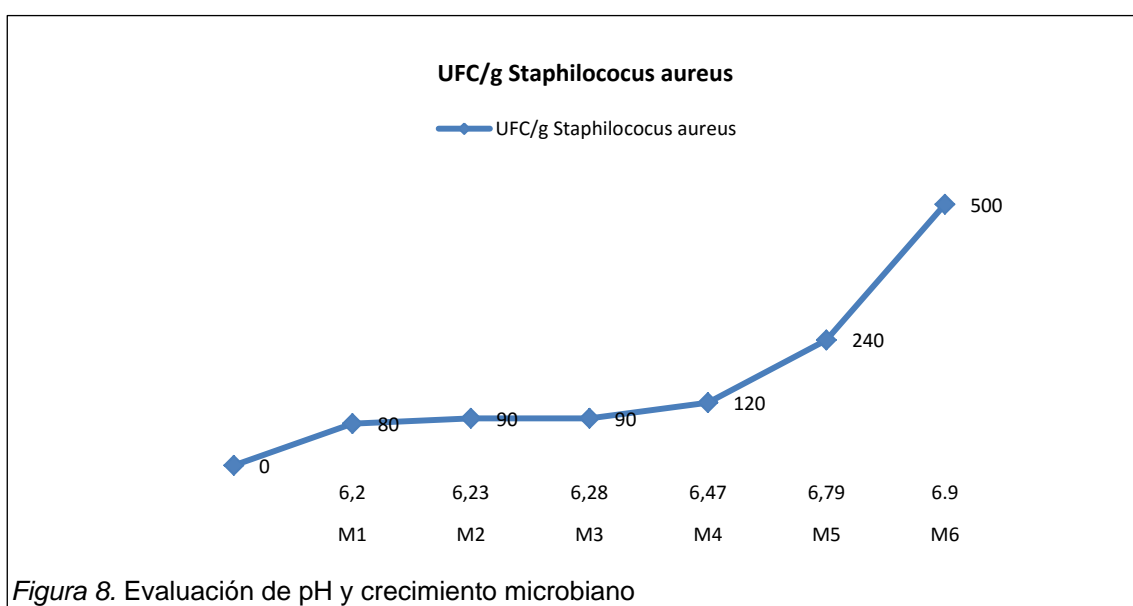


Tabla 12. Evaluación de pH y crecimiento Microbiológico *Staphilococcus aureus*.

Muestra	pH	UFC/g <i>Staphilococcus aureus</i>	
M1	6,2	80	
M2	6,23	90	
M3	6,28	90	
M4	6,47	120	
M5	6,79	240	
M6	6.9	500	



Como se puede observar en la figura 13 y 14 en la microbiología se considera que la mayor parte de microorganismos, incluyendo a *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus*, crecen con facilidad a un pH neutro entre 5 y 8. Respecto a los datos obtenidos de la medición del pH en las hamburguesas, se evidencia un aumento del pH desde 6,2 hasta 6,9 el cual coincide con el rango neutro que propicia el desarrollo microbiológico.

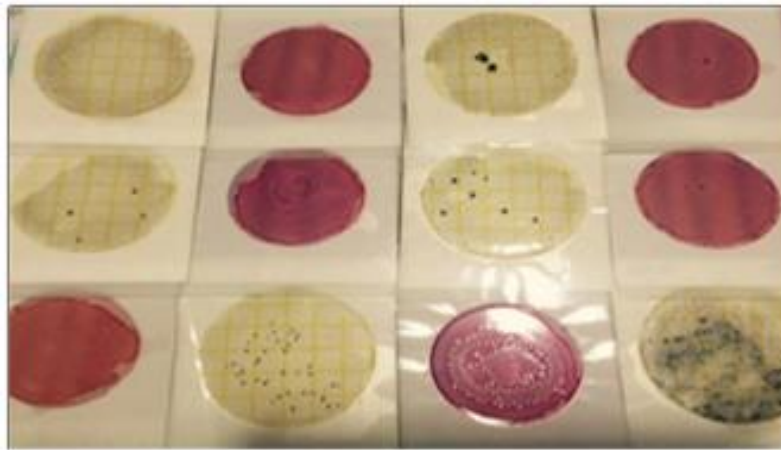


Figura 9. Análisis microbiológicos contaminados, diseño experimental preliminar.

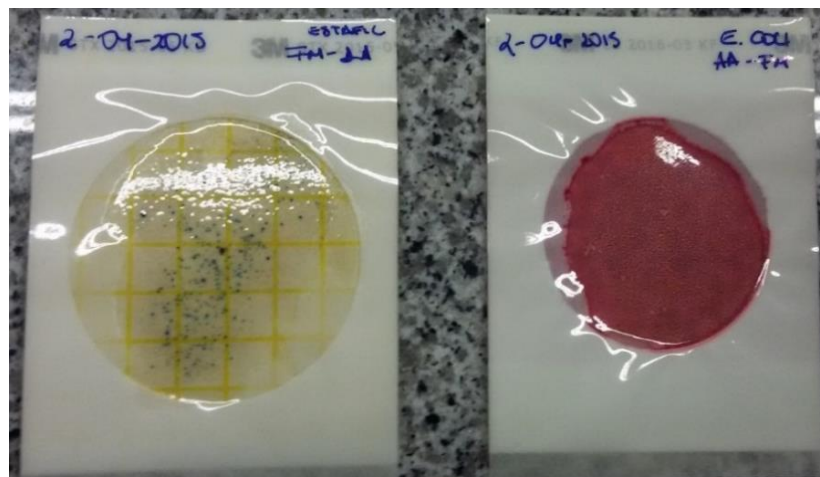


Figura 10. Testigos contaminados de *E. coli* y *S. aureus*

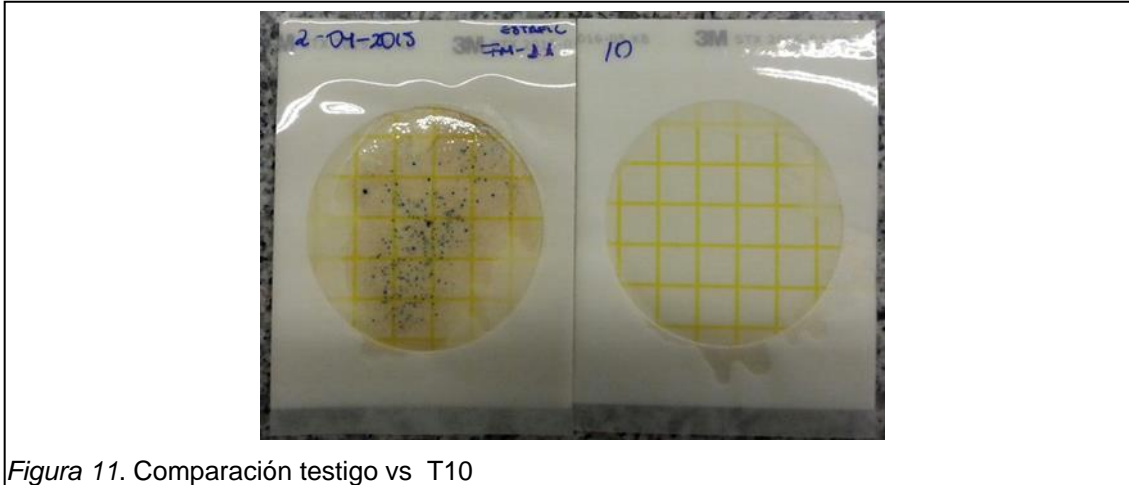


Figura 11. Comparación testigo vs T10

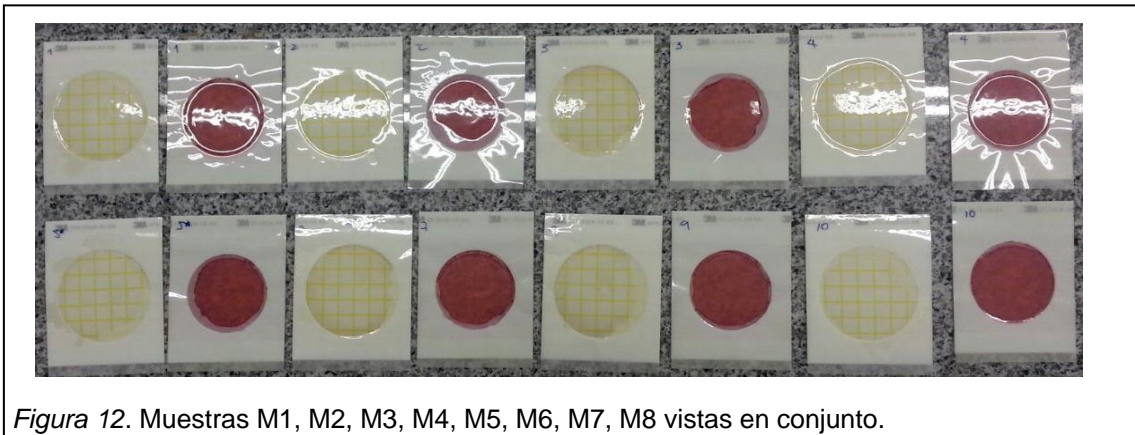


Figura 12. Muestras M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 vistas en conjunto.



Figura 13. Hamburguesa sin ácido ascórbico en pruebas de cámara de vida útil.

**6.2 Evaluación 2:** Se preparó un kilo de hamburguesas de quinua para ser depositadas independientemente en sistema de refrigeración hasta los 70 días. El objetivo fue permitir el desarrollo de microorganismos y hongos para identificar y determinar su tipo, de esta manera se podrá inhibirlos con los tratamientos de la investigación. Luego de 70 días en refrigeración sin ningún tipo de conservante natural se pudo identificar la presencia de dos tipos de hongos; *Fusarium* y *Aspergillus*.

Para el aislamiento del hongo fusarium en las hamburguesas de quinua, se tomaron tres muestras de 50g donde se evidenció una mayor proliferación de dicha especie de hongo. Los indicios del crecimiento de este hongo fueron observados de acuerdo a sus características macroscópicas las que respondían a una coloración pardorajiza en la base de sus colonias así como su forma y textura superficial filamentosa.



Figura 14. Muestra de Hamburguesa con Hongo *Fusarium*

Posteriormente se rasparon los hongos para ser transferidos a cajas Petri con contenido PDA selladas con Keenplak. Una vez sembradas las cajas se incubaron durante un tiempo de 5 días a 25 grados centígrados donde se observó un micelio de hongo. Se extrajo un fragmento del micelio en agar para volverlo a sembrar en nuevas cajas Petri con medio PDA a 27 grados centígrados. Al cabo de 7 días se tomó la sección del micelio y se observó en el microscopio, usando una tinción de azul de lactofenol. En este punto se pudo identificar que el micelio estaba formado por conidios que a su vez contenían

racimos de microconidios y clamidosporas lo cual confirmo que el hongo presente en las hamburguesas de quinua correspondió a *Fusarium verticilloides*.

Para la identificación del hongo *Aspergillus* se tuvieron presentes criterios de identificación generales como el color negro de su cuerpo, su textura rugosa y su forma filamentosa. Su aislamiento fue realizado con el mismo método que para *Fusarium*, y se pudo observar al final del proceso, la efectiva proliferación de conidios lo que confirmó la presencia de un *Aspergillus Niger*.



Figura 15. Muestra de hamburguesa con presencia de *Aspergillus Niger*

**6.3 Evaluación 3:** Se preparó 9 tripas de hamburguesa de quinua para ser sometidas a 9 tratamientos con diferentes concentraciones de aceites esenciales de romero y jengibre, las concentraciones se respaldan en los MIC a los cuales se deben *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus* para ser inhibidos. Las concentraciones fueron de 4000, 4100 y 4200 ppm para romero, y 2000, 3000 y 4000ppm para jengibre. Los aceites fueron añadidos en la masa madre antes del proceso de embutido.



La evaluación microbiológica de la carga inicial de las hamburguesas evidencia que el tratamiento con ácido ascórbico no es suficiente para inhibir toda la carga microbiana de *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli*. Pese a que la tasa se reduce significativamente gracias a la acción del ácido ascórbico por su efecto bactericida, es necesario controlar e inhibir el crecimiento microbiano para asegurar la inocuidad y estabilidad del producto por más de 30 días.

En la evaluación microbiológica de los tratamientos, al tercer día de almacenamiento en refrigeración, se evidencia la inhibición total de *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus* validando la efectividad inmediata de la adición de los aceites esenciales de romero y jengibre.

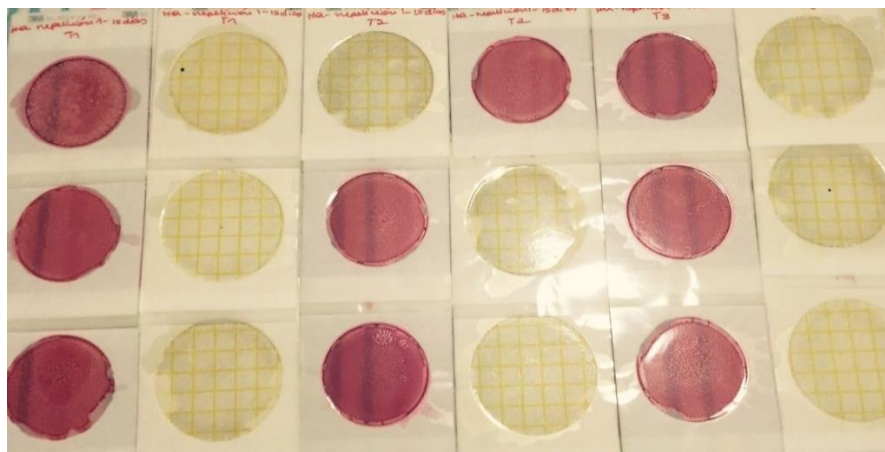


Figura 16. Resultados del análisis microbiológico al día 15

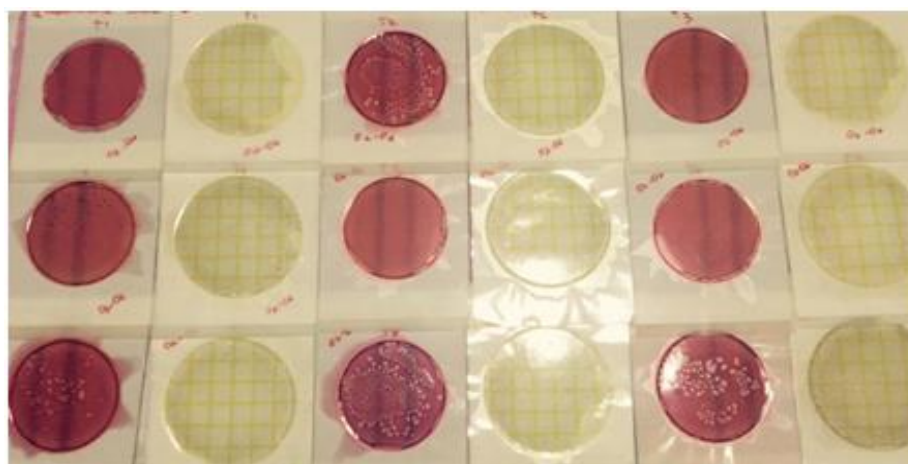


Figura 17. Resultados microbiológicos al día 30.

## 6.4 Interpretaciones de Varianza estadística

Los resultados se analizan exclusivamente para las variables y tiempos en los que se encuentran microorganismos, mientras que en las variables donde no se encuentran microorganismos no se realizara el estudio estadístico, sin embargo en el anexo se presenta la tabla completa del análisis de varianza del diseño experimental de bloques al azar con prueba TUKEY.

### 6.4.1 Evaluación de *Escherichia coli*

Tabla 13. Análisis de tratamientos para *Escherichia coli* en los días 0, 1, 15, 30 y 45

<i>Escherichia coli</i>						
Repetición	Tratamiento	<i>E. Coli</i> 0 días	<i>E. Coli</i> 1D R+J	<i>E. Coli</i> 15D R+J	<i>E. Coli</i> 30D R+J	<i>E. Coli</i> 45D R+J
1	1	10,5	1	1	1	1
1	2	10,5	1	1	1	1
1	3	10,5	1	1	1	1
1	4	10,5	1	1	1	1
1	5	10,5	1	1	1	1
1	6	10,5	1	1	1	1
1	7	10,5	1	1	1	1
1	8	10,5	1	1	1	1
1	9	10,5	1	1	1	1
2	1	11	1	1	1	1
2	2	11	1	1	1	1
2	3	11	1	1	1	1
2	4	11	1	1	1	1
2	5	11	1	1	1	1
2	6	11	1	1	1	1
2	7	11	1	1	1	1
2	8	11	1	1	1	1
2	9	11	1	1	1	1
3	1	10,5	1	1	1	1
3	2	10,5	1	1	1	1

3	3	10,5	1	1	1	1
3	4	10,5	1	1	1	1
3	5	10,5	1	1	1	1
3	6	10,5	1	1	1	1
3	7	10,5	1	1	1	1
3	8	10,5	1	1	1	1
3	9	10,5	1	1	1	1

Como se observa en la tabla todos los tratamientos al día 0 se presentan contaminados, dado que la muestra fue tomada de la masa madre al inicio del proceso. Cabe mencionar que al momento del muestreo ésta masa madre no contenía los aceites esenciales de romero y jengibre. Todos los tratamientos en el día 3 se expresan libres de contaminación, esto significa que el efecto de los aceites esenciales es letal cuando entra en contacto con el producto. Los días 15, 30 y 45 se enuncian de igual forma negativamente. Podemos concluir que el efecto de los aceites esenciales de romero y jengibre elimina la posibilidad de la re activación de los microorganismos en el producto, impidiendo su crecimiento desde el primer día en contacto con el mismo.

Dado que los datos arrojados en el día 1, 15, 30 y 45 son  $0 = 1(\sqrt{n} + 1)$  no se justifica hacer un análisis de varianza ya que los valores no presentan ninguna variación. Se puede interpretar que el efecto sinérgico del aceite esencial de romero y jengibre basado en la superioridad del MIC pertinente a cada uno de ellos, logra inhibir el desarrollo de *Escherichia coli* desde el primer día. Se puede discernir que el pH de 6,1 conjuntamente con una temperatura de refrigeración de 4°C contribuye también a que la bacteria no se desarrolle.

Según datos bibliográficos el MIC al cual *Escherichia coli* es inhibido es 4000ppm por tanto es justificable que la inhibición sea real en cada tratamiento desde el primer hasta los 45 días, pues los 9 tratamientos experimentales comprenden valores de 4000ppm hasta 4300ppm, de esta manera se asegura la inhibición y desarrollo absoluto de la bacteria.

## 6.4.2 *Staphilococcus aureus*, análisis de Varianza

### 6.4.2.1 Análisis día 15

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 14. Análisis de varianza para *Staphilococcus aureus* en el día 15.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	38,7			
REPETICION	2	0,96	0,48	1,06	0,3684
TRATAMIENTO	8	30,52	3,82	8,45	0,0002
ERROR	16	7,22	0,45		

Tabla 15. Ponderación de tratamientos para *Staphilococcus aureus* en el día 15.

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO	
1	3,73	A	
4	3,3	A	
6	2,53	A	B
2	2,53	A	B
8	1		B
9	1		B
3	1		B
7	1		B
5	1		B

#### Desviación estándar: 0.39

Como podemos observar el valor p (probabilidad) de los tratamientos es igual a 0.002 siendo menor a 0.05 (error experimental o nivel de significancia), esto revela que efectivamente si existen diferencias significativas en los tratamientos por tanto podemos determinar cuál es el más efectivo a los 15 días.

Según el test de Tukey los mejores tratamientos son el 5 y 7 estos contienen respectivamente 5(4100R – 3000J) y 7(4300R – 2000J). Se puede interpretar que según datos bibliográficos el MIC del romero efectivo para *Staphilococcus Aureus* es de 1024 ppm, sin embargo debido a la consecuencia de aplicar

volúmenes iguales o superiores a 4096 ppm con el objetivo de inhibir *Escherichia coli*, se respalda la inhibición y desarrollo de la bacteria *Staphilococcus Aureus*.

Respecto al efecto del aceite esencial de jengibre los estudios dictan que el rango efectivo para impedir el desarrollo de fumonisina y ergosterol, responsables del deterioro del alimento es de 2000 – 4000 ppm, este valor coincide con la efectividad de los tratamientos 5 y 7 siendo superiores con 3000 ppm para el T5 y 2000 para el T7, evidenciándose como los mejores al día 15.

#### 6.4.2.2 Análisis día 30

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 16. Análisis de varianza para *Staphilococcus Aureus* en el día 30.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	492,01			
REPETICION	2	3,14	1,57	0,3	0,7472
TRATAMIENTO	8	404,25	50,53	9,56	0,0001
ERROR	16	84,61	5,29		

Tabla 17. Ponderación de tratamientos para *Staphilococcus aureus* en el día 30.

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO	
1	10,87	A	
2	10,07	A	
7	3,3		B
4	1		B
3	1		B
8	1		B
5	1		B
6	1		B
9	1		B

### Desviación estándar: 1.33

Se puede observar que en el día 30 la bacteria *Staphilococcus aureus* presenta un valor de probabilidad (p) de 0.0001 menor al error experimental de 0.05 lo cual nos indica que hay una diferencia significativa en la acción de cada uno de los tratamientos, es así que se puede determinar el mejor de ellos para la inhibición de esta bacteria en dicho período de tiempo.

Claramente los tratamientos 9, 6 y 5 se muestran como los mejores sin embargo los tratamientos 9 (4300R-4000J) y 6 (4100-4000) contienen valores ppm de aceites esenciales muy altos y no necesarios para la inhibición, ya que el tratamiento 5 con (4100R-3000J) inhibe de forma positiva el crecimiento microbiano en las 3 repeticiones conteniendo valores inferiores de ppm de romero y jengibre que los tratamiento 9 y 6 a los 30 días.

#### 6.4.2.2 Análisis día 45

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 18. Análisis de varianza para *Staphilococcus Aureus* en el día 45.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	1176,67			
REPETICION	2	1,54	0,77	0,46	0,639
TRATAMIENTO	8	1148,41	143,55	85,95	<0,0001
ERROR	16	26,72	1,67		

Tabla 19. Ponderación de tratamientos para *Staphilococcus aureus* en el día 45.

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO	
1	16,67	A	
7	14,27	A	
2	13,23	A	
8	1		B
9	1		B
6	1		B
3	1		B
4	1		B
5	1		B

**Desviación estándar: 0.75**

Como podemos observar el valor p (probabilidad) de los tratamientos es igual a  $<0.0001$  siendo menor a 0.05 (error experimental o nivel de significancia), esto revela que efectivamente si existen diferencias significativas en los tratamientos por tanto podemos determinar cuál es el más efectivo a los 45 días.

Se puede determinar que el mejor tratamiento a los 45 días es el 5 (4100R – 3000J), estos resultados se respaldan en cuanto a las investigaciones preliminares ya que las 4100ppm del romero cubren el MIC de 4096ppm necesario para inhibir *Escherichia coli* y 1024ppm para inhibir *Staphilococcus aureus*. Los Valores del aceite esencial de jengibre también respaldan su función ya que en rangos de 2000-4000ppm se inhibe las fumonisinas y el ergosterol, responsables directos del deterioro y pérdida de vida útil del producto.

Es importante mencionar los tratamientos no efectivos para el estudio de *Staphilococcus aureus*, ya que esto contribuye en direccionar de mejor forma la selección de los mejores tratamientos. Es así que los tratamientos menos efectivos son: 1(4000R-2000J), 4(4100R-2000J) y 7(4300R-2000J), se puede inferir a que esto se debe al bajo contenido de jengibre 2000ppm, siendo insuficiente para inhibir el desarrollo de fumonisina y ergosterol lo cual produce un deterioro más rápido del producto así también ejerce un menor poder sinérgico con el aceite esencial de romero para inhibir el crecimiento de las bacterias estudiadas. Sin embargo se evidencia que contenidos de 3000ppm de jengibre ejercen un efecto sinérgico ideal con el aceite esencial de romero provocando que dichos tratamientos tales como el 5 y el 8 inhiban completamente el desarrollo de microorganismos hasta los 45 días.

### 6.4.3 Coliformes, Análisis de Varianza

#### 6.4.3.1 Análisis día 1

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 20. Análisis de varianza para Coliformes en el día 1

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	412,99			
REPETICION	2	7	3,5	4,72	0,0244
TRATAMIENTO	8	394,13	49,27	66,47	<0,0001
ERROR	16	11,86	0,74		

Tabla 21. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 1

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO			
1	13,33	A			
4	4,5		B		
2	4,07		B	C	
7	1,77			C	D
3	1				D
6	1				D
5	1				D
8	1				D
9	1				D

#### Desviación estándar: 0.50

Como podemos observar el valor p. de los tratamientos es igual a <0.0001 siendo menor a 0.05 (error experimental o nivel de significancia), esto revela que efectivamente si existen diferencias significativas en los tratamientos por tanto podemos determinar cuál es el más efectivo al primer día de aplicación de los mismos.



El mejor tratamiento que se puede observar en el análisis estadístico es el 9(4300R-4000J) seguido por el 5(4100R-3000J), sin embargo el 5 se superpone al 9 debido a que con menos concentración de los aceites esenciales ejerce el mismo efecto inhibitorio de los microorganismos desde el primer día de uso. Es importante recalcar que económicamente en la industria alimentaria, es más sustentable seleccionar un tratamiento que no requiera de cantidades mayores a las necesarias, para ser efectivo en el producto. Por tanto el tratamiento 5 es el ideal para inhibir el crecimiento de *Coliformes* desde el primer día.

#### 6.4.3.2 Análisis día 15

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 22. Análisis de varianza para Coliformes en el día 15.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	823,37			
REPETICION	2	35,67	17,83	5,52	0,0151
TRATAMIENTO	8	735,97	92	28,45	<0,0001
ERROR	16	51,73	3,23		

Tabla 23. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 15

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO		
1	18,17	A		
4	7		B	
7	4,57		B	C
2	2,8		B	C
6	2,2		B	C
5	1,77			C
8	1			C
9	1			C
3	1			C

### Desviación estándar: 1.04

Se puede observar que en el día 15 la bacteria Coliformes presenta un valor de probabilidad (p) de <0.0001 siendo menor al error experimental de 0.05 lo cual nos indica que hay una diferencia significativa en la acción de cada uno de los tratamientos, es así que se puede determinar el mejor de ellos para la inhibición de esta bacteria en dicho período de tiempo.

Los mejores tratamientos son el 3(4000R-4000J), 9(4300R-4000J), 8(4300R-3000J) y 5(4100R-3000J) respectivamente. El tratamiento 3 contiene las mismas proporciones de los aceites esenciales, sin embargo concentraciones de 3000ppm de jengibre son suficientes para inhibir fumonisina y ergosterol como es el caso del tratamiento 5. Los tratamientos 8 y 9 no se consideran ideales, pues como se mencionó anteriormente no son económicamente sustentables para ser usados en la industria ya que sus cantidades sobrepasan las dosis ya efectivas. Finalmente se puede considerar que el tratamiento 5 es el ideal dado por sus concentraciones (4100R-3000J) constituyéndose como efectivo para controlar el crecimiento de *coliformes* a los 15 días.

#### 6.4.3.3 Análisis día 30

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 24. Análisis de varianza para Coliformes en el día 30.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	1812,43			
REPETICION	2	3,74	1,87	0,31	0,7373
TRATAMIENTO	8	1712,3	214,04	35,53	<0,0001
ERROR	16	96,38	6,02		

Tabla 25. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 30

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO		
1	22,87	A		
7	17,4	A	B	
2	12,23		B	
4	11,07		B	
5	1,77			C
8	1			C
3	1			C
6	1			C
9	1			C

#### Desviación estándar: 1.42

Se puede observar que en el día 30 la bacteria *Coliformes* presenta un valor de probabilidad (p) de <0.0001 siendo menor al error experimental de 0.05 lo cual nos indica que hay una diferencia significativa en la acción de cada uno de los tratamientos, es así que se puede determinar el mejor de ellos para la inhibición de esta bacteria en dicho período de tiempo.

Los mejores tratamientos determinados en la tabla son el 9(4300R-4000J), 6(4100R-4000J), 3(4000R-4000J), 8(4300R-3000J) y 5(4100R-3000J) respectivamente. Se puede determinar que los tratamientos 9, 6, 3 y 8 contienen MIC efectivos pero que sin embargo son excesivos para la dosis efectiva del tratamiento 5. Es así que se puede establecer que el mejor tratamiento para inhibir el crecimiento de *Coliformes* a los 30 días es el tratamiento 5.

#### 6.4.3.4 Análisis día 45

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$$

$\mu$ : promedio de unidades formadoras de colonia UFC para los tratamientos T1 – T9

Tabla 26. Análisis de varianza para Coliformes en el día 45.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P. VALOR
TOTAL	26	2653,58			
REPETICION	2	9,44	4,72	1,11	0,3544
TRATAMIENTO	8	2575,93	321,99	75,54	<0,0001
ERROR	16	68,2	4,26		

Tabla 27. Ponderación de tratamientos para Coliformes en el día 45.

TRATAMIENTO	MEDIA	RANGO		
1	26,13	A		
7	22,9	A		
2	15,57		B	
4	11,91		B	
9	1			C
8	1			C
3	1			C
5	1			C
6	1			C

**Desviación estándar: 1.19**

Como podemos observar el valor p. de los tratamientos es igual a <0.0001 siendo menor a 0.05 (error experimental o nivel de significancia), esto revela que efectivamente si existen diferencias significativas en los tratamientos por tanto podemos determinar cuál es el más efectivo al primer día de aplicación de los mismos.

Como podemos observar los mejores tratamientos son el 6(4110R-4000J), 5(4100R-3000J), 3(4000R-4000J), 8(4300R-3000J) y 9(4300R-4000J). Se puede observar que los tratamientos 6, 3, 8 y 9 coinciden al contener concentraciones elevadas para el caso del aceite esencial de romero y jengibre. El tratamiento 5 a su vez se convierte en el mejor tratamiento, dado por sus concentraciones, para inhibir el crecimiento de microorganismos a los 45 días. Los tratamientos menos efectivos en el estudio de *Coliformes* son; 1(4000R-2000J), 4(4100R-2000J) y 7(4300R-2000J) estos tratamientos concuerdan al contener valores de 2000ppm para el caso del aceite esencial de

jengibre siendo menos efectivos para inhibir el desarrollo de dichos microorganismos.

### **6.5 Determinación de vida útil de las hamburguesas de quinua**

Los análisis microbiológicos se realizaron para determinar la presencia de las bacterias *Staphilococcus Aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes* en las hamburguesas de quinua en periodos de 1, 15, 30 45 días. El fin de este estudio fue poder comparar los resultados obtenidos con la norma *INEN 1346:2010* de carne molida, debido a que actualmente no existe una norma con parámetros específicos para productos vegetarianos o análogos cárnicos denominados como carne vegetal, y por cuanto el producto de esta norma tiene características similares a la de hamburguesa de quinua.

Al comprar los requisitos microbiológicos establecidos por la norma *INEN 1346:2010*, y tomando en consideración que la carne molida es producto de origen animal y por ende con mayores índices de contaminación, vs los resultados obtenidos a los 45 días de almacenamiento con los preservantes naturales, se puede comprender que esta investigación asegura la estabilidad microbiológica de las hamburguesas de quinua hasta los 45 días dado por la ausencia total de los microorganismos *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes*.

#### **6.5.1 Requisitos microbiológicos para la carne molida**

La tabla 18 nos muestra en notación exponencial los requisitos microbiológicos para la aceptación de productos vegetales procesados con quinua, los parámetros son dados por ensayos independientes *INEN* que muestran los límites tolerables y de rechazo. Esta tabla es fundamental para realizar los parámetros de comparación con la tabla obtenida del muestreo final de las hamburguesas de quinua.

Tabla 28. Requisitos microbiológicos para la carne molida

	<b>M ( Tolerable )</b>	<b>M ( Rechazo)</b>	<b>Método de ensayo</b>
Aerobios mesófilos ufc/g	1.0 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>	NTE INEN 1 529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	1.0 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>	NTE INEN 1 529-8
<i>Staphilococcus aureus</i>	1.0 x 10 <sup>2</sup>	5.0 x 10 <sup>2</sup>	NTE INEN 1 529-14
Salmonella	AUSENCIA	AUSENCIA	NTE INEN 1 529-15
Colliformes	1.0 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>	NTE INEN 1 529-13

Tomado de: INEN 1 346:2010

### 6.5.2 Resultados microbiológicos para las hamburguesas de quinua (T5).

Tabla 29. Requisitos microbiológicos para la hamburguesa de quinua

	<b>M ( Tolerable )</b>	<b>M ( Rechazo)</b>	<b>Método de ensayo</b>
Aerobios mesófilos ufc/g	10	100	Microbiológicos petrifilm
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	AUSENCIA	AUSENCIA	Microbiológicos petrifilm
<i>Staphilococcus aureus</i>	AUSENCIA	AUSENCIA	Microbiológicos petrifilm
Salmonella	AUSENCIA	AUSENCIA	Microbiológicos petrifilm
Colliformes	AUSENCIA	AUSENCIA	Microbiológicos petrifilm

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 Conclusiones

Las pruebas realizadas a nivel de laboratorio permitieron hallar la formulación ideal de un análogo proteico en forma de hamburguesa de quinua, que simula las características de una hamburguesa de carne común, cuya composición está sujeta a preservantes de origen natural que respaldan su inocuidad microbiológica y estabilidad en percha.

Las formulaciones de preservantes naturales conformadas por Ácido ascórbico, Aceite esencial de romero y jengibre que fueron analizadas en esta investigación, son efectivas para inhibir el crecimiento de bacterias *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes* en las hamburguesas de quinua, hasta los 45 días en sistema de refrigeración y con empacado al vacío.

En base del estudio preliminar del efecto sinérgico bactericida del ácido ascórbico, se determina que promedios iguales o superiores a 5000ppm contenidos en las hamburguesas, son más efectivos para reducir el crecimiento de bacterias. Sin embargo la muestra M9 (7000ppm ácido ascórbico) nos indica que la curva de crecimiento tiende a aumentar el promedio microbiológico después de la misma. Esto nos indica que el ácido ascórbico no es suficiente para inhibir completamente el desarrollo de los microorganismos estudiados.

Es fundamental aplicar conservantes en esta gama de productos ya que en la microbiología se considera que la mayor parte de bacterias crecen con facilidad a un pH neutro entre 5 y 8. Respecto a los datos obtenidos de la medición del pH en las hamburguesas, se evidencia un pH entre 6,2 hasta 6,9 el cual coincide con el rango neutro que propicia el desarrollo microbiológico.

La función bactericida de los aceites esenciales de jengibre y romero demuestran que es posible su uso como preservantes naturales en hamburguesas de quinua en reemplazo de preservantes de origen sintético.

Basados en los resultados obtenidos del diseño experimental de aceites esenciales realizados en los 9 tratamientos, se da a conocer que el tratamiento 5 (4100Romero-3000Jengibre) es el más efectivo para inhibir el crecimiento de las bacterias *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes* responsables del deterioro y pérdida de vida útil del producto.

A través de los análisis realizados a nivel de laboratorio en esta investigación se determinó que el tiempo de vida útil del producto sin preservantes era de 15 días, sin embargo gracias a la acción del preservante natural formulado se ha alcanzado efectivamente los 45 días libres de contaminación de las bacterias en estudio, asegurando la calidad y la inocuidad del producto.

## **7.2 Recomendaciones**

Desarrollar una norma técnica en Ecuador que regule los requisitos para elaborar productos análogos proteicos y permita direccionar el mejoramiento continuo de esta gama de productos funcionales.

Profundizar el estudio de aceites esenciales de romero y jengibre como preservantes naturales en otras gamas de alimentos de origen vegetal y animal.

Monitorear constantemente las necesidades de las industrias de alimentos a fin de definir las nuevas exigencias que tengan los productores, las cadenas de distribución y los clientes finales.



Proponer investigación y desarrollo de productos análogos proteicos o vegetarianos con base funcional, a fin de cubrir las necesidades de los consumidores que cada día se direccionan más a este tipo de alimentación.

Investigar los MIC de los aceites esenciales de romero y jengibre en otro tipo de bacterias, a fin de cuantificar dosis efectivas más exactas para ser añadidas a productos e inhibir la proliferación de microorganismos.

Realizar análisis sensoriales que definan el impacto real de la utilización de aceites esenciales en productos alimenticios.

## REFERENCIAS

- Aguay, M. (2012). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la mezcla de extractos fluidos de jengibre (Zingiber officinale), Tomillo (Thymus vulgaris L.), Romero (Rosmarinus officinalis) mediante el test de edema inducido en ratas (Rattus norvegicus) (Tesis de grado)*. Escuela Politécnica Superior de Chimborazo.
- Albán, C. (2015). Justificación de vida útil de análogos proteicos en líneas de comercialización Ecuador.
- Altamirano, A. (1997). *Caracterización fotoquímica y evaluación del contenido de pro- vitamina A y vitamina C en diez líneas promisorias de Oca (Oxalis tuberosa Mol) y zanahoria Blanca (Arracaria xanthorrhiza Bancroft)*. Quito: INIAP.
- Asar, H., May J.M., y Smirnoff N. (2004). *Vitamin C Functions and biochemistry I animals and plants*. Florida - Estados Unidos: BIOS Scientific Publishers.
- Astislarán, I., Lasheras, B., Ariño, A y Martínez, J. (2003). *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria*. Madrid: Díaz de santos.
- Astudillo, S. (2014). *Utilización de aceites esenciales como conservantes en la elaboración de salchichas de pollo*. (Tesis de maestría). Universidad Politécnica Salesiana.
- Bandoni, A., Retta, D., Dileo Lira, P., BAREN, C. (2009). *Son realmente útiles los aceites esenciales*. Santiago de Chile: Blacpma.
- Barbosa, G., Tapia, M. y Cano, P. (2004). *Novel food processing technologies: Supercritical fluid extraction*. Boca Ratón: Crc. Press.
- Basabe, B. (2000). Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cubana Aliment Nutrition*,
- Begin, F. y Calstren, V. (1999). *Aditivos alimentarios naturales*. Cali - Colombia: Ed. Siral.
- Campos, J., Ruiz, R., y Díaz, E. (2002). Efecto sinérgico del hidroxibutil-tolueno (BHT) y ácido ascórbico en un producto cereal lactado, *Revista amazónica de investigación*. Recuperado el 21 Junio de 2015 de:

<http://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol2/9.pdf>.

- Carceller, F., Reglero, G., Sanz, J., y Santa, E. (1989). Estudio de la composición del aceite esencial de romero procedente de plantas recogidas en diferentes épocas del año en distintas zonas de la comarca del Moncayo. *Revista Dialnet*. Recuperado el 23 de Junio de 2015 de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=662071>.
- Cardoso, G. y Sosa, M. (2012). Propiedades del aceite esencial de albahaca *Ocimum basilicum* L. y sus aplicaciones en alimentos. Fundación Universidad de las Américas Puebla. Recuperado el 22 de Junio de 2015 de: <http://www.udlap.mx/wp/tsia/files/No6-Vol-1/TSIA-6%281%29-Cardoso-Ugarte-et-al-2012.pdf>.
- Castaño H., Ciro, G., Zapata, G., y Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*.
- Crick, J. (2012). *Food, Nutrition and Health: Funtional food*. Nueva York: Johnson and Hoffman.
- Da Silva, J. (2013). Lanzamiento del año Internacional de la Quinoa. Recuperado el 18 de Julio de 2015 de: <http://www.fao.org/quinoa-2013/press-room/news/detail/es/>.
- Forwest, F. (2014). *Alimentos para la salud: Nutrición y tendencias*. Colombia: Ed. Enao.
- Gil, E., y Sáenz, A. (2000). Obtención de aceite esencial de Cardamomo, *Revista universidad EAFIT*. Recuperado el 21 de Agosto de 2015 de: <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/articloe/view/1031/931>.
- Gill, M. (2000). *Staphylococcus Aureus*, moleculares de la resistencia a metilicina, *Revista Chil infect*. Recuperado el 08 de Agosto de 2015 de: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v17n2/art10.pdf>.
- Gordon, L. (1998). *Staphylococcus aureus*, a Well-Armed Pathogen, *Oxford journals*. Recuperado el 19 de Agosto de 2015 de: <http://cid.oxfordjournals.org/content/26/5/1179.short>.

- Gutiérrez, B. (2000). *Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos*. España: Diaz de Santos.
- Hurtado, M. (2013). *Higiene general en la industria alimentaria*. INAQ018. España: IC Editorial.
- Ivest, G. (2014). *Dietas y culturas: Alimentos para vegetarianos*. Lima: Espejo.
- Ketzel, M. (2008). *Conservación de alimentos*. Bahía, Browes.
- Leguerinel, J. y Mafart, M. (2001). *Antioxidantes de masas*. Chile: Zaeta.
- Loma, E., Jené, X., Castillo, R., y Ganoza, V. (2000). *Estudio de la industria agroalimentaria en honduras*. Costa Rica: IICA.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., y Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Buenos Aires - Argentina: Panamericana.
- Martinez, M., Molina, N y Boucurt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (Guayaba). *Cubana plant med*.
- Marz, L. (2000). *Soberanía alimentaria e Industria*. Brasil: Freitas.
- Mendez, A. (2011). *Science and technology against pathogens*. World scientific. Singapore. Shemse.
- Michanie, S. (2003). *Escherichia coli* o157:H7, la bacteria que dispara el HACCP en la industria de la carne. Recuperado el 18 Octubre 2015 de: [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/carne\\_y\\_subproductos/44-escherichia\\_coli.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/44-escherichia_coli.pdf).
- Montoya, P. (2014). *Mitos y Verdades de los alimentos funcionales*. México DF: Cifuentes
- Moore, R. (2000). *La solución para la hipertensión*. México DF: Ediciones Étoile
- Morales, F. (2011). *Métodos de conservación de alimentos*. México: Sánchez.
- Moret, Y. (1997). *Vitamina C influencia que ejerce en la cicatrización y alteraciones de la cavidad bucal*. Caracas: Universidad central de Venezuela.
- Muñoz, E. (2000). *A cocinar con Quinoa. Valor nutritivo de la Quinoa*. Quito: INIAP.
- Muñoz, N. (2013). *Usos de la Quinoa: La Proteína de Quinoa*. Perú: Acura.
- Nakai, S., y Molder, W. (2000). *Food proteins: processing applicatios*. Estados Unidos: Willey-Vch.

- Nuñez, G. (2011). *Retos de la nueva industria alimentaria*. Chile: Madero.
- Ocampo, R., Amalia, R., Betancourt, L., y Ocampo, D. (2008). Curso de Química enfocado a la Biología y los alimentos. [Figura 1]. Colombia: Universidad de Caldas.
- Olivas, E., y Alarcón, L. (2004). *Manual de prácticas básicas de microbiología general y microbiología de alimentos*. Mexico: D.R.
- Pamplona, J. (1995). *Alimentos que Curan*. Madrid, España: Editorial Safeliz.
- Pasquel, F. (2001). Gomas, una aproximación a la industria alimentaria, usos, aplicaciones y funciones. Recuperado el 17 de Noviembre de 2015 de: <http://200.48.67.60/links/facultades/alimentarias/v1/1.pdf>.
- Perez, H., y Martinez, R. (2007). *Antioxidantes*. México DF: Omega.
- Phyllis, A. (2000). *Recetas nutritivas que curan*. Nueva York: C.N.C.
- Plaus, A., Flores, G., y Ataucusi, S (2001), Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *origanum vulgare* (oregano). Recuperado el 28 de Septiembre de 2015 de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018130X2001000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018130X2001000100004&script=sci_arttext).
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., y Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food, practical aplicatios*. Boca Ratón: CRC press.
- Preedy, V. (2015). *Essential oils in food preservaion, flavor and safety*. Londres: Elsevier.
- Ribeiro, Y., Grespan, R., Kohiyama, C., Ferreira, F., Mossini, S., Silva, E., Filho, B., Mikcha, J., y Mchinski, M. (2013). Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production.
- Rico, P. (2007). *Química de los alimentos*. México: Editorial Galicia.
- Riera, J., Salcedo, R., y Alegret, P. (2004). *Química y bioquímica de los alimentos*. Barcelona: I editions.
- Romeu, C., Botta, E., y Diaz, Y. (2007). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) y evaluación invitro de su actividad acaricida. Recuperado el 20 Diciembre de 2015 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116152003>.

- Rosberg, F. (2004). *Generalidades y características de los ácidos orgánicos*. Málaga: Mondragón.
- Sabaté, J., y Brown, J. (2005). *Dietas vegetarianas: Descripciones y tendencias*. Madrid: CRC press LLC.
- Sanchez, V. (2005). Alimentos como escudo contra el cáncer. Diciembre 2015, de Infomed. Recuperado el 25 de Noviembre de 2015 de: <http://www.sld.cu/saludvida/nutricion/temas.php?idv=7687>
- Sellar, W. (2003). Guía de aceites esenciales [Tabla1]. Madrid: Editorial EDAF.
- Shafiur, M. (2007). *Handbook of food preservation*. Boca raton: Crc. Press.
- Soriano, J. (2007). *Micotoxinas en los alimentos*. España: Diaz de Santos.
- Strabenn, M. (2011). *Antioxidantes y Salud*. México DF: Mendoza.
- Valdéz, C. (2006). *La industria Vegetariana*. España: Aralis.
- Valero, V. ( 2000). *Tecnología de los alimentos*. Chile: Manrique.
- Vásquez, M. (2001). *Avances en la seguridad Alimentaria*. Santiago de Compostela – España: Altaga.
- Watson, H. (2011). *Properties of Food Aditives: Aditives for Industry Canadá*: Cds. Press.
- Wiley, J. (2010). *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Islandia: Halldor Thormar.
- Xiong, L., Ho, C., y Shahidi, S. (2012). *Quality attributes of muscle foods*. Dallas: Springer science & business media.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. IMÁGENES DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HAMBURGUESAS



**Masa de quinua cocida**



**Adición de goma xanthan a la masa**



**Aceite esencial de romero y jengibre**





**Separación de masa de quinua en 9T**



**Tratamientos contenidos de ácido Ascórbico más aceites esenciales**









## Cuadro de raíces (n+1)

REPETI CIÓN	TRATAMI ENTO	E. COLI 0 DÍAS	STAPH. 0 DÍAS	COLIF. 0 DÍAS	E. COLI 3D R+J	STAPH. 3D R+J	COLIF. 3D R+J	E. COLI 15D R+J	STAPH. 15D R+J	COLIF. 15D R+J	E. COLI 30D R+J	STAPH. 30D R+J	COLIF. 30D R+J	E. COLI 45D R+J	STAPH. 45D R+J	COLIF. 45D R+J
1	1	10,5	16,2	7,8	1	0,0	13,8	1	3,3	17,3	1	14,5	21,5	1	20,3	24,7
1	2	10,5	16,2	7,8	1	0,0	3,3	1	1,0	1,0	1	8,4	15,8	1	11,4	16,8
1	3	10,5	16,2	7,8	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
1	4	10,5	16,2	7,8	1	0,0	4,6	1	3,3	3,3	1	1,0	12,3	1	1,0	16,5
1	5	10,5	16,2	7,8	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
1	6	10,5	16,2	7,8	1	0,0	1,0	1	3,3	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
1	7	10,5	16,2	7,8	1	0,0	1,0	1	1,0	6,4	1	3,3	17,3	1	15,5	23,9
1	8	10,5	16,2	7,8	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
1	9	10,5	16,2	7,8	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
2	1	11,0	17,3	8,5	1	0,0	15,2	1	4,6	23,0	1	11,0	27,6	1	14,2	30,7
2	2	11,0	17,3	8,5	1	0,0	5,6	1	3,3	6,4	1	5,6	13,1	1	14,5	16,8
2	3	11,0	17,3	8,5	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
2	4	11,0	17,3	8,5	1	0,0	5,6	1	3,3	7,1	1	1,0	7,1	1	1,0	8,4
2	5	11,0	17,3	8,5	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
2	6	11,0	17,3	8,5	1	0,0	1,0	1	3,3	4,6	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
2	7	11,0	17,3	8,5	1	0,0	3,3	1	1,0	9,0	1	3,3	18,7	1	13,8	22,6
2	8	11,0	17,3	8,5	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
2	9	11,0	17,3	8,5	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
3	1	10,5	16,8	6,4	1	0,0	11,0	1	3,3	14,2	1	7,1	19,5	1	15,5	23,0
3	2	10,5	16,8	6,4	1	0,0	3,3	1	3,3	1,0	1	16,2	7,8	1	13,8	13,1
3	3	10,5	16,8	6,4	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
3	4	10,5	16,8	6,4	1	0,0	3,3	1	3,3	3,3	1	1,0	13,8	1	1,0	11,0
3	5	10,5	16,8	6,4	1	0,0	1,0	1	1,0	3,3	1	1,0	3,3	1	1,0	1,0
3	6	10,5	16,8	6,4	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
3	7	10,5	16,8	6,4	1	0,0	1,0	1	1,0	5,6	1	3,3	16,2	1	13,5	22,2
3	8	10,5	16,8	6,4	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0
3	9	10,5	16,8	6,4	1	0,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0	1	1,0	1,0