



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES  
ESENCIALES DE ORÉGANO Y CANELA EN EL PAN INTEGRAL



AUTORA

María Belén Rubio Peralta

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES  
ESENCIALES DE ORÉGANO Y CANELA EN EL PAN INTEGRAL

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

Profesor Guía

M. Sc. Darío Miguel Posso Reyes

Autora

María Belén Rubio Peralta

Año

2017

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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 Titulación”.

---

Darío Miguel Posso Reyes

Master en Ciencias e Ingeniería de los Alimentos

CI: 1713040952

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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 Titulación”.

---

Dra. Janeth Fabiola Proaño Bastidas  
Magister en Gerencia y Liderazgo Educativo  
CI: 1706515564

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi 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”.

---

María Belén Rubio Peralta

CI: 1721336285

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por su fidelidad en mi vida, a mi padre, mi madre y mi hermana por su amor, confianza, esfuerzo y por su apoyo incondicional.

## **DEDICATORÍA**

A Dios por bendecirme con todo lo que tengo, a mi familia por ser mi felicidad y a las demás personas que amo y comparten este logro conmigo.

## RESUMEN

El presente proyecto de titulación tiene como finalidad evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela en el pan integral, como una alternativa natural para la sustitución de los conservantes químicos empleados actualmente en la industria panadera y que según estudios han demostrado causar efectos secundarios en la salud de los consumidores.

Para esto se elaboró lotes de pan integral en los que se adicionaron los conservantes naturales en distintas dosis y modos de aplicación. Posterior a esto, para el análisis microbiológico se realizaron siembras a profundidad en medio SDA + cloranfenicol de cada tratamiento, incluyendo muestras testigo y muestras con un conservante químico para realizar la comparación. Las siembras se incubaron a 30 °C durante 21 días en los que se controló el crecimiento microbiano, así como también se almacenaron piezas de pan en empaques de polietileno a temperatura ambiente y lugar seco y cuantificó en porcentaje el deterioro de las muestras. Como resultado se obtuvo que la aplicación en masa de estos aceites esenciales retarda el crecimiento de los hongos predominantes en el deterioro del pan (*Penicillium* y *Aspergillus*) por más tiempo en comparación con el benzoato de sodio; siendo el aceite de canela el que muestra mejores resultados y por un tiempo más prolongado.

Para conocer la aceptabilidad del producto con los aditivos en estudio, se elaboró una encuesta para evaluar, principalmente, el sabor del pan. Se elaboró pan integral con las concentraciones mínimas de cada aceite y se realizó la degustación, indicando que al 67% de los encuestados les agrada y 93% consumiría pan con aceites esenciales.

En cuanto a costos, el empleo de aceites esenciales provoca un aumento del costo de producción, llegando incluso a triplicar el valor. Pero el beneficio de la aplicación consiste en que puede alargar la vida útil del producto y por lo tanto el tiempo en que se lo puede mantener en percha, disminuyendo las pérdidas por caducidad del producto.



## ABSTRACT

This graduation project aims to evaluate the antimicrobial effect of oregano and cinnamon essential oils in wholemeal bread, as a natural alternative to the substitution of chemical conservatives, which, nowadays are used in the bakery industry, and according to studies have shown secondary effects in consumers' health.

For this purpose, wholemeal bread batches were made and natural conservatives were incorporated in different dose and application. After this, for the microbiological analysis deep sowings were made in SDA + chloramphenicol midst, including witness samples and samples containing a chemical conservative, in order to compare results.

Sowings were incubated at 30 °C for 21 days, in which, microbiological growth was controlled, as well as pieces of bread were kept in polyethylene in a dry place and ambience temperature and the percentage of samples spoilage were quantified.

As a result, it was obtained that mass applications of both essential oils delay fungus growth that are main responsible of bread spoilage (*Penicillium* and *Aspergillus*) longer in comparison with sodium benzoate; being cinnamon essential oil the one that shows better results for extended time.

In order to know the new additives acceptability, surveys were made to assess flavor mainly. Wholemeal bread was made with each essential oils minimal concentrations and people tasted the samples. Results show that 67% of them liked the flavor and 93% are willing to consume bread with essential oils.

Economically, the use of essential oils turns into an increase of production costs, reaching triple of the value. But the benefit of this application consist in extend shelf life and therefore the time the product can be in hanger, decreasing losses for product expiration.

## INDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Problemática .....	2
1.3 Justificación .....	2
1.4 Objetivos .....	3
1.4.1 Objetivo General .....	3
1.4.2 Objetivos Específicos .....	3
2. Revisión Literaria .....	4
2.1 Generalidades del pan integral .....	4
2.1.1 Composición Nutricional .....	5
2.2 Deterioro microbiológico del pan .....	6
2.3 Aditivos para prevenir el crecimiento microbiano .....	7
2.3.1 Conservantes sintéticos .....	8
2.3.2 Conservantes naturales .....	9
2.4 Vida Útil.....	11
3. Materiales y Métodos.....	12
3.1 Materiales.....	12
3.1.1 Biológicos.....	12
3.1.2 Laboratorio.....	12
3.2 Metodología.....	13
3.2.1 Ubicación del experimento.....	13
3.2.2 Estadística.....	13
3.2.2.1 Diseño experimental.....	13
3.2.2.2 Factores en estudio .....	13
3.2.2.3 Tratamientos.....	14
3.2.2.4 Análisis de varianza.....	15
3.2.2.5 Análisis funcional.....	15

3.2.2.6	Unidad experimental.....	15
3.2.2.7	Variable.....	16
3.3	Manejo del experimento.....	16
3.3.1	Obtención de aceites esenciales de orégano y canela.....	16
3.3.2	Elaboración de pan integral.....	17
3.3.3	Análisis microbiológico.....	24
3.3.4	Análisis físico.....	24
3.3.5	Aceptabilidad del producto.....	25
3.3.6	Análisis costo – beneficio.....	25
4.	Resultados y Discusión.....	26
4.1	Experimentales.....	26
4.2	Aceptabilidad.....	39
4.3	Costo – beneficio.....	43
5.	Conclusiones y Recomendaciones.....	45
5.1	Conclusiones.....	45
5.2	Recomendaciones.....	45
	Referencias .....	47
	Anexos.....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El pan es un producto básico en la alimentación diaria de las personas alrededor del mundo y los distintos niveles de consumo se deben a las costumbres y tradiciones alimentarias propias de cada región o país. El Ecuador no es la excepción, hasta el año 2006, el 90% de la población incorpora este producto en su dieta diaria (Cordero Sánchez, 2009). Desde el punto de vista industrial, el pan es considerado como un producto simple pues se elabora a partir de harina, agua, sal, azúcar y levadura. En cambio, desde el punto de vista químico - biológico, se lo considera un producto complejo, pues presenta cambios en su estructura de una forma acelerada, alterando la textura, sabor, color e incluso el olor.

El pan es un producto derivado de los cereales y es el más popular de entre ellos gracias a los nutrientes que provee al organismo y por las propiedades sensoriales que posee. El consumo de pan a nivel mundial es directamente proporcional al crecimiento de la población. En el Ecuador, en el año 2012, se registró un aumento del consumo de este producto en un 5,7% respecto al año 2011 y se estima que para el año 2018, este incremento será del 8% (PROECUADOR, 2013).

Existen distintos tipos pan, los más consumidos son el pan blando y el pan integral. Este último, surge como respuesta a una necesidad de los consumidores por disponer de productos más nutritivos. El pan integral posee efectos beneficiosos relacionados con su estructura en sí, al poseer gran cantidad de fibra, se le atribuye el incremento de la saciedad, mejoramiento del metabolismo al aumentar la velocidad del tránsito intestinal y ofrecer un menor índice glucémico (Llorach *et al.*, 2013).

## 1.2 Problemática

El principal inconveniente de cualquier tipo de pan, es el crecimiento de hongos, específicamente los del género *Penicillium spp* y *Aspergillus spp*, por lo que las industrias panaderas se vieron en la necesidad de incorporar conservantes sintéticos como los benzoatos y sorbatos en concentraciones permitidas para alargar la vida útil. Además, es de gran importancia el hecho de que estos microorganismos pueden generar micotoxinas que ponen en riesgo la salud del consumidor. Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), estos compuestos pueden ser incorporados en productos de panificación en su forma ácida, es decir, como ácido benzóico y ácido sórbico, respectivamente. Existen estudios que indican que estos conservantes pueden causar efectos secundarios a largo plazo como las alergias o algún grado de toxicidad e incluso se les atribuye propiedades precursoras del cáncer (Pongsavee, 2015).

## 1.3 Justificación

Para garantizar la calidad e inocuidad de los productos de panadería, la industria utiliza en la formulación conservantes sintéticos, pero la exigente demanda de los consumidores por productos naturales ha hecho que las industrias tengan que buscar alternativas cada vez más saludables y naturales. Existen especias como el orégano y la canela, cuyos aceites esenciales poseen principios activos con propiedades antifúngicas que pueden ser usados en la elaboración del pan integral para prolongar su vida útil y mantener las características sensoriales del mismo. De esta forma, se puede ofrecer a los consumidores un producto aún mucho más saludable sin la adición de compuestos químicos.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela en el pan integral.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Analizar el crecimiento de microorganismos ante la aplicación de los aceites esenciales de orégano y canela.
- Contrastar las características sensoriales de los panes en estudio.
- Elaborar un análisis costo/beneficio para determinar la viabilidad de la aplicación.

## 2. Revisión Literaria

### 2.1 Generalidades del Pan Integral

El INEN, define al pan como el producto alimenticio que resulta de la cocción de la masa fermentada proveniente de la mezcla de harina de trigo y ciertos ingredientes básicos.

También define al pan integral como el pan común de miga oscura a base de harina integral de trigo, agua potable, levadura, sal, azúcar, grasa comestible animal o vegetal y aditivos autorizados. La textura del pan integral es menos fina (mayor a 212 micras) en comparación al pan blanco, al igual que posee un contenido mayor de fibra (7,5 gramos) como indica la Tabla N° 1. La harina integral de trigo es aquella que se obtiene de la molienda de los granos de trigo y contienen todas las estructuras del mismo (EUFIC, 2014).

La harina de trigo es el componente mayoritario de la masa y es la más utilizada en panificación, debido a las proteínas que esta posee, que son las gliadinas y gluteninas, las cuales al mezclarse forman el gluten, el cual le confiere a la masa panaria una estructura en forma de redes en donde se retiene el gas producido en la fermentación, al igual que las características de cohesividad y viscoelasticidad, es decir, la capacidad de mantener unidas sus partículas y estirarse al mismo tiempo.

El agua es el segundo componente mayoritario en la masa y su función radica en hidratar las proteínas y formar el gluten. Posteriormente, el agua servirá para activar la levadura.

La levadura que se utiliza en panadería es *Saccharomyces cerevisiae*, encargada de realizar el proceso de fermentación para producir dióxido de

carbono, alcohol y algunos ácidos más que le confieren sabor y aromas característicos al producto, además de aumentar el volumen de la masa. Las enzimas de la levadura actúan convirtiendo el almidón en azúcares más simples que son fermentables al igual que el azúcar añadido.

La principal función de la sal o cloruro de sodio es el de acentuar el sabor, también actúa fortaleciendo el gluten, lo cual permite obtener masas más firmes. Además, regula la fermentación, interviene en la coloración de la corteza y aumenta la capacidad de retener el agua. El azúcar, además de servir de alimento para la levadura, confiere el color y sabor del producto.

Las dos principales funciones de la grasa, ya sea esta animal o vegetal, es de dar una textura blanda al pan y retener el aire al realizar operaciones como el amasado (Bernabé, 2009).

### **2.1.1 Composición Nutricional**

El pan es una fuente de hidratos de carbono, más de 50%, principalmente de almidón, y aporta una cantidad de energía moderada, hasta el 60% de la cantidad diaria requerida en la dieta. (Gil Hernández & Serra Majem, 2010). El contenido total de carbohidratos es de aproximadamente de 50 a 60 gramos por cada porción de 100 gramos, y en menor cantidad (2,7 gramos) entre celulosa, hemicelulosa, lignina, entre otros polisacáridos. El aporte de fibra del pan integral en comparación con el pan blanco es de 2 a 6 veces más. A pesar de que la fibra no es un nutriente como tal, los beneficios que brinda a la salud son considerables, el principal es el de mejorar el tránsito intestinal, además de producir una acción laxante debido a que las fibras son insolubles. El pan contiene vitaminas del complejo B, que son hidrosolubles, entre las cuales están la vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), B6 (píridoxina), vitamina B9 (ácido fólico), en los valores que muestra la Tabla N° 1. También aporta minerales como el fósforo, calcio, magnesio, potasio; y en



menor proporción sodio, yodo y hierro. En comparación con el pan blanco, el pan integral aporta estas vitaminas y nutrientes en mayor proporción (EUFIC, 2014).

	Pan Blanco	Pan Integral
Energía (kcal)	261	221
Proteína (g)	8,5	7
Hidratos de carbono (g)	51,5	38
Almidón (g)	41,8	36,2
Azúcares (g)	1,9	1,8
Fibra (g)	3,5	7,5
Lípidos (g)	1,6	2,9
Vitamina B1 (g)	0,086	0,34
Vitamina B2 (g)	0,06	0,09
Vitamina B6 (g)	0,06	0,09
Vitamina E (mg)	Trazas	0,18
Calcio (mg)	56	54
Fósforo (mg)	91	200
Hierro (mg)	1,6	2,7
Zinc (mg)	0,61	1,8
Magnesio (mg)	25,1	76
Sodio (mg)	540	550
Potasio (mg)	110	230
Selenio (mg)	28	35

Figura 1. Contenido de nutrientes por cada 100 gramos de pan. Adaptada de Gil Hernández, 2009, p. 83.

## 2.2 Deterioro Microbiológico del Pan

El pan es un producto que se deteriora rápidamente, aproximadamente a los tres días de elaborado el producto sin ningún tipo de conservante, ya que presenta condiciones óptimas para el crecimiento de microorganismos, específicamente los mohos, que son el porcentaje de humedad y la actividad de agua, cuyos valores son 38% y 0,98, respectivamente.

El crecimiento de los mohos se puede observar en la superficie del pan, los que pueden encontrarse corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Eurotium*, siendo *Aspergillus* y *Penicillium* los principales causantes del enmohecimiento.

Según el género, pueden identificarse según la coloración que provocan en la corteza, la coloración negra se le atribuye a los géneros *Mucor spp* y *Rhizopus spp.*; o una coloración verde propia de los géneros *Aspergillus spp.* y

*Penicillium spp.* El crecimiento de *Penicillium* es predominante debido a que la producción de esporas es abundante y se encuentran en el ambiente, la temperatura de proliferación varía entre los 7 y 10 grados centígrados, mientras que el rango de temperatura a la que prolifera *Aspergillus* es entre 22 a 24 grados centígrados (Salgado Nava & Jiménez Munguía, 2012).

En cuanto a las levaduras, aunque de baja incidencia, existen géneros que también provocan el deterioro del pan, entre los que se encuentran: *Saccharomycopsis fibuligera*, *Candida guilliermondi*, *Hansenula anomala*, *Debaromyces hansenii*, *Candida parapsilosis*, *Serratia marcescens*, *Endomyces fibuliger*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Pichia burtoni*. Entre estas, se caracterizan por presentar pigmentos rojos o manchas blancas dando la apariencia de una cobertura de yeso en la corteza

### **2.3 Aditivos para prevenir el crecimiento microbiano**

La industria de panificación se vio en la necesidad de incorporar aditivos con propiedades conservantes a la formulación de sus productos para prolongar el tiempo de vida útil de los mismos, ya que la función de estos es retrasar el crecimiento de los microorganismos. Y, debido a que los panes pueden permanecer en percha incluso pocos días antes de alcanzada su fecha de vencimiento, la industria debe asegurar que la totalidad de sus productos puedan ser vendidos y evitar pérdidas económicas.

Los conservantes químicos o sintéticos son los aditivos más utilizados al tener buen rendimiento y bajo costo. Pero en los últimos años, la alimentación libre de químicos ha tomado gran fuerza en la población, por lo que se estudia la factibilidad del empleo de aceites esenciales extraídos de especias que poseen características antimicrobianas (Chavarrías, 2004), específicamente antifúngicas, que pueden responder la problemática actual de la panificación.

### 2.3.1 Conservantes Sintéticos

Los aditivos químicos usados en la industria de la panadería son los sorbatos, benzoatos y propionatos, a pesar de que la norma INEN no contempla el uso de estos últimos para productos de panadería.

El INEN aprueba estos aditivos e indica dosis máxima permitida y la forma cómo deben ser aplicados, pero existen estudios que sostienen que estos aditivos químicos, a largo plazo, producen efectos secundarios en la salud de los consumidores (Pongsavee, 2015), ya que el ácido sórbico y el sorbato de potasio pueden producir irritación a la piel (urticaria), ojos y al tracto respiratorio (EFSA Journal, 2014).

Efectos secundarios de los benzoatos se han registrado como vasodilatación, empeora el asma y puede ser el causante de anomalías genéticas en fetos (Silva & Cebola Lidón, 2016). Ante esto, los consumidores exigen productos más saludables, menos procesados y sin el uso de sustancias químicas.

Aunque el INEN indica el uso de los sorbatos en forma de ácido sórbico, en una dosis máxima de 1000 mg / kg, también se utiliza este conservante en la forma de sorbato de potasio (aditivo E 202), que es más soluble que el ácido y tiene apenas el 74% de eficacia (INEN,2013). En comparación con los propionatos, los sorbatos son más eficaces en cuanto a la inhibición de mohos, por lo que su uso está dado en dosis más bajas.

Los sorbatos no pueden ser aplicados a la masa, pues también actúan como inhibidores de levaduras y retrasarían el proceso de fermentación, por lo que el método de aplicación se lo realiza mediante aspersion de una solución entre el 1 y 6% sobre la corteza del pan una vez que este ha salido del horno, pues la

temperatura hace que el agua de la solución del conservante se evapore, dejando así los residuos del conservante sobre la corteza del producto. Los sorbatos tienen una acción efectiva en medio ácido, es decir, en valores inferiores a 6,5 (San Lucas Sánchez, 2012).

En cuanto a los benzoatos, el INEN indica su uso en forma de ácido benzóico, en una dosis máxima de 1000 mg / kg, pero industrialmente, también es usado en forma de benzoato de sodio (aditivo E 211) (INEN, 2013). Los benzoatos se derivan del benceno, que es un hidrocarburo aromático tóxico, por lo que puede presentar problemas toxicológicos. Los benzoatos tiene una acción efectiva en medio ácido, es decir, valores inferiores a 4,5 (San Lucas Sánchez, 2012).

La norma INEN no indica el uso de propionatos en la panadería, solamente hace mención a productos lácteos como los quesos. Pero las industrias utilizan el propionato de calcio (aditivo E282) como conservante para productos de panadería y pueden ser utilizados en dosis mayores en comparación a los sorbatos y benzoatos. Los propionatos tienen una acción efectiva en medio ácido, es decir, valores inferiores a 5,5 (San Lucas Sánchez, 2012).

### **2.3.2 Conservantes Naturales**

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas presentes en las plantas, que pueden ser extraídos de tallo, flores, raíces y en especial de las hojas, mediante métodos de extracción como la destilación por arrastre de vapor y dilución con solventes, entre otros (Peredo Luna, 2009).

Contienen compuestos fenólicos, a los cuales se les atribuye las propiedades de antimicrobianos y, se ha demostrado que variables como la temperatura, contenido de grasa, contenido de proteína, concentración de sal, entre otras, pueden afectar la actividad antimicrobiana de estos aceites. Dependiendo de las variedad de planta, el tiempo de cosecha, las condiciones climáticas, entre

otras, el contenido de las sustancias que componen los aceites pueden variar (Stashenko, 2009).

El orégano está representado a nivel mundial por dos especies principales pertenecientes a dos familias: *Origanum vulgare*, de la familia de las Lamiaceae, y *Lippia graveolens*, de la familia de las Verbenaceae (García Pérez, Castro Álvarez, Gutiérrez Uribe, & García Lara, 2012). Es una de las especias usadas como condimento alimenticio desde tiempos antiguos. Existen otras variedades de orégano, las más comunes son: *Origanum viride*, *Origanum virens*.

El aceite esencial de orégano, posee actividad antimicrobiana sobre mohos (*Penicillium*) y levaduras al contener timol y carvacrol (en concentraciones del 82% y 72% respectivamente), que son compuestos fenólicos que le confieren esa actividad, al causar alteraciones en la estructura de las hifas de los mohos, reduciendo el diámetro. Además, causan el rompimiento de la membrana fosfolipídica de las bacterias gram negativas (Rodríguez García et al., 2016). Y además, puede mejorar las características sensoriales de los productos (Soycan-Önenç , Koc, Coşkuntuna, Özdüven, & Gümüş, 2015).

La canela (*Cinnamomum verum*), pertenece a la familia de las Lauraceae, y algunas variedades de canela producen aceites volátiles al destilarse, entre las que constan: *Cinnamon zeylanicum*, *Cinnamon cassia* y *Cinnamon caphora*. La canela posee variedad de aceites que pueden ser extraídos de las hojas o de la corteza, con diferentes características en cuanto a sabor y olor. Al comparar entre algunas especias como el orégano, nuez moscada y pimienta negra; la canela resulta ser la especia con mayor contenido de compuestos fenólicos.

Los componentes mayoritarios del aceite esencial de canela son el cinamaldehído (47,78%), metil eugenol (6,75%), delta cadineno (4,68%) y gamma cadineno (3,13%) (Kordsardouei, Barzegar, & Sahari, 2013). El aceite esencial de canela, se perfila como un conservante natural externo.

Investigaciones demuestran que pueden aumentar hasta en 10 días el tiempo de vida útil del pan al ser empleado como parte del envase contenedor del pan. La actividad antimicrobiana se le atribuye al aldehído cinámico y al eugenol (Sienkiewicz, Głowacka, Kowalczyk, Wiktorowska-Owczarek, Józwiak-Bębenista, & Łysakowska, 2014), que se encuentran en la corteza y las hojas de la canela, respectivamente.

## **2.4 Vida útil**

Se define como vida útil al período de tiempo en el cual un alimento puede ser consumido y sus propiedades organolépticas (sabor, aroma, color, textura), así como las propiedades químicas y microbiológicas son aceptables para el consumo. También comprende aquel período de tiempo entre la fabricación hasta que el alimento sufre cambios que no lo hacen apto para la ingesta. Para evaluar la vida útil de un alimento se debe tener en cuenta la formulación del producto, el procesamiento, la forma de empaque y las condiciones a las que se almacena (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2013).

La elaboración de pan sin ningún tipo de conservante o tecnología de barreras utilizadas en el proceso como atmósferas modificadas, congelación o pasteurización, da como resultado un producto que mantiene su calidad por alrededor de cinco días. Debido a que el pan se contamina de microorganismos presentes en el aire del ambiente tan pronto sale del proceso de horneado (Haegens, 2010).

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Biológicos

- Levadura

##### 3.1.2 Laboratorio

- Harina de trigo
- Harina integral de trigo
- Agua
- Sal
- Azúcar
- Manteca de cerdo
- Margarina sin sal
- Salvado de trigo
- Aceite de oliva
- Aceite esencial de orégano
- Aceite esencial de canela
- Benzoato de sodio
- Balanza digital
- Espátula
- Bowls
- Pipetas sin graduación
- Amasadora
- Cortador plástico de masa
- Horno
- Guantes

- Brocha de silicona
- Latas para horno
- Fundas de empaque con cierre
- Papel film transparente

### **3.2 Metodología**

#### 3.2.1 Ubicación del Experimento

El experimento se realizará en el laboratorio de húmedos LQ10 de la Universidad de las Américas Sede Querí. El laboratorio presenta temperatura y humedad baja.

#### 3.2.2 Estadística

##### 3.2.2.1 Diseño Experimental

Se utilizará un Diseño Completo al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x2x2, con 2 repeticiones.

##### 3.2.2.2 Factores en Estudio

- Conservantes Naturales (C): se utilizarán aceites esenciales de orégano (C1) y de canela (C2).
- Concentración (D): se trabajará con dos concentraciones para cada aceite. Para el orégano, del 0.5% (D1) y 1% (D2). Para la canela, del 0,2% (D1) y 0,5 (D2)%.
- Método de Empleo (M): los conservantes naturales serán añadidos en la masa (M1) y en la corteza (M2).



### 3.2.2.3 Tratamientos

Tabla 1.

*Descripción de los tratamientos a realizar según el tipo de conservante natural, % de concentración y método de empleo.*

<b>No. Tratamiento</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Conservante Natural</b>	<b>Concentración (%)</b>	<b>Método de Empleo</b>
1	C1D1M1	Aceite esencial de orégano	0,5	Masa
2	C1D2M1	Aceite esencial de orégano	1	Masa
3	C1D1M2	Aceite esencial de orégano	0,5	Corteza
4	C1D2M2	Aceite esencial de orégano	1	Corteza
5	C2D1M1	Aceite esencial de canela	0,2	Masa
6	C2D2M1	Aceite esencial de canela	0,5	Masa
7	C2D1M2	Aceite esencial de canela	0,2	Corteza
8	C2D2M2	Aceite esencial	0,5	Corteza

		de canela		
--	--	-----------	--	--

#### 3.2.2.4 Análisis de Varianza

Tabla 2.

*Desarrollo del análisis de varianza, conteniendo las fuentes de variación con sus respectivos grados de libertad.*

<b>Fuentes de Variación (F de V)</b>	<b>Grados de Libertad (gl)</b>
Total	15
F1	1
F2	1
F1 x F2	1
F3	1
F1 x F3	1
F2 x F3	1
F1 x F2 x F3	1
Error Experimental	8

#### 3.2.2.5 Análisis Funcional

Se utilizará la prueba de Fisher al 5% cuando existan diferencias estadísticas entre los factores y los tratamientos.

#### 3.2.2.6 Unidad Experimental

Estará representada por una pieza de pan integral entre 60 y 65 gramos de peso en crudo.

#### 3.2.2.7 Variable

- Crecimiento de Microorganismos (ufc/g, Porcentaje): se verificará la presencia de hongos diariamente, mediante el recuento de unidades formadoras de colonias y por control visual en las piezas de pan almacenadas.

### 3.3 Manejo del Experimento

#### 3.3.1 Obtención de Aceites Esenciales de Orégano y Canela

##### - Canela:

El aceite esencial de canela se adquirió mediante el proveedor Azolea - Aceites Esenciales, que lo importó de China, listo para el uso. El método de extracción utilizado es destilación por arrastre de vapor de la corteza y las hojas de la planta. Es un aceite 100% puro y natural. Sus principales componentes bioquímicos es el cinamaldehído (90%) y cumarina (4%).

##### - Orégano:

Para la obtención del aceite esencial de orégano, se empleó el método de extracción por hidroddestilación con trampa de Clevenger (Anexo N° 1), que permite la recirculación del agua y la separación de la misma con el aceite, consistió en:

1. Depositar en un recipiente de acero 1 kilogramo de hojas secas de *Origanum vulgare*. El recipiente contiene una malla en su interior para evitar que las hojas secas hagan contacto con el agua.
2. Añadir 1,5 litros de agua destilada.

3. Colocar el recipiente con las hojas y el agua en una estufa y calentar hasta ebullición. El tiempo de extracción es de aproximadamente 4 horas.
4. El aceite extraído es envasado en un recipiente de vidrio y autoclavado durante 2 horas a 120 °C.

### **3.3.2 Elaboración de Pan Integral**

Previa la elaboración del pan se realizó el procedimiento de limpieza y desinfección de equipos y materiales usados en el laboratorio para disminuir la probabilidad de que el producto se contamine durante el proceso. Para la limpieza y desinfección de la mesa de trabajo:

1. Preparar una solución acuosa 1:33 del producto TB Cide, que es un desinfectante y sanitizante a base de ácido peracético.
2. Depositar sobre la superficie y dejar durante 10 minutos en contacto.
3. Enjuagar con agua, secar y aplicar etanol al 98%.
4. Dejar secar

Para los materiales y utensilios como recipientes, espátulas, ganchos de batidora, latas de horno, cortador de masa, cuchara:

1. Lavan con detergente de cocina y abundante agua.
2. Secan y aplicar etanol al 98%.

Los equipos (balanza, batidora) se limpian con paño húmedo y se aplica etanol al 98%.

El procedimiento para elaborar el pan integral con la incorporación de los aceites esenciales en masa se muestra en las Figuras 2, 3 y 4; y el procedimiento con la aplicación de los aceites esenciales en corteza se indica en la Figura 5, 6 y 7.

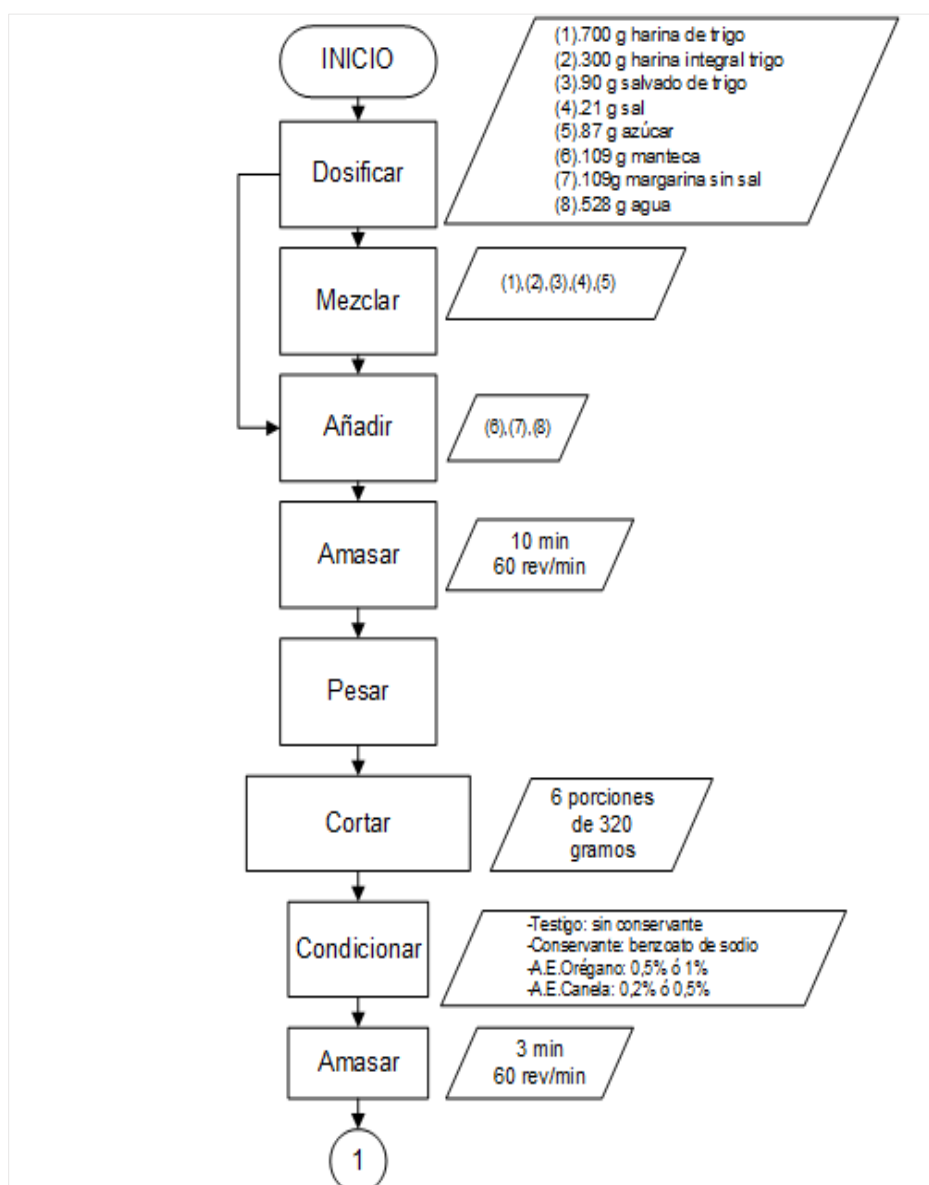


Figura 2. Diagrama de Procesos Elaboración de Pan Integral con Aceites en Masa, parte 1.

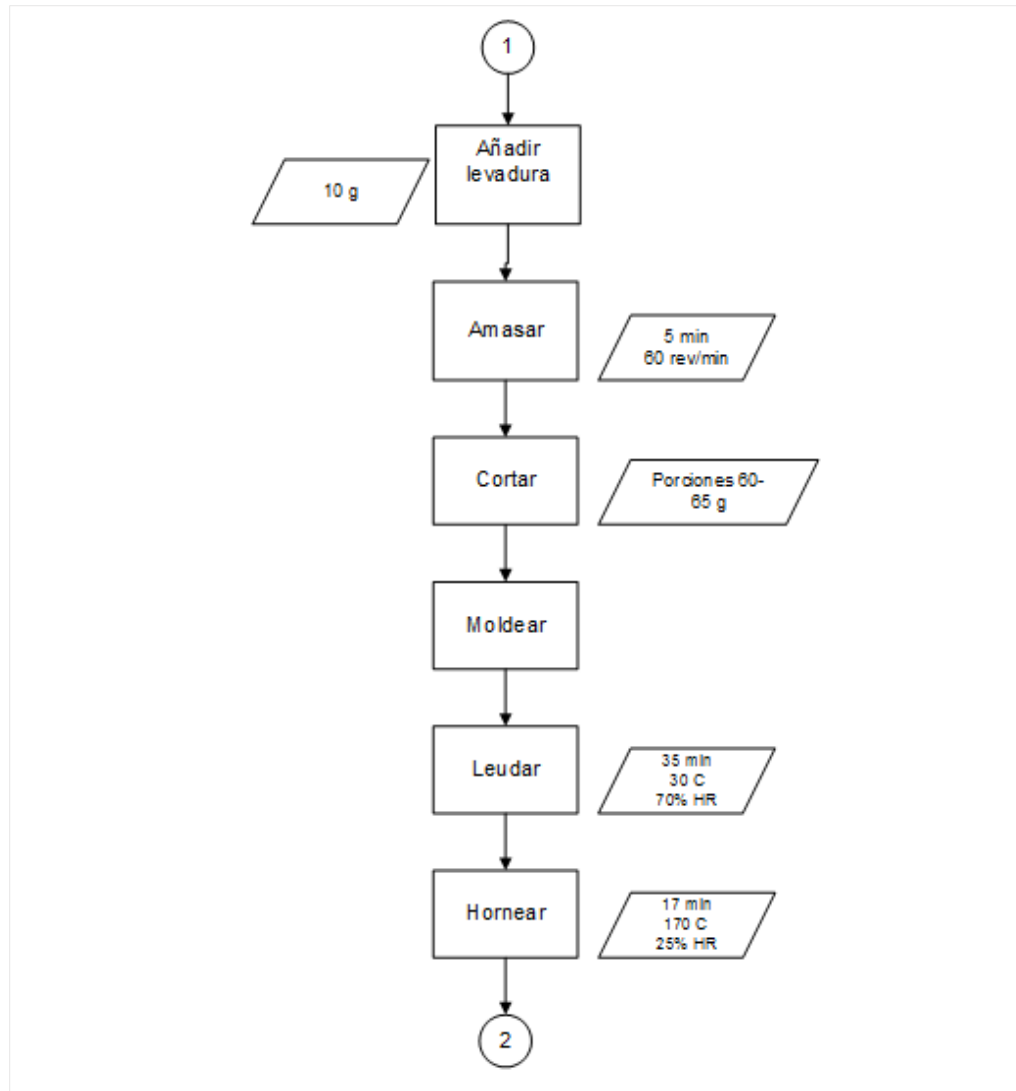
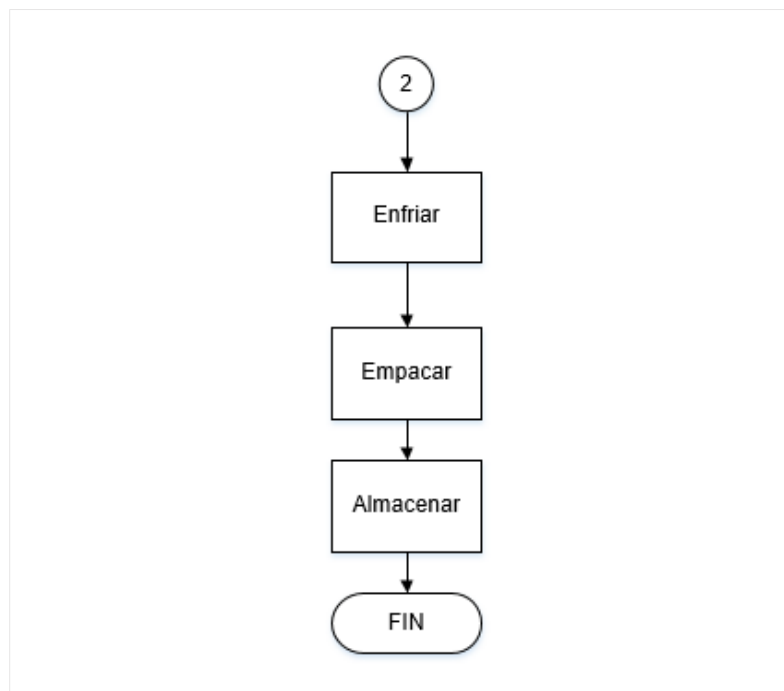


Figura 3. Diagrama de Procesos Elaboración de Pan Integral con Aceites en Masa, parte 2.



*Figura 4.* Diagrama de Procesos Elaboración de Pan Integral con Aceites en Masa, parte 3.

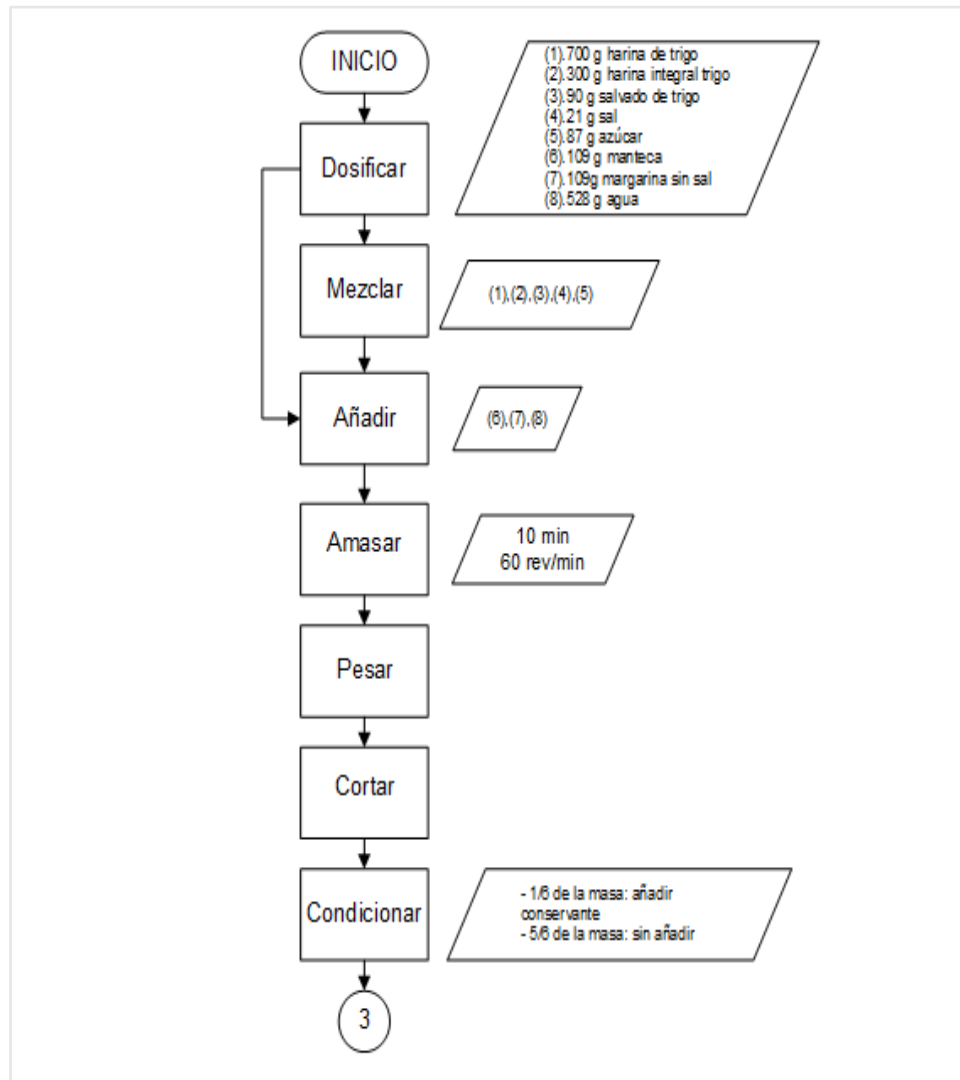


Figura 5. Diagrama de Procesos Elaboración de Pan Integral con Aceites en Corteza, parte 1.



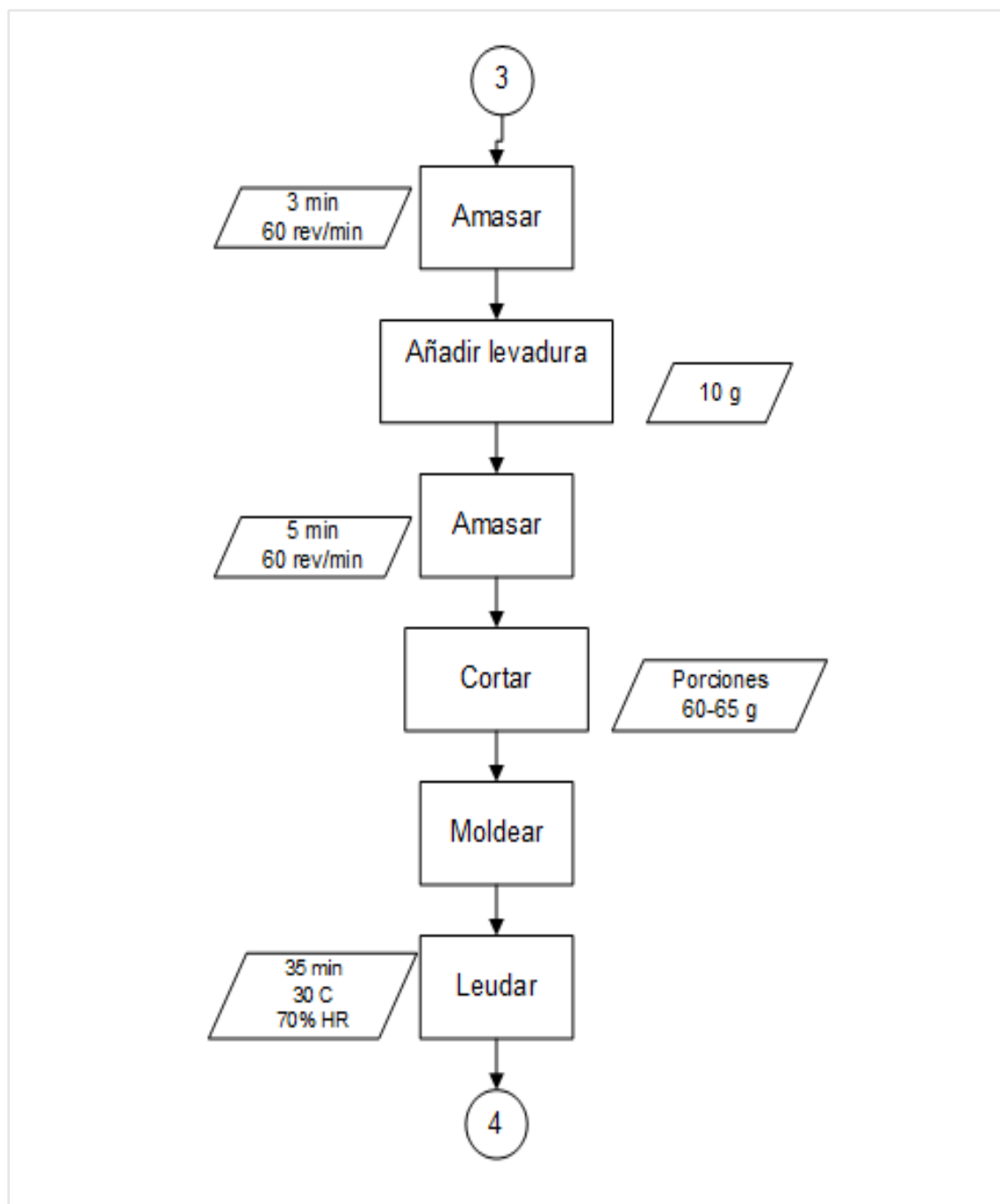


Figura 6. Diagrama de Procesos Elaboración de Pan Integral con Aceites en Corteza, parte 2.

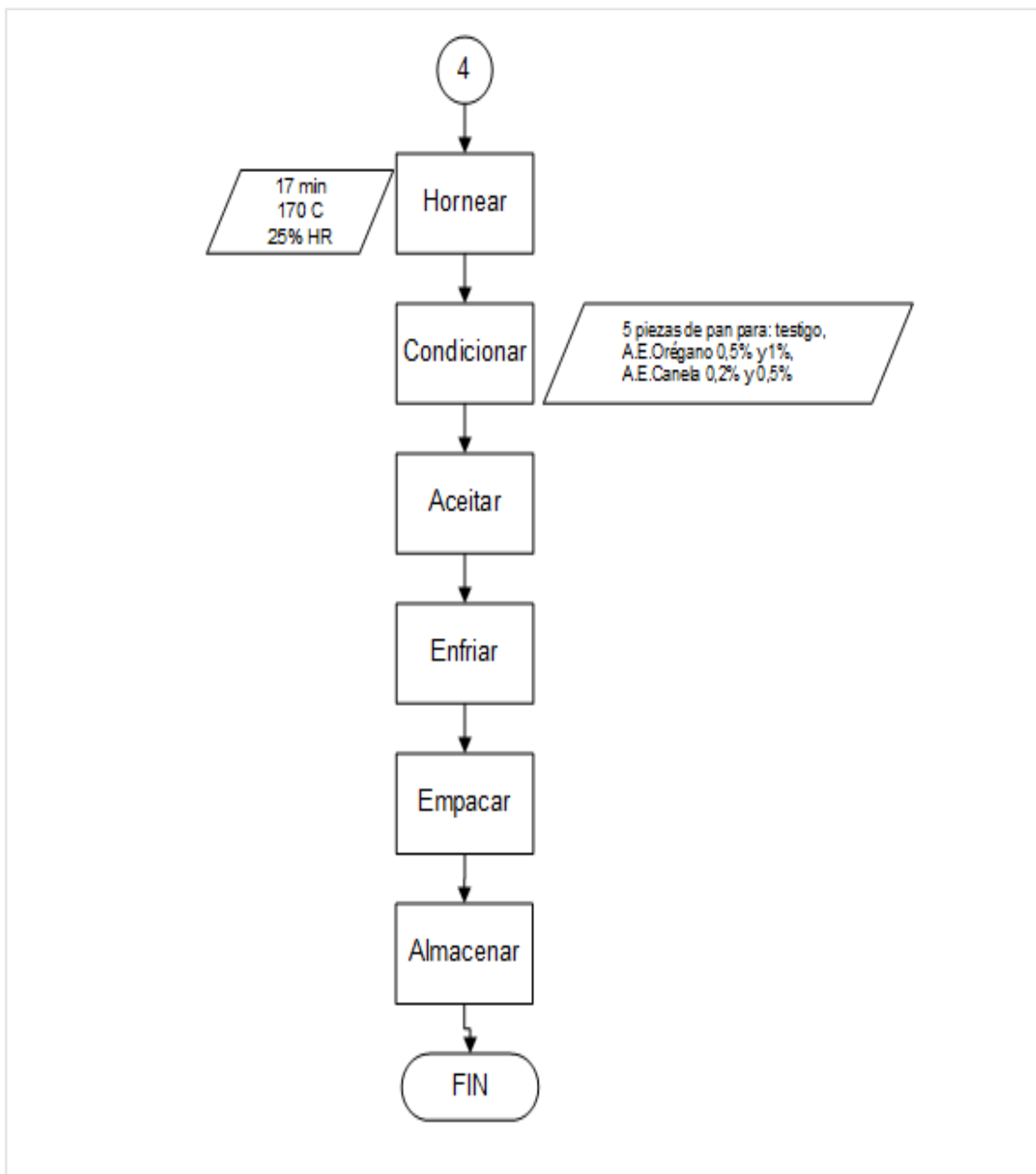


Figura 7. Diagrama de Procesos Elaboración de Pan Integral con Aceites en Corteza, parte 3.

### 3.3.3 Análisis Microbiológico

Las siembras para el análisis microbiológico de mohos y levaduras de cada tratamiento (Anexo N° 3), se realizaron el mismo día de elaborados los panes, así:

1. Pesar asépticamente 10 gramos de cada muestra.
2. Colocar en un erlenmeyer estéril, añadir 90 mililitros de agua peptonada 0,1% y agitar enérgicamente. Esta solución corresponde a la dilución  $10^{-1}$ .
3. Toma 1 mililitro de la dilución  $10^{-1}$  con una micropipeta automática
4. Depositar en un tubo de ensayo que contiene 9 mililitros de agua peptona y se agita. Esta solución es la dilución  $10^{-2}$ .
5. Tomar 1 mililitro de cada dilución y depositar en una caja petri estéril desechable.
6. Añadir aproximadamente 25 mililitros de medio SDA + cloranfenicol (Sabouraud Dextrosa Agar) y realizar movimiento circulares para dispersar la siembra.
7. Cultivar los medios en incubadora a 30 °C por 21 días.
8. Realizar control de crecimiento microbiano reportando ufc/g.

### 3.3.4 Análisis Físico

El control del crecimiento de hongos en las muestras de pan consistió en:

1. Almacenar las piezas de pan en bolsas plásticas con cierre en ambiente seco y a temperatura ambiente.
2. Realizar controles visuales cada 3 días durante 21 días.
3. Registrar el porcentaje de contaminación que se puede visualizar en cada bolsa de pan, dividiendo cada pieza en cuatro cuadrantes como se muestra en el Anexo N° 13.

### **3.3.5 Aceptabilidad del Producto**

La determinación de la aceptabilidad del pan integral con aceites esenciales, se realiza mediante degustación y encuestas que buscan conocer la opinión de los consumidores acerca del sabor y textura del producto, así como también si se logra percibir el sabor de los aceites.

Se procedió de la siguiente manera:

1. Se elaboró dos lotes de pan integral con aceite esencial de orégano y canela con aplicación en masa, debido a que mostró mejor resultado en comparación a la aplicación en corteza.
2. Se cortó cada pieza de pan en porciones de aproximadamente 20 gramos.
3. Se distribuyó las muestras de pan juntamente la encuesta (Anexo N° 14).
4. Se tabularon los resultados

### **3.3.6 Análisis Costo – Beneficio**

Para realizar la comparación entre el aceite esencial de orégano, aceite esencial de canela y el conservante químico, se tomó en cuenta:

1. El precio más bajo de cada uno de estos al igual que los insumos necesarios para la elaboración.
2. Cantidades a utilizar según la receta
3. Y, el tiempo estimado de vida útil como beneficio.

## 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Experimentales

Tabla 3.

*Unidades formadoras de colonia de mohos y levaduras por gramo y porcentaje de contaminación en siembras y piezas de pan con aceites esenciales.*

TIEMPO (h)	TRATAMIENTO											
	Testigo		Conservante Benzoato de Sodio		Orégano Masa 0,5%		Orégano Masa 1%		Canela Masa 0,2%		Canela Masa 0,5%	
	UFC /g	%	UFC /g	%	UFC /g	%	UFC /g	%	UFC /g	%	UFC /g	%
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>24</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>72</b>	1	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>144</b>	3	35	1	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>240</b>	5	66	4	25	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>312</b>	8	90	7	50	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>408</b>	12	100	11	75	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>456</b>	17	100	15	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>504</b>	21	100	18	100	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: Aplicación en masa del 14 de Octubre del 2016. Primera repetición.

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos durante los 21 días de estudio expresados en horas, del crecimiento microbiano y el porcentaje de contaminación en muestras almacenadas (Anexo N° 4) en los tratamientos realizados el día 14 de octubre de 2016 a la muestra testigo, muestra con benzoato de sodio, aceite esencial de orégano y canela en las dos dosis. Indicando que no existió crecimiento alguno en los tratamientos con los aceites esenciales, a comparación del tratamiento con conservante químico, en el cual el crecimiento inició a las 144 horas (6 días) de incubada la muestra.

Tabla 4.

*Unidades formadoras de colonia de mohos y levaduras por gramo y porcentaje de contaminación en siembras y piezas de pan con aceites esenciales.*

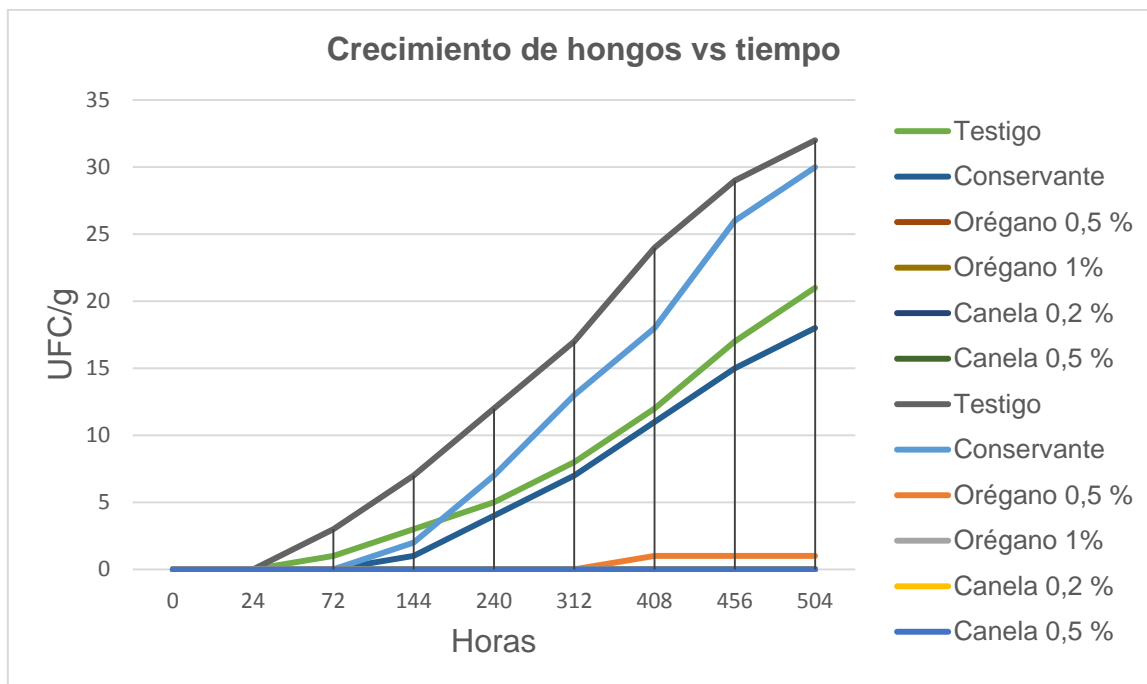
TIEMPO (h)	TRATAMIENTO											
	Testigo		Conservante Benzoato de Sodio		Orégano Masa 0,5%		Orégano Masa 1%		Canela Masa 0,2%		Canela Masa 0,5%	
	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>24</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>72</b>	3	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>144</b>	7	33	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>240</b>	12	45	7	15	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>312</b>	17	50	13	25	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>408</b>	24	75	18	30	1	5	0	0	0	0	0	0

<b>456</b>	29	90	26	45	1	10	0	0	0	0	0	0
<b>504</b>	32	100	30	60	1	15	0	5	0	0	0	0

Nota: Aplicación en masa del 17 de Octubre del 2016. Segunda repetición.

La Tabla 4 con los resultados de los tratamientos realizados el día 17 de octubre de 2016 muestran que hubo crecimiento de hongos en el tratamiento con aceite de orégano al 0,5% a partir del día 17 (408 horas) y con el aceite de orégano al 1% el crecimiento se originó en el día 21 (504 horas). En comparación con el primer análisis (Tabla 3), en el que el crecimiento fue nulo en los tratamientos con las dos dosis de aceite esencial de orégano, las condiciones de temperatura y humedad en la incubadora, así como el grado de contaminación en el área de elaboración de los panes pudo ser un causante de que el crecimiento fúngico sucediera 4 días antes. En cambio, los tratamientos con aceite de canela no vuelven a presentar crecimiento de hongos (Anexo N° 5).

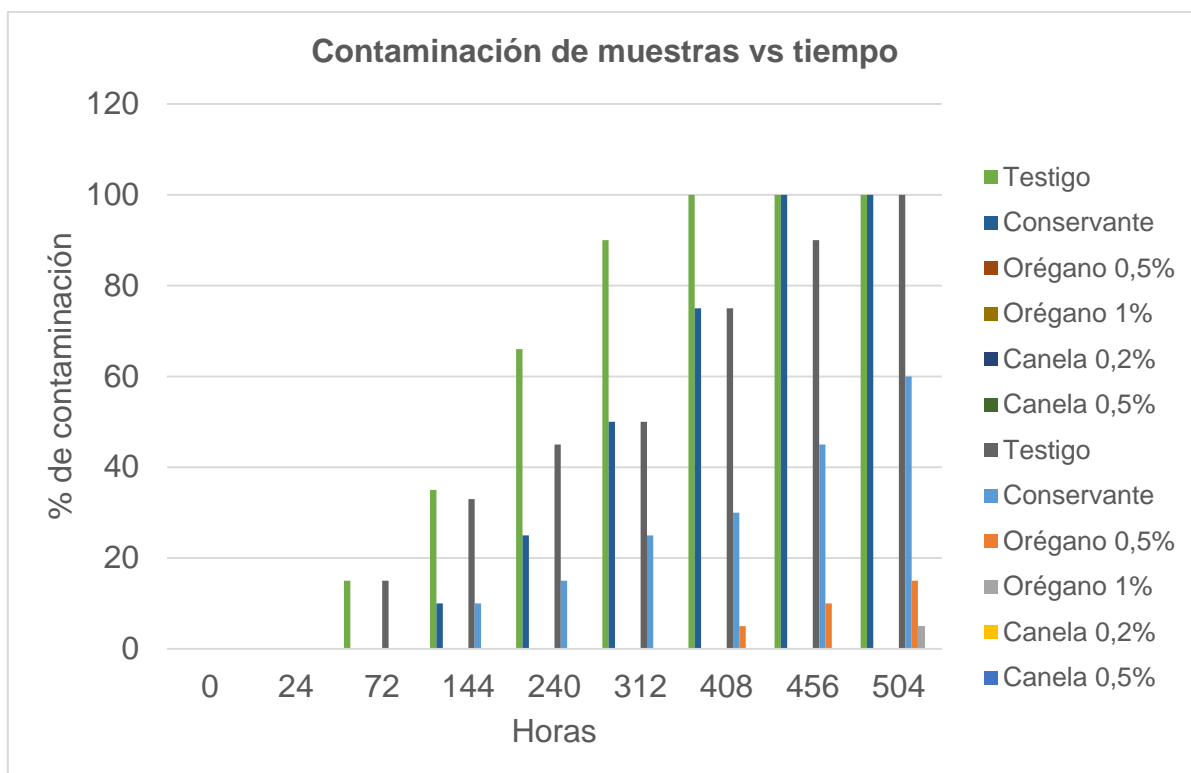
Los resultados microbiológicos que se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4 indican que las dos distintas concentraciones de cada aceite esencial empleadas en la masa de pan detienen el crecimiento microbiano, específicamente de hongos y levaduras, en comparación al conservante químico (benzoato de sodio), que a las 144 horas (6 días) comienza a presentar unidades formadoras de colonia. Al comparar los dos aceites esenciales, el de canela suprime totalmente la aparición de hongos, no así el aceite esencial de orégano que muestra ufc a las 408 horas (17 días) según la Tabla 4. También en las muestras almacenadas hay evidencia física de crecimiento de mohos del género *Penicillium* y *Aspergillus* según el tipo de coloración (Salgado & Jiménez, 2012).



*Figura 8.* Curva de crecimiento de hongos en pan con aceites esenciales en masa de lotes del 14 y 17 de Octubre del 2016

La Figura 8 muestran una comparación de los 12 tratamientos en masa (repetición 1 y 2) realizados entre el 14 y 17 de octubre, en donde se puede observar la curva de crecimiento de cada caso, notando que los tratamientos testigo y conservante son los que tienen crecimiento fúngico que inicia en un punto en común, a las 24 horas para los testigos y a las 72 horas para los conservantes. En cambio, el mínimo crecimiento que se observa con el aceite de orégano al 0,5%, se mantiene estable hasta el período final.





*Figura 9.* Porcentaje de piezas de pan con aceites esenciales en masa contaminadas de lotes del 14 y 17 de Octubre del 2016.

La Figura 9 muestran los 12 tratamientos en masa realizados entre el 14 y 17 de octubre, en donde se puede observar que los tratamientos testigo y conservante en ambos casos son los que tienen crecimiento fúngico en las muestras almacenadas para el análisis físico. Se puede observar que el porcentaje de contaminación del testigo y benzoato de sodio aumenta de manera acelerada, no así los tratamientos con los aceites esenciales.

Tabla 5.

*Unidades formadoras de colonia de hongos y levaduras por gramo y porcentaje de contaminación en siembras y piezas de pan con aceites esenciales.*

TIEMPO (h)	TRATAMIENTO											
	Testigo		Conservante Benzoato de sodio		Orégano Corteza 0,5%		Orégano Corteza 1%		Canela Corteza 0,2%		Canela Corteza 0,5%	
	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>24</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>72</b>	4	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>144</b>	7	25	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>240</b>	12	40	2	15	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>312</b>	18	60	3	30	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>408</b>	22	80	5	45	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>456</b>	27	100	6	60	0	5	0	0	0	0	0	0
<b>504</b>	33	100	7	75	0	10	0	5	0	0	0	0

Nota: Aplicación en corteza del 24 de Octubre del 2016. Primera repetición.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos hasta los 21 días de la experimentación de los tratamientos con los aceites esenciales en corteza realizados el 24 de octubre del 2016, que indica que el aceite de canela y orégano suprimen el crecimiento de hongos. En cuanto al porcentaje de contaminación, se puede ver que existe presencia de hongos en la corteza del

pan con aceite de orégano a las 456 horas (19 días) y 504 horas (21 días), lo que puede determinar que la aplicación en corteza no sea igual de eficaz que la aplicación en masa.

Tabla 6.

*Unidades formadoras de colonia de mohos y levaduras por gramo y porcentaje de contaminación en siembras y piezas de pan con aceites esenciales.*

TIEMPO (h)	TRATAMIENTO											
	Testigo		Conservante Benzoato de sodio		Orégano Corteza 0,5%		Orégano Corteza 1%		Canela Corteza 0,2%		Canela Corteza 0,5%	
	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>24</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>72</b>	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>144</b>	3	8	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>240</b>	5	20	3	16	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>312</b>	6	45	5	30	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>408</b>	7	75	7	55	0	2	0	0	0	0	0	0
<b>456</b>	8	100	9	80	0	3	0	0	0	0	0	0
<b>504</b>	10	100	11	100	0	6	0	5	0	0	0	0

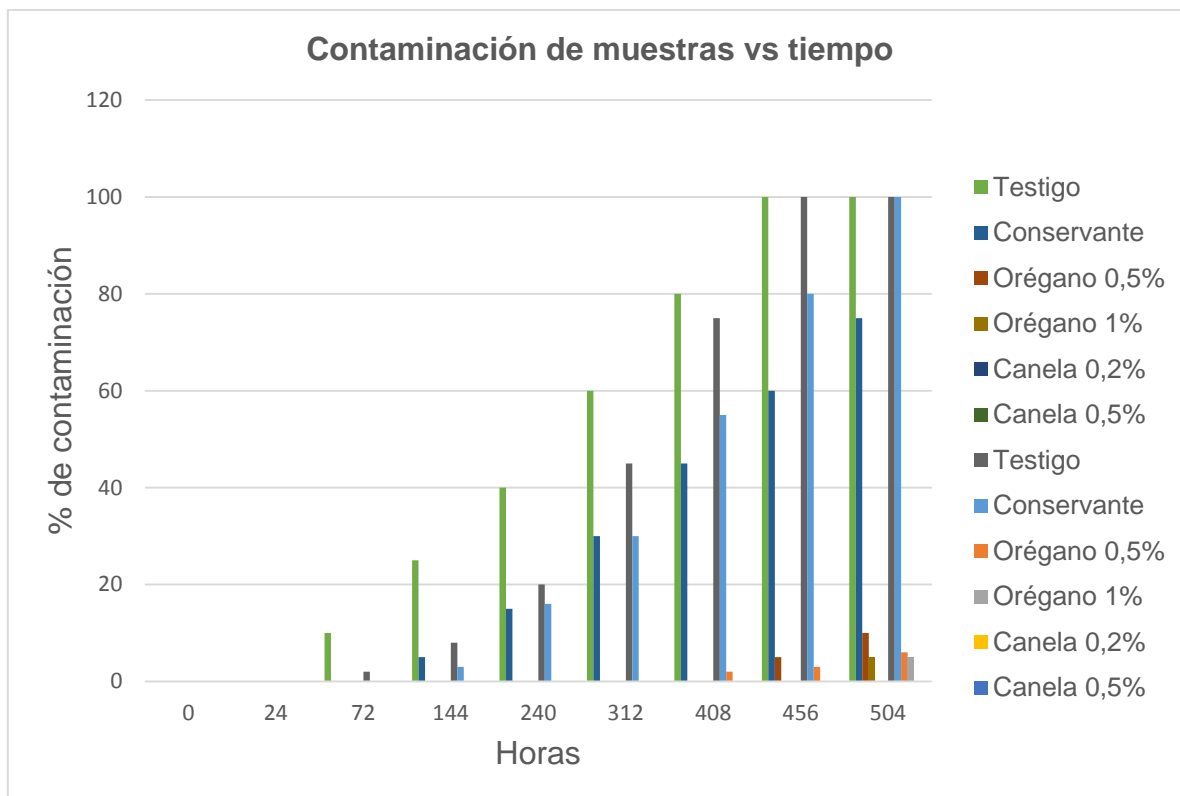
Nota: Aplicación en corteza del 28 de Octubre del 2016. Segunda repetición.

Los resultados en la Tabla 6 indican que el aceite de canela cumple su acción fungicida de la misma manera, conservando al pan libre de hongos por más tiempo al compararlos con el benzoato de sodio. En cambio, los tratamientos con orégano presentan valores en el porcentaje del crecimiento fúngico a las 408 y 504 horas, tal como ocurrió en la primera repetición, corroborando de esa manera que la aplicación en masa ofrece mejores resultados.



*Figura 10.* Curva de crecimiento de hongos en pan con aceites esenciales en corteza de lotes del 24 y 28 de Octubre del 2016

La Figura 10 indica que el crecimiento microbiano únicamente se produjo en el testigo y conservante de las dos repeticiones y las muestras almacenadas durante 21 días se contaminaron en su totalidad en los mismos tratamientos como muestra la Figura 11.



*Figura 11.* Porcentaje de piezas de pan con aceites esenciales en corteza contaminadas de lotes del 24 y 28 de Octubre del 2016.

El diseño experimental escogido corresponde al Diseño Completo al Azar con tres niveles que corresponden al tipo de aceite, el modo de aplicación y la dosis, con dos repeticiones.

Tabla 7.

*Diseño Completamente al Azar de los resultados de UFC/g obtenidos a las 504 horas.*

			to Repetició	1	2	Total Trata mien to	C	M	D	CM	CD	MD	CM D			
C1	M1	D1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	M1	D2	2	0	0	0							1	1	1	0
	M2	D1	3	0	0	0							0	0	0	0
	M2	D2	4	0	0	0							0	0	0	0
C2	M1	D1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	M1	D2	6	0	0	0							0	0	0	0
	M2	D1	7	0	0	0							0	0	0	0
	M2	D2	8	0	0	0							0	0	0	0
			Total Repe tició	0	1	1										
						0,06 25										

Tabla 8.

*Análisis de Varianza de los resultados de UFC/g obtenidos a las 504 horas.*

Fuentes de Variación (F de V)	Grados de Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado	F tablas
Total	15	0,9375	-	-	-
C	1	0,0625	0,0625	1,600	3,458
M	1	0,063	0,063	1,600	3,458
CxM	1	0,063	0,063	1,600	3,458
D	1	0,063	0,063	1,600	3,458
CxD	1	0,063	0,063	1,600	3,458
MxD	1	0,0625	0,063	1,600	3,458
CxMxD	1	0,250	0,250	6,400	3,458
Error	8	0,3125	0,039		

<b>C =</b>	0,0625
------------	--------

Las Tablas 7 y 8 representan los datos obtenidos a las 504 horas de la experimentación, que permiten realizar el desarrollo del diseño experimental DCA de los tratamientos en microbiología. El análisis de varianza (ANOVA) a nivel microbiológico indica que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos según la Tabla 8.

Tabla 9.

*Diseño Completamente al Azar de los resultados de % de contaminación obtenidos a las 504 horas.*

			Trat Rep	1	2	Total Trat.	C	M	D	CM	CD	MD	CMD
<b>C1</b>	<b>M1</b>	<b>D1</b>	<b>1</b>	0	15	15	46	20	31	20	31	15	15
	<b>M1</b>	<b>D2</b>	<b>2</b>	0	5	5							5
	<b>M2</b>	<b>D1</b>	<b>3</b>	10	6	16				26	15	5	16
	<b>M2</b>	<b>D2</b>	<b>4</b>	5	5	10							10
<b>C2</b>	<b>M1</b>	<b>D1</b>	<b>5</b>	0	0	0	0	26	15	0	0	16	0
	<b>M1</b>	<b>D2</b>	<b>6</b>	0	0	0							0
	<b>M2</b>	<b>D1</b>	<b>7</b>	0	0	0				0	0	10	0
	<b>M2</b>	<b>D2</b>	<b>8</b>	0	0	0							0
			<b>Total Rep.</b>	15	31	46							
						2,875							

Tabla 10.

*Análisis de Varianza de los resultados de % de contaminación obtenidos a las 504 horas.*

<b>Fuentes de Variación (F de V)</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tablas</b>
<b>Total</b>	15	303,75	-	-	-
<b>C</b>	1	132,25	132,25	9,301	3,458
<b>M</b>	1	2,250	2,250	0,158	3,458
<b>CxM</b>	1	2,250	2,250	0,158	3,458
<b>D</b>	1	16,000	16,000	1,125	3,458
<b>CxD</b>	1	16,000	16,000	1,125	3,458
<b>MxD</b>	1	1	1,000	0,070	3,458
<b>CxMxD</b>	1	20,250	20,250	1,424	3,458
<b>Error</b>	8	113,75	14,219		
<b>C =</b>	132,25				

Las Tablas 9 y 10 representan los datos obtenidos a las 504 horas de la experimentación, para realizar el desarrollo del diseño experimental DCA (Diseño Completo al Azar) de los tratamientos en las muestras de pan almacenadas para el control físico. El ANOVA a nivel de porcentaje de contaminación (Tabla 10), indica que si existe una diferencia entre los tratamientos, y es que los tratamientos con aceite de canela, incluso con la dosis más baja, impiden el crecimiento de hongos en la superficie de los panes con mejores resultados que el de aceite esencial de orégano.

Los panes almacenados muestran con claridad que el efecto antimicrobiano de los aceites detiene el crecimiento de hongos por más tiempo (triplica el efecto del conservante químico), tal como muestran las evidencias en los Anexos N° 8,9, 10,11 y 12.



Tabla 11.

*Nomenclatura tipo de aceite, aplicación y dosis.*

<b>C1</b>	Aceite Esencial de Orégano
<b>C2</b>	Aceite Esencial de Canela
<b>M1</b>	Masa
<b>M2</b>	Corteza
<b>D1</b>	0,5%(orégano) y 0,2%(canela)
<b>D2</b>	1%(orégano) y 0,5%(canela)

Al comparar el aceite esencial de orégano y canela entre sí, es evidente que ambos cumplen su función de conservantes naturales, siendo el aceite de canela el más eficaz y a menor concentración.

El aceite esencial de orégano presenta mejor eficacia aplicado en masa en su mayor concentración (1% de la masa total), ya que detiene el crecimiento fúngico hasta las 504 horas (21 días), es decir que triplica la acción antimicrobiana del conservante químico.

El aceite esencial de canela detiene en su totalidad el crecimiento fúngico en su dosis menor (0,2% de la masa total) y logra hacerlo por más de los 21 días programados para este estudio. Además de ser útil en los dos modos de aplicación.

## 4.2 Aceptabilidad

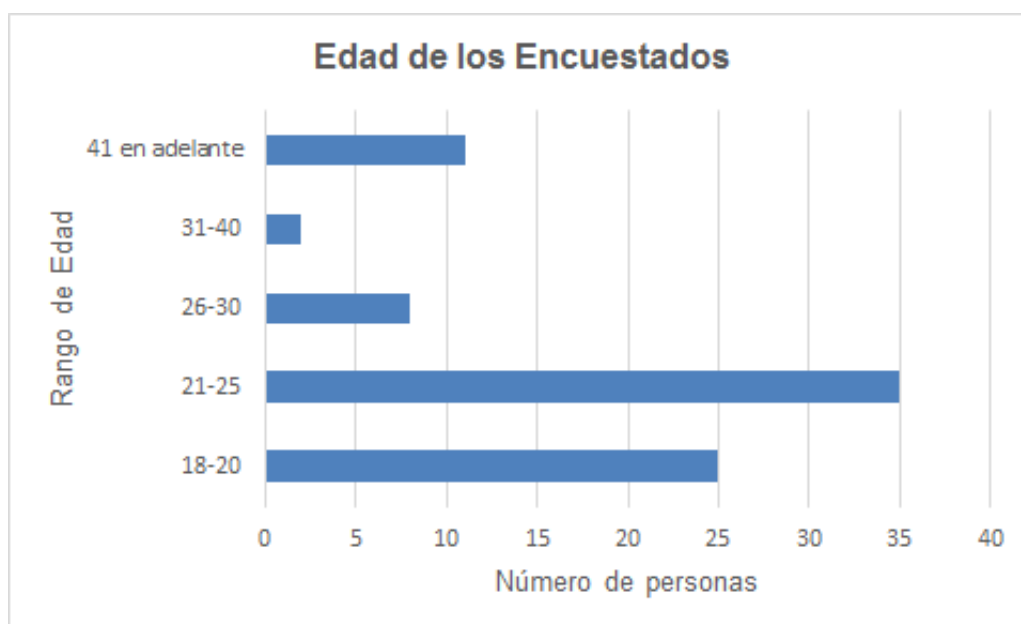


Figura 12. Rango de edad de los encuestados

Las encuestas se realizaron a 80 personas, de las cuales el 60% corresponde a mujeres y el 40% a hombres, entre las edades de 18 a 40 años según la Figura 12. Siendo el sector de jóvenes y adultos el que consume este producto con mayor frecuencia. El 99% de los encuestados consume algún tipo de pan, ya sea este artesanal o industrial, blanco o integral.



Figura 13. Porcentaje de encuestados que lograron percibir un sabor en particular en la degustación del pan

La degustación de los panes indicó que el 93% de los encuestados fue capaz de percibir algún sabor en particular en los panes (Figura 13), ya sea este agradable o no, aunque solamente el 65% pudo reconocer el sabor correcto, es decir, pudo identificar el orégano (asociado con el sabor a pizza o hierbas) y la canela (asociado al dulce o picante).

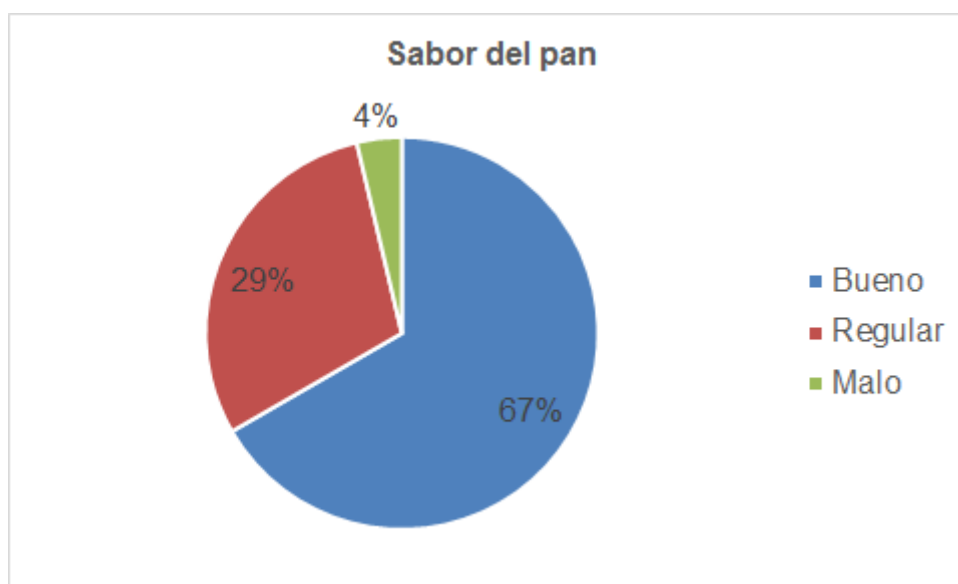


Figura 14. Calificación del sabor del pan según el criterio de los encuestados

Además, el 67% considera que el sabor de los mismos es bueno, según la Figura 14, siendo el de canela mejor aceptado. Sin embargo, consideran que el aceite de orégano brinda un sabor de boca amargo y el de canela picante.

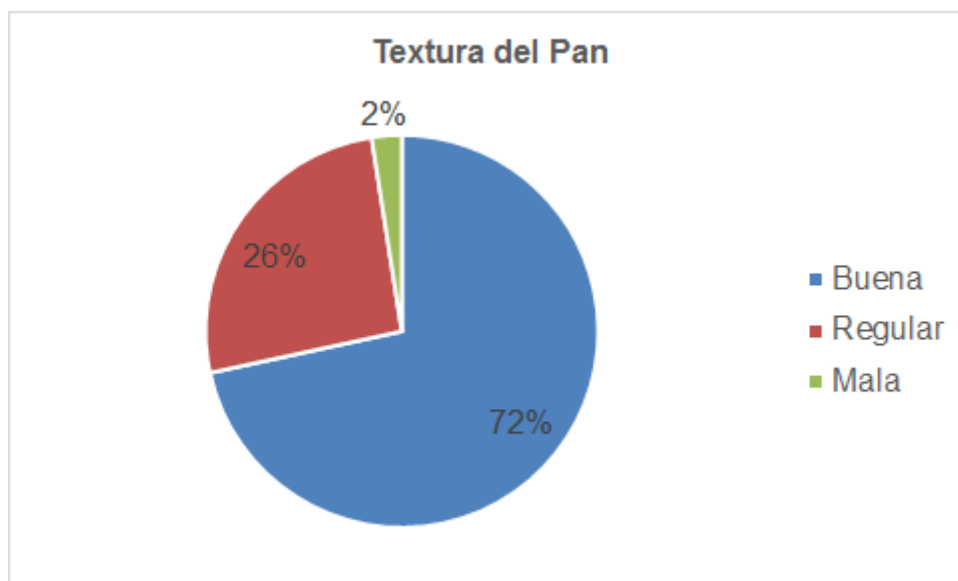


Figura 15. Calificación de la textura del pan según el criterio de los encuestados

El 72% de los degustadores consideró que la textura de los panes es buena (Figura 15), de la textura del pan depende también la intensidad del sabor de los aceites esenciales. Un pan mejor leudado y horneado a la temperatura (170 °C) y tiempo correcto (17 minutos) brindará mejor sabor.

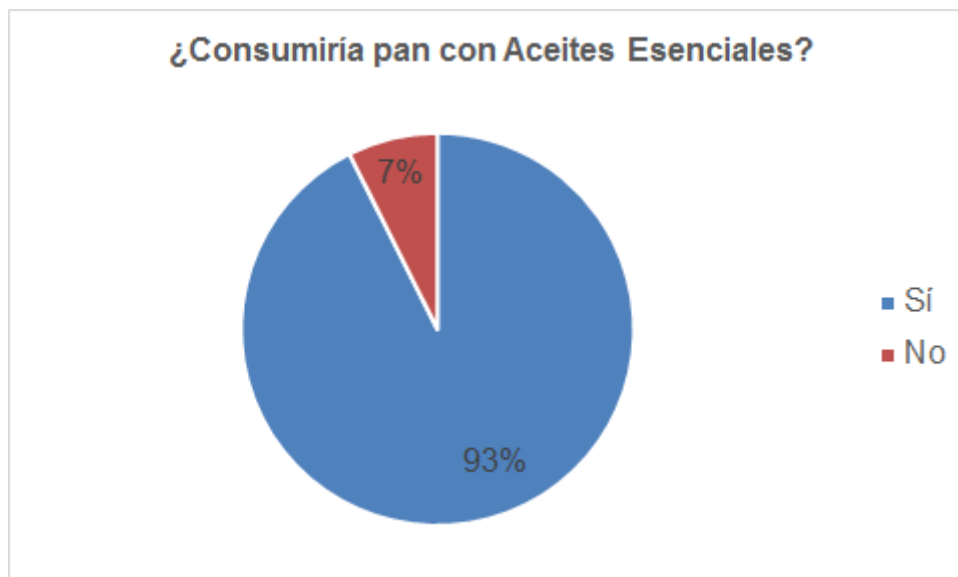


Figura 16. Porcentaje de encuestados que dispuestos a consumir aceites esenciales como sustitutos a los conservantes químicos en el pan

Debido a esto, los panes elaborados con aceites esenciales de orégano y canela, podrían ser comercializados como productos de sal y dulce, respectivamente. A esto, el 93% de todos los encuestados están dispuestos a consumir pan con aceites esenciales como sustitutos a los conservantes químicos como muestra la Figura 16.

### 4.3 Costo - Beneficio

Tabla 12.

*Precio ingredientes y conservantes*

<b>COSTOS</b>				
<b>DIRECTOS</b>				
<b>Ingredientes</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad Requerida (g)</b>	<b>Valor Requerido</b>
<b>Harina de trigo</b>	\$ 0,95	kg	700	\$ 0,67
<b>Harina Integral de trigo</b>	\$ 1,10	kg	300	\$ 0,33
<b>Salvado de trigo</b>	\$ 6,25	kg	90	\$ 0,56
<b>Azúcar</b>	\$ 1,00	kg	87	\$ 0,09
<b>Sal</b>	\$ 0,42	kg	21	\$ 0,01
<b>Manteca</b>	\$ 1,79	kg	109	\$ 0,20
<b>Margarina sin sal</b>	\$ 3,31	kg	109	\$ 0,36
<b>Levadura</b>	\$ 4,82	kg	60	\$ 0,29
<b>Aceite Esencial de Orégano</b>	\$ 1,64	g	1,94	\$ 3,18
<b>Aceite Esencial de Canela</b>	\$ 3,54	g	1,94	\$ 6,87

<b>Sorbato de Potasio</b>	\$ 20,00	kg	1,94	\$ 0,04
<b>Benzoato de Sodio</b>	\$ 12,00	kg	1,94	\$ 0,02

Tabla 13.

*Costo total de elaboración y tiempo de vida útil al emplear cada conservante.*

<b>Conservante</b>	<b>Costo</b>	<b>Tiempo Vida Útil (días)</b>
<b>Sorbato de Potasio y Benzoato de Sodio</b>	\$ 2,56	21
<b>Aceite Esencial de Orégano</b>	\$ 5,68	Mayor a 21 días
<b>Aceite Esencial de Canela</b>	\$ 9,37	Mayor a 21 días

La Tabla 12 muestra todos los ingredientes a emplear en la elaboración del pan integral para este experimento, juntamente con el precio al por mayor, las cantidades requeridas para la receta y el precio ajustado a dichas cantidades.

Económicamente, el empleo de los conservantes naturales implica un aumento en el precio de venta a los consumidores, ya que como muestra la Tabla 13, el costo total de elaborar un lote de pan utilizando aceite de orégano equivale al doble comparado con el uso de los conservantes químicos. Y, al emplear el aceite de canela, el costo de elaboración se triplica. Por lo que convendría el uso de los aceites esenciales en pan para ser vendidos como productos gourmet a un precio mayor.

## **5. Conclusiones y Recomendaciones**

### **5.1 Conclusiones**

El aceite esencial de orégano y canela aplicado en concentración de 1% y 0,5% de la masa total, respectivamente inhiben el crecimiento de hongos y levaduras durante más tiempo que el conservante químico.

La incorporación de los aceites esenciales que ofrece mejor resultado en la inhibición de crecimiento fúngico es en la masa.

El aceite esencial de canela en concentración de 0,2% es el que otorga mejor sabor al pan.

La sustitución de los conservantes químicos por los aceites esenciales de orégano y canela deriva en un costo mayor, aumentando al doble y al triple respectivamente, el precio del producto final al consumidor.

### **5.2 Recomendaciones**

Se recomienda realizar el estudio con concentraciones menores de cada aceite esencial para evitar el fuerte sabor de regusto.

Es importante mantener condiciones inocuas para la realización de futuras investigaciones, por lo que se recomienda disponer de un área específica para el área de panadería.

Se puede realizar una modificación a las cantidades de la receta del pan para mejorar el sabor, como por ejemplo emplear nuevos insumos.



Se recomienda realizar la misma experimentación tomando en consideración un período más corto de tiempo entre controles para determinar el día exacto en donde se produce el crecimiento fúngico.

## Referencias Bibliográficas

- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). Recuperado el 07 de Mayo de 2016, de [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642013000400005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642013000400005&script=sci_arttext)
- Bernabé, C. J. (2009). Panorama Panadero. Recuperado el 31 de Agosto de 2016, de Influencia de los componentes de la harina en la panificación:  
[http://www.indespan.com/userfiles/file/ARTICULO%20MEJORANTE S.pdf](http://www.indespan.com/userfiles/file/ARTICULO%20MEJORANTE%20S.pdf)
- Carrillo Inungaray, M. L., & Reyes Munguía, A. (2013). Vida útil de los alimentos. Recuperado de Lifetime food: [www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/download/20/32](http://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/download/20/32)
- Castaño Sepúlveda, M. V. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de aceites esenciales de clavo y canela sobre la levadura en leche chocolatada. Recuperado el 14 de Abril de 2016, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9149/1/43013611.2012.pdf>
- Chavarrías, M. (2014). Antimicrobianos naturales para el pan de molde. Recuperado el 14 de Abril de 2016, de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Salgado-Nava-et-al-2012.pdf>
- Cordero Sánchez, C. d. (2009). Estudio de factibilidad para la instalación de una panificadora automatizada, en el Sector El Condado, de la ciudad de Quito. Recuperado el 14 de Abril de 2016, de <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/951/3/658X4570.pdf>

- EFSA Journal. (2014). Scientific opinion on the safety and efficacy of sorbic acid and potassium sorbate when used as technological additives for all animal species. *EFSA*, 1-18.
- European Food Information Council. (2014). El pan, alimento básico de nuestra dieta. Recuperado el 14 de Abril de 2016, de <http://www.eufic.org/article/es/rid/pan-alimento-basico-de-nuestra-dieta/>
- García Pérez, E., Castro Álvarez, F. F., Gutiérrez Uribe, J. A., & García Lara, S. (2012). Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 339-353.
- Gil Hernández, Á., & Serra Majem, L. (2010). Libro Blanco del Pan. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Haegens, N. (2010). *The microbiological shelf life of bread*. Recuperado de [http://www.classofoods.com/page3\\_5.html](http://www.classofoods.com/page3_5.html)
- Kordsardouei, H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2013). Application of Zataria multiflora Boiss and Cinnamon zeylanicum essential oils as two natural preservatives in cake. *Journal of Phytomedicine*, 239-247.
- INEN. (2006). Pan . Recuperado el 13 de Abril de 2016, de Terminología: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/93.pdf>
- INEN. (2013). Norma General del Códex para los aditivos alimentarios. Recuperado el 13 de Abril de 2016, de <http://www.normalizacion.gob.ec/wp->

content/uploads/downloads/2014/ACTUALIZACION/04112014/192-CODEX-UNIDO.pdf

Latorre López, D. C., & Yance Guevara, A. E. (2012). Plan de comercialización para la introducción del pan de molde para diabéticos y dieta al mercado de la ciudad de Guayaquil. Recuperado el 13 de Abril de 2016, de <http://repositorio.ulvr.edu.ec/bitstream/44000/371/1/T-ULVR-0358.pdf>

Llorach Asunción, R., Andrés Lacueva, C., Urpi Sarda, M., Tulipani, S., García, M., Vázquez, R., y otros. (2011). Evaluación del impacto de consumo de pan, tanto integral como blanco, en una población de edad avanzada con alto riesgo cardiovascular: una aproximación metabolómica. Recuperado el 13 de Abril de 2016, de <https://pancadadia.files.wordpress.com/2013/03/estudio-4-ok.pdf>

Manso, S., Nerín, C., & Gómez Lus, R. (2011). *Antifungal activity of the essential oil of cinnamon (Cinnamomun zeylanicum), oregano (Origanum vulgare) and lauramide argine ethyl ester (LAE) against the mold Aspergillus flavus CECT 2949*. Recuperado el 07 de Mayo de 2016, de <http://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=11201770&AN=87765927&h=Balfi3yHxHVhFO9tNA%2fua4RuXHaVZHdexsyn%2fpX6vgkMJANcgWEkXpERjqPacHDBQ%2bjDeMbPO0X%2bYqJPrSHK3Q%3d%3d&crl=f&resultNs=AdminWebAuth&resultLo>

Pongsavee, M. (2015). *Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes*. Recuperado el 15 de Abril de 2016, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25785261>

Portillo Ruiz, M. C., Sosa Sánchez, R. Á., Viramontes Ramos, S., Torres Muñoz, J. V., & Nevárez Moorillón, G. V. (2012). Antifungal Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandeieri* Schauer) Essential Oil on a Wheat Flour-Based Medium. *Journal of Food Science*, 441-445.

PROECUADOR. (2013). Alimentos frescos y procesados. Recuperado el 13 de Abril de 2016, de <http://www.proecuador.gob.ec/sector1-6/>

Rodríguez García, I., Silva Espinoza, B. A., Ortega Ramírez, L. A., Levya, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz Valenzuela, M. R., . . . Ayala Zavala, J. F. (2016). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Food Science and Nutrition*, 1717-1726.

Salgado Nava, A. A., & Jiménez Munguía, M. T. (2012). Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan. Recuperado de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Salgado-Nava-et-al-2012.pdf>

San Lucas Sánchez, C. H. (2012). Uso de la natamicina en pan de molde sin corteza para aumentar el tiempo de vida útil. Recuperado el 14 de Abril de 2016, de <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/90175/D-79572.pdf>

Sienkiewicz, M., Głowacka, A., Kowalczyk, E., Wiktorowska-Owczarek, A., Józwiak-Bębenista, M., & Łysakowska, M. (2014). *The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils*. Recuperado el 15 de Abril de 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25514231>

Silva, M. M., & Cebola Lidón, F. (2016). Food preservatives - An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 366-373.

- Soycan-Önenç , S., Koc, F., Coşkuntuna, L., Özdüven, M., & Gümüş, T. (2015). *The effect of oregano and cinnamon essential oils on fermentation quality and aerobic stability of field pea silages*. Recuperado el 15 de Abril de 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323518>
- Stashenko, E. E. (2009). Aceites Esenciales. Recuperado de <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.p>
- Trujillo Hernández, J. C. (2015). Evaluación de conservadores naturales en panes tipo muffins. Recuperado el 14 de Abril de 2016, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7771/63814%20TRUJILLO%20HERNANDEZ,%20JUAN%20CARLOS%20%20TESIS-%202.pdf?sequence=1>

## **Anexos**

**Anexo N° 1.** Equipo destilación al vapor con trampa Clevenger

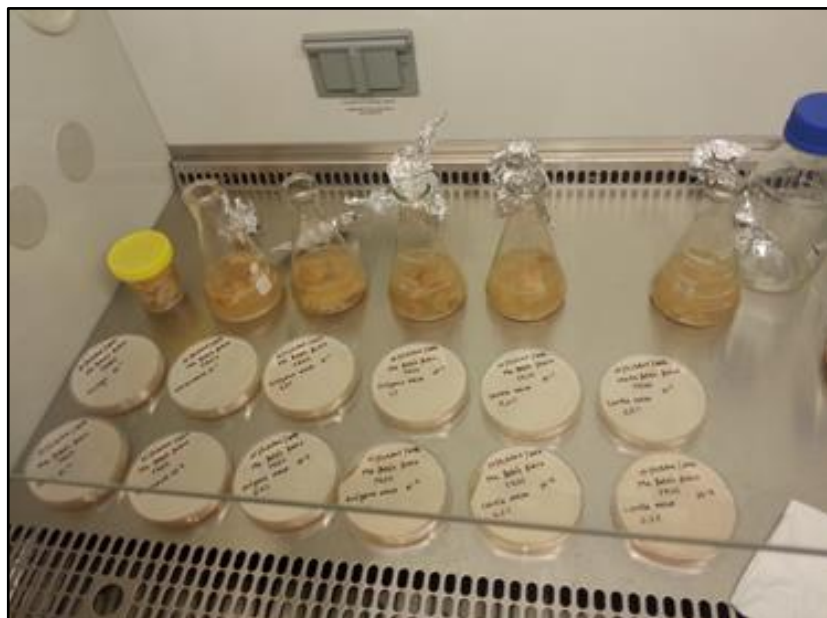


**Anexo N° 2.** Aceite esencial extraído

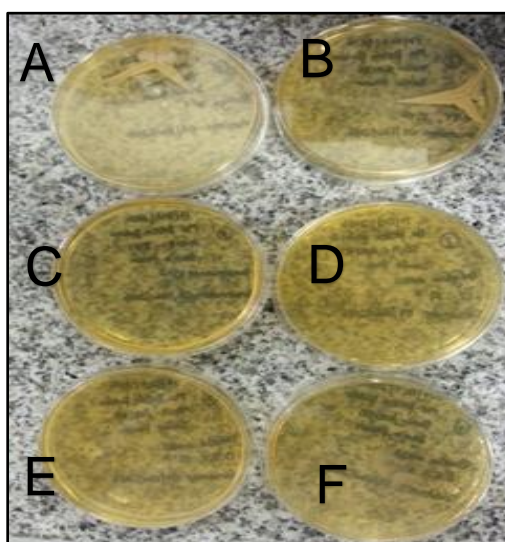




### Anexo N° 3. Siembra de muestras para análisis microbiológico



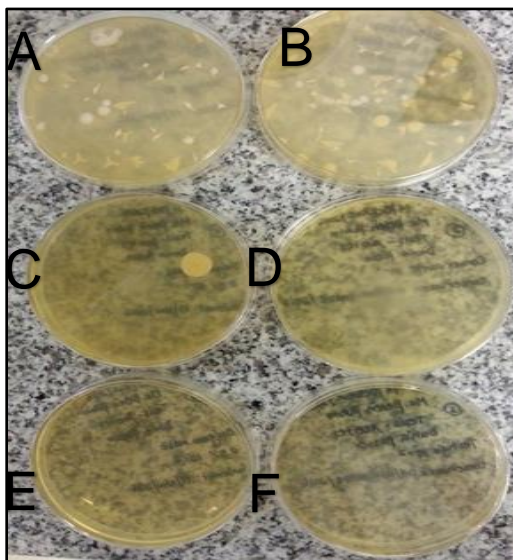
### Anexo N° 4. Siembra de muestras de aceite en masa a los 21 días del 14 de Octubre



Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

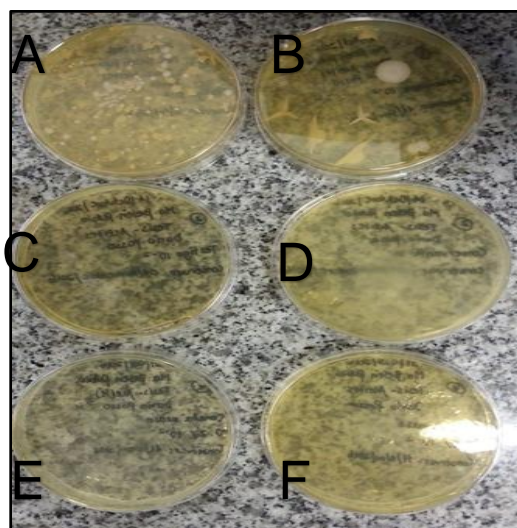
**Anexo N° 5.** Siembra de muestras de aceite en masa a los 21 días del 17 de octubre



Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

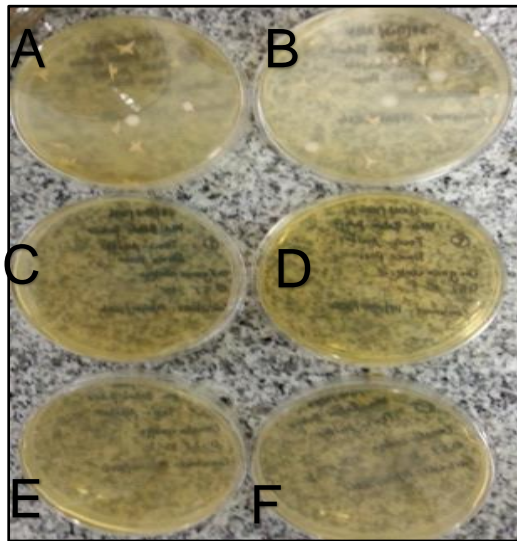
**Anexo N° 6.** Siembra de muestras de aceite en corteza a los 21 días del 24 de octubre



Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

**Anexo N° 7.** Siembra de muestras de aceite en corteza a los 21 días del 28 de octubre



Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

**Anexo N° 8.** Pan con aceites esenciales almacenado 6 días



Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

**Anexo N° 9.** Pan con aceites esenciales almacenado 10 días



Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%

(E) canela 0,2%

(F) canela 0,5%

**Anexo N° 10.** Pan con aceites esenciales almacenado 13 días



Nota:

(A) testigo

(B) conservante

(C) orégano 0,5%

(D) orégano 1%

(E) canela 0,2%

(F) canela 0,5%

**Anexo N° 11.** Pan con aceites esenciales almacenado 17 días



Nota:

(A) testigo

(B) conservante

- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

**Anexo N° 12.** Pan con aceites esenciales almacenado 21 días




Nota:

- (A) testigo
- (B) conservante
- (C) orégano 0,5%
- (D) orégano 1%
- (E) canela 0,2%
- (F) canela 0,5%

**Anexo N° 13.** Hoja de registro de contaminación de muestras

Registro Contaminación Muestras de Pan						
Día	Muestra	Cuadrante Contaminado				Porcentaje
		1	2	3	4	

## Anexo N° 14. Formato de Encuesta de Aceptabilidad

  
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS  
ENCUESTA PARA ACEPTABILIDAD DE PRODUCTO  
TESIS  
OV

Sección I: Información General

1. Indique su sexo  
Femenino  Masculino

2. Indique su rango de edad  
18 - 20 años  21 - 25 años  26 - 30 años   
31 - 40 años  41 años en adelante

3. ¿Consumes pan?  
Sí  No

4. ¿Qué tipo de pan consumes?  
Blanco  Integral

5. ¿Qué tipo de pan prefiere?  
Industrial  Artesanal

Sección II: Información de Producto

6. Según su opinión, el pan que degusta es:  
Blanco  Integral

7. ¿Percibe algún sabor en particular en el pan?  
Sí  ¿Cuál? \_\_\_\_\_ No

8. Según su criterio, el sabor del pan es:  
Bueno  Regular  Malo

9. Según su criterio, la textura del pan es:  
Buena  Regular  Mala

10. ¿Consumiría pan con aceites esenciales como sustitutos a los conservantes químicos?  
Sí  No

GRACIAS

