

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL

UNIDAD DE POSGRADO



**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO),
VITAMINA E (TOCOFEROLES) Y ACEITE ESENCIAL DE ROMERO
(*Rosmarines officianalis*) PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE
ALIMENTOS PROCESADOS CON ALTO CONTENIDO GRASO
(SALCHICHAS DE POLLO)**

TESIS

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN INGENIERÍA
INDUSTRIAL**

Presentado por:

Janeth Fabiola Proaño Bastidas

LIMA- PERÚ

2018

DEDICATORIA

**Dedico este trabajo de investigación a mis padres[†], a mi esposo Víctor,
a mis hijos Rafa y Belén compañeros de la vida, a mis hermanos
Marcelo, Mary, Grace, Darío, Yoli y a mis sobrinos.**

AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida y su amor incondicional

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la oportunidad de estudiar en sus instalaciones.

Al Doctor Juan Manuel Cevallos Ampuero por su ayuda en el desarrollo de este trabajo de investigación

A mi esposo Víctor por su apoyo siempre oportuno.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
1.1 Situación problemática	11
1.2 Formulación del problema	3
1.2.1 Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	4
1.3 Justificación de la investigación	4
1.4 Objetivos de la investigación	7
1.4.1 Objetivo general	7
1.4.2 Objetivos específicos	8
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	9
2.1 Marco filosófico de la investigación	9
2.2 Antecedentes de la investigación	13
2.3 Bases teóricas	19
2.3.1 Preservantes	19
2.3.2 Antioxidantes	21
2.3.3 Vitamina E	25
2.3.4 Vitamina C (Ácido L-ascórbico)	26
2.3.5 Aceites esenciales	31
2.3.5.1. Aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	32
2.3.6 Salchichas de pollo tipo Frankfurt	36
2.3.7 Deterioro de lípidos en salchichas de pollo tipo Frankfurt	39
2.3.8 Capacidad antioxidante de los preservantes naturales	40
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	41
3.1 Hipótesis y variables	41
3.1.1 Hipótesis general	41
3.1.2 Hipótesis específicas	41
3.2 Tipo y diseño de investigación	44
3.3 Unidad de análisis	45
3.4 Población de estudio	45
3.5 Técnica de recolección de datos	45
3.6 Análisis e interpretación de la información	45
3.7 Definición conceptual y operacionalidad de variables	47
3.7.1 Definición conceptual de variables	47
3.7.2 Operacionalidad de variables	48
3.7.3 Aceite esencial de romero	49
3.7.4 Salchichas de pollo	50
3.7.5 Análisis microbiológico	53
3.8 Análisis físico-químico	58
3.8.1 Potencial hidrógeno	58
3.8.2 Determinación de peróxidos	59
3.8.3 Acidez titulable	60

3.8.4 Efecto antioxidante	61
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1. Análisis microbiológicos	63
4.1.1 <i>S. aureus</i>	63
4.1.2 Aerobios mesófilos	74
4.1.3 <i>E. coli, salmonella</i>	81
4.1.4 Comprobación hipótesis 3.1.2.1.	82
4.2. Rancidez de la grasa en salchichas de pollo tipo Frankfurt	83
4.2.1 Peróxidos	83
4.2.2 Comprobación hipótesis 3.1.2.2.	87
4.3. Propiedades físicas	87
4.3.1 Potencial hidrógeno	87
4.3.1.1 Comprobación hipótesis 3.1.2.3	88
4.3.2 Acidez	89
4.3.2.1 Comprobación hipótesis 3.1.2.3	90
4.4. Efecto antioxidante	91
CONCLUSIONES	96
RECOMENDACIONES.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS.....	115
Anexo 1: Datos <i>S. aureus</i>	116
Anexo 2: Datos <i>aerobios mesófilos</i>	124
Anexo 3: Datos peróxidos	133
Anexo 4: Datos de pH	131
Anexo 5: Datos de acidez	142
Anexo 6: Comprobación de supuestos de ANOVA	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula de la vitamina E	25
Figura 2: Fórmula del ácido ascórbico	28
Figura 3: Reducción del ácido ascórbico.	29
Figura 4: Aceite esencial de romero (Rosmarinus officinalis).....	32
Figura 5: Salchichas de pollo tipo Frankfurt.....	36
Figura 6: Extracción de aceite esencial de romero por hidrodestilación	50
Figura 7: Diagrama de flujo para la elaboración de salchichas de pollo tipo Frankfurt	52
Figura 8: Elaboración de salchichas de pollo tipo Frankfurt.....	53
Figura 9: Cámara de Flujo Laminar Thermo Scientific 1300.....	54
Figura 10: Cajas petri para determinación de aerobios mesófilos	56
Figura 11: Cajas petri para evaluar E. coli	56
Figura 12: Cajas petri para determinar S. aureus	57
Figura 13: Cajas petri para determinar salmolella.....	58
Figura 14: Determinación de pH	59
Figura 15: Determinación de peróxidos. Método colorimétrico	60
Figura 16: Determinación de la acidez.....	61
Figura 17: Soluciones de HPPT.....	62
Figura 18: Espectrofotómetro para determinar absorbancia.....	62
Figura 19: Cambio de color, efecto antioxidante DPPH.....	62
Figura 20: Crecimiento de S. aureus desde el día 0 hasta el día 30.....	64
Figura 21: Curva de crecimiento de S. aureus.....	65
Figura 22: S. aureus día 30	66
Figura 23: Diferencias significativas de tukey para el día 30 S. aureus	67
Figura 24: Diagrama superficie de respuestas S. aureus vs AA y AER.....	70
Figura 25: Diagrama de superficie de respuesta S. aureus vs. AA y VE	71
Figura 26: Diagrama superficie de respuestas S. aureus vs. VE y AER.....	71
Figura 27: Combinación óptima de AA, VE y AER.....	72
Figura 28: Crecimiento de A. mesófilos durante 30 días	75
Figura 29: Aerobios mesófilos día 30.....	76
Figura 30: Crecimiento de A. mesófilos	76
Figura 31: Superficie de respuesta A. mesófilos vs. AA y VE	79
Figura 32: Superficie de respuesta A. mesófilos vs VE y AER	80
Figura 33: Formulación óptima	81
Figura 34: Peróxidos <i>día 30</i>	84
Figura 35: pH de los 14 tratamientos durante los 30 días de estudio	88
Figura 36: Acidez titulable.....	90
Figura 37: Efecto antioxidante tratamiento 12	92
Figura 38: Efecto antioxidante tratamiento 11	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Indicadores de la investigación	13
Tabla 2: Requisitos bromatológicos para salchichas escaldadas.	37
Tabla 3: Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos	38
Tabla 4: Diseño experimental	44
Tabla 5: Análisis de la información	46
Tabla 6: Formulaciones de soluciones preservantes naturales	49
Tabla 7: Formulación para salchichas de pollo	51
Tabla 8: Materiales y equipos de laboratorio para sembrar las muestras	55
Tabla 9: Promedio y desviación estándar para los días 10,15, 20, 25, 30 67	
Tabla 10: Resumen ANOVA para <i>S. aureus</i> para los 30 días de investigación	69
Tabla 11: Coeficiente modelo multivariante	69
Tabla 12: Formulación óptima para <i>S. aureus</i>	72
Tabla 13: Cuadro resumen de <i>A. mesófilos</i> para los 30 días de tratamientos	77
Tabla 14: Coeficientes modelo multivariado	78
Tabla 15: Formulación óptima <i>A. mesófilos</i>	80
Tabla 16: Resumen de ANOVA	85
Tabla 17: Peróxidos	85
Tabla 18: Efecto antioxidante tratamiento 12	91
Tabla 19: Efecto antioxidante tratamiento 11	93
Tabla 20: Efecto antioxidante tratamiento 13	94
Tabla 21: Datos de ufc de <i>S. aureus</i> por días	116
Tabla 22: Datos transformados con la raíz de $n+1$	117
Tabla 23: <i>S. aureus</i> Día 0	118
Tabla 24: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	118
Tabla 25: <i>S. aureus</i> día 5	119
Tabla 26: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	119
Tabla 27: <i>S. aureus</i> día 10	120
Tabla 28: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	120
Tabla 29: <i>S. aureus</i> día 15	120
Tabla 30: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	121
Tabla 31: <i>S. aureus</i> día 20	121
Tabla 32: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	121
Tabla 33: <i>S. aureus</i> día 25	122
Tabla 34: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	122
Tabla 35: <i>S. aureus</i> día 30	123
Tabla 36: Ponderación tratamientos <i>S. aureus</i>	123
Tabla 37: Coeficientes modelo multivariante <i>S. aureus</i>	124
Tabla 38: Análisis de varianza de <i>S. Aureus</i>	124
Tabla 39: Datos <i>A. mesófilos</i> tomados en el laboratorio	124
Tabla 40: Datos transformados con la raíz de $n+1$	126

Tabla 41: Tukey día 0	127
Tabla 42: ANOVA día 5	128
Tabla 43: Tukey día 10	128
Tabla 44: ANOVA día 10	128
Tabla 45: Tukey día 10	129
Tabla 46: ANOVA día 15	129
Tabla 47: Tukey día 15	129
Tabla 48: ANOVA día 20	130
Tabla 49: Tukey día 20	130
Tabla 50: ANOVA día 25	131
Tabla 51: Tukey día 25	131
Tabla 52: ANOVA día 30	131
Tabla 53: Tukey día 30	132
Tabla 54: Datos para realizar el método de superficie de respuesta	132
Tabla 55: Coeficientes de regresión A. mesófilos	133
Tabla 56: ANOVA A. mesófilos	133
Tabla 57: Datos peróxidos	133
Tabla 58: ANOVA con tukey peróxidos.....	136
Tabla 59: Datos potencial hidrógeno	141
Tabla 60: Datos de acidez	142
Tabla 61: Prueba de normalidad de los datos de S. aureus	144
Tabla 62: Prueba de normalidad de los datos de A. mesófilos	146
Tabla 63: Prueba de varianzas iguales S. aureus.....	148
Tabla 64: Varianzas iguales A. mesófilos	149
Tabla 65: Varianzas iguales peróxidos	150

RESUMEN

En la presente investigación se prepararon 14 soluciones de antioxidantes y antimicrobianos naturales a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero (*Rosmaninus officinalis*), en distintas concentraciones. El tratamiento 1 no tuvo ningún preservante, ni químico ni natural; en el tratamiento 2 se usó BHT, que es un preservante químico; desde el tratamiento 3 hasta el 14 se realizaron soluciones de diferentes concentraciones con las tres sustancias.

Se prepararon salchichas de pollo tipo Frankfurt a las que se les aplicó las soluciones antioxidantes previamente elaboradas, se las almacenó durante 30 días en refrigeración a 4 grados centígrados.

El efecto antimicrobiano de los diferentes tratamientos se determinó en agares específicos para cada tipo de microorganismo *E. coli*, *S. aureus*, *salmonella sp* y aerobios mesófilos; se tomaron los datos de unidades formadoras de colonias en el día 0 y cada 5 días hasta el día 30. También se tomaron datos de peróxidos, acidez y pH.

Estas soluciones inhibieron por completo a las bacterias de *E. coli* y *salmonella*, para *S. aureus* y *aerobios mesófilos* la cantidad de unidades formadoras que se registraron fueron inferiores a las cantidades establecidas por la norma INEN 1388 2010 del Ecuador.

Los tratamientos aplicados previnieron la formación de peróxidos en las salchichas de pollo tipo Frankfurt, al igual que mantuvieron el pH en límites permitidos y la acidez permaneció estable.

Se puede concluir que las formulaciones con preservantes naturales pueden sustituir a los preservantes químicos y mantener la vida útil de las salchichas por 30 días, desde el punto de vista microbiológico.

SUMMARY

In the present investigation, 14 solutions of natural antioxidants and antimicrobials were prepared based on vitamin C, vitamin E and rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*), in different concentrations. Treatment 1 did not have any chemical or natural preservative, while in treatment 2 BHT was used which is a chemical preservative. From treatment 3 to 14 solutions were made with the three substances.

Frankfurt-type chicken sausages were prepared to which the previously elaborated antioxidant solutions were applied, they were stored for 30 days in refrigeration at 4 degrees centigrade.

The antimicrobial effect of the different treatments was determined in specific agars for each type of microorganism *E. coli*, *S. aureus*, *salmonella sp* and Mesophilic aerobics. The data of colony forming units were taken on day 0 and every 5 days until 30 days. Data on peroxides, acidity and pH were also gathered.

These solutions completely inhibited *E. coli and salmonella batteries*, in *S. aureus*, and *Mesophilic aerobics* the number of forming units registered were lower than those given by the INEN 1388 2010 norm of Ecuador.

The applied treatments prevented the formation of peroxides in the Frankfurt-type chicken sausages, as well as maintaining the pH in allowed limits and the acidity remained stable.

It can be concluded that the formulations with natural preservatives can replace the chemical preservatives and maintain the useful life of the sausages for 30 days from the microbiological point of view.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

Los preservantes son adicionados a los alimentos en forma intencional, para controlar el deterioro de los mismos. Los alimentos procesados cuando envejecen se deterioran, se oxidan y tienden a desarrollar microorganismos patógenos en determinadas condiciones ambientales, que pueden ser inhibidos por antioxidantes naturales o sintéticos. En la actualidad, se utilizan antioxidantes sintéticos por ser de fácil adquisición y de bajo costo; sin embargo, la adición de antioxidantes sintéticos ha comenzado a ser restringido debido a su toxicidad y a los riesgos que implican en la salud (Buxiang y Fukuhara 1997).

Además de la proliferación de microorganismos que se producen por el deterioro de los alimentos procesados es necesario tomar en cuenta que en los alimentos con alto contenido de grasa se produce la peroxidación de lípidos, que constituye uno de los más importantes cambios en el deterioro de

los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y transporte, y tiene su origen en la acción de radicales libres (Halliwell y Chirico, 1993; Zambiasi, 1999).

En la oxidación de las grasas presentes en alimentos conservados, se forman radicales libres que, una vez ingeridos, pueden tener consecuencias tóxicas importantes en los procesos biológicos humanos.

La industria alimenticia busca métodos de conservación de alimentos, que eviten la generación de microorganismos y controlen el deterioro de grasas. En la actualidad se utilizan muchos preservantes sintéticos, pero la utilización de estos como benzoatos, nitritos y nitratos, entre otros, que han sido ampliamente usados en la industria alimentaria, se ve cuestionada cada vez más, debido a los posibles efectos adversos para la salud; como consecuencia de su uso se pueden presentar intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas (Álvarez-Parrilla, 2005).

En la actualidad, en la mayoría de procesamientos de alimentos se utilizan conservantes de origen químico; sin embargo, existen sustancias de origen natural provenientes de plantas que se pueden utilizar como antioxidantes de alimentos. Se estima que alrededor del 10% de las 500 000 especies de plantas que existen en el mundo se las usa como antioxidantes y antimicrobianos en los alimentos.

Esto implica la necesidad de desarrollar preservantes naturales, a partir del ácido ascórbico, tocoferoles y aceites esenciales, para controlar el crecimiento de microorganismos, mantener sus propiedades físico-químicas y alargar la vida útil de los mismos (Shahidi y Wanasundara 1992).

En esta investigación se consideró la vitamina C por ser un compuesto natural antioxidante; su función es eliminar los radicales libres y disminuir en las células el estrés oxidativo (Temple 2000).

Se ha probado en alimentos procesados que el ácido L-ascórbico actúa como preservante alimentario; sin embargo, en alimentos ricos en grasa es necesario utilizar sus derivados como son sus sales y sus ésteres, o a su vez combinarlo con tocoferoles o aceites esenciales (Kähkönen 1999).

La combinación de ácido ascórbico y el aceite esencial de romero mostró la mayor protección contra el deterioro de lípidos y la oxidación de la mioglobina, evitando la pérdida del color en productos cárnicos (Sánchez-Moreno, 2001).

En el desarrollo de esta tesis se buscaron alternativas para la producción de antioxidantes naturales a partir de ácido L-ascórbico, tocoferoles y aceite esencial de romero, que inhiban el crecimiento microbiano, alarguen la vida útil de los alimentos y que cumplan con lo establecido en el Codex Alimentarius.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

La aplicación de formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero en las salchichas de pollo ¿incrementa la vida útil de las mismas?

1.2.2. Problemas específicos

- 1.2.2.1. Las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero ¿inhiben el crecimiento de microorganismos en salchichas de pollo?
- 1.2.2.2. Las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero ¿controlan la rancidez de lípidos, en las salchichas de pollo?
- 1.2.2.3. Las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero ¿controlan los cambios en el pH, en las salchichas de pollo?
- 1.2.2.4. Las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero ¿controlan los cambios en la acidez, en las salchichas de pollo?
- 1.2.2.5. El porcentaje del efecto antioxidante de las formulaciones a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero ¿inciden sobre el deterioro de las salchichas de pollo?

1.3. Justificación de la investigación

La ingeniería de alimentos, haciendo uso de los recursos tecnológicos actuales, ha desarrollado todo tipo de productos procesados que llegan a la mesa del consumidor con mucha facilidad y a bajo costo; esto facilita la vida de las personas que los consumen; sin embargo, es necesario tomar en cuenta que estos alimentos no siempre cumplen con las normas establecidas por el Codex Alimentarius ni con lo establecido por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) o con la OMS

(Organización Mundial de la Salud) ni garantizan una buena salud de las personas.

Considerando que el tipo de alimentación está relacionado directamente con la salud del ser humano, se hace necesario seleccionar alimentos de calidad, seguros y naturales, que formen parte de una dieta balanceada y saludable. En estos alimentos es necesario adicionar conservantes alimentarios que pueden ser de origen natural o químico, para alargar la vida útil de los alimentos y detener los cambios en sus propiedades organolépticas, debido a que los alimentos tanto naturales como procesados se pueden deteriorar por el ataque de microorganismos como bacterias y hongos, antes de llegar al consumidor, lo que representa grandes pérdidas económicas (Matamoros, 1998). En el mundo se pierde el 20% de todos los alimentos por ataque de los microorganismos; estos alimentos alterados, además, pueden resultar muy perjudiciales para la salud.

El uso de conservantes en los alimentos ayuda a preservarlos, a pesar de que no matan a los microorganismos, pero ayudan a evitar su proliferación deteniendo el deterioro alimenticio. Su uso está reglamentado estrictamente en todos los países del mundo, debido a las consecuencias que pueden ocasionar a la salud. (Alvarez-Parrilla, 2005). Algunos estudios realizados en las últimas décadas nos indican que el consumo en forma prolongada y en altas dosis de antioxidantes sintéticos están asociados con problemas cancerígenos y mutagénicos en animales de experimentación; sin embargo, en la actualidad, dada la efectividad, el bajo costo y la controversia de la evidencia del riesgo en humanos, los antioxidantes sintéticos siguen siendo empleados por sobre los antioxidantes naturales (Christen, Gaziano y Hennekens 2000).

La sociedad y grupos de consumo parecen tener una tendencia hacia la disminución de la inclusión de aditivos sintéticos en los alimentos (Burt, 2004). El reto es obtener productos más duraderos, pero sin sacrificar sus características nutricionales y organolépticas iniciales (Del Valle, 2003).

Buscar alternativas de conservación naturales que tengan propiedades antimicrobianas similares a las que producen los conservantes químicos (Álvarez-Parrilla, 2005).

Es por esta razón que en esta investigación se propone obtener una formulación óptima de un preservante natural a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero, que pueda sustituir a los preservantes químicos, sin alterar las propiedades físico-químicas y organolépticas de los alimentos y, a su vez, controle la proliferación de microorganismos alargando la vida útil de los alimentos. Se propone en esta investigación realizar formulaciones de diferentes concentraciones con estos tres reactivos, para obtener una formulación óptima que permita controlar la proliferación de microorganismos como *aerobios mesófilos*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *salmonella* en salchichas de pollo tipo Frankfurt. De igual manera, que controle la rancidez oxidativa del alimento, las propiedades físico-químicas y tenga el mejor poder antioxidante.

Se han escogido estas tres sustancias debido a que cada una de ellos tiene un efecto específico en determinados microorganismos y en las propiedades físico-químicas de los alimentos.

El uso de algunas plantas también pueden sustituir a preservantes químicos; a estas plantas se las conoce como hierbas GRAS (Generally recognized as safe) (Food and Drug Administration FDA, 2014). Su uso es más seguro y pueden extender la vida útil de los alimentos porque muchas de ellas contienen principios activos antioxidantes y antimicrobianos.

Estas hierbas GRAS han generado gran interés mundial y se han desarrollado métodos más naturales para preservar los alimentos; esto cumple con las

expectativas del consumidor que prefiere alimentos con preservantes naturales (Cardona y Mejía, 2009).

El romero es considerado como hierba GRAS; ha sido utilizado en la alimentación como antioxidante desde muchos años atrás y es la única hierba que en Estados Unidos es reconocida como antioxidante de alimentos (Moreira, Ponce, Del Valle y Roura, 2005).

La actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante del romero ha permitido ser utilizado como conservante alimentario (Oluwatuyi, Kaatza y Gibbons, 2004; Sánchez-Escalante, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003).

De igual manera, la vitamina E ha sido considerada como antioxidante en productos alimenticios con alto contenido en grasa, desde hace más de 50 años (Aoyama, 1986).

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Comprobar el efecto antioxidante de las formulaciones de la vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) aplicadas en las salchichas de pollo, para alargar su vida útil.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1.4.2.1. Determinar si las soluciones antioxidantes en base a vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) inhiben el crecimiento de microorganismos en las salchichas de pollo.
- 1.4.2.2. Determinar si las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero controlan la rancidez de lípidos, en las salchichas de pollo.
- 1.4.2.3. Determinar si las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero controlan los cambios en el pH, en las salchichas de pollo.
- 1.4.2.4. Determinar si las formulaciones antioxidantes a base de vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero controlan los cambios en la acidez, en las salchichas de pollo.
- 1.4.2.5. Determinar el porcentaje del efecto antioxidante de las formulaciones de vitamina C (*ácido ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Marco filosófico de la investigación

La metodología de la investigación del presente documento está basada en el positivismo que afirma que el único camino para llegar a producir conocimiento es a través del método científico.

El positivismo apoya al enunciado que todas las actividades filosóficas y científicas deben efectuarse únicamente en el marco del análisis de los hechos reales verificados por la experiencia. Por lo tanto, la lógica aristotélica ha sido reemplazada por la nueva lógica experimental e inductiva (Moulines, 1979).

En este contexto, la lógica experimental e inductiva permite un acceso a la verdad, parte de los hechos particulares, para llegar a la generalización de un modo continuo y progresivo, de esta manera se puede crear principios más generales (Stewart, A. 2012).

En esto se basa la determinación de la vida útil de un alimento, donde se analizan los hechos particulares de envejecimiento y cambio de las características organolépticas; pero que no solo se basa en las observaciones sino en principios generales microbiológicos que no son observables a simple vista.

Para ello es necesario considerar que hay que comenzar el estudio por las cosas más simples y más evidentes, cambios físicos en la textura de los alimentos, basados en la intuición y el entendimiento. Dividir cada una de las dificultades que se examinarán en cuantas partes fuere posible y en cuantas requiera su mejor solución; es decir, descomponer en cada una de las propiedades físico-químicas como son: pH, acidez y deterioro de la grasa del alimento. Esto permitirá realizar un análisis de los pensamientos más simples y fáciles de conocer hasta los más complejos, en este caso la vida útil de un alimento (Descartes, 2004).

Esta investigación se basará en la propuesta de Kant, debido a que el tiempo de vida útil de un alimento está basada en la experimentación al comprobar las leyes que permiten confirmar con certeza que un alimento todavía es apto para el consumo humano; sin embargo, hay características que nos permiten empíricamente aceptar o desechar un alimento sin haber realizado las pruebas experimentales, como son: los cambios en la textura, el color y el olor, confirmando el enunciado de Kant que dice que no todo comienza con la experimentación, sino que puede derivarse del pensamiento empírico y de nuestra propia facultad de conocer (Kant, 1881).

Bernad (siglo XX) sostiene que la observación es la constatación pura y simple de los fenómenos naturales tal como se presenta a los sentidos, mientras que la experimentación es la constatación de los fenómenos creados por el experimentador. Esto se aplica perfectamente a esta investigación, puesto que primero se observan los alimentos, se determinan las características físicas y organolépticas usando los sentidos, para proceder a la experimentación donde se constatan los fenómenos creados por el investigador, como es la medición de los microorganismos que han proliferado en un alimento, la cantidad de peróxidos y las propiedades físico-químicas. Por lo tanto, en el razonamiento experimental se trata de partir de una observación para llegar a una

experimentación, de manera que la observación y la experiencia constituyan los dos extremos del razonamiento experimental (Bernad & Bert, 1878).

La medición de los microorganismos en los alimentos es un indicador de la calidad del alimento y de la vida útil del mismo. Este concepto tiene su origen en el siglo XVII, donde los filósofos como Aristóteles, Teofrasto y Plinio explicaron que estos microorganismos no siempre procedían de la misma especie y se creía que eran espontáneos.

Pasteur usó el método científico para desacreditar la generación espontánea de microorganismos; usó la técnica del cultivo en caldo nutritivo y con ayuda del microscopio se pudo identificar el tipo de microorganismos. También demostró que todo proceso de fermentación se debe a la acción de organismos vivos. Además, se investigó sobre la pasteurización como un medio de evitar la proliferación de microorganismos en los alimentos.

En una segunda instancia, esta investigación se basará en el pragmatismo que afirma que solo es verdadero aquello que funciona. Es decir, que si aplicamos las técnicas adecuadas de microbiología para la determinación de vida útil de un alimento, esto será verdadero si es útil para determinar si un alimento puede o no ser ingerido por un ser humano.

Willian James (1842–1910) afirma que lo verdadero es aquello que tiene utilidad pragmática; las ideas se tornan verdaderas en la medida en que nos ayudan a establecer relaciones satisfactorias con otros sectores de nuestra experiencia. El método pragmático trata de interpretar trazando sus respectivas consecuencias prácticas. Para James, el pragmatismo es un método, en sí mismo no enseña nada en particular, sino que es un modo de enfrentarse al mundo.

Con relación a estos principios dados por los representantes del pragmatismo, se puede afirmar que esta investigación busca la verdad a través de la utilidad para el ser humano con los resultados esperados. Se experimentará para determinar la cantidad de microorganismos que han proliferado en las salchichas de pollo después de ser aplicadas los preservantes naturales (vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero); esto dará como resultado que se pueda determinar si el ser humano puede o no comer estos alimentos y que estos le sirvan para una alimentación sana, libre de enfermedades.

En una tercera instancia, esta investigación aplicará la teoría de Karl Popper, quien hace un cambio significativo en la filosofía. En su obra la lógica de la investigación científica dice: “La teoría que se desarrollará en las páginas siguientes se opone directamente a todo intento de operar con las ideas de la lógica inductiva. Podría describirse como la teoría del método deductivo para poner a prueba las teorías, o como punto de vista de que una hipótesis solo puede probarse o comprobarse empíricamente, y solo después de que se ha presentado y sometido a la comprobación” (Popper, 1989).

En este contexto, la presente investigación se basa en los principios microbiológicos y en la determinación de microorganismos en los alimentos, que han sido tratados con antioxidantes naturales (ácido L-ascórbico, tocoferoles y aceite esencial de romero), en el principio de rancidez de la grasa contenida en los alimentos y el principio del poder antioxidante de las soluciones preservantes de alimentos.

El paso siguiente es relacionar estos conceptos con indicadores observables pertinentes a los elementos inobservables de las teorías mencionadas (Tabla 1).

Tabla 1. Indicadores de la investigación

INDICADO	INDICADOR
Microbiología de los alimentos	Unidades formadoras de colonias
Principio de rancidez de una grasa.	Miligramos de oxígeno por miligramo de alimento.
Propiedades físico-químicas de las salchichas de pollo (pH y acidez).	Medida del pH. Medida de la acidez.
Poder antioxidante de soluciones preservantes de alimentos.	Porcentaje antioxidante de las formulaciones antioxidantes.

Fuente: Elaboración propia

Por último, se leen las observaciones y los instrumentos de medición; en este caso, se leerán los medios de cultivos de microorganismos cuyas unidades son las unidades formadoras de colonias, el índice de rancidez de las salchichas de pollo y el porcentaje de oxidación en el espectrofotómetro.

Esta investigación ofrecerá al ser humano una nueva forma de alimentarse más natural, libre de agentes que contaminen su cuerpo y le produzcan enfermedades; alimentos que le permitan tener una mejor calidad de vida y más prolongada.

2.2 Antecedentes de la investigación

La capacidad de almacenar grandes cantidades de alimentos, evitando su deterioro microbiano, ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de la humanidad. Existen evidencias arqueológicas e históricas de la conservación de alimentos que se remonta de entre 15 000 a 10 000 años antes de Cristo. El primer uso de los métodos biológicos se remonta a 6 000-1 000 a.C., con la evidencia de la utilización de procesos de fermentación en la producción de cerveza, vino, vinagre, pan, queso, mantequilla y yogur (Soomro, Masud y Anwaar, 2002).

La causa del deterioro de los alimentos fue demostrada en 1864 por Louis Pasteur, quien manifestó que la presencia de microorganismos en los alimentos los altera y los contamina; además dio mucha importancia al proceso de conservación y almacenamiento de los alimentos mediante un calentamiento en condiciones específicas. En 1940, se logró un desarrollo importante en el almacenamiento y conservación de alimentos, cuando se viabilizó, comercial y tecnológicamente, el sistema de refrigeración. Paralelamente, se desarrollaban otros procedimientos tipo secado artificial, embalaje en condiciones de vacío, conservación por ionización, radiación y química (Soomro, Masud, y Anwaar, 2002).

El continuo desarrollo de los protocolos de preservación incluye una combinación de técnicas, donde se utilizan ácidos orgánicos para la conservación de productos alimenticios (Hsiao y Siebert, 1999; Nakai y Siebert, 2003). De manera similar, la utilización de ácidos débiles como antimicrobianos posee antecedentes históricos relevantes. El primer agente químico de conservación fue el sulfito, que se empleó durante siglos para la esterilización de los contenedores de vino, siendo hoy totalmente substituido por ácidos orgánicos débiles (Piper, 1999).

La gran significación, estructural y tecnológica, de los ácidos orgánicos como potenciales preservantes de alimentos se fundamenta en que estos, per se, son ingredientes alimentarios de amplia distribución en la naturaleza, producidos por microorganismos o constituyentes de plantas o tejidos animales. En este contexto, la inclusión de ácidos orgánicos como aditivos químicos para controlar el crecimiento y la contaminación microbiana en alimentos naturales y conservas, constituye una estrategia de amplia utilización. Un caso clásico es el vinagre (FAO/OMS, 1987; Tesfaye, 2002).

El ácido benzoico, sus sales y esteres o en combinación con otros agentes, como son los sorbatos, acetatos y lactatos son los preservantes más antiguos y más usados (Raso y Barbosa-Cánovas 2003).

Galarza (2001), en su investigación sobre los niveles de ácido benzoico en productos lácteos, demostró que este compuesto químico actúa como un agente conservante en los quesos.

El sorbato de potasio adicionado a productos cárnicos inhibe el crecimiento de microorganismos y alarga la vida útil de los mismos, siempre que se mantengan condiciones de pH, actividad de agua, cantidad de acidulantes y temperatura de almacenamiento controlados (Campos 1995).

El lactato de potasio y el diacetato sódico, añadidos a productos cárnicos como el jamón, dieron efectos bacteriostáticos, controlando la proliferación de microorganismos (Marcos 2007).

A escala mundial, aproximadamente el 40% de los alimentos cultivados para el consumo humano se pierde debido a las plagas y microorganismos (Universidad San Xavier, 2000). Actualmente, el proceso de conservación es uno de los temas claves orientados a la soberanía alimentaria, sustitución de importaciones y optimización de estrategias de incremento de vida útil nutricional (Sauceda 2011).

La preservación de los alimentos requiere el control del crecimiento de microorganismos y la adecuada supervisión para garantizar la seguridad y la estabilidad del producto durante su vida útil (Prange, 2005).

No obstante, existe una demanda creciente por alimentos sin aditivos químicos conservantes (Begin, Van Calsteren, 1999).

En este escenario, a escala mundial, la industria alimentaria y de conservas se enfrenta con muchos desafíos, como es el procesar alimentos con larga vida útil, pero mínimamente procesados y que no pierdan su valor nutritivo ni sus características organolépticas (Leguerinel y Mafart, 2001), (Valero y Giner, 2000).

Dada la adaptabilidad microbiana a los actuales métodos de control, se han intensificado las investigaciones para mantener la calidad de los alimentos e inhibir el crecimiento microbiano no deseado, incluyendo técnicas de descontaminación y ecología microbiana de los productos alimenticios (Samelis, Bedie, Sofos y Belk, 2002).

Los ácidos orgánicos débiles, productos típicos de metabolismo microbiano y ampliamente distribuidos en plantas y animales, se han utilizado históricamente como aditivos alimentarios y preservantes en la prevención del deterioro de alimentos y han demostrado ser efectivos bajo una amplia variedad de condiciones de procesamiento de alimentos. Varios de estos están aprobados en las regulaciones de la FDA para varios fines técnicos, además de la preservación y conservación de alimentos (Ricke, 2003).

Estos incluyen la aplicación de ácidos orgánicos como agentes acidulantes, antioxidantes, aromatizantes, agentes controladores de pH, e incluso nutrientes (Smulders y Greer, 1998).

Tradicionalmente, los ácidos orgánicos se han utilizado ampliamente en las industrias alimentaria y farmacéutica como conservantes, intermediarios de procesos y materias primas (Bailly, 2002).

Muchas investigaciones se han dedicado a la aplicación de los ácidos orgánicos como preservantes debido a su actividad bactericida, siendo “generalmente reconocidos como seguros”. Estos ácidos, debido a su reconocida acción antimicrobiana, se han empleado como conservantes químicos seguros de amplio espectro (Plumridge, 2004).

Se destaca que, además de constituir eficaces preservantes de alimentos por su efecto inhibitorio antimicrobiano, actúan como agentes acidulantes reductores del crecimiento bacteriano al disminuir el pH de los productos alimenticios (Dziezak, 1990; Hinton, Jr., 2006).

Entre los ácidos orgánicos más importantes como agentes preservantes de amplio espectro de acción, figura el ácido L-ascórbico y sus sales, que han constituido líderes moleculares antioxidantes usados en frutas, hortalizas, en zumos de frutas, etc. Este método de aplicación es eficaz en la prevención del pardeamiento y otras reacciones y procesos oxidativos. El ácido ascórbico también actúa como un eliminador de oxígeno mediante la eliminación oxígeno molecular en las reacciones del polifenol oxidasa. El ácido L-ascórbico y sus derivados, sales y ésteres, son conservantes comunes en la producción de alimentos en conserva (Pérez-Ruiz, Martínez-Lozano, y García, 2007).

El ácido ascórbico es un ácido orgánico muy utilizado en la preservación de alimentos, por su gran poder antimicrobiano y oxidante; esto fue comprobado

por Barreiro y Vera (2017) en su estudio sobre el uso del ácido ascórbico para controlar el pardeamiento enzimático de la pulpa de pitahaya, donde 1,2% de ácido ascórbico controló el pardeamiento de la fruta.

También se han utilizado por muchos años extractos o aceites esenciales de hierbas y plantas que contienen compuestos fenólicos contra la actividad microbiana en los alimentos (Nychas, 1995).

Según Astudillo (2014), en su estudio sobre el uso de aceites esenciales como preservante de salchichas de pollo, dice que es posible utilizar los aceites esenciales de romero, comino y canela como preservantes con la misma efectividad que los de origen químico.

Los aceites esenciales de clavo y canela fueron efectivos para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos en las jaleas y mermeladas y mantener su vida útil por mayor tiempo (Montagnani SA).

La función antioxidante de los polifenos del aceite esencial de jengibre aplicados a galletas en base de harina de trigo, controla el daño oxidativo, sin alterar la parte organoléptica (Platinetti, Porcal, y Sánchez 2016).

El aceite esencial de orégano se caracteriza por un alto contenido de fenoles como el carvacrol y el timol, que son los responsables del efecto antioxidante en alimentos (Torrenegra, 2014).

En las investigaciones de Laura Guerra, sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional, se concluyó que el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) inhibió cepas de

Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus resistente a oxacilina Streptococcus pyogenes, al igual que el aceite esencial de orégano (Origanum majorana).

El aceite esencial de romero proporciona un efecto antimicrobiano similar al buril-hidroxitolueno BHT, al ser aplicado a piensos para peces (Hernández, 2014).

El extracto de orégano tiene efecto conservante en hamburguesas refrigeradas. Este efecto se lo debe a sus principios activos timol y carvacrol y tuvo un efecto antimicrobiano disminuyendo la proliferación de coliformes, Aeróbicos mesófilos e inhibiendo por completo S. aureus, Salmonella y E. coli (Bonilla, 2012).

El extracto de tomillo, al ser usado como un agente antimicrobiano en carne de pollo molida contrarrestó la proliferación de C. jejuni, permitiendo extender su vida útil (Robles, 2010).

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Preservantes

Preservantes alimentarios son sustancias que se añaden a los alimentos en forma intencional para alargar la vida útil de los mismos, cuya función es inhibir, retardar e interrumpir alteraciones biológicas producidas por microorganismos en los alimentos (Gavilán, 2012).

La cantidad y el tipo de preservante que se va aplicar depende del alimento y está estrictamente regulado en todos los países del mundo, debido a que pueden producir daños a la salud de los consumidores (Masagati, 2013).

Los preservantes pueden ser químicos o naturales; dentro de los químicos se encuentran los orgánicos e inorgánicos que actúan en un amplio espectro de alimentos debido a su configuración molecular (Gavilán, 2012).

Entre los preservantes orgánicos se pueden citar a los boratos, sorbatos, benzoatos, p-hidrtoxi-benzoatos, entre otros. Los sulfatos, nitritos y nitrados, y propianatos son preservantes inorgánicos (Gavilán, 2012).

El nitrato (NO_3)⁻¹ ayuda a la preservación de productos cárnicos gracias a la reacción de reducción a nitrito (NO_2)⁻¹ que es catalizada por enzimas bacterianas, actúa en el proceso de curado, donde los nitritos reaccionan con la mioglobina para evitar la decoloración de la carne. Los nitritos inhiben la proliferación de microorganismos patógenos que se producen en los productos cárnicos, especialmente *Clostridium botulinum* (Masagati 2013).

La alta toxicidad de los nitritos y nitratos hace que se fije una cantidad máxima de su uso, que se encuentra entre 150 ppm hasta 300 ppm, debido a que si se sobrepasa estas dosis puede producir la muerte de los consumidores, debido a que los nitritos producen sustancias cancerígenas llamadas nitrosamidas o pueden actuar en la mioglobina causando daños en la sangre de los consumidores (Masagati 2013).

En general, en el uso de los preservantes químicos es necesario respetar los límites establecidos por la norma INEN, porque en estudios realizados por

Alvares-Parrilla (2006) se ha asociado el consumo de preservantes alimentarios con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades (Álvarez-Parrilla, 2006).

2.3.2 Antioxidantes

Se consideran antioxidantes a las sustancias que tienen la capacidad de detener los procesos oxidativos. Los alimentos pueden ser afectados por la presencia de oxígeno, desarrollando una rancidez por oxidación de las grasas insaturadas, decoloración de pigmentos, presencia de radicales libres y otros (Vieira, 2003).

La adición de antioxidantes a los alimentos ayuda a estabilizar sus componentes y minimizan los procesos oxidativos (Gavilán, 2012).

Los antioxidantes pueden ser naturales, sintéticos y misceláneos. Se consideran como antioxidantes naturales a los ascorbatos y tocoferoles. Entre los sintéticos están los galatos, el butil hidroxitolueno BHT, entre otros, y como misceláneos el butil hidroxil anisol, cloruro estanoso, 4-hexil resolsinol (Vieira, 2012). Además, se encuentran los bioantioxidantes, estos tienen la capacidad antioxidante debido a que en su estructura química se encuentran principios bioactivos (Gavilán, 2012).

Los principios bioactivos evitan la oxidación de carbohidratos, grasas y proteínas, impidiendo que en los alimentos se formen óxidos y peróxidos que ocasionen deterioro de las propiedades organolépticas de los alimentos y, por tanto, afecten a la salud de los consumidores (Cárdenas y Packer, 2005); los componentes bioactivos son carnosina, carnosol, carotenos, licopenos, fitoenos, fitofluenos, ubiquinona, entre otras.

Según la Norma general de aditivos alimentarios en su primera edición (NTE INEN-CODEX 192-2013), se debe utilizar como antioxidantes, benzoatos, Butil hidroxianisol (BHA), Butil hidroxitolueno (BHT) para productos cárnicos, aves de corral y caza picados, elaborados, desecados y sin tratamiento térmico, en piezas enteras o en cortes.

Los conservantes naturales como la sal y el azúcar que han sido utilizados desde la antigüedad como antimicrobianos, pueden causar efectos negativos sobre la salud de determinados colectivos de consumidores; por esta razón los investigadores buscan nuevas sustancias antioxidantes naturales que aseguren la calidad e inocuidad de un alimento, para garantizar la salud de los consumidores (Beuchat, 2001).

Tanto los consumidores como las industrias alimentarias cada vez están más interesados en productos con mayor seguridad en cuanto a su calidad e inocuidad. La tendencia está dirigida hacia el consumo de alimentos con preservantes naturales, procedentes de extractos de plantas o derivados naturales químicamente modificados. Estos preservantes naturales (antimicrobianos) ganan importancia debido a la aceptación que tienen por parte de los consumidores y además porque cumplen con los requisitos legales que impone el mercado (Rauha, 2000).

Un agente antimicrobiano es un compuesto químico, natural o sintético, que produce la muerte o inhibe el crecimiento de los microorganismos; su efecto puede ser: bacteriostático, bactericida y bacteriolítico. El primero se observa cuando se inhibe el crecimiento de bacterias, pero las células no mueren. Los agentes bactericidas producen la muerte celular pero no dan lugar a la lisis

celular. Los agentes bacteriolíticos provocan la muerte celular por lisis celular (Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T. & Baser, K. H. C., 2007).

Los agentes antimicrobianos pueden proceder de tres orígenes: animal, vegetal y microbiano. En el grupo procedente de los animales podemos citar las proteínas, enzimas, hidrolasas y proteasas (Davidson y Zivanovic, 2003).

Un segundo grupo está formado por plantas de las cuales se aprovecha las cortezas, los tallos, las hojas, las raíces y las flores para extraer aceites esenciales, compuestos fenólicos que son aprovechados como agentes antimicrobianos (Beuchat, 2001). En el tercer grupo se encuentran los que tienen su origen en microorganismos.

En relación con el segundo grupo, se sabe que los compuestos fenólicos poseen una actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, virus y protozoos (Branen, 1980; Ward y Ward, 1976). Los compuestos fenólicos ejercen su actividad antimicrobiana modificando el contenido lipídico de las membranas y provocando la salida de contenido celular.

Esta actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos (incluyendo los sintéticos) ha sido probada en especies como *Salmonella senftenberg*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi* (Kabara, 1991) y se ha visto que las bacterias Gram-positivas son más sensibles a estos compuestos. Parece que la actividad antimicrobiana depende tanto de la especie como del tipo y la concentración de los

compuestos fenólicos, que además de ser antimicrobiano ayudan en el control del crecimiento de bacterias patógenas, su posible combinación con otros antimicrobianos, la temperatura, los aditivos alimentarios y los componentes de estos (Raccach, 1984).

Los aceites esenciales, metabolitos secundarios que se pueden extraer de plantas, son conocidos también por su actividad antimicrobiana contra un amplio intervalo de bacterias y hongos (Ayala-Zavala, 2005). Generalmente, los aceites esenciales que poseen propiedades antibacterianas frente a los patógenos alimentarios contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos, siendo estos los responsables de dicha actividad (Cosentino, 1999; Dorman y Deans, 2000; Farag et al., 1989; Juliano et al., 2000; Lambert, 2001; Thoroski, 1989).

Existen evidencias de que los compuestos minoritarios presentes en los aceites esenciales desempeñan un papel muy importante en la actividad antibacteriana, que unidos a otros antimicrobianos pueden tener un efecto sinérgico (Burt, 2004).

Se ha considerado que las mezclas policomponentes de los aceites esenciales actúan sobre sistemas enzimáticos localizados en la membrana citoplasmática (Knobloch, 1989). Se han sugerido dos posibles mecanismos por los cuales los hidrocarburos cíclicos podrían actuar sobre estas enzimas; por una parte, se podrían acumular moléculas hidrocarbonadas lipofílicas en la bicapa lipídica distorsionando las interacciones lípido-proteína y, por otra parte, podría producirse la interacción directa de los compuestos lipofílicos con las partes hidrofóbicas de las proteínas (Juven, 1994 y Sikkema, 1995).

La actividad antimicrobiana de aceites y extractos vegetales ha constituido la base de muchas aplicaciones, tanto como agentes preservantes para la

conservación de los alimentos, como en productos farmacéuticos, en medicina alternativa y en terapias naturales (Cosentino, 1999).

2.3.3 Vitamina E

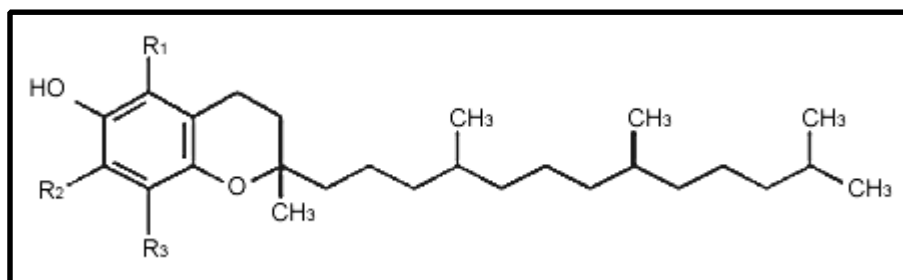


Figura 1: Fórmula de la vitamina E

Fuente: Villaverde Cecilia

La vitamina E está formada por dos grandes grupos de sustancias, los tocoferoles y los tocotrienoles; estos tienen estructuras similares, la única diferencia está en la cadena lateral que puede ser saturada e insaturada. Químicamente, la vitamina E tiene un anillo cromano con un grupo alcohol en posición seis. Figura 1 (Wang, Quinn 1999).

Los tocoferoles pueden ser alfa, beta o gama dependiendo de su posición en el anillo; los alfa tocoferoles son los componentes mayoritarios en la vitamina E, que se encuentra en los alimentos; la vitamina E sintética puede tener hasta ocho isómeros (Wang, Quinn 1999).

La vitamina E es considerada como un antioxidante en alimentos por el NTE INEN-CODEX 192-2003, por ser capaz de proteger a las membranas celulares y subcelulares de peroxidarse y de formar radicales con capacidad oxidativa. El alfa tocoferol actúa como un barredor de radicales libres, evitando la formación de estos, que son los responsables del daño celular (Sies 1995).

En estudios realizados por Schuler (1990) se comprobó el efecto antioxidante del tocoferol en salchichas de pollo crudas, que fueron protegidas del enranciamiento en un pH entre 4,5 a 5.

Los tocoferoles por sí solos no pueden alcanzar una actividad antioxidante suficiente para alargar la vida útil de un alimento; se hace necesario buscar un efecto sinergia con otros compuestos como los ácidos orgánicos o aminoácidos. Kavashima (1979) probó una mezcla de tocoferoles con gelatina que es rica en prolina, obteniendo buenos resultados, tanto en sistemas acuosos como en aceites y lípidos insaturados.

La acción sinergista de la vitamina E fue probada al unirse con sustancias como esteres metílicos de triptófano, lisina, glutamina, prolina y tirosina que fueron aplicadas a sebo y dieron excelentes resultados (Aoyama, 1987).

Al comparar el efecto del gama-tocoferol en concentración del 0,02% con los preservantes químicos BHA y BHT, este dio mejores resultados. Al igual que los tocoferoles, resultaron ser más eficaces que el TBHG y el galato de propilo (Aoyama, 1986).

2.3.4 Vitamina C (ácido L-ascórbico)

El ácido L-ascórbico, mejor conocido como Vitamina C, se encuentra en la mayoría de frutas, entre las que se pueden citar la acerola, grosella, fresa, guayaba, papaya y todos los cítricos. La ingesta recomendada para la vitamina C por parte de Food & Nutrition Board en el 2000 fue de 60 mg/día; sin embargo, en la actualidad se sugiere elevar esta dosis a 100 mg/día para evitar el envejecimiento celular y reducir el riesgo de enfermedades crónicas en personas no fumadores (Carr & Frei, 1999). El consumo de frutas aporta al

organismo con el 21% de vitamina C, mientras que si se consume de frutas y verduras el aporte llega hasta el 45% del total de vitamina C necesario diariamente.

Las funciones fisiológicas de la vitamina C en el organismo son: mantiene la integridad del tejido conjuntivo, previene la formación del escorbuto, cataliza reacciones de hidroxilación en la síntesis del colágeno, favorece la amidación de las hormonas peptídicas, regenera la vitamina E, participa en la oxidación de los ácidos grasos, sintetiza las catecolaminas y protege el estrés oxidativo (Gershoff, 1993, Halliwell, 1995).

Carr y Frei (1999) en sus estudios realizados concluyeron que cantidades adecuadas de vitamina C en el organismo disminuye el riesgo de padecer Alzheimer; se estudiaron a pacientes que lo padecían y se encontraron que los niveles de vitamina C en el plasma era muy bajo.

La ingesta adecuada de vitamina C también está relacionada con la capacidad de la memoria en los seres humanos (Perrig, 1997).

Uno de los antioxidantes naturales que tiene un efecto más eficaz y menos tóxico es la vitamina C, debido a que esta puede secuestrar radicales libres, actúa frente a radicales peróxidos, hidroxilo y oxígeno singulete (Halliwell & Chirico 1993).

La vitamina C (ácido ascórbico) químicamente es una cetolactona de seis carbonos, tiene una estructura química análoga a los carbohidratos, es

hidrosoluble, termolábil y sensible frente a la oxidación, a los álcalis e iones metálicos (Figura 2). La vitamina C es un micronutriente esencial necesario para el normal funcionamiento metabólico del cuerpo (Basabe, 2000). Participa en el metabolismo y síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas, ayuda a regular el almacenamiento y distribución del hierro en la sangre (Roseberg, 2004).

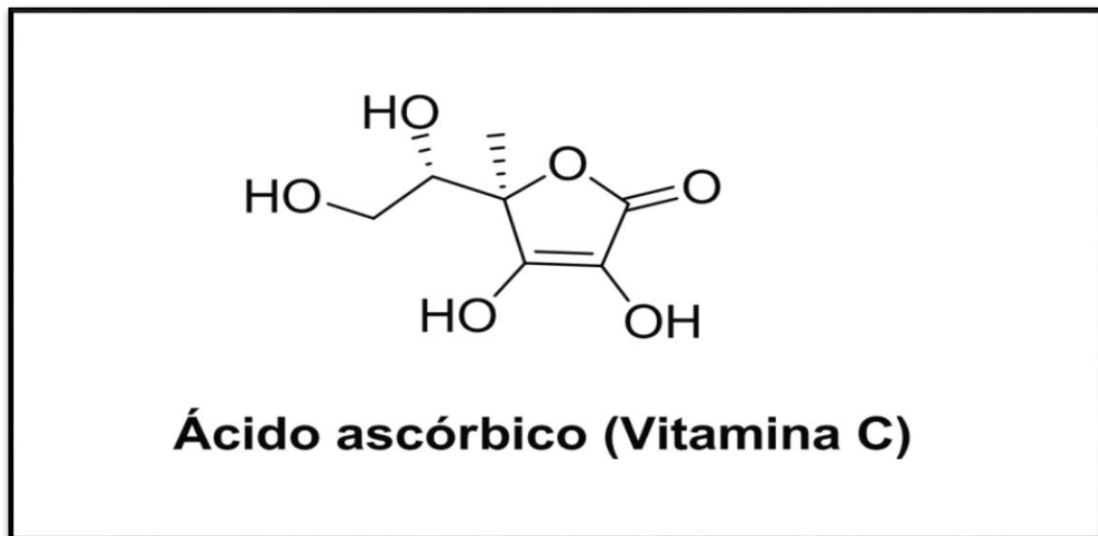


Figura 2: Fórmula del ácido ascórbico

Fuente: Antonio F. Muro, Revista DSaIud

El ácido L-ascórbico es una sustancia reductora muy potente, se transforma en dehidroascórbico por la pérdida de hidrógenos. Cuando el anillo lactónico del ácido dehidroascórbico se hidroliza para formar ácido dicetogulónico, la actividad vitamina se pierde (Figura 3).

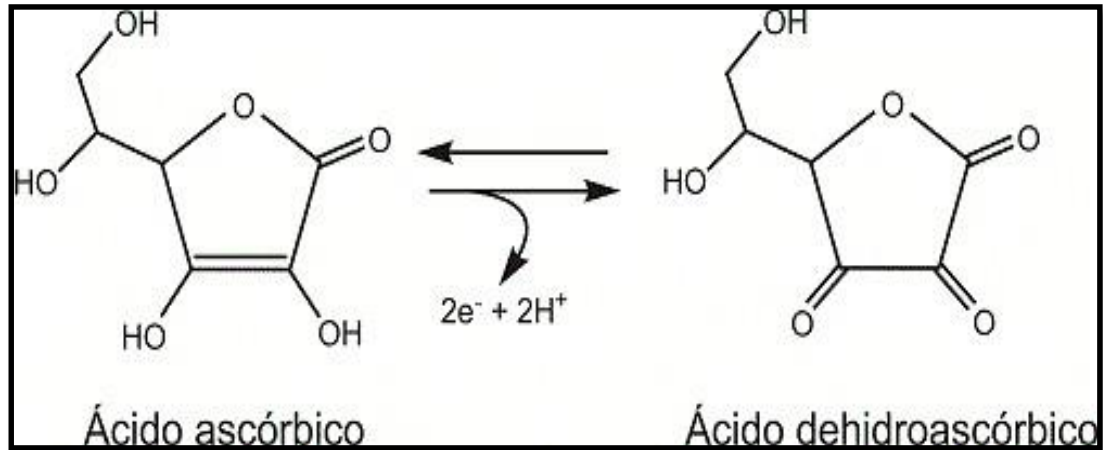


Figura 3: Reducción del ácido ascórbico

Fuente: Antonio F. Muro, Revista DSaIud

En la industria alimentaria, el ácido ascórbico ha sido utilizado por que tiene propiedades antioxidantes, ayuda extender las propiedades funcionales de las proteínas, puede mantener la consistencia de geles en emulsiones de alimentos (Nakai y Molder, 2000). Se la ha utilizado como una alternativa de conservación, evita el pardeamiento de los alimentos y reduce la carga microbiana (Shafiur, 2010).

El ácido ascórbico ha sido probado como antioxidante, en la conservación de zumos de fruta, bebidas refrescantes, productos cárnicos, productos de repostería, en bebidas fermentadas y vinos, porque evita procesos degenerativos provocados por el oxígeno, el cual deteriora el color del producto, ocasionando que el aspecto se vuelva desagradable a la vista. Su uso reduce el consumo de antioxidantes químicos como los sulfatos (Astiasarán, Laheras y Lariño, 2003).

En productos cárnicos se ha demostrado que el ácido ascórbico tiene una acción antibacteriana; la aplicación de este ácido reduce el pH de la emulsión cárnica, lo que provoca la reducción de la actividad microbiana y el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

Pseudomonas (Martínez, Molina y Boucort 1997) y bacterias aeróbicas como Campylobacter jejuni, (Xiong, Ho y Shahidi 2012), (Xiong, Ho y Shahidi 2012).

Se desnaturaliza aproximadamente a los 57 grados centígrados, es muy sensible al calor, resistente a la congelación y muy inestable en contacto con los metales como el aluminio. Por estas características hay que tomar en cuenta el momento de la aplicación en los productos alimenticios (Moret, 1997).

Además, es muy importante considerar la propiedad sinergista del ácido ascórbico, que hace que aumente su poder antioxidante al unirse con otras sustancias como los tocoferoles, la vitamina A o la vitamina E (Gutiérrez, 2000). Al mezclarse con los α -tocoferoles, se fortalece el poder antioxidante en los lípidos y proteínas de las membranas celulares, actuando como un co-antioxidante regenerando el α -tocoferol desde el radical α -tocoferoxil producido por la vía del secuestro de radicales solubles en lípidos, evitando daños oxidativos en los alimentos. La actividad sinergista del ácido ascórbico con el butil hidroxi tolueno (BHT) fue demostrado en los estudios de Campos, Ruiz y Díaz (2002).

Tanto la vitamina C como la vitamina E y la vitamina A han sido reconocidas como antioxidantes dietéticos por la US Food and Drug Administration (FDA), siendo precursores los β -caroteno, y el selenio, componente esencial de enzimas antioxidantes.

Entre los antioxidantes no enzimáticos se destacan el glutatión, el tocoferol y la vitamina E, siendo el ácido L-ascórbico (vitamina C) el más reconocido, presente fundamentalmente como ascorbato, una molécula hidrosoluble que elimina varias especies reactivas de oxígeno. Su efecto protector antioxidante se basa en dos mecanismos: reacciona con los radicales peróxidos que se

forman en el citoplasma antes de que puedan alcanzar la membrana, evitando de esta manera la peroxidación lipídica; y potencia la actividad antioxidante de la vitamina E, regenerando el α -tocoferol a partir del radical α -tocoferilo. El ascorbato oxidado en este proceso se regenera por reacción con glutación (GSH).

2.3.5 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son extractos líquidos aromáticos y volátiles, en temperaturas ambientales; tienen apariencia viscosa, su densidad es menor que el agua, provenientes de material vegetal (raíz, tallo, hojas, flores o frutos) y son los responsables del aroma característico de las plantas. Están formados por componentes alifáticos de bajo peso molecular, terpenos y fenil propanos (Martínez, 2003). Son liposolubles, solubles en alcoholes y poco solubles en agua (Gil y Sáenz, 2000). En su mayoría son extraídos por hidrodestilación, se utiliza el agua como solvente, el rendimiento de la esencia extraída generalmente está entre el 1% y el 3% del peso de la masa vegetal (Rodríguez, Arias, Vásquez, Ma Stashenko, 2012).

Los aceites esenciales son considerados metabolitos secundarios debido a sus propiedades antimicrobianas, antiparásitos, insecticida, antiviral, antifúngica y antioxidantes (Bruneton, 2001). También son efectivos contra mohos y levaduras (Méndez, 2011).

La industria alimentaria los utiliza como saborizantes, aromatizantes y como conservantes antimicrobianos naturales de los alimentos. Aceites esenciales de orégano, albahaca, romero y jengibre inhiben microorganismos en alimentos procesados (Cardoso y Sosa, 2012). Sin embargo, para su uso, es necesario considerar la concentración mínima no tóxica, el tipo de microorganismos que inhibe y el efecto antioxidante en los componentes del alimento (Hyldgaard, Mygind, Piotrowska, Foss & Meyer, 2015).

Los aceites esenciales más utilizados son el de orégano, por su alto contenido de carvacol y terpinenol, que regulan el pH; el aceite esencial de jengibre, por ser fungicida; y el aceite esencial de romero, por su contenido de carvacol (Plaus, Flores y Ataucusi, 2001).

2.3.5.1. Aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) pertenece a la familia *Labiatae*. Por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes se la considera como una planta aromática medicinal (Chan, Kong, Yee, Chua y Loo, 2012). Figura 4.



Figura 4: Aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*)

Fuente: <http://otramedicina.imujer.com>

El aceite esencial de romero es de color verdoso y posee un intenso sabor amargo; su densidad es menor que el agua y sus características dependen de la zona en la que es cultivado, pero en general está formado por borneol (18%), alcanfor (12%), cineol (32%), cafeno y limoneno (Romeu, Botta, Díaz, 2007).

El aceite esencial de romero es un compuesto hidrófobo, contiene ácidos fenólicos, triperpenos, diprperenos y taninos, que le confieren propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Entre los ácidos fenólicos tenemos el rosmarínico y el clorogénico. Triperpenos el ursólico, diterpenos el rosmadial y rosmanol. Polifenoles diterpenos el ácido carnósico y carnosol (Okamura, Haraguchi y Yagi, 1994).

Entre los flavonoides presentes en el aceite esencial de romero tenemos: epigenol, apigenina, genkwanina y luteolina (Okamura, Haraguchi, Hashimitok y Yagi, 1994), (Hernández, Ponce, Jaramillo y Guerrero, 2007).

El efecto preservante del aceite esencial de romero se debe a que puede producir radicales libres inactivos que secuestran a cualquier especie reactiva del oxígeno; este efecto se debe a los metabolitos secundarios del romero como son las quinonas (Basaga, Tekkaya y Acikel, 2005). También evitan la formación de radicales libres al actuar como agentes quelantes de iones metálicos (Daglia, 2012).

Los compuestos fenólicos del aceite esencial de romero, los ácidos carnosol y carnósico actúan sobre las emulsiones lipídicas como preservantes (Aroma, 1992), evitan la peroxidación de los lípidos de la membrana por que ejercen actividad quelante frente a radicales peroxilo (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000); en sistemas acuosos el que mayor efecto conservante presenta es el ácido rosmarínico (Hopia, Huang, Schuwarz, German y Frankel, 2006).

En estudios realizados por Armitage, Hettiarachch y Moonsor (2002) sobre el potencial conservante del aceite esencial de romero para sustituir a los nitritos y BHA en salami, se concluyó que el romero controló el *in vitro* la proliferación de *Clostridium perfringens*.

Las propiedades antioxidantes del aceite esencial de romero se le atribuyen al epigenol, que es un flavonoide que elimina los radicales libres e impide el desarrollo de procesos degenerativos en las células. Además, el carnosol y el ácido rosmarínico también son los responsables de la actividad antioxidante (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000). El efecto antioxidante del romero fue demostrado en filetes de carne (Djenane y otros, 2002).

Se aplicó el aceite esencial de romero en pastas cárnicas, al igual que el aceite esencial de orégano y sábila, siendo el romero el que dio mayor poder antioxidante (Hernández, Ponce, Jaramillo y Guerrero, 2007).

El aceite esencial de romero inhibió la oxidación lipídica al ser aplicado en salchichas Frankfurt, gracias a su efecto antioxidante (Estévez y Cava, 2005).

En los estudios realizados por Faixova y Faix (2008) de la actividad antimicrobiana del romero, se demostró que extractos alcohólicos de romero *in vitro* e *in situ* presentaron efectos antibacterianos frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella tiphynurium*.

La actividad antibacteriana se debe a que los compuestos fenólicos diterpenoides dañan la membrana celular, lo que provoca un escape de los componentes celulares y destruyen a los microorganismos (Del Campo, Amiot, y Nguyen, 2000; Cuvelier, Richard y Berset, 2002), (Oussalah, Caillet, Saucier y Lacroix, 2006).

Fue demostrado el efecto antibacteriano del aceite esencial de romero en un estudio en *in vitro* realizado por Moreira, Ponce, Del Valle y Roura (2005), donde se contrarrestaron bacterias Gram positivas y negativas. En 2013, en un estudio realizado por Shelef, Naglik y Bogen se verificó el efecto del aceite esencial de romero contra organismos como: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

La concentración inhibitoria mínima (MIC) del aceite esencial de romero se ha determinado en estudios realizados por Castaño, Ciro, Zapata y Jiménez (2010), donde se comprobó el MIC para el aceite esencial de romero extraído a partir de sus hojas es de 4096 ppm para *E. coli*, 1 024 ppm para *S. aureus*, 512 ppm *Salmonella*. Estos resultados se verifican con estudios realizados por Moreira, Ponce, Del Valle y Roura (2005).

Sebrabnek, Sewalt, Robbins y Houser (2005) verificaron la efectividad de un extracto de romero al ser aplicado en salchichas de cerdo precocidas, en concentraciones de 1 500 y 2 500 ppm, en salchichas de cerdo frescas y en refrigeración 500 a 3 000 ppm.

Otros estudios realizados por Karpinska-Tymoszczyk (2008) demostraron que la aplicación de romero molido en albóndigas de carne de pavo tuvo un efecto inhibitorio sobre bacterias *psicrotrofas*, *coliformes* y *Clostridium sp.*

Estudios realizados por Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales (2003) comprobaron que la combinación de ácido ascórbico y aceite esencial de romero mostraron protección contra la oxidación de la mioglobina y de lípidos.

El aceite esencial de romero, por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, es utilizado como un preservante natural, que puede sustituir a preservantes químicos como el BHT y BHA utilizados en cárnicos; sin embargo, al utilizar las MIC para cada tipo de microorganismo, se pueden alterar las propiedades organolépticas; es por esto que es necesario combinarlo con otros preservantes químicos como son el ácido ascórbico y los tocoferoles de la vitamina E.

2.3.6 Salchichas de pollo tipo Frankfurt

Se define como salchichas a emulsiones de carne, grasa, ingredientes no cárnicos y aditivos, que son sometidos a escaldado o ahumado según la norma INEN 1217:2006. El escaldado o precocción se realiza a 75° C, coagula la proteína y permite la conservación de la emulsión evitando el crecimiento de microorganismos (Bedolla et al., 2004). Figura 5.



Figura 5: Salchichas de pollo tipo Frankfurt

Fuente: Elaboración propia

Las salchichas escaldadas tipo Frankfurt deben cumplir con los siguientes requisitos según la norma INEN en cuanto a los requisitos bromatológicos. Tabla 2.

Tabla 2. Requisitos bromatológicos para salchichas escaldadas

Requisitos	Mínimo/100 g	Máximo/100 g
<i>Ph</i>	6	6,2
<i>Humedad</i>	-	65%
<i>Contenido energético</i>	240 Kcal	300 Kcal
<i>Grasa total</i>	20%	27%
<i>Grasa insaturada</i>	-	12%
<i>Grasa saturada</i>	-	10%
<i>Valor proteico</i>	12%	14%
<i>Hidratos de carbono</i>	0.4%	8.4%

Fuente: Norma NTE INEN 1338:96

El contenido proteico de las salchichas Frankfurt es menor que el de las carnes frescas, esto se debe a que la proteína utilizada es de menor calidad, como es el uso de colágeno, tejido conjuntivo, que no tienen todos los aminoácidos esenciales (Savic, 1985).

Las salchichas tipo Frankfurt contienen minerales en un 0,3% como zinc, fósforo, hierro. También pueden contener vitaminas del grupo B, las vitaminas liposolubles en mínima cantidad debido a que no son estables al proceso de cocción y pueden ser lixiviadas en la grasa del caldo (Savic, 1985).

Las salchichas Frankfurt contienen mayor cantidad de grasa insaturada que saturada, pero la grasa insaturada es la responsable de los procesos oxidativos de las salchichas, que hacen que estos productos sean de vida útil corta (Savic, 1985). Otra razón por la que los embutidos pueden tener vida útil corta es el deterioro microbiológico, algunas bacterias pueden causar putrefacción, otras intoxicación alimentaria, y como consecuencia un deterioro en las características organolépticas provocando olores y sabores indeseables, cambios en el color, rancidez, etc. (Heinz y Hautzinger, 2007).

Las bacterias que pueden proliferar en salchichas de pollo tipo Frankfurt según la norma INEN 1217:2006 son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, aerobios mesófilos. Los *S. aureus* pueden proliferar en las salchichas debido a una contaminación en la fabricación por transmisión de la piel, boca o nariz de los manipuladores. *Salmonella*, aunque sí puede proliferar pero rara vez se han asociado enfermedades transmitidas por alimentos. *E. coli* se puede producir por una contaminación cruzada o una fabricación inadecuada y falta de control en los procesos. Además, es necesario tener una acción preventiva para *Clostridium botulinum* cuando no se usan nitritos; de igual manera para A. mesófilos porque son las causantes de las intoxicaciones y una completa esterilidad del medio ambiente no es totalmente posible, por lo que el desarrollo de estas bacterias es difícil de controlar (Heinz y Hautzinger, 2007).

La norma INEN 1338:2010 establece los parámetros de tolerancia de las bacterias que pueden proliferar en las salchichas de pollo. Tabla 3.

Tabla 3. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos

Requisitos	n	c	m	M	Método de ensayo
<i>Aerobios mesófilos</i> *ufc/g	5	1	$5,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> *ufc/g	5	0	< 3	-	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> *ufc/g	5	1	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$	NTE INEN 1529-14
<i>Salmonella sp</i>	5	0	-	-	NTE INEN 1529-14

Fuente: (Norma INEN, 2011)

n: número de unidades de la muestra

c: número de unidades defectuosas

m: nivel de aceptación

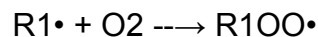
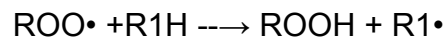
M: nivel de rechazo

2.3.7. Deterioro de lípidos en salchichas de pollo tipo Frankfurt.

La oxidación o degradación de lípidos en salchichas de pollo tipo Frankfurt provoca cambios bioquímicos, que se producen por procesos tecnológicos con temperaturas elevadas y concentración de oxígeno en el alimento (Gil y Ruiz, 2010).

La oxidación de lípidos produce enranciamiento de los alimentos, esto causa alteración en las propiedades organolépticas y cambios en el valor nutritivo de los mismos (Gil y Ruiz, 2010).

En la oxidación de lípidos se combinan los ácidos grasos con el oxígeno formando hidroperóxidos y se propagan los radicales libres (Calvo, 2005). Estos compuestos formados provocan enfermedades como diabetes, cáncer, cardiovasculares, entre otras. Según la siguiente reacción:



La oxidación o enranciamiento lipídico produce en el alimento peróxidos que tienen enlace oxígeno-oxígeno. La calidad del aceite en la industria alimentaria se mide por medio de la formación de peróxidos que contienen enlaces oxígeno-oxígeno, que son los que provocan el enranciamiento de los alimentos (Belitzs, Grosch y Schieberle, 2009).

2.3.8 Capacidad antioxidante de los preservantes naturales

En el deterioro de los alimentos se producen radicales libres que alteran las características intrínsecas y extrínsecas de los mismos. Para evitar la formación de radicales libres es necesario utilizar sustancias antioxidantes. La capacidad antioxidante se mide en función de los radicales libres (Ramos, Castañeda e Ibáñez, 2008).

Uno de los métodos para determinar la cantidad antioxidante de una sustancia es por medio del compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazil DPPH; este compuesto es de color violeta y tiene un electrón libre, la sustancia antioxidante capta este radical provocando una reacción de decoloración. Esta decoloración depende de las sustancias antioxidantes y de su concentración, también del efecto sinergista que se produce al interactuar los antioxidantes que forman las formulaciones antioxidantes. Se mide en el espectrofotómetro la absorbancia inicial al poner en contacto el reactivo con el antioxidante y la absorbancia final, cuando se produzca el cambio de color (Williams, Cuvelier y Berset, 1995), (Luximon, Bahorun y Crozier, 2003).

En este método se mide la capacidad antioxidante de una sustancia por la capacidad de donar hidrógeno; el DPPH se estabiliza mediante los antioxidantes, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm, el proceso de decoloración del DPPH, de violeta a casi transparente indica el cien por ciento de la capacidad de atrapar los radicales libres (Palomo et al, 2009), (Gurrieri, Miceli y Lanza, 2000).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Hipótesis y variables

3.1.1 Hipótesis general

El efecto antioxidante de las formulaciones de la vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) aplicadas en salchichas de pollo, alargan su vida útil.

3.1.2 Hipótesis específicas

3.1.2.1 Formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) inhiben el crecimiento microbiano en las salchichas de pollo.

Ho: $ufcT1 = ufcT2 = ufcT3 = ufcT4 = ufcT5 = ufcT6 = ufcT7 = ufcT8 = ufcT9 = ufcT10 = ufcT11 = ufcT12 = ufcT13 = ufcT14$

Ha: $ufc1T \neq ufcT2 \neq ufcT3 \neq ufcT4 \neq ufcT5 \neq ufcT6 \neq ufcT7 \neq ufcT8 \neq ufcT9 \neq ufcT10 \neq ufcT11 \neq ufcT12 \neq ufcT13 \neq ufcT14$

Donde: ufcT= unidades formadoras de colonias de los 14 tratamientos.

Variable independiente:

Formulaciones antioxidantes de los 14 tratamientos.

Variable dependiente:

Unidades formadoras de colonias de microorganismos en salchichas de pollo tratadas con formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

- 3.1.2.2 Formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) controlan la rancidez de los lípidos en salchichas de pollo.

Ho: PT1 = P T2 = P T3 = P T4 = P T5 = P T6 = P T7 = P T8 = P T9 = P T10 = P T11 = P T12 = P T13 = P T14

Ha: P T1 ≠ P T2 ≠ P T3 ≠ P T4 ≠ P T5 ≠ P T6 ≠ P T7 ≠ P T8 ≠ P T9 ≠ P T10 ≠ P T11 ≠ P T12 ≠ P T13 ≠ P T14

Donde: P T= Peróxidos de los 14 tratamientos.

Variable independiente:

Formulaciones antioxidantes de los 14 tratamientos.

Variable dependiente:

Peróxidos de las salchichas de pollo tratadas con formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

- 3.1.2.3 Formulaciones de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) controlan los cambios de pH en las salchichas de pollo.

Ho: pH T1 = pH T2 = pH T3 = pH T4 = pH T5 = pH T6 = pH T7 = pH T8 = pH T9 = pH T10 = pH T11 = pH T12 = pH T13 = pH T14

Ha: pH1 \neq pH2 \neq pH3 \neq pH4 \neq pH5 \neq pH6 \neq pH7 \neq pH8 \neq pH9 \neq
 pH10 \neq pH11 \neq pH12 \neq pH13 \neq pH14

Donde: pHT = Potencial hidrógeno de los 14 tratamientos.

Variable independiente:

Formulaciones antioxidantes de los 14 tratamientos.

Variable dependiente:

pH de las salchichas de pollo tratadas con formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

- 3.1.2.4 Formulaciones de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) controlan los cambios en la acidez de las salchichas de pollo.

Ho: A T1 = A T2 = A T3 = A T4 = A T5 = A T6 = A T7 = A T8 = A T9
 = A T10 = A T11 = A T12 = A T13 = A T14

Ha: A1 \neq A2 \neq A3 \neq A4 \neq A5 \neq A6 \neq A7 \neq A8 \neq A9 \neq A10 = A11 \neq A12
 \neq A13 \neq A14

Donde: A T = Acidez de los 14 tratamientos.

Variable independiente:

Formulaciones antioxidantes de los 14 tratamientos.

Variable dependiente:

Acidez titulable de las salchichas de pollo tratadas con formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

3.2 Tipo y diseño de investigación

La investigación realizada es de tipo experimental, debido a que se efectuaron relaciones de causa-efecto entre las variables, bajo condiciones específicas y se aplicó el método científico (Observación, planteamiento del problema de investigación, formulación de objetivos, formulación de hipótesis, realización del diseño experimental, recolección y análisis de datos, resultados y formulación de conclusiones).

Se identificaron y valoraron las variables que tienen mayor influencia (ufc de microorganismos, pH, rancidez oxidativa, efecto antioxidante) sobre la vida útil de las salchichas de pollo tipo Frankfurt. Se analizó el comportamiento que estas variables tienen en la variable dependiente.

Se trabajó con el siguiente diseño experimental (Tabla 4).

Tabla 4: Diseño experimental

GCr	X ₀	O ₁	O ₂	O ₃
GCr ₂	X	O ₄	O ₅	O ₆
GE3	X	O ₇	O ₈	O ₉
GE4	X	O ₁₀	O ₁₁	O ₁₂
GE5	X	O ₁₃	O ₁₄	O ₁₅
GE6	X	O ₁₆	O ₁₇	O ₁₈
GE7	X	O ₁₉	O ₂₀	O ₂₁
GE8	X	O ₂₂	O ₂₃	O ₂₄
GE9	X	O ₂₅	O ₂₆	O ₂₇
GE10	X	O ₂₈	O ₂₉	O ₃₀
GE11	X	O ₃₁	O ₃₂	O ₃₃
GE12	X	O ₃₄	O ₃₅	O ₃₆
GE13	X	O ₃₇	O ₃₈	O ₃₉
GE14		O ₄₀	O ₄₁	O ₄₂

Fuente: Elaboración propia

GCR: grupo control referencial

GE: grupo experimental

O: observación

3.3 Unidad de análisis

En la presente investigación se analizaron salchichas de pollo tipo Frankfurt, que fueron elaboradas en el laboratorio de procesamiento de alimentos de la Universidad de las Américas.

3.4 Población de estudio

Se trabajó con toda la población que fue de 4 304 salchichas de pollo tipo Frankfurt, fabricadas con las especificaciones dadas en la Tabla 7.

3.5 Técnica de recolección de datos

Los datos se registraron mediante un cuaderno de trabajo, fichas técnicas, fotografías y videos de los procedimientos y resultados.

Los microorganismos que fueron medidos son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *aerobios* y *salmonella*. Se los cuantificó por triplicado para los 12 tratamientos y los dos testigos; es decir, se registraron 718 datos por cada repetición y por cada día en que se tomaron los datos (día 0, día 5, día 10, día 15, día 20, día 25, día 30); en total se tomaron 2 152 datos.

3.6 Análisis e interpretación de la información

Una vez recogidos los datos en el laboratorio de experimentación, se procedió a su registro y codificación a través de tablas de resultados, construcción de curvas y gráficos. En cuanto al diseño estadístico se consideró un modelo aleatorizado de 12 tratamientos y dos grupos control con tres repeticiones cada una. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el método de bloques completamente al azar, con la prueba de significancia de tukey, en el programa estadístico INFOSTAT, para determinar los efectos en el control antimicrobiano, rancidez oxidativa y propiedades físico-químicas. Esto

permitió comprobar las hipótesis planteadas. Para determinar la formulación óptima se aplicó el método de superficie de respuesta, modelo multivariado, en el programa MINITAB. En la determinación de la actividad antioxidante se utilizó estadística básica, para obtener los promedios, gráficos, regresión lineal, ecuación de la recta y extrapolaciones.

Es necesario analizar la información en función de las variables dependientes considerando la escala de medida, estadística descriptiva y la estadística inferencial (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis de la información

Variable dependiente	Escala de medidas	Estadística descriptiva	Estadística inferencial
ufc	Razón	Promedio Desviación estándar	ANOVA
Peróxidos	Razón	Promedio Desviación estándar	ANOVA
pH	Razón	Promedio Desviación estándar	ANOVA
Acidez	Razón	Promedio Desviación estándar	ANOVA

Fuente: Elaboración propia

3.7 Definición conceptual y operacionalidad de variables

3.7.1 Definición conceptual de variables

3.7.1.1 Efecto antioxidante de las formulaciones a base de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*). El efecto antioxidante es causado por un antioxidante que puede ser natural o artificial, para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas y para proteger en este caso a las salchichas de pollo tipo Frankfurt de su deterioro provocado por radicales libres.

3.7.1.2 Formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) de los 14 tratamientos. Son soluciones que se fabricaron con vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero en diferentes concentraciones (Tabla 6).

3.7.1.3. Unidades formadoras de colonias de microorganismos en salchichas de pollo tratadas con formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*). Es la unidad de medida que se emplea para cuantificar a los microorganismos que se desarrollan en los diferentes agares contenidos en cajas petri o en los petrifilm.

3.7.1.4. Peróxidos de las salchichas de pollo tratadas con formulaciones antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*). Son sustancias que tienen enlace oxígeno-oxígeno y el oxígeno se encuentra en estado de oxidación -1. Se presentan en los alimentos con alto contenido de grasa cuando la grasa se deteriora; presenta rancidez oxidativa.

3.7.1.5. Propiedades físico-químicas: pH y acidez titulable.

Potencial hidrógeno, pH, está determinado por la concentración iones $[H^+]$ que existe en una sustancia o solución, mide la acidez o alcalinidad de las mismas.

Acidez titulable es la medida de los ácidos libres presentes en una solución; se la determina por titulación con hidróxido de sodio.

3.7.2 Operacionalidad de variables

En esta investigación se probó la eficacia de preservantes naturales elaborados con ácido ascórbico, tocoferoles y aceite esencial de romero, que fueron aplicados a salchichas de pollo con alto contenido de grasa. La investigación fue experimental, se consideraron cuatro variables dependientes y una variable independiente.

Los análisis microbiológicos se los realizó en el laboratorio de microbiología; la determinación de peróxidos, pH y acidez, en el laboratorio de química de la Universidad de las Américas.

Se establecieron 14 tratamientos con diferentes concentraciones de preservantes naturales, como se describe en la Tabla 6. Estas concentraciones se establecieron en base de pruebas preliminares y de la bibliografía.

Las soluciones se prepararon en porcentaje en masa usando agua mili Q como solvente para el ácido ascórbico, para los tocoferoles y aceite esencial de romero el solvente será aceite de maíz; esto permitirá formar emulsiones de aceite-agua, en las mismas proporciones.

Estas formulaciones fueron aplicadas a las salchichas de pollo tipo Frankfurt previamente elaboradas y almacenadas a 4 grados centígrados; se determinaron las unidades formadoras de colonias de bacterias como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *aerobios* y *salmonella*, los peróxidos, el pH y la acidez titulable desde el día 0, cada 5 días, hasta el día 30.

Tabla 6: Formulaciones de soluciones preservantes naturales

Formulaciones de Antioxidantes a base de Ácido Ascórbico, Vitamina E, Aceite Esencial de Romero y Butil hiroxi Tolueno				
Tratamientos	Ácido Ascórbico ppm	Vitamina E ppm	Aceite Esencial de Romero ppm	Butil hiroxi Tolueno ppm
1	0	0	0	0
2	0	0	0	100
3	5000	0	0	0
4	0	5000	0	0
5	0	0	500	0
6	500	500	0	0
7	500	0	200	0
8	0	500	200	0
9	1000	1000	0	0
10	1000	0	400	0
11		1000	400	0
12	1000	800	400	0
13	800	800	300	0
14	1000	1000	400	0

Fuente. Elaboración propia

3.7.3 Aceite esencial de romero

El aceite esencial de romero se lo obtuvo por el método de hidrodestilación, como se puede observar en la Figura 6.

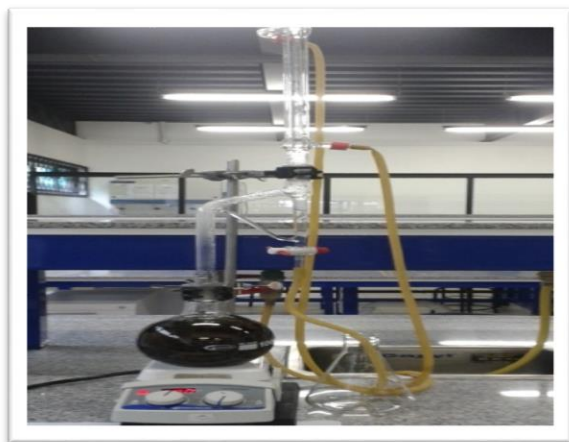


Figura 6: Extracción de aceite esencial de romero por hidrodestilación

Fuente: Elaboración propia

Se utilizaron hojas de romero secas y como solvente se utilizó agua; el rendimiento de la extracción del aceite esencial se calculó con la ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{ml de aceite esencial de romero}) \times 100}{(\text{g de material vegetal})}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(1,5 \text{ ml de aceite esencial}) \times 100}{100 \text{ g de material vegetal}} = 1,5\%$$

3.7.4 Salchichas de pollo

Se elaboraron salchichas de pollo tipo Frankfurt siguiendo la siguiente formulación (Tabla 7):

Tabla 7: Formulación para salchichas de pollo

Ingredientes	Porcentaje %
Carne de pollo	40
Grasa de pollo	15
Proteína de soya	13
Almidones y féculas	7
Sal	3
Especias	3
Azúcares y especias	2
Carrageninas	1
Agua 0°C	15

Fuente: Guía de prácticas para laboratorio – UDLA, 2014

Se picaron 800 gramos de carne de pollo con 300 gramos de grasa de pollo, se mezcló manteniendo siempre una temperatura de 4 grados centígrados; se formó una emulsión cárnica, en la cual se colocó la carragenina, 20 gramos; almidón, 149 gramos; proteína de soya, 260 gramos; y se agregaron 60 gramos de condimentos. Por último, se adicionaron los preservantes (Tabla 6) en los 12 tratamientos; en el otro se adicionó un preservante sintético, BHT butilhidroxitolueno; finalmente, en el último se dejó sin preservante. Se embutió la emulsión cárnica en una tripa de celulosa; se las colocó en baño María hasta alcanzar un centro térmico en las salchichas de temperaturas superiores a los 70 grados centígrados; posteriormente se envasó al vacío y se las almacenó a 4 grados centígrados.

La elaboración se la realizó siguiendo el siguiente diagrama de flujo (Figuras 7 y 8).

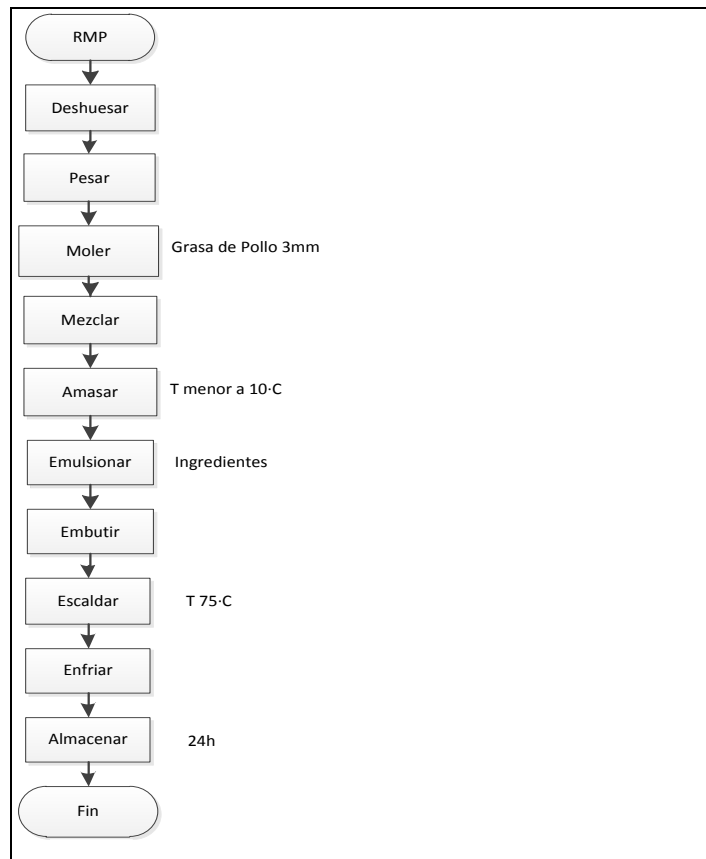


Figura 7: Diagrama de flujo para la elaboración de salchichas de pollo tipo Frankfurt

Fuente: Elaboración propia



Figura 8: Elaboración de salchichas de pollo tipo Frankfurt

Fuente: Elaboración propia

3.7.5 Análisis microbiológico

3.7.5.1 Procedimiento para siembra de muestras

Cada muestra de salchichas de pollo, empacada individualmente al vacío, se desinfectó con alcohol al 99% antes de abrirla; se esterilizó el bisturí después de cada corte con alcohol del 99%; el asa de Drigalski se desinfectó luego de cada siembra con alcohol del 99%; y con el contacto con la llama de una lámpara de alcohol introducida dentro de la cámara, se desecharon las puntas de las micropipetas utilizadas en cada medición; para sembrar las muestras se utilizó la Cámara de Flujo Laminar, para evitar la contaminación cruzada. La cámara fue desinfectada con luz ultravioleta durante media hora (Figura 9).



Figura 9: Cámara de Flujo Laminar Thermo Scientific 1300

Fuente: Elaboración propia

Para proceder a la siembra de las muestras es necesario seguir el procedimiento siguiente:

Pesar 1 g de salchicha y poner en un tubo de ensayo, adicionar 9 ml de agua de pectona, colocar en un agitador BOECO PSU - 10i por 10 minutos, dejar reposar 5 minutos y con ayuda de una micropipeta Ecopipette Capp de 10-100 µl colocar en las cajas petri que ya contienen el agar respectivo para cada microorganismo. Poner en la incubadora INCUCELI a 37,5 grados centígrados por 48 horas. Proceder a leer en un contador de colonias BOECO Germany CC-1. Para finalizar el proceso es necesario autoclavar las cajas petri, para eliminar las muestras contaminadas.

Para calcular las ufc que se formaron se aplica la fórmula 1.

Fórmula 1:

$$\text{Unidades formadoras de colonias} = \text{Número de colonias} * (\text{Volumen})^{-1} (\text{ml}) * (\text{factor de dilución de la muestra})^{-1} (\text{ml})$$

Los materiales y reactivos se describen en la Tabla 8.

Tabla 8: Materiales y equipos de laboratorio para sembrar las muestras

Materiales de laboratorio
• Cajas tripetri
• Tubos de ensayo
• Micropipeta Ecopipette Capp de 10-100 μ l
• Puntas de micropipeta
• Asa de Drigalski Triangular
• Bisturí
• Lámpara de alcohol
• Gradillas

Equipos de laboratorio
• Refrigerador Hardman
• Balanza Shimadzo Tx 3202L
• Agitador BOECO PSU-10i
• Cámara de Flujo Laminar Thermo Scientific 1300
• Incubadora Incucell
• Contador de Colonias BOECO Germany CC-1
• Autoclave Tuttnauer 3870

Fuente. Elaboración propia

3.7.5.2 Aerobios mesófilos

Para cuantificar las ufc de aerobios mesófilos se utilizó el agar nutritivo PCA (Plate Count Agar), que está compuesto por 5 g de triptona, 1 g de dextrosa, 2,5 g de extracto de levadura y 12 g de agar. Las colonias de estas bacterias son de color amarillo pálido, son circulares y pueden tener diferentes tamaños (Figura 10).

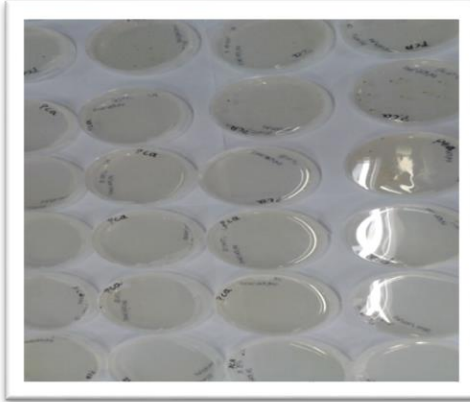


Figura 10: Cajas petri para determinación de aerobios mesófilos

Fuente: Elaboración propia

3.7.5.3 Escherichia coli

Para cuantificar las colonias de *Escherichia coli* se empleó un agar nutritivo EMB (Eosina-Azul de Metileno); es un medio de cultivo morado que contiene 10 g de peptona, 10 g de lactosa, 2 g de fosfato dipotásico, 15 g de agar, 0,4 g de eosina y 0,065 g de azul de metileno. Las colonias son de color verde metálico, con brillo y centro azulado; generalmente se presentan de forma circular y pueden ser de diferentes tamaños (Figura 11).

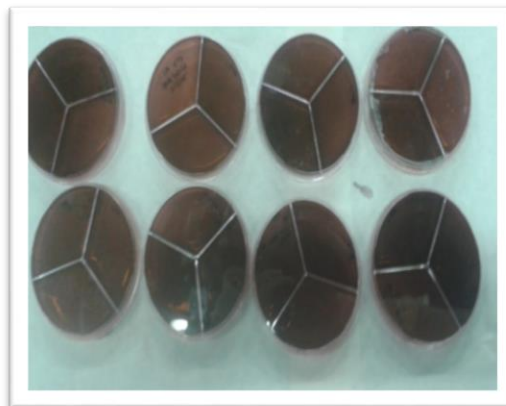


Figura 11: Cajas petri para evaluar E. coli

Fuente: Elaboración propia

3.7.5.4 *Staphylococcus aureus*

Se determinó *Staphylococcus aureus* en un agar de Manitol Salado, contiene 1 g de extracto de carne bovina, 5 g de digerido pancreático de caseína, 5 g de digerido péptido de tejido animal, 75 g de cloruro sódico, 10 g de D-manitol, 0,025 g de rojo fenol y 15 g de agar (Dickinson, 2013). Estas bacterias son de color amarillo (Figura 12).

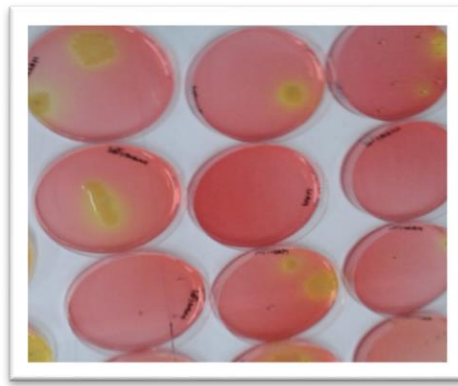


Figura 12: Cajas petri para determinar *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia

3.7.5.5 *Salmonella*

El procedimiento para la siembra de la muestra de salchichas para determinar la contaminación por salmonella consta de tres pasos: en primer lugar hay que realizar un enriquecido, luego un aislamiento con un caldo de Muller Kauffmann tetracionato y rappaport vassiliadis soja. Se reportan las colonias que presentan color rosa o rojo intenso (Figura 13).

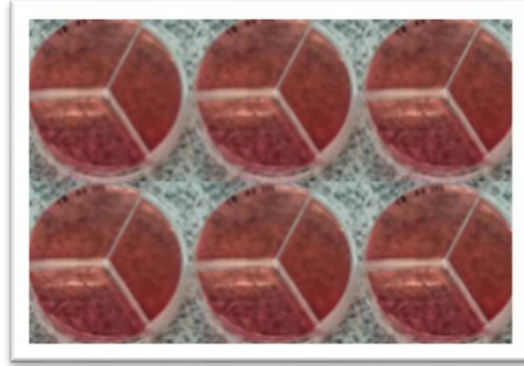


Figura 13: Cajas petri para determinar salmonella

Fuente: Elaboración propia

3.8 Análisis físico químico

Se determinaron pruebas físico-químicas, pH, acidez titulable y peróxidos.

3.8.1 Potencial hidrógeno

El pH en salchichas de pollo es un indicador de calidad; se determinó el día 0 hasta el día 30 con intervalos de cinco días para controlar la producción de iones hidrógeno que afectan en el deterioro de las salchichas. Se preparó una solución al 10% con las salchichas de pollo en agua destilada y se dejó en reposo durante 30 minutos, se tomó la medida con un potenciómetro Fisher Scientific Accume previamente calibrado (Figura 14).

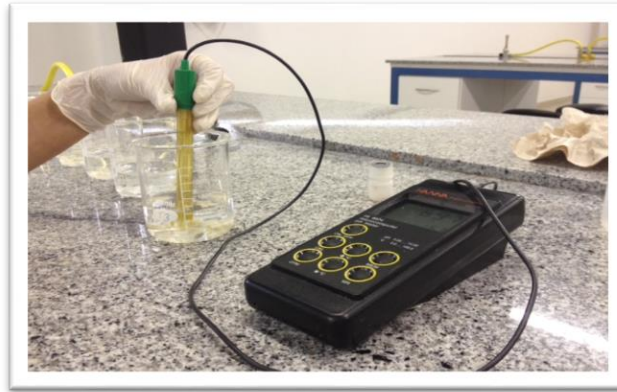


Figura 14: Determinación de pH

Fuente: Elaboración propia

3.8.2 Determinación de peróxidos

Para la determinación de peróxidos se utilizó el Test de Peróxidos MQuant de la MERC, que está en rango 0,5-25 mg/l H₂O₂; se midió por cambio de color en las tiras indicadoras, contra un patrón colorimétrico.

Se realizó una solución 1:1 de salchicha de pollo en agua destilada en un vaso de precipitación se 250 ml a una temperatura de 15 grados centígrados; la muestra debe encontrarse en un pH entre 2-12. La zona reactiva de la tira se sumergió en la solución acuosa durante 1 segundo. Se determinó la tonalidad de la tira transcurridos 15 segundos después del contacto con la muestra. La escala colorimétrica permitió determinar cualitativamente la presencia de peróxidos en mg/l de H₂O₂ (Figura 15).



Figura 15: Determinación de peróxidos. Método colorimétrico

Fuente: Elaboración propia

3.8.3 Acidez titulable

Se pesaron 10 g de la salchicha de pollo y se trituraron finamente. Se colocó la muestra en una probeta con agua destilada aforando hasta 100 ml a 40 grados centígrados. Se agitó y se filtró la solución. Posteriormente, se extrajeron 25 ml de la dilución y se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N. Se utilizó como indicador la fenolftaleína al 1%, se determinó la cantidad de hidróxido consumido, al efectuarse el cambio de color (Figura 16). La acidez de la muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = V \times N \times \text{Meq} / \text{volumen de muestra} \times 100g$$

V= Volumen de NaOH

N= Normalidad de NaOH

Meq= peso equivalente del ácido dominante en la muestra

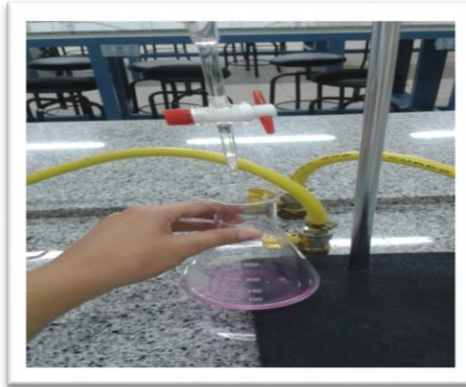


Figura 16: Determinación de la acidez

Fuente: Elaboración propia

3.8.4 Efecto antioxidante

Para cada una de las formulaciones de antioxidantes se realizó la prueba del efecto antioxidante por el método HPPT (1,1 difenil 2 picril hidrazilo) para ello es necesario adicionar 25 μ l de las soluciones antioxidantes óptimas, 40 μ l de la solución DPPH, se incubó en la oscuridad. En el espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific se midió la absorbancia de la solución a 517 nm, se realizaron las lecturas cada minuto durante 30 minutos y se determinó el porcentaje de actividad antioxidante (Figuras 17, 18, 19).

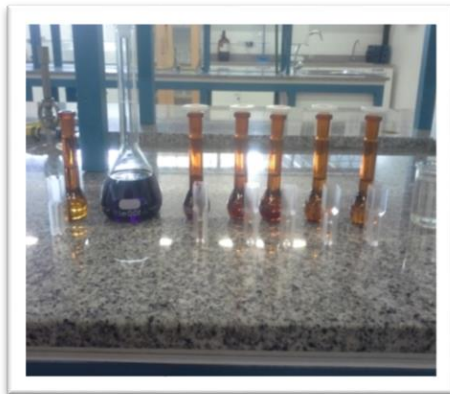


Figura 17: Soluciones de HPPT

Fuente: Elaboración propia

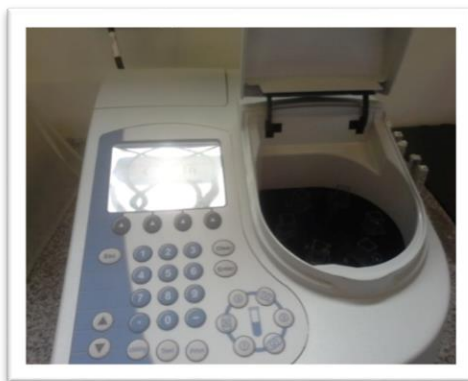


Figura 18: Espectrofotómetro para determinar absorbancia

Fuente: Elaboración propia



Figura 19: Cambio de color, efecto antioxidante DPPH

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis microbiológicos

4.1.1. *S. aureus*

Al realizar los análisis microbiológicos de las salchichas de pollo tipo Frankfurt en medio Manitol Salado, se contaron las ufc de *S. aureus*; estos resultados muestran que los tratamientos 3, 7, 8, 9, 11, 12, 13 no sobrepasan los límites establecidos por la norma INEN 1338:2010 (Tabla 3) que es de $1 \cdot 10^3$ ufc/g del alimento para productos cárnicos cocidos. El tratamiento 3 con BHT que es el testigo tuvo valores mayores que este valor.

La figura 20 representa el comportamiento de las bacterias a través de los 30 días; se puede visualizar que se produce un incremento de ufc de *S. aureus* a través de los 30 días de estudio.

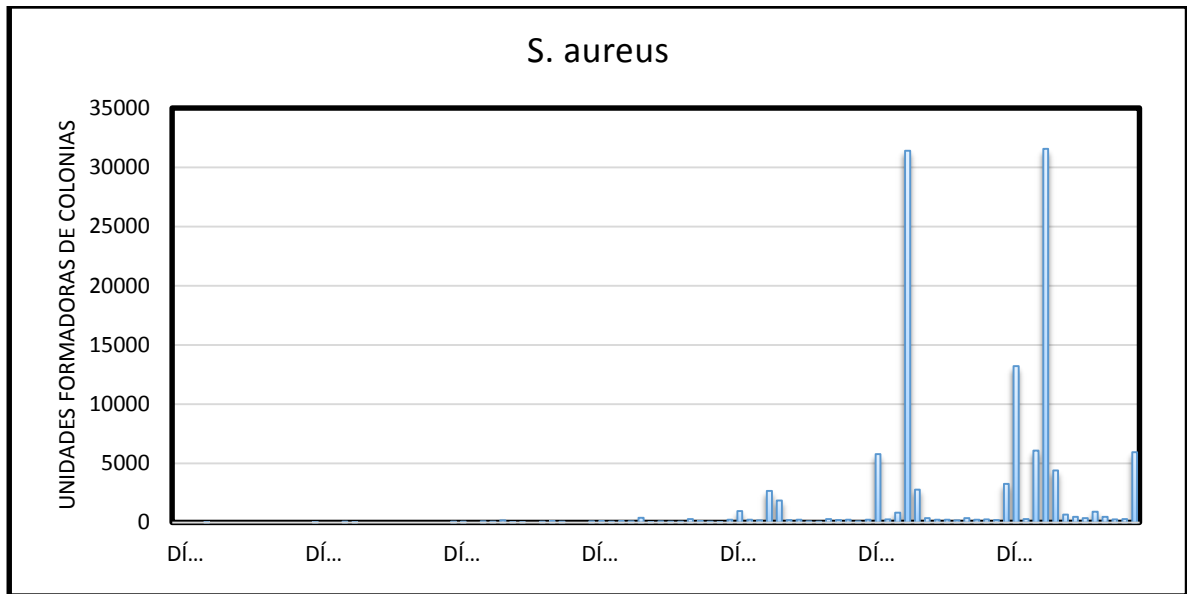


Figura 20: Crecimiento de S. aureus desde el día 0 hasta el día 30

Fuente: Elaboración propia

Se graficaron los cuatro tratamientos que tenían menores promedios de ufc a lo largo de los 30 días; los mejores tratamientos fueron 8, 9, 12, 13 (Figura 21).

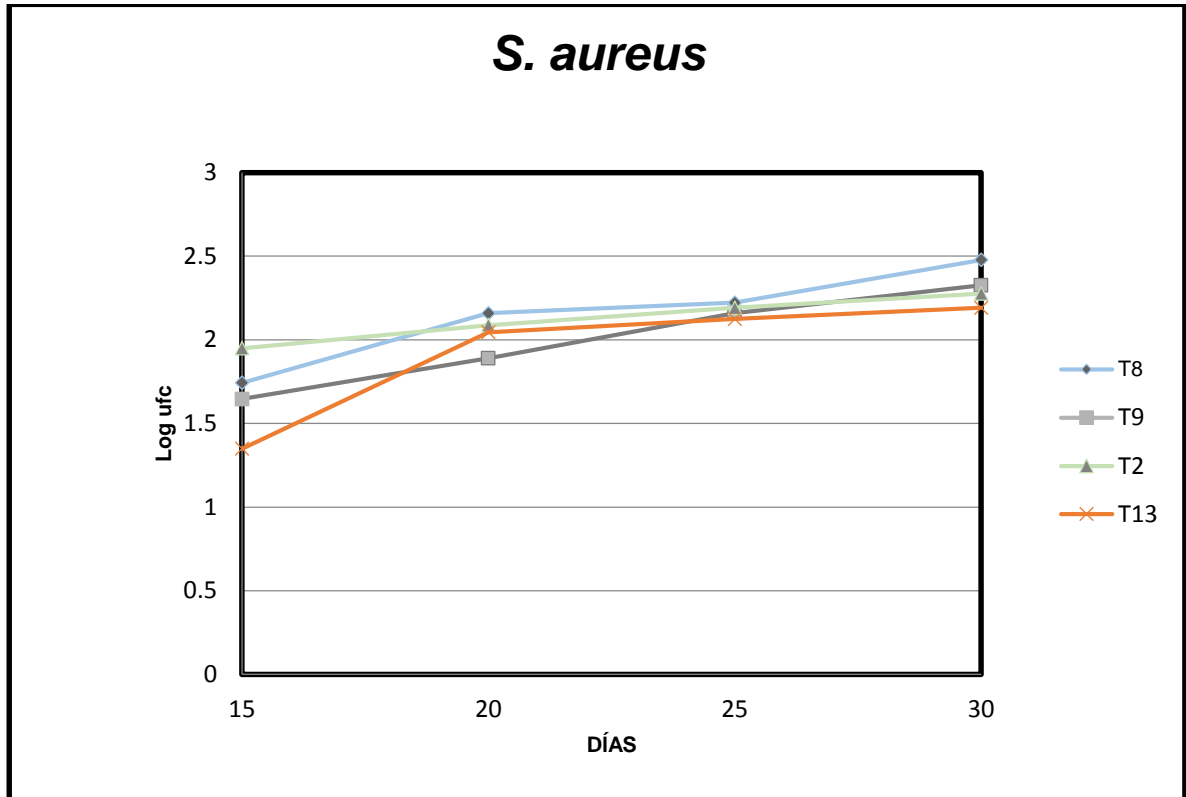


Figura 21: Curva de crecimiento de S. aureus

Fuente: Elaboración propia

El tratamiento 13 inhibió las bacterias de S. aureus de mejor manera, solo se reportaron 155 ufc en el día 30. El tratamiento 10, por el contrario, es el que menor inhibió estas bacterias, reportándose un valor de 600 ufc de S. aureus (Figura 22).

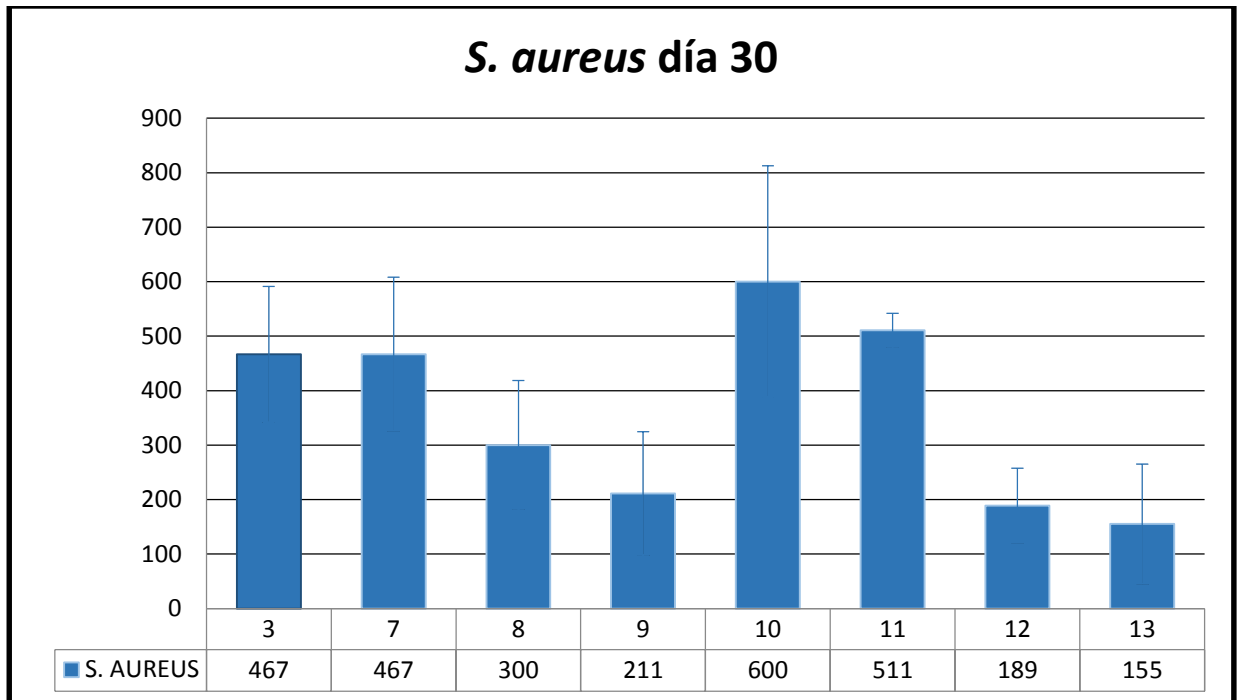


Figura 22: *S. aureus* día 30

Fuente: Elaboración propia

Para analizar los datos encontrados fue necesario realizar un cambio de base a los datos tomados de microorganismos, con la raíz de $n+1$, debido a que se encontraron agares con 0 unidades formadoras de colonias (Anexo 1).

Estos datos fueron procesados en el programa INFOSTAT para realizar un ANOVA de bloques completamente al azar; las comparaciones entre tratamientos y repeticiones fueron analizadas por la prueba de significancia de tukey. Los resultados obtenidos se reportan en las tablas del Anexo 1.

En los días 0 y 5 no existen diferencias significativas entre las repeticiones ni entre los tratamientos porque el p-valor es mayor que 0,05; es decir, que todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre las salchichas de pollo (Anexo 1). En el resto de días sí existen diferencias significativas (Tabla 10).

La figura 23 representa las diferencias significativas de tukey para el día 30; los tratamientos iguales y que tienen promedios de unidades formadoras de colonias menores son los tratamientos 12, 3, 14, 7, 8, 10, 9, 13; están representados con la letra C.

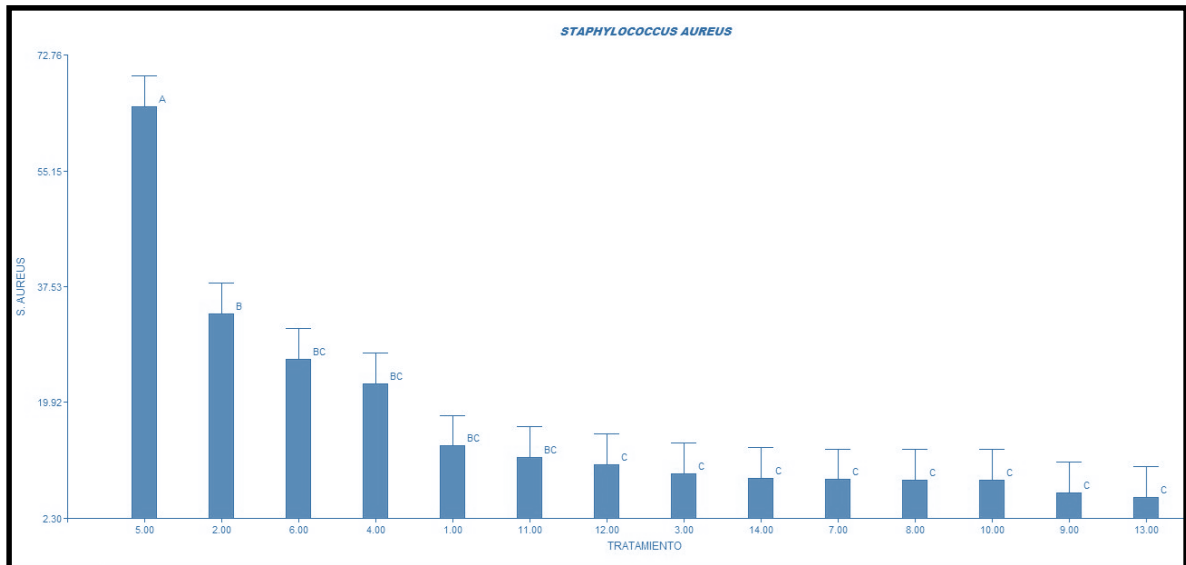


Figura 23: Diferencias significativas de tukey para el día 30 S. aureus

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se visualizan los promedios de las unidades formadoras de colonias de *S. aureus* por cada tratamiento, para los días en los que sí existen diferencias significativas.

Tabla 9 Promedio y desviación estándar para los días 10, 15, 20, 25, 30

S. aureus Tukey					
T	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
	Promedio ± des. estándar	Promedio ± des. estándar	Promedio ± des. estándar	Promedio ± des. estándar	Promedio ± des. estándar
1	27 33 ± 1 ab	55 ± 32 abc	111 ± 87 ad	144 ± 68 e	321 ± 181 e
2	27 33 ± 1 ab	66 ± 47 abc	80 ± 125 cd	575 ± 286 b	1322 ± 83 ab
3	15 22 ± 1 ab	44 ± 16 abc	144 ± 63 ad	256 ± 16 e	467 ± 125 fg
4	100 ± 0 a	122 ± 16 abc	189 ± 16 ad	911 ± 69 ad	745 ± 230 c
5	41 56 ± 1 ab	122 ± 16 abc	506 ± 1791 ad	3186 ± 347 ad	3415 ± 2712 a
6	100 ± 47 a	200 ± 141 abc	1456 ± 291 ab	2522 ± 346 c	435 ± 63 ad
7	15 11 ± 1 ab	33 ± 21 abc	133 ± 72 ad	222 ± 110 e	467 ± 141 fg
8	33 ± 0 ab	55 ± 32 abc	144 ± 68 ad	167 ± 54 e	300 ± 119 gh
9	0 ± 0 ab	44 ± 16 abc	78 ± 32 ad	144 ± 68 e	211 ± 113 gh
10	22 ± 31 ab	33 ± 27 abc	56 ± 16 ad	211 ± 31 e	600 ± 213 f
11	31 89 ± 1 ab	156 ± 10 abc	200 ± 72 ad	311 ± 42 e	511 ± 31 f
12	0	89 ± 31 abc	122 ± 57 ad	155 ± 57 e	189 ± 69 gh
13	0 ± 0 ab	22 ± 32 bc	111 ± 87 ad	133 ± 98 e	155 ± 110 f
14	0 ± 0 ab	22 ± 16 c	89 ± 42 ad	122 ± 69 e	391 ± 1718 de

La prueba de significancia de tukey indica que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos para los días 10, 15, 20, 25 y 30. Como se puede observar en la Tabla 10 y en la Figura 23, la mayor cantidad de bacterias se producen en los días 25 y 30. En los días 0 y 5 no se reportan ufc de *S. aureus* (Figura 23).

Tabla 10: Resumen ANOVA para S. aureus para los 30 días de investigación

F de V	GL	CM	P-valor
Día 0	13	2,61	0,0441
Día 5	13	10,45	0,0190
Día 10	13	31,65	0,0001
Día 15	13	27,30	0,0001
Día 20	13	882,42	0,0001
Día 25	13	890,68	0,0001
Día 30	13	7442,71	0,0001

Fuente: Elaboración propia

F de V: fuente de variación

GL: grados de libertad

CM: cuadrados medios

Al obtenerse ocho tratamientos con resultados similares, según la prueba de tukey en el día 30, fue necesario realizar una optimización para encontrar la mejor formulación antimicrobiana. Esto se realizó por el método de superficies de respuesta (Anexo 1) en el programa MINITAB; los coeficientes del modelo multivariante son (Tabla 11):

Tabla 11: Coeficiente modelo multivariante

Término	Coef
Constante	17.3400
AA	-0.0479250
AER	0.123375
VE	-0.0336650
AA*AA	5.90700 E-05
AER*AER	-3.42250 E-04
VE*VE	1.52300 E-05

Fuente: Elaboración propia

El modelo obtenido es el siguiente:

$$S. aureus = 17.34 - 0,04 \text{ ácido ascórbico} + 0.12 \text{ Aceite esencial de romero} - 0.03 \text{ vitamina E} + 5.9 * 10^{-5} \text{ ácido ascórbico} * \text{ácido ascórbico} - 3.45 * 10^{-4} \text{ Aceite esencial de romero} * \text{Aceite esencial de romero} - 1.52 * 10^{-5} \text{ vitamina E} * \text{vitamina E}.$$

En la figura 24 se puede observar cómo varía la cantidad de ufc de *S. aureus* con respecto a las concentraciones de ácido ascórbico y aceite esencial de romero. El punto mínimo se visualiza a 400 ppm de AA y 200 ppm AER, aproximadamente.

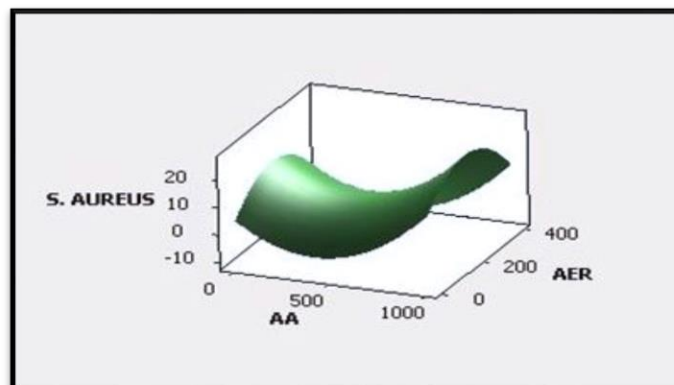


Figura 24: Diagrama superficie de respuestas *S. aureus* vs AA y AER

Fuente: Elaboración propia

En las Figura 25 se observa cómo varía la cantidad de ufc de *S. aureus* con respecto a las concentraciones de ácido ascórbico y la vitamina E. El punto mínimo se visualiza a 400 ppm de AA y 400 ppm de VE, aproximadamente.

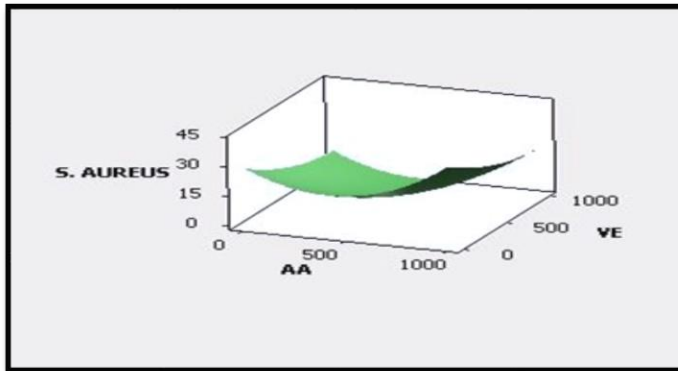


Figura 25: Diagrama de superficie de respuesta S. aureus vs. AA y VE

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 26 se observa cómo varía la cantidad de ufc de *S. aureus* con respecto a las concentraciones de aceite esencial de romero y la vitamina E. El punto mínimo se visualiza a 1 000 ppm de AER y 400 ppm de VE, aproximadamente

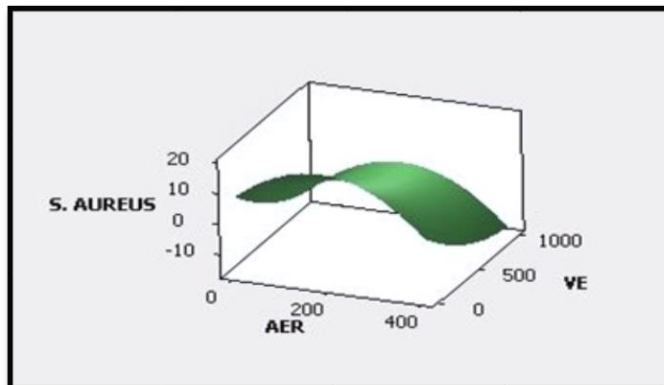


Figura 26: Diagrama superficie de respuestas S. aureus vs. VE y AER

Fuente: Elaboración propia

Se obtuvo una mezcla óptima que contiene 404 ppm de AA, 400 ppm de AER y 1 000 ppm de VE (Figura 27) (Tabla 12), al realizar la optimización en el rango de 0 a 5 000 ppm de los tres componentes de las formulaciones.

Tabla 12: Formulación óptima para *S. aureus*

Antimicrobianos naturales	Formulación óptima
Ácido ascórbico	404 ppm
Vitamina E	1000 ppm
Aceite esencial de romero	400 ppm

Fuente: Elaboración propia

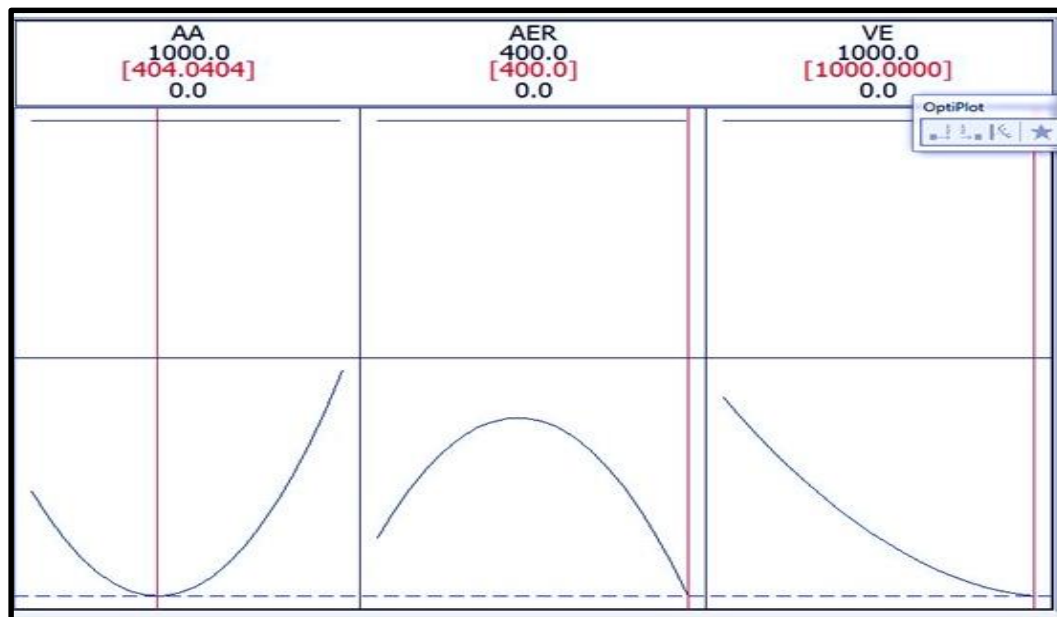


Figura 27: Combinación óptima de AA, VE y AER

Fuente: Elaboración propia

La mezcla óptima indica que es necesaria la presencia de los tres antioxidantes naturales para inhibir la presencia de *S. aureus*; el tratamiento 13 (AA 800 ppm, AER 300 ppm, VE 800 ppm) es el que más se aproxima; sin embargo, no es necesario utilizar grandes cantidades de ácido ascórbico.

Estos resultados coinciden con las investigaciones realizadas por Martínez, Molina y Boucort (1997), que demostraron que la actividad antimicrobiana del ácido ascórbico inhibe el crecimiento de cepas de *S. aureus*, cuando fueron utilizados en productos cárnicos.

En los estudios realizados por Moreira, Ponce, Del Valle y Roura (2005), se probó la eficacia del AER en alimentos, reportando que sí tiene efecto antimicrobiano para bacterias gram positivas como *S. aureus*, corroborándose los resultados obtenidos en esta investigación. Esto se confirma en los trabajos realizados por Shelef, Naglir y Bogem (2013) y por Weckesser (2001).

Martínez, Molina y Boucort (1997) demostraron que el ácido ascórbico reduce la actividad microbiana de *Staphilococcus aureus* en productos cárnicos.

Estudios realizados por Lee et al (2009) probaron el aceite esencial de romero para inhibir *S. typhimurium*, *Enterobacter sakazakii*, *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* y demostraron que disminuye la proliferación de estas bacterias.

La concentración mínima inhibitoria del AER para inhibir cepas *S. aureus* es de 1 024 ppm (Klancnik, 2009), esto demuestra que la mezcla óptima está en rangos aceptables.

Barry, en 1976, después de muchas pruebas realizadas con aceites esenciales, llegó a la conclusión que al ser usados en forma combinada estos pueden tener efectos mayores o pueden ser igual a la suma de los efectos individuales. En el caso de esta investigación, se puede comprobar que los T3, T4 y T5 que contienen un solo componente tienen menor efecto que el tratamiento 13 que es la mezcla de los tres.

4.1.2. Aerobios mesófilos

Andino y Castillo en 2019 comprobaron que la presencia de *aerobios mesófilos* en los alimentos determinaba la inocuidad de los mismos, esto se consideró en toda la cadena de producción.

Según Domínguez, en su investigación realizada en 2015, concluyó que la carne de pollo se contamina con mucha facilidad; sin embargo, esto va a depender del uso de preservantes. En esta investigación se logró controlar la cantidad aerobios con los preservantes aplicados, de tal manera que en los 30 días de estudio la cantidad ufc de todos los tratamientos no sobrepasó lo establecido por la norma INEN.

En los primeros días hasta el día 20, la cantidad de ufc de *aerobios mesófilos* es mínima; todos los tratamientos tienen el mismo efecto; para los días 25 y 30 se puede observar que se produce un incremento significativo llegando hasta 32 233 ufc para el tratamiento 6 en el día 30 (Figura 26).

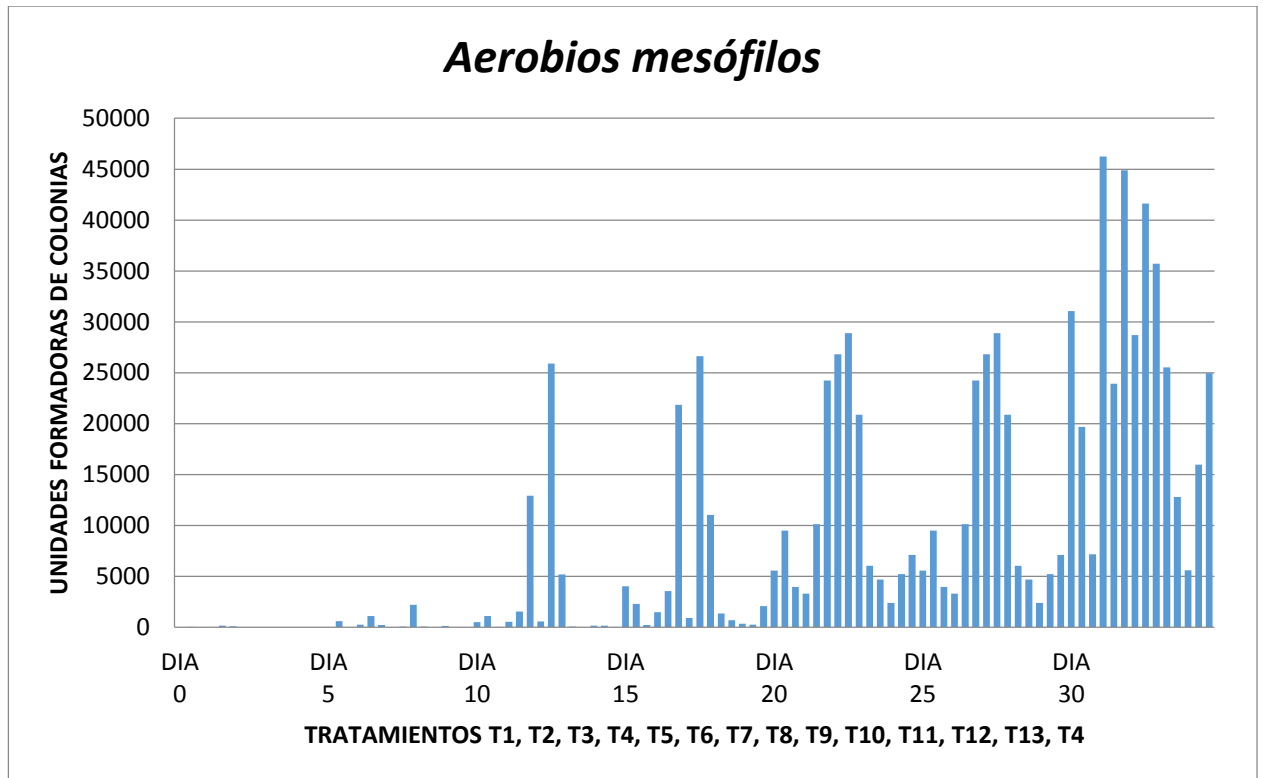


Figura 28: Crecimiento de A. mesófilos durante 30 días

Fuente: Elaboración propia

Los tratamientos 3, 10, 11, 12, 14 inhibieron la proliferación de bacterias aeróbicas; de estos el mejor fue el tratamiento 3 con 5 093 ufc, luego el tratamiento 12 con 8 300 ufc y el 14 con 9 833 ufc en el día 30.

En estos tres tratamientos se puede observar que el contenido de ácido ascórbico es de 5 000 ppm, 1 000 ppm y 1 000 ppm, respectivamente (Figura 29).

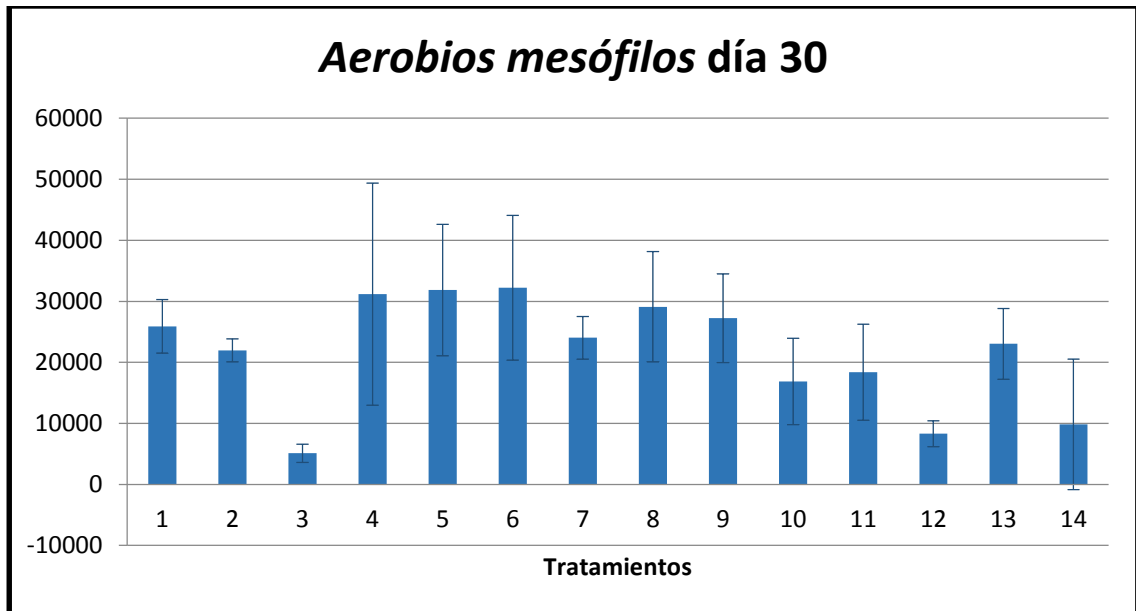


Figura 29: Aerobios mesófilos día 30

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 30 se observa el crecimiento del logaritmo de las ufc de *aerobios mesófilos* de los tratamientos 3, 10, 11, 12, 14, que fueron los que mejor inhibieron estas bacterias.

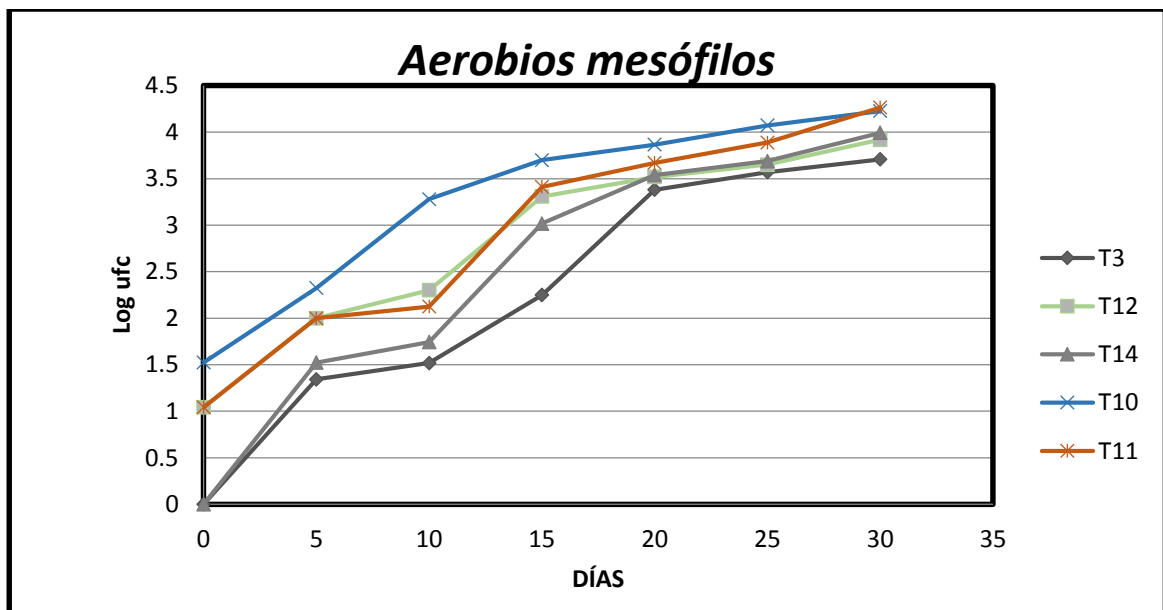


Figura 30: Crecimiento de A. mesófilos

Fuente: Elaboración propia

Los datos tomados en el laboratorio de microbiología se muestran en el Anexo 2; fue necesario realizar un cambio de base a la raíz de $n + 1$.

Estos datos fueron procesados en el programa estadístico INFOSTAT; se realizó un ANOVA de bloques completamente al azar y se utilizó la prueba de significancia de tukey (Anexo 2).

En los días 0 hasta el 20 no existen diferencias significativas entre los tratamientos; esto quiere decir que todos los tratamientos tienen el mismo efecto antimicrobiano en las salchichas de pollo (Anexo 2). Se puede observar que todos los tratamientos tienen la letra A.

Para los días 25 y 30 ya se presentan diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que el p-valor es mejor que 0,05 (Tabla 13).

Tabla 13: Cuadro resumen de *A. mesófilos* para los 30 días de tratamientos

F de V	GL	C M	P-valor
Día 0	13	0,0028	0,4613
Día 5	13	0,0028	0,5788
Día 10	13	0,0034	0,5801
Día 15	13	0,004	0,1195
Día 20	13	2,08	0,0657
Día 25	13	1,95	0,0418
Día 30	13	2,85	0,0112

Fuente: Elaboración propia

Los promedios de ufc *A. mesófilos* y las desviaciones estándar se muestran en la Tabla 15 para los días 25 y 30 y sus diferencias de la prueba de significancia de tukey, expresados por las letras a y b. Tabla 14

Tabla 14: A. mesófilos días 25 y 30

<i>Aerobios mesófilos</i>		
T	DÍA 25	DÍA 30
	PROMEDIO ± DES. ESTANDAR	PROMEDIO ± DES. ESTANDAR
1	15200 ± 4390 b	25889 ± 4375 b
2	13755 ± 3105 ab	21967 ± 1892 ab
3	3711 ± 1107 ab	5093 ± 1477 ab
4	17067 ± 20586 ab	31167 ± 18192 ab
5	23156 ± 10024 ab	31839 ± 10758 ab
6	24078 ± 8614 ab	32233 ± 11848 ab
7	17789 ± 8554 ab	24022 ± 3478 ab
8	20622 ± 10082 ab	29089 ± 9052 ab
9	21822 ± 6782 ab	27245 ± 7262 ab
10	11789 ± 4671 ab	16878 ± 7089 ab
11	7733 ± 3535 ab	18367 ± 7872 ab
12	4478 ± 2728 ab	8300 ± 2127 ab
13	12500 ± 5967 ab	23045 ± 5797 ab
14	4878 ± 4243 a	9833 ± 10706 a

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la prueba de significancia de tukey determinan que existen 12 tratamientos estadísticamente similares; para determinar cuál de estos es el mejor es necesario realizar una prueba de optimización por el método de superficie de respuesta (Anexo 2). Se obtuvo un modelo multivariante, cuyos coeficientes se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15: Coeficientes modelo multivariado

Término	Coeficientes
Constante	178 190
AA	-0,0223003
AER	0,0455008
VE	0,00780341
AA*AER	-1,93316 E-04
AA*VE	1,35808 E-05
AER*VE	-8,59223 E-05

Fuente: Elaboración propia

Modelo multivariante para *A. mesófilos* es:

Aerobios mesófilos = $205.8 - 0.03 \text{ ácido ascórbico} - 0.13 \text{ aceite esencial de romero} + 4.52 + 10^{-5} \text{ Vitamina E}$

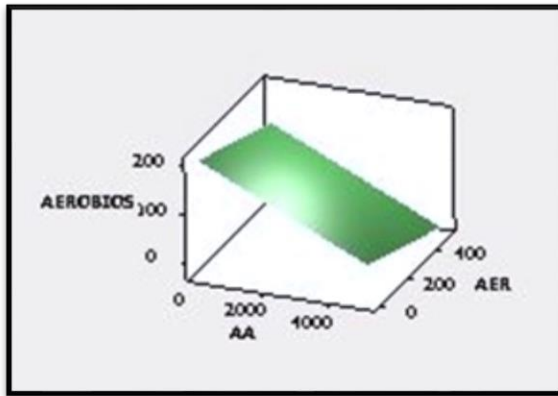


Figura 31: Superficie de respuesta *A. mesófilos* vs. AA y AER

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 31 se observa la relación del ácido ascórbico con el aceite esencial de romero; el punto mínimo está en la mayor cantidad de ácido y la menor cantidad de aceite esencial de romero.

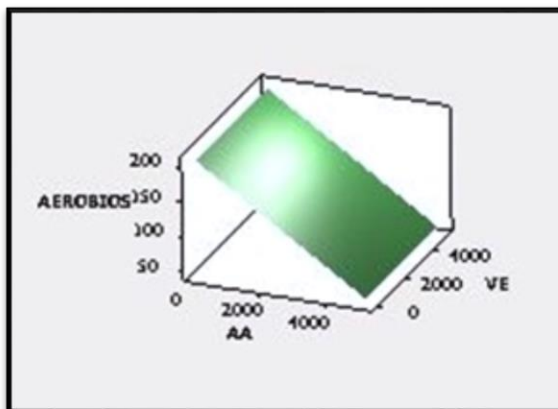


Figura 312: Superficie de respuesta *A. mesófilos* vs. AA y VE

Fuente: Elaboración propia

La relación entre el ácido ascórbico y la vitamina E para encontrar la menor cantidad de *A. mesófilos* se da cuando la cantidad de ácido ascórbico es grande y la cantidad de vitamina E también lo es (Figura 32).

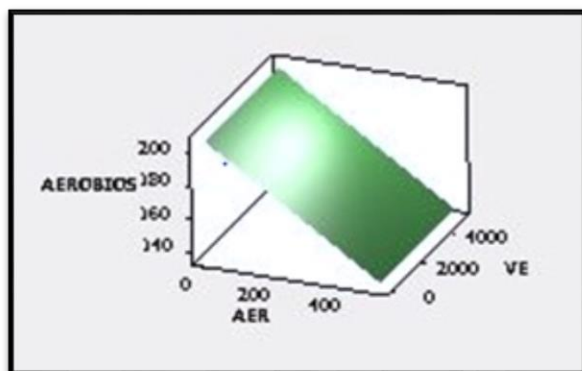


Figura 323: Superficie de respuesta *A. mesófilos* vs VE y AER

Fuente: Elaboración propia

En la figura 33 se observa que mientras mayor es la cantidad de ácido ascórbico y menor es la cantidad de vitamina E, se obtiene menor número de ufc de *A. mesófilos*.

Se realizó una minimización en los rangos de 0 a 5 000 de AA, AER y VE obteniéndose una solución óptima (Tabla 16, figura 34).

Tabla 16: Formulación óptima *A. mesófilos*

Antimicrobianos Naturales	Formulación óptima
Ácido ascórbico	5 000 ppm
Vitamina E	0 ppm
Aceite esencial de romero	500 ppm

Fuente: Elaboración propia

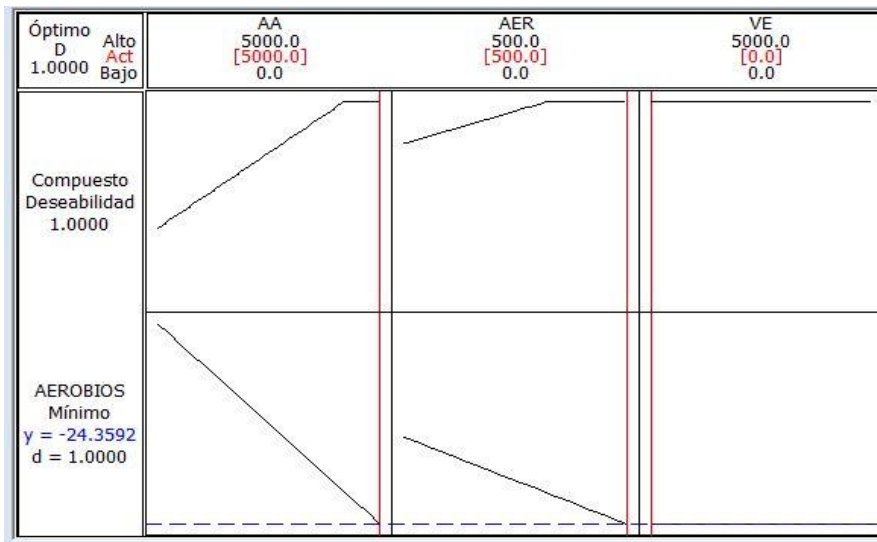


Figura 334: Formulación óptima

Fuente: Elaboración propia

Al comparar los resultados del tratamiento 3 con la mezcla óptima, se observa que los dos tienen igual concentración de ácido ascórbico, pero la concentración AER es diferente; esto implica que se produce un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el aceite esencial de romero, mejorando la inhibición de la actividad antimicrobiana.

El ácido ascórbico inhibe el crecimiento de *Aerobios mesófilos* en productos cárnicos, gracias al eugenol, uno de los componentes del romero (Serrano, et al, 2005), (Xong, Ho, Shahidi 2012).

4.1.3. *E. coli*, salmonella

Durante los 30 días de investigación no se desarrollaron ufc de *Escherichia coli* y *salmonella*; todos los tratamientos lograron inhibir estas bacterias.

La acción del ácido ascórbico reduce el pH de un alimento, evitando el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli* (Shaidi 2002). Martínez,

Molina y Boucort (1997) afirmaron que el ácido ascórbico inhibe la proliferación de *E. coli* en productos cárnicos.

El aceite esencial de romero en muestras in vitro inhibe el crecimiento de colonias de *Clostridium perfringens*, lo que permite sustituir total o parcialmente a los nitritos. (Amitage, Hettiarach y Moonsor 2002).

Según Klancnik (2009) y Boxinet (2007), el aceite esencial de romero inhibe cepas de *E. coli* cuando se aplica en una concentración igual a un MIC de 4 096 ppm, por lo que podemos concluir que en los tratamientos aplicados en esta investigación que contienen una mezcla de antioxidantes, se produce un mejor efecto a los causados individualmente; esta es la razón por la que no es necesario usar 4 096 ppm AER.

El AER mostró ser antibacteriano en pruebas in vitro para cepas de *E. coli*. (Weckesser 2001).

Klancnik et al (2009) evaluó la actividad del aceite esencial de romero contra bacterias Gram positivas (*Bacillus aureus* y *Staphylococcus* spp) y Gram negativas (*Salmonella* spp), demostrando que inhibe estas bacterias.

En el estudio de Moreira et al, en el año 2005, y Bozin et al, en el 2007, demostraron que el aceite esencial de hojas de romero es efectivo contra varias cepas de *E. coli*.

4.1.4 Comprobación hipótesis 3.1.2.1.

Formulaciones antioxidantes de vitamina C (ácido L-ascórbico), vitamina E (tocoferoles) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) inhiben el crecimiento microbiano en las salchichas de pollo.

Ho: ufcT1 = ufcT2 = ufcT3 = ufcT4 = ufcT5 = ufcT6 = ufcT7 = ufcT8 = ufcT9 = ufcT10 = ufcT11 = ufcT12 = ufcT13 = ufcT14

Ha: ufcT1 \neq ufcT2 \neq ufcT3 \neq ufcT4 \neq ufcT5 \neq ufcT6 \neq ufcT7 \neq ufcT8 \neq ufcT9 \neq ufcT10 \neq ufcT11 \neq ufcT12 \neq ufcT13 \neq ufcT14

ufc T = unidades formadoras de colonias de los 14 tratamientos.

Los resultados obtenidos de la prueba de ANOVA para los microorganismos *S. aureus*, *A. mesófilos*, *E. coli* y *salmonella* comprueban la hipótesis 3.1.2.1. Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Las formulaciones de antioxidantes de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (tocoferoles) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sí inhiben el crecimiento microbiano en las salchichas de pollo, pero sus efectos no son iguales al inhibir los microorganismos.

En los 30 días de investigación en las salchichas de pollo proliferó un número de bacterias inferior al que permite la norma INEN para salchichas de pollo tipo Frankfurt; esto nos permite concluir que desde el punto de vista microbiológico la vida útil de las salchichas de pollo tipo Frankfurt es de 30 días.

4.2. Rancidez de la grasa en salchichas de pollo tipo Frankfurt

4.2.1. Peróxidos

Debido a que las salchichas de pollo tipo Frankfurt tienen 15% de grasa, fue necesario analizar las concentraciones de peróxidos formadas durante los 30 días de la experimentación.

La calidad de la carne procesada se deteriora por la oxidación de lípidos, al producir peróxidos, que afectan en la vida útil de los alimentos (Sammet, et al 2006).

En el Anexo 3 se muestran los datos recogidos experimentalmente de los peróxidos formados en los 30 días de experimentación y se encuentran los datos con cambio de base a raíz de $n+1$.

La Figura 35 representa la cantidad de peróxidos en el día 30; los tratamientos que controlaron la formación de peróxidos fueron el 3, 13 y 14.

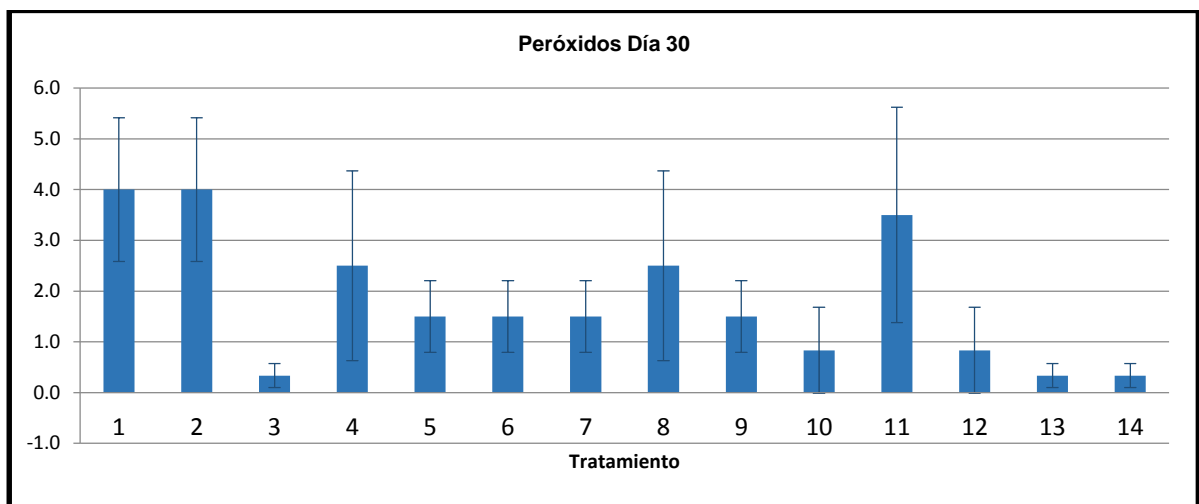


Figura 345: Peróxidos día 30

Fuente: Elaboración propia

Se realizó un ANOVA de bloques completamente al azar, utilizando la prueba de significancia de tukey, para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. En el Anexo 3 se presentan los resultados obtenidos.

En la Tabla 17 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en ANOVA para peróxidos, en los 30 días de experimentación.

Tabla 147: Resumen de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	P-valor
Día 0	13	0,0028	0,4613
Día 5	13	1,02	0,4313
Día 10	13	2,59	0,0189
Día 15	13	5,16	0,0002
Día 20	13	3,19	0,0057
Día 25	13	5,04	0,0002
Día 30	13	7,45	0,001

La prueba de tukey refleja que existen diferencias significativas entre los tratamientos a partir del día 10. En los días 0 y 5 no existen diferencias significativas, y la cantidad de peróxido es baja; a partir del día 10 se produce un pequeño incremento en los valores de peróxido y también se reportan diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 3).

La Tabla 18 muestra los promedios y las desviaciones estándar de los días 15, 20, 25 y 30, con la prueba de significancia de tukey, que demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos, como se puede observar por la presencia de diferentes letras. Esto significa que no todos los tratamientos controlan de la misma manera el deterioro de las grasas de las salchichas. Los mejores tratamientos son el 3, 13 y 14.

Tabla 158: Peróxidos

Peróxidos				
	DÍA 15	DÍA 20	DÍA 25	DÍA 30
	PROMEDIO ± DES. ESTÁNDAR	PROMEDIO ± DES. ESTÁNDAR	PROMEDIO ± DES. ESTÁNDAR	PROMEDIO ± DES. ESTÁNDAR
1	1,3 ± 0,94 b	1,5 ± 0,71 a	3,0 ± 1,41 a	4,0 ± 1,41 a
2	1,3 ± 0,94 a	1,5 ± 0,71 a	1,5 ± 0,71 ab	4,0 ± 1,41 a
3	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,3 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b
4	1,3 ± 0,94 a	1,3 ± 0,94 b	1,3 ± 0,94 a	2,5 ± 1,87 ab
5	0,3 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b	1,5 ± 0,71 ab	1,5 ± 0,71 ab

6	0,0 ± 0,00 b	0,2 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b	1,5 ± 0,71 ab
7	0,0 ± 0,00 b	0,2 ± 0,24 b	1,0 ± 0,71 ab	1,5 ± 0,71 ab
8	0,8 ± 0,85 b	1,3 ± 0,94 b	1,3 ± 0,94 ab	2,5 ± 1,87 ab
9	0,0 ± 0,00 b	0,2 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b	1,5 ± 0,71 ab
10	0,0 ± 0,00 b	0,2 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b	0,8 ± 0,85 b
11	0,8 ± 0,85 b	1,3 ± 0,94 b	2,5 ± 1,87 b	3,5 ± 2,12 b
12	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,3 ± 0,24 b	0,8 ± 0,85 b
13	0,0 ± 0,00 b	0,2 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b
14	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b	0,3 ± 0,24 b	0,3 ± 0,24 b

Fuente: Elaboración propia

La cantidad de peróxidos producidos en las salchichas de pollo están dentro de los límites permisibles; todos los tratamientos controlaron la proliferación de peróxidos, esto se comprueba por lo afirmado por (Gutiérrez 2000), (Kavashima 1979) y (Aoyama 1988). El poder sinergista del ácido ascórbico se manifiesta al unirse con otro antioxidante como la vitamina E, para mejorar el poder antioxidante en los lípidos y proteínas de las membranas celulares, dando mayor protección contra oxidantes en los alimentos.

Estévez y Cava (2005) comprobaron que el aceite esencial de romero inhibe la oxidación lipídica y proteica de un alimento.

En los estudios de Sánchez, Djename y Beltrán (2003) se comprobó que la combinación de ácido ascórbico y aceite esencial de romero ejercía mayor protección a la oxidación de la mioglobina y de los lípidos.

Los tocoferoles son secuestradores de radicales libres y de radicales peróxidos (Maestro, Borja 1993).

Un medio acuoso ácido, como es el caso de las salchichas, produce un grado de hidrólisis, esto permite una liberación de tocoferol, que actúa como antioxidante evitando el enranciamiento de las salchichas (Scholer, 1990).

La estabilidad de los tocoferoles es mayor que de otros antioxidantes en alimentos con altos contenidos lipídicos al ser calentados (Pongratz 1988).

4.2.2. Comprobación hipótesis 3.1.2.2

Formulaciones antioxidantes de vitamina C (ácido L-ascórbico), vitamina E (tocoferoles) y aceite esencial de romero (*Rosmarines officianalis*) controlan la rancidez de los lípidos en las salchichas de pollo.

Ho: P T1 = P T2 = P T3 = P T4 = P T5 = P T6 = P T7 = P T8 = P T9 = P T10 = P T11 = P T12 = P T13 = P T14

Ha: P T1 ≠ P T2 ≠ P T3 ≠ P T4 ≠ P T5 ≠ P T6 ≠ P T7 ≠ P T8 ≠ P T9 ≠ P T10 ≠ P T11 ≠ P T12 ≠ P T13 ≠ P T14

P T = Peróxidos de los 14 tratamientos.

Se puede concluir, en base a los resultados obtenidos en ANOVA, que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; es decir, que los tratamientos son estadísticamente diferentes en cuanto al control de peróxidos en las salchichas de pollo.

4.3. Propiedades físicas

4.3.1. Potencial hidrógeno

Todos los tratamientos se encuentran dentro del límite permitido según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1338:96 (1996), que es de 6,2 para salchichas tipo Frankfurt.

Los datos obtenidos de pH tomados desde el día 0 hasta el día 30 se describen en Tabla 54.

El pH se mantuvo dentro de los rangos permitidos como se observa en la Figura 36, para todos los tratamientos durante los 30 días de estudio.

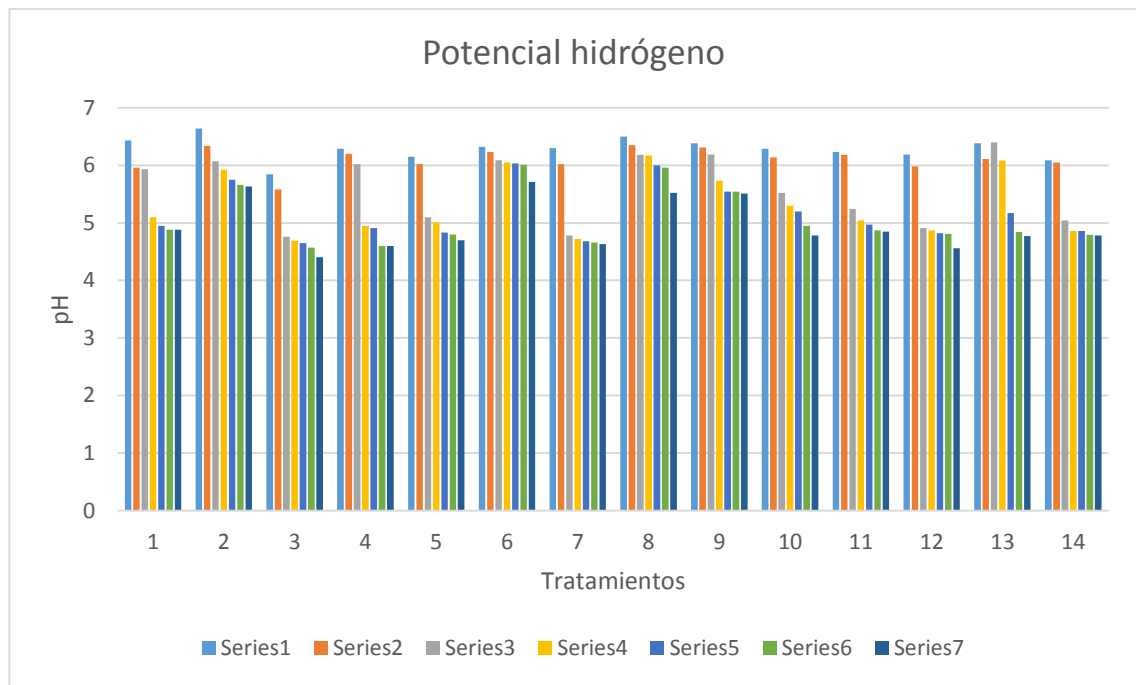


Figura 356: pH de los 14 tratamientos durante los 30 días de estudio

Fuente: Elaboración propia

Serie 1 día 0, Serie 2 día 5, Serie 3 día 10, Serie 4 día 15, Serie 5 día 20, Serie 6 día 25, Serie 7 día 30.

4.3.1.1. Comprobación hipótesis 3.1.2.3

Formulaciones de vitamina C (ácido L-ascórbico), vitamina E (Ktocoferoles) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) modifican las características físico-químicas de las salchichas de pollo.

Potencial hidrógeno:

Ho: pH T1 = Ph T2 = Ph T3 = Ph T4 = Ph T5 = Ph T6 = Ph T7 = Ph T8 = Ph T9 = Ph T10 = Ph T11 = Ph T12 = pH13 = pH14

Ha: pH1 \neq pH2 \neq pH3 \neq Ph T4 \neq Ph T5 \neq Ph T6 \neq Ph T7 \neq Ph T8 \neq Ph T9 \neq Ph T10 \neq Ph T11 \neq Ph T12 \neq Ph T13 \neq Ph T14

Ph T= Potencial hidrógeno de los 14 tratamientos.

Con los resultados de ANOVA, con la prueba de significancia de tukey, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna; esto quiere decir que las formulaciones de los 14 tratamientos controlan el pH, bajo los límites de la norma INEN; de igual manera, no existen diferencias significativas entre ellos.

4.3.2. Acidez

Los datos tomados de la acidez titulable para las salchichas de pollo se muestran en el Anexo 5.

La acidez titulable constituye la presencia de ácidos orgánicos libres en una muestra. Para determinar la acidez se tomó en cuenta el ácido orgánico más abundante, que es el ácido acético. En este caso la acidez de las salchichas se mantuvo en los rangos establecidos por la norma INEN (Figura 37).

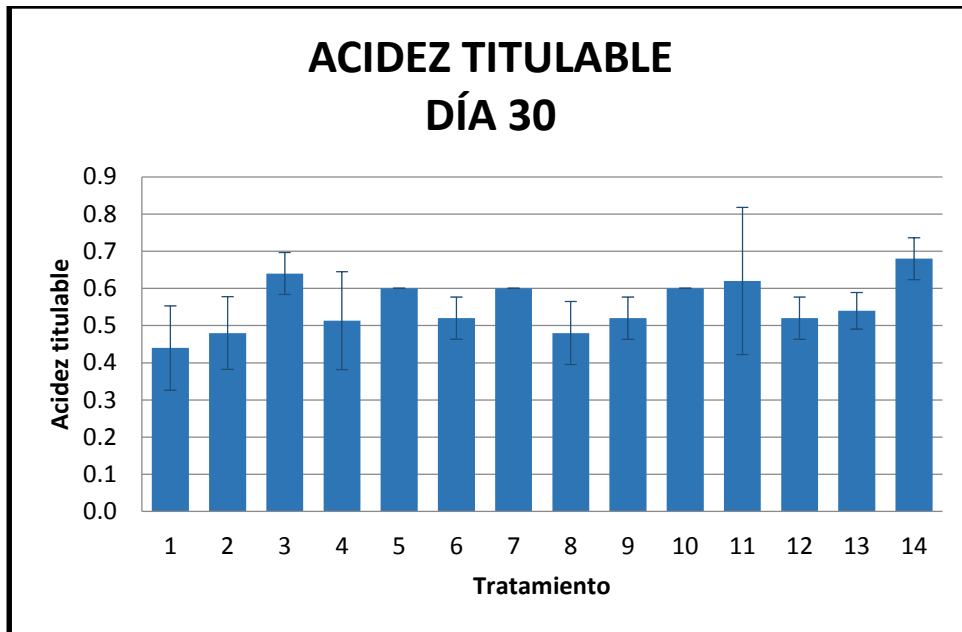


Figura 367: Acidez titulable

Fuente: Elaboración propia

4.3.2.1. Comprobación hipótesis 3.1.2.3

Formulaciones de vitamina C (*ácido L-ascórbico*), vitamina E (*tocoferoles*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) modifican las características físico-químicas de las salchichas de pollo.

Acidez titulable:

$$H_0: A T1 = A T2 = A T3 = A T4 = A T5 = A T6 = A T7 = A T8 = A T9 \\ = A T10 = A T11 = A T12 = A T13 = A T14$$

$$H_a: A T1 \neq A T2 \neq A T3 \neq A T4 \neq A T5 \neq A T6 \neq A T7 \neq A T8 \neq A T9 \\ \neq A T10 = A T11 \neq A T12 \neq A T13 \neq A T14$$

A T= Acidez de los 14 tratamientos.

Los resultados de ANOVA con la prueba de significancia de tukey permiten concluir que se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna; esto quiere decir que las formulaciones de los 14 tratamientos controlan la acidez de las salchichas de pollo; no existen diferencias significativas entre ellos.

4.4. Efecto antioxidante

Para la determinación del porcentaje del efecto antioxidante se tomaron en cuenta las soluciones formadas por los tratamientos 11, 12 y 13, que fueron los que presentaron mejores resultados tanto en la inhibición de microorganismos como en el mantenimiento de las propiedades físicas de las salchichas de pollo.

La Tabla 19 representa la absorbancia de la formulación del tratamiento 11 tomada durante 30 minutos. Como se puede observar, la absorbancia va descendiendo a medida que la solución neutraliza el radical libre del DPPH (Figura 38).

Tabla 169: Efecto antioxidante tratamiento 12

Tiempo (minutos)	Absorbancia T12
1	1,175
2	1,175
3	1,171
4	1,156
5	1,143
6	1,099
7	1,034
8	0,987
9	0,965
10	0,934
11	0,912
12	0,865
13	0,856
14	0,803
15	0,705
16	0,689
17	0,546
18	0,543
19	0,349
20	0,245

22	0,143
23	0,099
24	0,038
25	0,025
26	0,025
27	0,025
28	0,025
29	0,025
30	0,025

Fuente: Elaboración propia

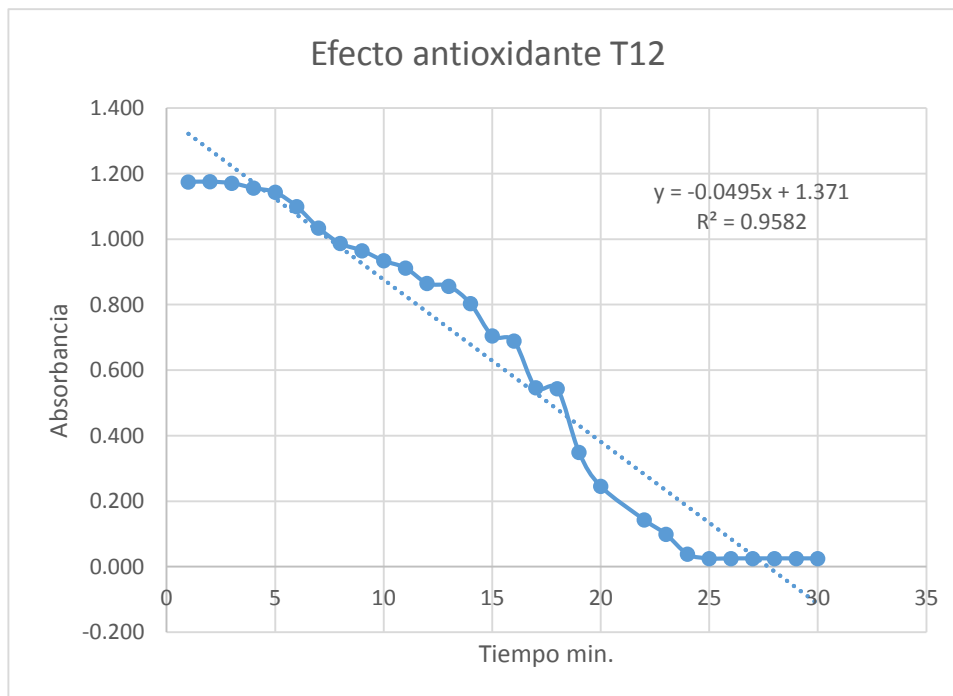


Figura 378: Efecto antioxidante tratamiento 12

Fuente: Elaboración propia

La absorbancia disminuye con el tiempo y tiene una relación lineal, como se muestra en la ecuación de regresión: $y = -0,0495x + 1,371$ y tiene un $R^2 = 0,958$.

En los tratamientos 12 y 13 se produjo el mismo efecto al ser mezclado con el DPPH, como se puede observar en la tabla 20 y 21 y las Figuras 39 y 40.

Tabla 17: Efecto antioxidante tratamiento 11

Absorbancia T12	Tiempo (minutos)
0,476	1
0,475	2
0,458	3
0,438	4
0,423	5
0,423	6
0,421	7
0,406	8
0,389	9
0,336	10
0,328	11
0,317	12
0,299	13
0,291	14
0,287	15
0,265	16
0,232	17
0,233	18
0,245	19
0,234	20
0,224	22
0,217	23
0,213	24
0,205	25
0,205	26
0,205	27
0,205	28
0,205	29
0,205	30

Fuente: Elaboración propia

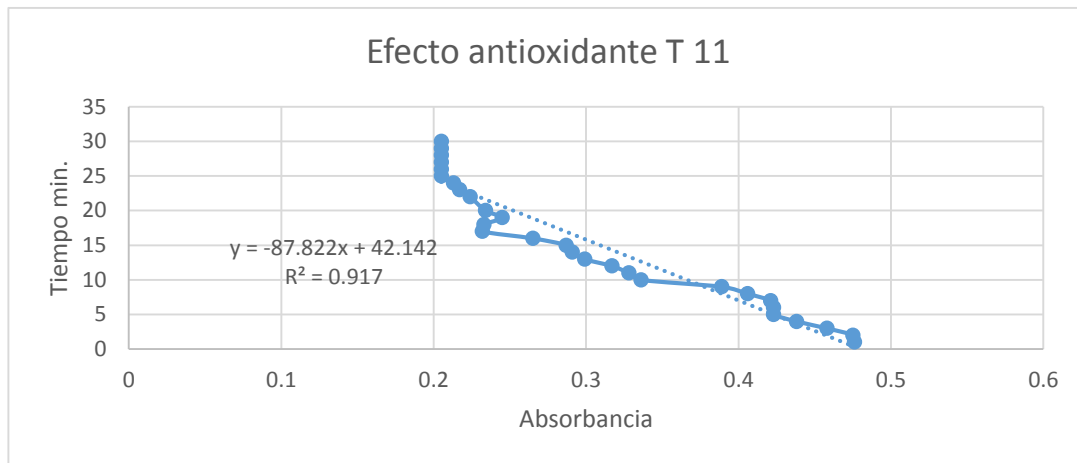


Figura 389: Efecto antioxidante tratamiento 11

Fuente: Elaboración propia

Tabla 181: Efecto antioxidante tratamiento 13

Tiempo (minutos)	Absorbancia T13
1	0,941
2	0,846
3	0,775
4	0,725
5	0,698
6	0,654
7	0,587
8	0,466
9	0,405
10	0,396
11	0,345
12	0,28
13	0,299
14	0,185
15	0,109
16	0,099
17	0,056
18	0,055
19	0,147

20	0,041
22	0,032
23	0,028
24	0,025
25	0,005
26	0,009
27	0,008
28	0,003
29	0,003
30	0,003

Fuente: Elaboración propia

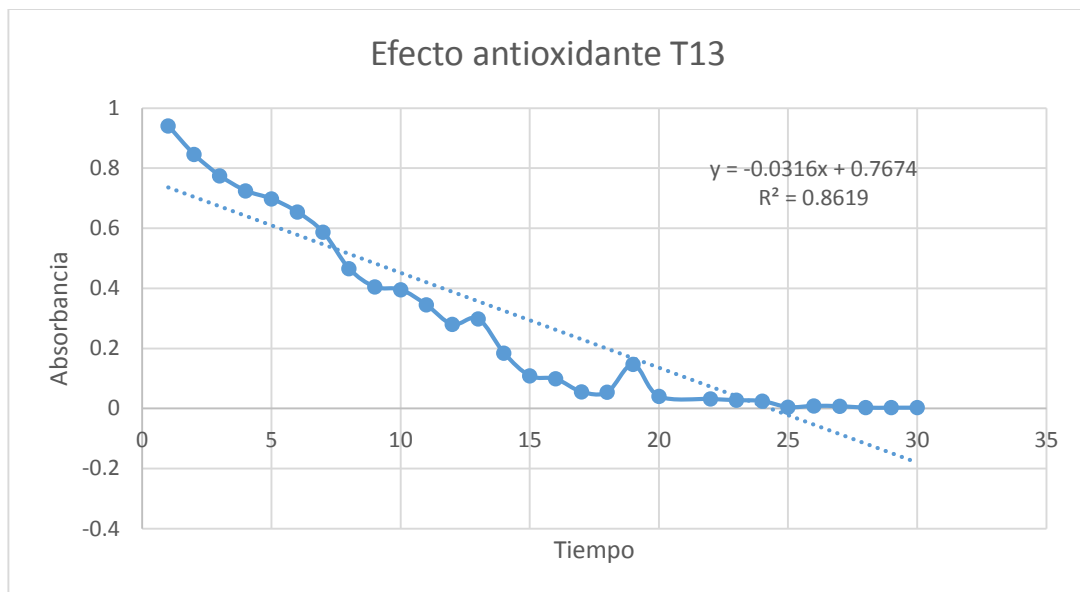


Figura 40: Efecto antioxidante tratamiento 13

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje del efecto antioxidante de las formulaciones de los tratamientos fue para el tratamiento 12 el 97,8%; para el tratamiento 11 se obtuvo el 56,9%; para el tratamiento 13 fue 96,8%. Como se puede observar, el tratamiento T13 (800 ppm AA, 800 ppm VE, 300 ppm AER) tiene un mayor efecto antioxidante que el T12 (1 000 ppm AA, 800 ppm VE, 400 ppm AER) y que el T11 (0 ppm AA, 1 000 pmm VE, 400 ppm AER).

CONCLUSIONES

1. Las formulaciones antioxidantes y antimicrobianas naturales formadas por Vitamina C, Vitamina E y aceite esencial de romero (*Rosmaninus officianalis*) inhibieron la proliferación de bacterias, con mejores resultados que el tratamiento con BHT.
2. Todas las formulaciones de antioxidantes naturales inhibieron totalmente a las bacterias *E. coli* y *salmonella*, durante los 30 días de experimentación.
3. Los tratamientos 3, 7, 8, 9, 11, 12 y 13 inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, de tal manera que se encuentran dentro de los límites establecidos por la norma INEN 1388:2010 del Ecuador, en los 30 días de investigación.
4. Todos los tratamientos inhibieron el crecimiento de bacterias *A. mesófilos* en los 30 días de investigación; no se pasaron los límites establecidos por la norma INEN 1388:2010 del Ecuador.
5. El tratamiento 12 que contiene 800 ppm de AA, 800 ppm de VE, 300 ppm de AER tuvo 155 ufc de *S. aureus* en el día 30. Sin embargo, este tratamiento es estadísticamente similar al 7, 8, 11, 12, según la prueba de tukey.
6. El modelo multivariante para las combinaciones de las formulaciones de antioxidantes naturales a base de Vitamina C, Vitamina E y Aceite Esencial de Romero es: $S. aureus = 17.34 - 0,04 \text{ ácido ascórbico} + 0.12 \text{ Aceite esencial de romero} - 0.03 \text{ vitamina E} + 5.9 * 10^{-5} \text{ ácido ascórbico}$

* ácido ascórbico – $3.45 * 10^{-4}$ Aceite esencial de romero * Aceite esencial de romero – $1.52 * 10^{-5}$ vitamina E * vitamina E.

7. Al realizar una minimización con las formulaciones estadísticamente similares para *S. aureus*, se encontró que la combinación de antioxidantes naturales óptima es 404 ppm de AA, 400 ppm de AER y 1 000 ppm de VE.
8. Las bacterias de *aerobios mesófilos* fueron controlados por todos los tratamientos durante los 30 días de investigación, con excepción del T1 y T2 (100 ppm BHT).
9. Los tratamientos que reportaron menores unidades formadoras de *A. mesófilos* fueron el T2, T11 y T13.
10. El T6 es el tratamiento que reportó mayor cantidad de *A. mesófilos* con un valor de 32 233 ufc, para el día 30; este valor sigue siendo menor que el límite permitido por la norma INEN 1388:2010.
11. Para *Aerobios mesófilos* se encontró la ecuación: *Aerobios mesófilos* = $205.8 - 0.03 \text{ ácido ascórbico} - 0.13 \text{ aceite esencial de romero} + 4.52 + 10^{-5} \text{ Vitamina E}$
12. Para la inhibición de *A. mesófilos* se encontró que la combinación óptima obtenida es 5 000 ppm de vitamina C, 500 ppm de aceite esencial de romero y 0 ppm de vitamina E.
13. Todos los tratamientos controlaron la proliferación de peróxidos en las salchichas de pollo; los tratamientos que según la prueba de tukey son similares: los tratamientos 13, 2, 14, 10 y 11.

14. Todos los tratamientos mantuvieron los niveles de pH en los límites aceptados por la norma INEN del Ecuador.
15. A las formulaciones naturales formadas por AA, VE y AER, se las puede usar como preservantes de salchichas de pollo tipo Frankfurt, en un período de 30 días.
16. Los tratamientos 11, 12 y 13 tuvieron mejores efectos en la inhibición de bacterias que el BHT.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios de antioxidantes naturales con otros aceites esenciales como el de jengibre y guayaba.
2. Se recomienda realizar la experimentación en más de 30 días para conocer exactamente hasta cuándo se puede alargar la vida útil de las salchichas de pollo tipo Frankfurt.
3. Se recomienda realizar un análisis sensorial de las salchichas de pollo a las que se les ha aplicado las formulaciones antioxidantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Parrilla, 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas. Disponible en: http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf, [Consulta 09/ Nov. /2007]
- Aoyama, M., Maruyama, T., Niiya, I. and Akatsuka, S. 1987. Antioxidant effects of tocopherols on palm oil frying test. *J. Jap.Soc. Food Sci. Technol.* 34 (11): 714-719
- Aoyama, M., Maruyama. T., Kanematsu, H., Niiya, I., Tsukamoto, M., Tokairin, 8. Y Matsumoto. T. (1986b). - "Studies of the improvement of antioxidant effect of tocopherols. X I. Antioxidant efficiencies and effective tests on margarine". *Yukagaku* 35, 449-453.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., & Löliger, J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22(2), 257-268.
- 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 naturales esenciales como conservantes en la elaboración de salchichas de pollo. Tesis de maestría. Universidad Politécnica Salesiana. Ecuador.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7009/1/UPSCT003676.pdf>
- Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y., & González-Aguilar, G. A. (2005). Methyl ...jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest

life of strawberry fruit. *European Food Research and Technology*, 221(6), 731.

Bailly, M. (2002). Production of organic acids by bipolar electro dialysis: realizations and perspectives. *Desalination*, 144(1-3), 157-162.

Barreiro, M., y Vera, L. (2017). Efecto del ácido ascórbico en el pardeamiento enzimático de la pulpa de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenada a diferentes temperaturas de congelación. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Tesis de pregrado. Ecuador.

Basabe, B. (2000). Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 14(1), 46-54

Begin, A., & Van Calsteren, M. R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63-67.

Beuchat, L. R., Farber, J. M., GARRETT, 3, E. H., Harris, L. J., Parish, M. E., Suslow, T. V., & Busta, F. F. (2001). Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1079-1084

Bernard, C., & Bert, P. (1878). *La science expérimentale*. JB Baillièrè & fils.

Branen, A. L., Davidson, P. M., & Katz, B. (1980). Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technology (USA)*.

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. Zaragoza: Acribia S.A.

Bunge, M. (2006). *A la Casa de la Realidad*. Gedisa. Barcelona 175- 262.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253
- Buxiang, S., and Fukuhara, M. (1997) Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavanoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology*, 122, 61-72
- Bonilla, T. (2012). Aplicación del orégano como conservante para extender el tiempo de vida útil de hamburguesa refrigerada. Tesis tercer nivel. Universidad tecnológica Equinoccial. Ecuador.
http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5010/1/51567_1.pdf
- Cadenas, E., & Packer, L. (2005). *Handbook of Antioxidants*. New York: Taylor & Francis.
- Campos, J., Ruiz, R. y Díaz, E. (2002). Efecto sinérgico del hidroxibutiltolueno (BHT) y ácido ascórbico en un producto cereal lactado, *Revista amazónica de investigación*, 2(1), 89–95. Recuperado de: <http://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol2/9.pdf>
- Campos, C. Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y almacenamiento de alimentos. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n2705_Campos.pdf
- Cardona Henao, L. E., Mejía, G., & Fernando, L. (2009). EVALUATION OF ANTIOXIDANT EFFECT OF ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS OF EUGENIA CARYOPHYLLATA, ORIGANUM VULGARE AND THYMUS VULGARIS. *Biosalud*, 8(1), 58-70.

- 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*, 6(1), 54–55
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bohn SK, Dragland S, Smpson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Snada C, Barikmo I, Berthe N, Willett KM, Jacobs DR Jr. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs, and supplements used worllwide. *Nutr J* 2010 p. 9-11
- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal*, 13(9), 1007-1024.
- Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., & Córdoba, M. G. (2012). Microbiological quality of salchichon and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control*, 24(1), 191-198. PARA DISCUSIÓN
- Castaño, H. I., Ciro, G., Zapata, J. E., & Jiménez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17(2).
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553-559.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
- Christen W, Gaziano J, Hennekens C. (2000) Design of Physician-Health Study II- a randomized trial of beta-carotene, vitamins E and C, and multivitamins in

prevention of cancer, cardiovascular disease, and eye disease, and review of results of completed trials. *Ann Epidemiol*, 125-34.

Davidson, P. M., & Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials. Zeuthen P and Bogh-Sorensen L. Food preservation techniques. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, 5-30.

Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2013). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food microbiology* (pp. 765-801). American Society of Microbiology.

Del Bano, et al, 2003. Aruoma, Halliwell, Aesch y Loliger, 2003; Del Bano, et al, 2003.

Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J. A., Ortuño, A.,... & Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.

Del Valle, E. M., (2003). Preservación de frutas y hortalizas, mediante métodos artesanales. Disponible en: <http://www.ocetif.org/buenaspracticass.html> [Consulta 03 /Nov. /2007

Descartes, R. (2004). Discurso del método. Ediciones Colihue SRL.

Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beefsteaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76(4), 407-415.

Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.

Dziejak, J. D. (1990). Taking the gamble out of product development. *Food Technology*, 44(6), 110.

- Gavilán, Á. (2012). Seguridad Alimentaria y nutrición: Actualidad y nuevos enfoques. Santiago de Compostela: AFCA.
- Galarza, A. (2001). Niveles de ácido benzoico en productos lácteos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. <http://eprints.uanl.mx/882/1/1080094996.PDF>
- Gershoff, S. N. (1993). Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements. *Nutrition Reviews*, 51(11), 313-326
- Gey KF. (1995) In *Free Radicals, Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis Biological and clinical Aspects*, Bellomo and C. Rice-Evans, Eds, Richelieu Press. London, 9: 53-99.
- Gey KF. (1998). Vitamin E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *Biofactor*, Issue. 113-174.
- Gil, E. y Sáenz, A. (2000). Obtención de aceite esencial de Cardamomo, *Revista universidad EAFIT*, 36 (118), 15-21. Recuperado de: <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/1031/931>
- Guerra, L (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional. Tesis maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. <http://eprints.uanl.mx/2455/1/1080223835.pdf>
- Gutiérrez, B. (2000). *Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos*. España: Díaz de Santos.
- Halliwel B, Gutteridge JMC. (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press. 1989.
- Halliwel, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-724S.

- Halliwell, B., Chirico S. (1993) Lipid peroxidation, its mechanism, measurement and its significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57 pp. 715s–725s.
- Hernández, A. (2014). Incorporación de conservantes naturales en los piensos para peces: optimización de la calidad y vida útil de la dorada. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. España. [file:///Users/janethproano/Downloads/Tesis%20%C3%81ngel%20Hern%C3%A1ndez%20Contreras%20sin%20art%C3%ADculos%20\(1\).pdf](file:///Users/janethproano/Downloads/Tesis%20%C3%81ngel%20Hern%C3%A1ndez%20Contreras%20sin%20art%C3%ADculos%20(1).pdf)
- Hernández, E., Ponce, E., Jaramillo, M., & Guerrero, I. (2007). Efecto antioxidante de extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) de Salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) y de Orégano mexicano (*Lippia* spp) en pastas cárnicas. RESPYN
- Hinton Jr, A., & Ingram, K. D. (2006). Antimicrobial activity of potassium hydroxide and lauric acid against microorganisms associated with poultry processing. *Journal of food protection*, 69(7), 1611-1615.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Piotrowska, R., Foss, M., & Meyer, R. L. (2015). Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Frontiers in microbiology*, 6.
- INEN. (2013). Norma general del códex para los aditivos alimentarios (MOD). NTE INEN-CODEX 192:2013.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, 76(6), 626-631.
- Kabara, J. J. (1991). Chemistry and biology of monoglycerides in cosmetic formulations. *Cosmetic science and technology series*, 11, 311-344.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts

containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.

- Kant, I. (1881). *Fundamentos de una metafísica de las costumbres* (Vol. 3). Dirección y Administración.
- Karpinska-Tymoszczyk M. Effect of the addition of ground rosemary on the quality and shelf-life of turkey meatballs during refrigerated storage. *Brit Poultry Sci.* 2008 Nov; 49 (6): 742-750.
- Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., & Chibata, I. (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27(8), 1912-1916.
- Kawashima, K., Ono, I. y Chibata, I. (1979). "Synergistic ternary antioxidant composition comprising tocopherol, partial hydrolyzate of gelatin and organic acid". *Agrie. Biol. Chem.* 43, 827-831. C.A. 91:18459v.
- Lee Y, Shacter E (1999). «Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells». *J Biol Chem* 274 (28): pp. 19792-8.
- Leguérinel, I., & Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International journal of food microbiology*, 63(1), 29-34.
- Lelli J, Becks L, Dabrowska M, Hinshaw D. (1998). «ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells». *Free Radic Biol Med* 25 (6): pp. 694-702.
- Lennon S, Martin S, Cotter T (1991). «Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli». *Cell Prolif* 24 (2): pp. 203.
- Marcos, B. (2007). *Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes*. Tesis doctoral. Universidad de Girona. España.

- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. Medellín: Universidad de Antioquía
- Masagati, T. (2013). Chemistry of food additives and preservatives. Oxford: WILEY-BLACKWELL.
- Matamoros, L., (1998). Aumenta el uso de antimicrobianos naturales en la UE para garantizar la seguridad de los alimentos manteniendo sus características. Disponible en: <http://www.salud7.com.mx/nutricion/2006/12/antimicrobianosnaturales-y-conservacin.html> [Consulta 28 / Oct. /2007]
- Méndez, A. (2011). Science and technology against pathogens. World scientific: Singapore
- Montagnani, M. (SA) Optimización de la calidad de jaleas y mermeladas de reducido tenor glucídico mediante el uso de aditivos naturales. Tesis maestría. Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Buenos Aires.
<http://posgrado.frba.utn.edu.ar/investigacion/tesis/MTA-2012-Maria%20Montagnani.pdf>
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT-Food Science and Technology, 38(5), 565-570.
- Moreira, M., Ponce, A., Del Valle, C. y Roura, S. (2005). Parámetros inhibitorios de aceites esenciales para reducir un patógeno de transmisión alimentaria. LWT-Food Ciencia y Tecnología. 565-570.
- Moret, Y. (1997). Vitamina C influencia que ejerce en la cicatrización y alteraciones de la cavidad bucal. Caracas: Universidad central de Venezuela.
- Moulines, C. U. (1979). La génesis del positivismo en su contexto científico. Cátedra de Geografía Humana, Facultad de Geografía e Historia, Universidad de Barcelona.

- Nakai, S., Molder, W. (2000). Food proteins: processing applications. Estados Unidos: Willey-Vc
- Nychas, G.J.E. 1995. Natural Antimicrobials from plants. En: New Methods of food preservation. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. p. 1-21. Citado en: Welti-Chanes, J., Vergara Balderas, F., y López-Malo, A. 1997. Minimally Processed foods state of the Art and Future. En: P. Fito., E. Ortega Rodríguez y G. Barbosa-Canovas (Eds.). Food Engineering 2000. E.U.A. Chapman y Hall. pp. 181-212.
- Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., & Yagi, A. (1994). Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves. *Phytochemistry*, 37(5), 1463-1466.
- Oluwatuy, M., Kaatz, G., y Gibbons, S. (2004). Antibacteriana y resistencia a la actividad de la modificación de Rosmarinus officinalis. *Fitoquímica*, 3249 – 3254.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., & García, M. D. (2007). Determination of N-methylcarbamate pesticides in environmental samples by an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method based on post-column photolysis and chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1164(1), 174-180.
- Perrig, W. J., Perrig, P., & Stähelin, H. B. (1997). The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45(6), 718-724
- Plaus, A., Flores, G., Ataucusi, S (2001), Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano), 12(1), 16-19 recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018130X2001000100004&script=sci_arttext

Platinetti, L. Porcal, M. y Sánchez, R. (2016) Galletas a base de harina de trigo enriquecidas con extracto de jengibre rico en plifenoles. Tesis licenciatura en nutrición. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4614/Informe%20FINAL%20Tesis%20Jengibre.pdf?sequence=1>

Plumridge, A., Hesse, S. J., Watson, A. J., Lowe, K. C., Stratford, M., & Archer, D. B. (2004). The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Applied and environmental microbiology*, 70 (6), 3506-3511.

Pokorny J. Yanishlieva N. Gordon M. (2001) Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial ACRIBA S.A. España p. 364.

Popper, K. R., & Popper, K. R. (1989). La lógica de la investigación científica. REI.

Prange, A., Modrow, H., Hormes, J., Krämer, J., & Köhler, P. (2005). Influence of mycotoxin producing fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on gluten proteins during suboptimal storage of wheat after harvest and competitive interactions between field and storage fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(17), 6930-6938.

Raccach, M. (1984). The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: A review. *Journal of Food Safety*, 6(3), 141-170.

Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques.

Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T.,... & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts

- containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology*, 56(1), 3-12.
- Repeto M. Repeto G. (2002). *Toxicología fundamentos*. Cuarta Edición. Ediciones Santos. España. P. 450.
- Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science*, 82(4), 632-639
- Rodríguez, E., Arias, G., Vásquez, J., Martínez, R., & Stashenko, E. (2012). *Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis y Psidium guajava obtenidos con co2*. *Acad. Colomb. Ciencias*, 305-316.
- Robles, M. (2010). Efecto de extractos de productos naturales para controlar la presencia de *Campylobacter jejuni* y *Salmonella spp*, en carne molida de pollo. Tesis maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
<http://eprints.uanl.mx/2237/1/1080156748.pdf>
- Romeu, C., Botta, E., Díaz, Y. (2007). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) y evaluación in vitro de su actividad acaricida, 11(2), 75-78, recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116152003>
- Rosberg, F. (2004). *Generalidades y características de los ácidos orgánicos*. Málaga: Mondragón.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4 C in vacuum packages. *Journal of Food Protection*, 65(2), 299-307.

- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 8(3), 121-137.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J. A., & Roncales, P. (2003). Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, 68(1), 339-344
- Sangha O, Stucki G. (1998) Vitamin E in therapy of rheumatic diseases. *Z Rheumatol*, 207-14.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Schafer F., Buettner G (2001). «Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple». *Free Radic Biol Med* 30 (11): pp. 1191-212.
- Schuler, P. (1990). "Natural antioxidants exploited commercially" en "Food antioxidants". Ed. Hudson, B.J.F. Elsevier Applied Science. Londres y Nueva York, pág. 99-170.
- Shafiur, M. (2007). Handbook of food preservation. Boca raton: Crc. Press.
- Shahidi, F., Wanasundara, U. N., & Amarowicz, R. (1994). Natural antioxidants from low-pungency mustard flour. *Food Research International*, 27(5), 489-493.
- Shtenberg, A. J., & Ignat'Ev, A. D. (1970). Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Food and cosmetics toxicology*, 8(4), 369-380.
- Sies H, Sthal W. (1995). Vitamins E and C, betha-carotene, and other carotenoids as antioxidants *J Am Clin Nutr* 62(suppl): 1315S-1321S.

- Sies, H., & Krinsky, N. I. (1995). The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1299S-1300S.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), 201-222.
- Smulders, F. J. M., & Greer, G. G. (1998). Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 44(3), 149-169.
- Soomro, A. H., Masud, T., & Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.
- Stewart, A. (2012). *The Oxford Francis Bacon I: primeros escritos 1584-1596*.
- Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-459.
- Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition research*, 20(3), 449-459.
- Temple, W. J., & Saettler, E. B. (2000). Locally recurrent rectal cancer: role of composite resection of extensive pelvic tumors with strategies for minimizing risk of recurrence. *Journal of surgical oncology*, 73(1), 47-58.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 13(1), 12-21.
- Torrenegra, M. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de orégano (*Origanum vulgare*), orégano “borde blanco” (*Origanum vulgare* ssp) y oreganito (*Lippia alba* mill) cultivado en la zona norte del Departamento de Bolívar

(Colombia). Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

<http://www.bdigital.unal.edu.co/39674/1/45506760.2014.pdf>

Valero, M., & Giner, M. J. (2006). Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International journal of food microbiology*, 106(1), 90-94.

Valko M., Morris H., Cronin, M. (2005). «Metals, toxicity and oxidative stress». *Curr Med Chem* 12 (10): pp. 1161-208.

Vieira, E. (2003). *Elementary Food Science*. Massachusetts: Chapman & Hall.

Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335-342.

Wang X, Quinn PJ. (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.* 1 309-336

Wang, X., & Quinn, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in lipid research*, 38(4), 309-336.

Yang M, Koo SL, Song WO, Chun OK. Food matrix effecting anthocyanin bioavailability. *Curr Med Chem* 2011. 291-300

Zambiasi, C. (1999). Oxidation reactions of vegetable oils and fats. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Brazil)*.

ANEXOS

Las tablas que se muestran a continuación representan los datos tomados en el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Américas, Quito, de las bacterias *S. aureus* y *A. mesófilos*, utilizando muestras de las salchichas a las que se les colocó los 14 tratamientos de esta investigación.

El Anexo 1 es de datos *S. aureus*, datos transformados, ANOVA y el modelo de superficie de respuesta.

El Anexo 2 es de datos *A. mesófilos*, datos transformados, ANOVA y el modelo de superficie de respuesta.

Se determinaron también las propiedades físico-químicas de las salchichas de pollo tipo Frankfurt; se analizó el pH, la acidez y peróxidos.

El Anexo 3 es de datos de peróxidos, datos transformados y ANOVA.

El Anexo 4 es de datos de pH.

El Anexo 5 es de datos de acidez.

En el Anexo 6 se encuentran las pruebas de comprobación de supuestos de ANOVA.

Anexo 1: Datos *S. aureus*Tabla 192: Datos de ufc de *S. aureus* por días

Repetición	Tratamiento	<i>S. aureus</i> día 0	<i>S. aureus</i> día 5	<i>S. aureus</i> día 10	<i>S. aureus</i> día 15	<i>S. aureus</i> día 20	<i>S. aureus</i> día 25	<i>S. aureus</i> día 30
1	1	0	33	67	100	233	233	3267
1	2	0	0	67	133	967	5 767	13 200
1	3	0	0	0	67	233	267	300
1	4	33	67	100	133	167	833	6 067
1	5	0	33	67	100	2 667	31 400	31 567
1	6	0	0	167	400	1 867	2 767	4 400
1	7	0	0	33	33	200	367	667
1	8	0	0	33	100	233	233	
1	9	0	0	0	67	100	233	367
1	10	0	0	67	67	67	167	900
1	11	0	0	133	300	300	367	467
1	12	0	0	67	133	200	233	267
1	13	0	0	0	67	233	267	300
1	14	0	0	0	33	100	200	5 933
2	1	0	0	0	33	33	67	2967
2	2	0	0	0	33	767	5 400	13 333
2	3	0	0	33	33	100	233	600
2	4	0	33	100	100	200	1 000	10 700
2	5	0	0	0	133	6 967	32 233	37 900
2	6	33	33	67	100	1 233	2 767	4 400
2	7	0	0	0	33	33	100	367
2	8	0	0	33	33	67	100	233
2	9	0	0	0	33	33	67	100
2	10	0	0	0	0	33	233	467
2	11	0	33	67	67	167	300	533
2	12	0	33	67	67	100	100	100
2	13	0	0	0	0	33	33	33
2	14	0	0	0	0	33	33	1 733
3	1	0	0	33	33	67	133	3 400
3	2	0	0	33	33	667	6 100	13 133
3	3	0	33	33	33	100	267	500
3	4	0	33	100	133	200	900	5 600
3	5	0	0	100	133	5 567	31 967	33 000
3	6	33	33	67	100	1 267	2 033	4 267
3	7	0	0	0	33	167	200	367

3	8	0	0	33	33	133	167	200
3	9	0	0	0	33	100	133	167
3	10	0	0	0	33	67	233	433
3	11	0	33	67	100	133	267	533
3	12	0	67	67	67	67	133	200
3	13	0	0	0	0	67	100	133
3	14	0	0	0	33	133	133	4 067

Fuente: Elaboración propia

Tabla 203: Datos transformados con la raíz de n+1

Repe tición	Trata mient o	S. aureus día 0	S. aureus día 5	S. aureus día 10	S. aureus día 15	S. aureus día 20	S. aureus día 25	S. aureus día 30
1	1	1	5,83	8,24	10,04	15,29	15,29	57,16
1	2	1	1	8,24	11,57	31,11	75,94	114,89
1	3	1	1	1	8,24	15,29	16,37	17,34
1	4	5,83	8,24	10,04	11,57	12,96	28,87	77,89
1	5	1	5,83	8,24	10,04	51,65	177,20	177,67
1	6	1	1	12,96	20,02	43,22	52,61	66,34
1	7	1	1	5,83	5,83	14,17	19,18	25,84
1	8	1	1	5,83	10,04	15,29	15,29	21,63
1	9	1	1	1	8,24	10,04	15,29	19,18
1	10	1	1	8,24	8,24	8,24	12,96	30,01
1	11	1	1	11,57	17,34	17,34	19,18	21,6
1	12	1	1	8,24	11,57	14,17	15,29	16,37
1	13	1	1	1	8,24	15,29	16,37	17,34
1	14	1	1	1	5,83	10,04	14,17	77,56
2	1	1	1	1	5,83	5,83	8,24	54,47
2	2	1	1	1	5,83	27,71	73,49	115,47
2	3	1	1	5,83	5,83	10,04	15,29	24,51
2	4	1	5,83	10,04	10,04	14,17	31,63	103,44
2	5	1	1	1	11,57	83,47	179,55	194,68
2	6	5,83	5,83	8,24	10049	35,12	52,61	66,34
2	7	1	1	1	5,83	5,83	10,04	19,18
2	8	1	1	5,83	5,83	8,24	10,04	15,29
2	9	1	1	1	5,83	5,83	8,24	10,04
2	10	1	1	1	1	5,83	15,29	21,63
2	11	1	5,83	8,24	8,24	12,96	17,34	23,10
2	12	1	5,83	8,24	8,24	10,04	10,04	10,04

2	13	1	1	1	1	5,83	5,83	5,83
2	14	1	1	1	1	5,83	5,83	41,64
3	1	1	1	5,83	5,83	8,24	11,57	58,31
3	2	1	1	5,83	5,83	25,84	78,10	114,60
3	3	1	5,83	5,83	5,83	10,04	16,37	22,38
3	4	1	5,83	10,04	11,57	14,17	30,01	74,83
3	5	1	1	10,04	11,57	74,61	178,76	181,66
3	6	5,83	5,83	8,24	10,04	35,60	45,09	65,32
3	7	1	1	1	5,83	12,96	14,17	19,18
3	8	1	1	5,83	5,83	11,57	12,96	14,17
3	9	1	1	1	5,83	10,04	11,57	12,96
3	10	1	1	1	5,83	8,24	15,29	20,83
3	11	1	5,83	8,24	10,04	11,57	16,37	23,10
3	12	1	8,24	8,24	8,24	8,24	11,57	14,17
3	13	1	1	1	1	8,24	10,04	11,57
3	14	1	1	1	5,83	11,57	11,57	63,78

Fuente: Elaboración propia

ANOVA *S. aureus*

Tabla 214: *S. aureus* Día 0

F.V	G.L.	S.C	C.M	F	P. VALOR
TOTAL	41	65,01			
REPETICIÓN	2	0	0	0	0,999
TRATAMIENTO	13	33,9	2,61	2,18	0,0441
ERROR	26	31,012	1,2		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 225: Ponderación tratamientos *S. aureus*

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
6	4,22	A
4	2,61	A
9	1	A
13	1	A
10	1	A
12	1	A

11	1	A
8	1	A
1	1	A
2	1	A
3	1	A
7	1	A
5	1	A
14	1	A

Fuente: Elaboración propia

Tabla 236: S. aureus día 5

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	244,49			
REPETICIÓN	2	3,61	1,81	0,45	0,645
TRATAMIENTO	13	135,58	10,43	2,58	0,019
ERROR	26	105,3	4,05		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 247: Ponderación tratamientos S. aureus

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
4	6,64	A
12	5,03	A
6	4,22	A
11	4,22	A
1	2,61	A
3	2,61	A
5	2,61	A
14	1	A
10	1	A
2	1	A
13	1	A
9	1	A
7	1	A
8	1	A

Fuente: Elaboración propia

Tabla 258: S. aureus día 10

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	600			
REPETICIÓN	2	48,97	24,49	4,56	0,2001
TRATAMIENTO	13	411,43	31,65	5,89	0,0001
ERROR	26	139,7	5,37		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 269: Ponderación tratamientos S. aureus

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO		
4	10,05	A		
6	9,62	A		
11	9,36	A	B	
12	8,25	A	B	
5	6,43	A	B	C
8	5,83	A	B	C
1	5,05	A	B	C
2	5,03	A	B	C
3	4,22	A	B	C
10	3,42	A	B	C
7	2,61		B	C
13	1			C
9	1			C
14	1			C

Fuente: Elaboración propia

Tabla 27: S. aureus día 15

F.V	G.L.	S.C	C.M	F	P. VALOR
TOTAL	41	609,5			
REPETICIÓN	2	146,17	73,08	17,52	0,0001
TRATAMIENTO	13	354,9	27,3	6,55	0,0001
ERROR	26	108,43	4,17		

Fuente. Elaboración propia

Tabla 281: Ponderación tratamientos S. aureus

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO			
6	13,37	A			
11	11,88	A	B		
5	11,07	A	B	C	
4	11,07	A	B	C	
12	9,36	A	B	C	D
2	7,75	A	B	C	D
1	7,24	A	B	C	D
8	7,24	A	B	C	D
9	6,64		B	C	D
3	6,64		B	C	D
7	5,83		B	C	D
10	4,03			C	D
14	4,22				D
13	3,42				D

Fuente: Elaboración propia

Tabla 292: S. aureus día 20

F.V	G.L.	S.C	C.M	F	P. VALOR
TOTAL	41	12318,26			
REPETICIÓN	2	50,9	25,45	0,83	0,4467
TRATAMIENTO	13	11471,5	882,42	28,83	0,0001
ERROR	26	795,86	30,61		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 303: Ponderación tratamientos S. aureus

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO			
5	69,92	A			
6	37,99		B		
2	28,22		B	C	
11	13,96			C	D
4	13,77			C	D
3	11,8			C	D
8	11,71			C	D
7	10,99				D
12	10,82				D

13	9,79				D
1	9,79				D
14	9,15				D
9	8,64				D
10	7,44				D

Fuente: Elaboración propia

Tabla 314: S. aureus día 25

F.V	G.L.	S.C	C.M	F	P. VALOR
TOTAL	41	82064,21			
REPETICIÓN	2	92,57	46,29	6,55	0,005
TRATAMIENTO	13	81787,99	6291,38	890,68	0,0001
ERROR	26	183,65	7,06		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 325: Ponderación tratamientos S. aureus

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO			
5	178,51	A			
2	75,85		B		
6	50,11			C	
4	30,18				D
11	17,63				E
3	16,01				E
10	14,52				E
7	14,47				E
8	12,77				E
12	12,31				E
1	11,71				E
9	11,71				E
13	10,75				E
14	10,53				E

Fuente: Elaboración propia

Tabla 336: S. aureus día 30

F.V	G.L.	S.C	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	98327,82			
REPETICIÓN	2	75,4	37,7	0,65	0,528
TRATAMIENTO	13	96755,19	7442,71	129,25	0,0001
ERROR	26	1497,23	57,59		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 347: Ponderación tratamientos S. aureus

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO				
5	184,67	A				
2	114,99		B			
4	85,39			C		
6	66			C	D	
14	60,82				D	
1	56,65				D	
10	24,16					E
11	22,62					E
3	21,42					E
7	21,4					E
8	17,04					E
9	14,06					E
12	13,53					E
13	11,59					E

Fuente: Elaboración propia

Modelo superficie de respuestas *S. aureus*

Tabla 358: Coeficientes modelo multivariante *S. aureus*

Coeficientes de regresión estimados de AUREUS				
Término	Coef SE	Coef	T	P
Constante	6.105	3.231	1.889	0.310
AA	5.572	6.844	0.814	0.565
AER	-2.705	1.445	-1.872	0.312
VE	-9.218	1.251	-7.366	0.086
AA*AA	14.767	9.359	1.578	0.360
AER*AER	-13.690	14.134	-0.969	0.510
VE*VE	3.807	2.396	1.589	0.358

Fuente: Elaboración propia

Tabla 369: Análisis de varianza de *S. aureus*

Análisis de varianza de AUREUS						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	6	378.191	378.191	63.032	15.09	0.195
Lineal	3	339.637	310.828	103.609	24.81	0.146
Cuadrado	3	38.554	38.554	12.851	3.08	0.391
Error residual	1	4.176	4.176	4.176		
Error puro	1	4.176	4.176	4.176		
Total	7	382.367				

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2: Datos aerobios mesófilos

Tabla 37: Datos A. mesófilos tomados en el laboratorio

Repetición	Tratamiento	Aerobios día 0	Aerobios día 5	Aerobios día 10	Aerobios día 15	Aerobios día 20	Aerobios día 20	Aerobios día 30
1	1	0	0	500	4 033	5 567	5 567	31 067
1	2	33	600	1 100	2 300	9 500		19 700
1	3	0	0	33	233	3 967	3 967	7 167

1	4	0	267	533	1 500	3 300	3 300	46 233
1	5	167	1 100	1 567	3 567	10 133	10 133	23 933
1	6	100	233	12 933	21 867	24 233	24 233	44 900
1	7	0	0	567	933	26 833	26 833	28 700
1	8	0	67	25 900	26 633	28 900	28 900	41 633
1	9	0	22 00	5 200	11 033	20 867	20 867	35 700
1	10	0	67	67	1 367	6 033	6 033	25 533
1	11	0	0	0	700	4 700	4 700	12 800
1	12	0	133	167	367	2 400	2 400	5 600
1	13	0	0	167	267	5 233	5 233	15 967
1	14	0	0	33	2 100	7 100	7 100	24 967
2	1	0	67	1500	5 667	16 800	18 567	26 233
2	2	0	0	500	2 567	9 100	11 033	21 867
2	3	0	33	33	167	367	2 633	4 280
2	4	33	67	500	500	500	1 767	41 600
2	5	0	0	200	1 233	7 467	37 267	47 050
2	6	33	67	267	367	967	24 133	35 400
2	7	33	233	400	467	2 967	6 500	23 000
2	8	33	33	100	133	4 967	9 600	2 5033
2	9	0	33	100	233	4 967	17 867	28 067
2	10	67	267	733	1 600	2 733	5 233	8 167
2	11	0	133	167	867	1 333	2 800	29 500
2	12	0	100	133	1 350	1 400	1 833	10 800
2	13	33	67	167	233	1 067	9 667	30 167
2	14	0	0	33	100	1 500	1 567	1 833
3	1	0	100	700	4 467	15 833	18 033	20 367
3	2	33	200	767	2 767	8 800	12 133	2 433
3	3	0	33	33	133	2 867	3 267	3 833
3	4	0	67	100	433	1 200	3 267	5 667
3	5	0	0	1167	2 800	9 533	17 267	24 533
3	6	33	100	100	5 333	8 500	13 500	16 400
3	7	33	200	1 633	4 500	7 400	19 667	20 367
3	8	0	100	6 400	13 700	16 333	18 300	20 600
3	9	0	133	2 800	11 600	13 433	16 233	17 967
3	10	33	300	4 900	12 033	13 233	14 367	16 933
3	11	33	167	233	6 167	8 000	10 900	12 800
3	12	33	67	300	4 400	6 100	8 233	8 500
3	13	33	133	200	467	1 000	20 800	23 000
3	14	0	100	100	933	1 767	2 200	2 700

Fuente: Elaboración propia

Tabla 381: Datos transformado con la raíz de n+1

Repetición	Tratamiento	Aerobios día 0	Aerobios día 5	Aerobios día 10	Aerobios día 15	Aerobios día 20	Aerobios día 25	Aerobios día 30
1	1	1	1	22,38	63,51	74,62	94,87	176,26
1	2	5,83	24,52	33,18	47,97	97,47	134,54	140,36
1	3	1	1	5,83	15,30	62,99	72,35	84,66
1	4	1	16,37	23,11	38,74	57,45	214,87	215,02
1	5	12,96	33,18	39,60	59,73	100,67	122,20	154,71
1	6	10,04	15,30	113,73	147,88	155,67	186,01	211,90
1	7	1	1	23,83	30,56	163,81	164,93	169,41
1	8	1	8,25	160,94	163,20	170,00	184,30	204,04
1	9	1	46,91	72,12	105,04	144,46	177,11	188,95
1	10	1	8,25	8,25	36,99	77,68	125,57	159,79
1	11	1	1	1,00	26,48	68,56	97,47	113,14
1	12	1	11,58	12,96	19,18	49,00	58,03	74,84
1	13	1	1	12,96	16,37	72,35	83,87	126,36
1	14	1	1	5,83	45,84	84,27	104,25	158,01
2	1	1	8,25	38,74	75,29	129,62	136,26	161,97
2	2	1	1	22,38	50,68	95,40	105,04	147,88
2	3	1	5,83	5,83	12,96	19,18	51,32	65,43
2	4	5,83	8,25	22,38	22,38	22,38	42,05	203,96
2	5	1	1	14,18	35,13	86,42	193,05	216,91
2	6	5,83	8,25	16,37	19,18	31,11	155,35	188,15
2	7	5,83	15,30	20,02	21,63	54,48	80,63	151,66
2	8	5,83	5,83	10,05	11,58	70,48	97,98	158,22
2	9	1	5,83	10,05	15,30	70,48	133,67	167,54
2	10	8,25	16,37	27,09	40,01	52,29	72,35	90,38
2	11	1	11,58	12,96	29,46	36,52	52,92	171,76
2	12	1	10,05	11,58	36,76	37,43	42,83	103,93
2	13	5,8	8,25	12,96	15,30	32,68	98,33	173,69
2	14	1	1	5,83	10,05	38,74	39,60	42,83
3	1	1	10,05	26,48	66,84	125,83	134,29	142,72
3	2	5,83	14,18	27,71	52,61	93,81	110,15	49,34
3	3	1	5,83	5,83	11,58	53,55	57,17	61,92
3	4	1	8,25	10,05	20,83	34,66	57,17	75,29
3	5	1	1	34,18	52,92	97,64	131,41	156,63
3	6	5,83	10,05	10,05	73,03	92,20	116,19	128,07

3	7	5,83	14,18	40,42	67,09	86,03	140,24	142,72
3	8	1	10,05	80,01	117,05	127,80	135,28	143,53
3	9	1	11,58	52,92	107,71	115,91	127,41	134,04
3	10	5,83	17,35	70,01	109,70	115,04	119,87	130,13
3	11	5,83	12,96	15,30	78,54	89,45	104,41	113,14
3	12	5,83	8,25	17,35	66,34	78,11	90,74	92,20
3	13	5,83	11,58	14,18	21,63	31,64	144,23	151,66
3	14	1	10,05	10,05	30,56	42,05	46,91	51,97

Fuente: Elaboración propia

ANOVA aerobios mesófilos

Tabla 42 ANOVA día 0

F.V	G.L.	S.C	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,14			
REPETICIÓN	2	0,03	0,01	4,64	0,0189
TRATAMIENTO	13	0,04	0,0028	1,02	0,4613
ERROR	26	0,07	0,0028		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 393: Tukey día 0

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
5	0,36	A
10	0,34	A
11	0,34	A
3	0,34	A
9	0,32	A
14	0,32	A
13	0,3	A
7	0,3	A
2	0,28	A
12	0,28	A
4	0,28	A
8	0,28	A
6	0,28	A
1	0,26	A

Fuente: Elaboración propia

Tabla 404: ANOVA día 5

F.V	G.L.	S.C.	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,15			
REPETICIÓN	2	0,03	0,02	4,87	0,016
TRATAMIENTO	13	0,04	0,0028	0,88	0,5788
ERROR	26	0,08	0,0032		

Fuente. Elaboración propia**Tabla 415: Tukey día 10**

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
5	0,4	A
10	0,36	A
9	0,36	A
11	0,36	A
3	0,36	A
14	0,34	A
2	0,34	A
4	0,32	A
6	0,32	A
13	0,32	A
12	0,3	A
1	0,3	A
7	0,3	A
8	0,3	A

Fuente: Elaboración propia**Tabla 426: ANOVA día 10**

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,27			
REPETICIÓN	2	0,12	0,06	15,62	0,0001
TRATAMIENTO	13	0,04	0,0034	0,88	0,5801
ERROR	26	0,1	0,0039		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 437: Tukey día 10

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
14	0,44	A
9	0,42	A
5	0,4	A
11	0,4	A
12	0,4	A
13	0,38	A
10	0,36	A
3	0,36	A
4	0,36	A
6	0,36	A
7	0,36	A
2	0,34	A
8	0,34	A
1	0,32	A

Fuente: Elaboración propia

Tabla 448: ANOVA día 15

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,35			
REPETICIÓN	2	0,23	0,12	49,2	0,0001
TRATAMIENTO	13	0,05	0,004	1,71	0,1195
ERROR	26	0,06	0,0024		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 459: Tukey día 15

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
14	0,48	A
12	0,46	A
5	0,44	A
9	0,44	A
7	0,42	A
11	0,42	A
2	0,4	A

4	0,4	A
13	0,4	A
1	0,4	A
6	0,38	A
8	0,38	A
10	0,38	A
3	0,34	A

Fuente: Elaboración propia

Tabla 46: ANOVA día 20

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,47			
REPETICIÓN	2	0,4	0,2	173,16	0,0001
TRATAMIENTO	13	0,04	0,0031	2,68	0,0657
ERROR	26	0,03	0,0012		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 47: Tukey día 20

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
7	0,48	A
9	0,48	A
11	0,48	A
12	0,48	A
14	0,48	A
6	0,48	A
5	0,48	A
13	0,44	A
2	0,42	A
1	0,42	A
3	0,42	A
4	0,42	A
10	0,42	A
3	0,4	A

Fuente: Elaboración propia

Tabla 482: ANOVA día 25

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,37			
REPETICIÓN	2	0,21	0,11	35,69	0,0001
TRATAMIENTO	13	0,08	0,01	1,95	0,0418
ERROR	26	0,08	0,003		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 493: Tukey día 25

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO	
14	0,6	A	
7	0,52	A	B
9	0,52	A	B
11	0,52	A	B
5	0,52	A	B
13	0,5	A	B
2	0,48	A	B
12	0,48	A	B
6	0,48	A	B
4	0,48	A	B
10	0,46	A	B
8	0,46	A	B
3	0,44	A	B
1	0,42		B

Fuente: Elaboración propia

Tabla 504: ANOVA día 30

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,5			
REPETICIÓN	2	0,18	0,09	17,62	0,0001
TRATAMIENTO	13	0,19	0,01	2,85	0,0112
ERROR	26	0,13	0,01		

Fuente: Elaboración propia

Tabla 515: Tukey día 30

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO	
14	0,68	A	
3	0,64	A	B
11	0,62	A	B
7	0,6	A	B
10	0,6	A	B
5	0,6	A	B
13	0,54	A	B
12	0,52	A	B
9	0,52	A	B
6	0,52	A	B
4	0,51	A	B
8	0,48	A	B
2	0,48	A	B
1	0,44		B

Fuente: Elaboración propia

Método de superficies de respuesta *Aerobios mesófilos*

Tabla 526: Datos para realizar el método de superficie de respuesta

TRATA MIENTO	AA	AER	VE	AEROBIOS	Orden Est	Orden Corrida	Bloques	Tipo Pt
3	5000	0	0	65,43	1	1	1	1
4	0	500	0	203,96	2	2	1	1
5	0	0	5000	216,91	3	3	1	1
6	500	0	500	188,15	4	4	1	1
7	500	200	0	151,66	5	5	1	1
8	0	200	500	158,22	6	6	1	1
9	1 000	0	1 000	167,59	7	7	1	1
10	1 000	400	0	90,38	8	8	1	1
11	0	400	1 000	171,76	9	9	1	1
12	1 000	400	800	103,93	10	10	1	1
13	800	300	800	173,69	11	11	1	1
14	1 000	400	1000	42,83	12	12	1	1

Fuente: Elaboración propia

Tabla 537: Coeficientes de regresión A. mesófilos

Coeficientes de regresión estimados de AEROBIOS				
Término	Coef SE	Coef	T	P
Constante	63.68	167.43	0.380	0.719
AA	-91.69	191.48	-0.479	0.652
AER	-163.15	65.75	-2.481	0.056
VE	50.69	193.05	0.263	0.803
AA*AER	-120.82	55.36	-2.183	0.081
AA*VE	84.88	210.44	0.403	0.703
AER*VE	-53.7	56.70	-0.947	0.387

Fuente: Elaboración propia

Tabla 548: ANOVA A. mesófilos

Análisis de varianza de AEROBIOS						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	6	28589.4	28589.4	4764.91	4.23	0.067
Lineal	3	20228.6	16521.9	5507.30	4.89	0.060
Interacción	3	8360.8	8360.8	2786.95	2.48	0.176
Error residual	5	5626.1	5626.1	1125.22		
Total	11	34215.6				

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3: Datos peróxidos

Tabla 559: Datos peróxidos

Repetición	Tratamiento	P0	P5	P10	P15	P20	P25	P30
1	1	0	0	0,5	0	0,5	2	2
1	2	0	0	0	0	0,5	0,5	2
1	3	0	0	0	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0	0	0	0,5
1	5	0	0	0	0	0	0,5	0,5
1	6	0	0	0	0	0	0	0,5

1	7	0	0	0	0	0	0,5	0,5
1	8	0	0	0	0	0	0	0,5
1	9	0	0	0	0	0	0	2
1	10	0	0	0	0	0	0	0
1	11	0	0	0	0	0	0,5	0,5
1	12	0	0	0	0	0	0	0
1	13	0	0	0	0	0	0	0
1	14	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0,5	2	2	2	2	5
2	2	0	0,5	0,5	2	2	2	5
2	3	0	0	0	0	0	0,5	0,5
2	4	0	0,5	0,5	2	2	2	5
2	5	0	0,5	0,5	0,5	0,5	2	2
2	6	0	0	0	0	0	0,5	2
2	7	0	0	0	0	0	0,5	2
2	8	0	0,5	0,5	2	2	2	5
2	9	0	0	0	0	0,5	0,5	2
2	10	0	0	0	0	0	0,5	2
2	11	0	0	0,5	2	2	2	5
2	12	0	0	0	0	0	0,5	2
2	13	0	0	0	0	0	0,5	0,5
2	14	0	0	0	0	0	0,5	0,5
3	1	0	0,5	2	2	2	2	5
3	2	0	0,5	2	2	2	2	5
3	3	0	0	0	0	0	0,5	0,5
3	4	0	0	0,5	2	2	2	2
3	5	0	0	0,5	0,5	0,5	2	2
3	6	0	0	0	0	0,5	0,5	2
3	7	0	0	0	0	0,5	2	2
3	8	0	0,5	0,5	0,5	2	2	2
3	9	0	0	0	0	0	0,5	2
3	10	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5
3	11	0	0	0,5	0,5	2	5	5
3	12	0	0	0	0	0	0,5	0,5
3	13	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5
3	14	0	0	0	0	0	0,5	0,5

Fuente: Elaboración propia

Tabla 60: Datos transformados con raíz de n+1

Repetición	Tratamiento	P0	P5	P10	P15	P20	P25	P30
1	1	1	1	1,22	1	1,22	1,73	1,73
1	2	1	1	1	1	1,22	1,22	1,73
1	3	1	1	1	1	1,00	1,00	1,00
1	4	1	1	1	1	1,00	1,00	1,22
1	5	1	1	1	1	1,00	1,22	1,22
1	6	1	1	1	1	1,00	1,00	1,22
1	7	1	1	1	1	1,00	1,22	1,22
1	8	1	1	1	1	1,00	1,00	1,22
1	9	1	1	1	1	1,00	1,00	1,73
1	10	1	1	1	1	1,00	1,00	1,00
1	11	1	1	1	1	1,00	1,22	1,22
1	12	1	1	1	1	1,00	1,00	1,00
1	13	1	1	1	1	1,00	1,00	1,00
1	14	1	1	1	1	1,00	1,00	1,00
2	1	1	1,22	1,73	1,73	1,73	1,73	2,45
2	2	1	1,22	1,22	1,73	1,73	1,73	2,45
2	3	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22
2	4	1	1,22	1,22	1,73	1,73	1,73	2,45
2	5	1	1,22	1,22	1,22	1,22	1,73	1,73
2	6	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,73
2	7	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,73
2	8	1	1,22	1,22	1,73	1,73	1,73	2,45
2	9	1	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22	1,73
2	10	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,73
2	11	1	1,00	1,22	1,73	1,73	1,73	2,45
2	12	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,73
2	13	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22
2	14	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22
3	1	1	1,22	1,73	1,73	1,73	1,73	2,45
3	2	1	1,22	1,73	1,73	1,73	1,73	2,45
3	3	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22
3	4	1	1,00	1,22	1,73	1,73	1,73	1,73
3	5	1	1,00	1,22	1,22	1,22	1,73	1,73
3	6	1	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22	1,73

3	7	1	1,00	1,00	1,00	1,22	1,73	1,73
3	8	1	1,22	1,22	1,22	1,73	1,73	1,73
3	9	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,73
3	10	1	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22	1,22
3	11	1	1,00	1,22	1,22	1,73	2,45	2,45
3	12	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22
3	13	1	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22	1,22
3	14	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22	1,22

Fuente: Elaboración propia

ANOVA peróxidos

Tabla 56: ANOVA con tukey peróxidos

PERÓXIDOS		DÍA 0		
F.V.	G.L.	S.C.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,14		
REPETICIÓN	2	0,03	4,64	0,0189
TRATAMIENTO	13	0,04	1,02	0,4613
ERROR	26	0,07		

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
5	0,36	A
10	0,34	A
11	0,34	A
3	0,34	A
9	0,32	A
14	0,32	A
13	0,3	A
7	0,3	A
2	0,28	A
12	0,28	A
4	0,28	A
8	0,28	A
6	0,28	A
1	0,26	A

PERÓXIDOS DÍA 5

F.V.	G.L.	S.C.	F	P. VALOR
TOTAL	41	0,33		
REPETICIÓN	2	0,05	4,84	0,0163
TRATAMIENTO	13	0,16	2,59	0,0189
ERROR	26	0,12		

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
8	1,15	A
2	1,15	A
1	1,15	A
5	1,07	A
4	1,07	A
14	1	A
11	1	A
12	1	A
13	1	A
10	1	A
3	1	A
6	1	A
7	1	A
9	1	A

PERÓXIDOS DÍA 10

F.V.	G.L.	S.C.	F	P. VALOR
TOTAL	41	1,64		
REPETICIÓN	2	0,18	5,67	0,0091
TRATAMIENTO	13	1,06	5,16	0,0002
ERROR	26	0,41		

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
1	1,56	A

2	1,32	A
4	1,15	B
8	1,15	B
11	1,15	B
5	1,15	B
14	1	B
12	1	B
13	1	B
10	1	B
3	1	B
6	1	B
7	1	B
9	1	B

PERÓXIDOS

DÍA 15

F.V.	G.L.	S.C.	F	P. VALOR
TOTAL	41	3,4		
REPETICIÓN	2	0,58	6,93	0,0039
TRATAMIENTO	13	1,73	3,19	0,0057
ERROR	26	1,09		

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
4	1,56	A
2	1,32	A
1	1,15	B
8	1,15	B
11	1,15	B
5	1,15	B
14	1	B
12	1	B
13	1	B
10	1	B
3	1	B
6	1	B
7	1	B
9	1	B

PERÓXIDOS DÍA 20

F.V.	G.L.	S.C.	F	P. VALOR
TOTAL	41	3,74		
REPETICIÓN	2	0,78	12,03	0,0002
TRATAMIENTO	13	2,12	5,04	0,0002
ERROR	26	0,84		

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
2	1,56	A
1	1,56	A
8	1,49	B
4	1,49	B
11	1,49	B
5	1,15	B
13	1,07	B
10	1,07	B
9	1,07	B
6	1,07	B
7	1,07	B
14	1	B
3	1	B
12	1	B

PERÓXIDOS DÍA 25

F.V.	G.L.	S.C.	F	P. VALOR
TOTAL	41	4,5		
REPETICIÓN	2	1,33	19,27	0,0001
TRATAMIENTO	13	2,28	5,09	0,0002
ERROR	26	0,9		

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
11	1,8	A
1	1,73	A
2	1,56	AB
5	1,56	AB
4	1,49	AB

Tabla 57: Datos potencial hidrógeno

Repetición	Tratamiento	pH día 0	pH día 5	pH día 10	pH día 15	pH día 20	pH día 25	pH día 30
1	1	6,43	5,96	5,93	5,1	4,95	4,88	4,88
1	2	6,64	6,34	6,07	5,92	5,75	5,66	5,63
1	3	5,84	5,58	4,76	4,69	4,65	4,57	4,4
1	4	6,29	6,2	6,02	4,95	4,91	4,6	4,6
1	5	6,15	6,02	5,1	5,01	4,83	4,8	4,7
1	6	6,32	6,23	6,09	6,05	6,03	6,01	5,71
1	7	6,3	6,02	4,78	4,72	4,68	4,66	4,63
1	8	6,5	6,35	6,18	6,17	6	5,96	5,52
1	9	6,38	6,31	6,19	5,73	5,54	5,54	5,51
1	10	6,29	6,14	5,52	5,3	5,2	4,95	4,78
1	11	6,23	6,18	5,24	5,04	4,97	4,87	4,85
1	12	6,19	5,98	4,91	4,87	4,82	4,81	4,56
1	13	6,38	6,11	6,4	6,08	5,17	4,84	4,77
1	14	6,09	6,05	5,04	4,86	4,86	4,79	4,78
2	1	6,7	6,59	6,51	6,3	5,57	5,43	5,19
2	2	6,64	6,57	6,53	6,23	6,21	6,16	5,99
2	3	6,55	6,36	6,28	6,18	6,08	5,97	5,87
2	4	6,63	6,61	6,58	6,52	6,43	6,25	6,17
2	5	6,59	6,56	6,54	6,41	6,16	6,12	5,81
2	6	6,53	6,52	6,47	6,46	6,42	6,26	6,16
2	7	6,49	6,48	6,47	6,39	6,24	6,24	5,8
2	8	6,55	6,55	6,44	6,22	6,18	5,93	5,75
2	9	6,41	6,4	6,31	6,22	5,78	5,61	5,32
2	10	6,38	6,35	6,33	6,2	6,09	5,89	5,75
2	11	6,5	6,47	6,45	6,37	6,22	5,75	5,64
2	12	6,49	6,49	6,44	6,35	6,31	6,24	6,16
2	13	6,4	6,38	6,37	6,34	6,34	6,14	5,92
2	14	6,46	6,46	6,37	6,31	6,29	6,23	6,14
3	1	6,68	6,57	6,49	6,28	5,55	5,41	5,17

3	2	6,62	6,55	6,51	6,21	6,19	6,14	5,97
3	3	6,55	6,41	6,33	6,23	6,16	6,05	5,98
3	4	6,6	6,58	6,55	6,49	6,4	6,22	6,14
3	5	6,57	6,54	6,52	6,39	6,14	6,1	5,79
3	6	6,55	6,54	6,49	6,48	6,44	6,28	6,18
3	7	6,49	6,48	6,47	6,39	6,24	6,21	5,77
3	8	6,55	6,51	6,41	6,19	6,15	5,9	5,72
3	9	6,45	6,44	6,35	6,26	5,82	5,65	5,36
3	10	6,41	6,38	6,36	6,23	6,12	5,92	5,78
3	11	6,49	6,46	6,44	6,36	6,21	5,74	5,63
3	12	6,52	6,49	6,44	6,35	6,31	6,24	6,16
3	13	6,43	6,41	6,4	6,37	6,37	6,17	5,95
3	14	6,47	6,45	6,36	6,3	6,28	6,22	6,13

Fuente: Elaboración propia

Anexo 5: Datos de acidez

Tabla 583: Datos de acidez

Repetición	Tratamiento	Acidez día 0	Acidez día 5	Acidez día 10	Acidez día 15	Acidez día 20	Acidez día 25	Acidez día 30
1	1	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6
1	2	0,36	0,42	0,42	0,54	0,6	0,48	0,6
1	3	0,48	0,48	0,48	0,42	0,6	0,6	0,72
1	4	0,3	0,36	0,42	0,48	0,54	0,6	0,7
1	5	0,42	0,48	0,48	0,6	0,6	0,6	0,6
1	6	0,24	0,3	0,36	0,42	0,6	0,6	0,6
1	7	0,3	0,3	0,48	0,6	0,6	0,6	0,6
1	8	0,24	0,3	0,3	0,42	0,48	0,6	0,6
1	9	0,3	0,36	0,48	0,48	0,6	0,6	0,6
1	10	0,42	0,48	0,48	0,48	0,6	0,6	0,6
1	11	0,42	0,48	0,48	0,48	0,6	0,6	0,9
1	12	0,36	0,36	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
1	13	0,3	0,3	0,42	0,48	0,6	0,6	0,6

1	14	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,72
2	1	0,24	0,3	0,36	0,3	0,3	0,3	0,36
2	2	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,48	0,36
2	3	0,24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,36	0,6
2	4	0,24	0,3	0,3	0,36	0,36	0,42	0,42
2	5	0,3	0,36	0,36	0,36	0,42	0,48	0,6
2	6	0,3	0,3	0,36	0,36	0,42	0,42	0,48
2	7	0,24	0,24	0,24	0,3	0,42	0,48	0,6
2	8	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,42
2	9	0,36	0,42	0,42	0,42	0,42	0,48	0,48
2	10	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,42	0,6
2	11	0,3	0,3	0,36	0,36	0,42	0,48	0,48
2	12	0,24	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,48
2	13	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,48
2	14	0,3	0,36	0,36	0,42	0,42	0,6	0,6
3	1	0,24	0,3	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36
3	2	0,24	0,3	0,3	0,36	0,36	0,48	0,48
3	3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,36	0,36	0,6
3	4	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,42	0,42
3	5	0,36	0,36	0,36	0,36	0,42	0,48	0,6
3	6	0,3	0,36	0,36	0,36	0,42	0,42	0,48
3	7	0,36	0,36	0,36	0,36	0,42	0,48	0,6
3	8	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,42	0,42
3	9	0,3	0,3	0,36	0,42	0,42	0,48	0,48
3	10	0,3	0,3	0,3	0,36	0,36	0,36	0,6
3	11	0,3	0,3	0,36	0,42	0,42	0,48	0,48
3	12	0,24	0,24	0,3	0,42	0,48	0,48	0,48
3	13	0,3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,54	0,54
3	14	0,36	0,36	0,36	0,42	0,42	0,6	0,72

Fuente: Elaboración propia

Anexo 6: Comprobación de supuestos de ANOVA

1. Prueba de normalidad

En la tabla 64 se muestran los valores de p para la prueba de normalidad de los datos; los p-valor son mayores que 0,05, por lo tanto se confirma que los datos siguen una distribución normal.

Hipótesis:

Ho: Los datos son normales.

Ha: Los datos no son normales.

Tabla 594: Prueba de normalidad de los datos de S. aureus

Fuente de variación	P-valor
Día 0	0,089
Día 5	0,090
Día 10	0,098
Día 15	0,157
Día 20	0,230
Día 25	0,460
Día 30	0,145

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar, en la Tabla 64 todos los valores del p-valor para los datos S. aureus son mayores que 0,05, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula; eso quiere decir que los datos mantienen una distribución normal.

Se graficaron los datos para los días 20, 25 y 30, en los cuales se puede observar que existe distribución normal.

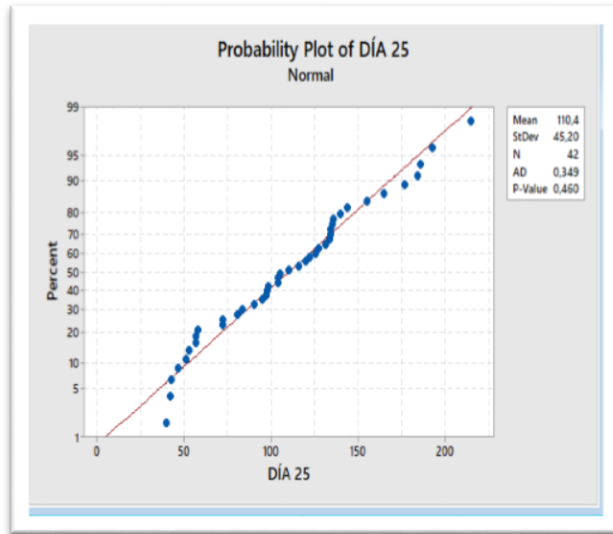


Figura 41: Distribución normal día 20 *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia

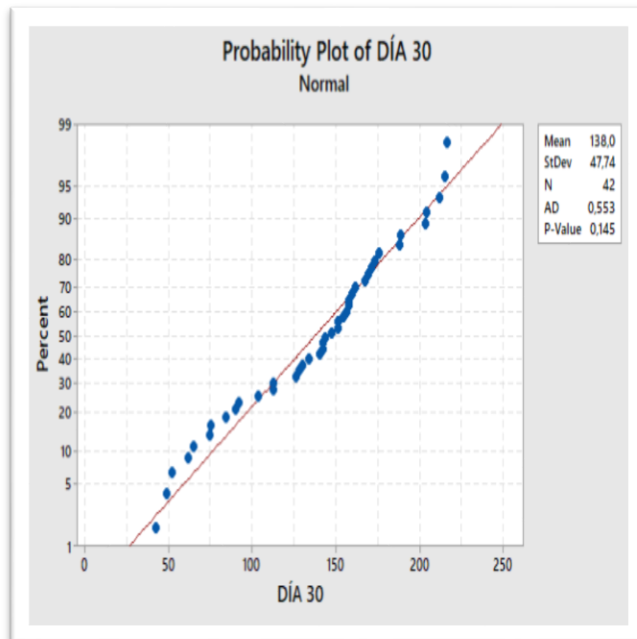


Figura 42: Distribución normal día 25 *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia

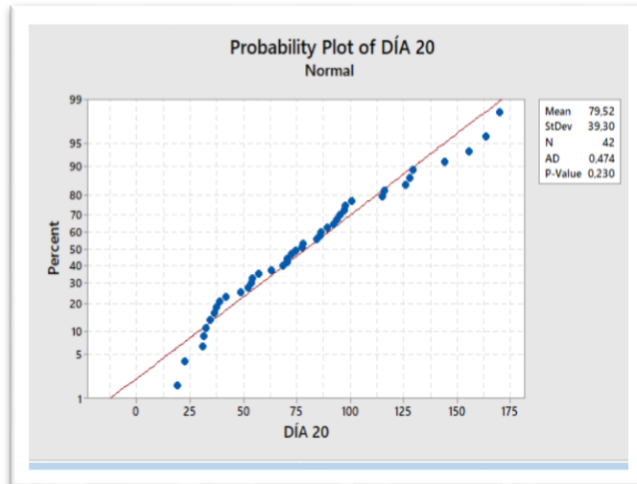


Figura 43: Distribución normal día 30 *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia

Tabla 605: Prueba de normalidad de los datos de *A. mesófilos*

Fuente de variación	P-valor
Día 0	0,059
Día 5	0,060
Día 10	0,069
Día 15	0,127
Día 20	0,230
Día 25	0,460
Día 30	0,145

Fuente: Elaboración Propia

Como se puede observar, en la Tabla 65 todos los valores del p-valor para los datos *S. aureus* son mayores que 0,05, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula, eso quiere decir que los datos mantienen una distribución normal.

Se graficaron los datos para los días 20, 25 y 30, en los cuales se puede observar que existe distribución normal.

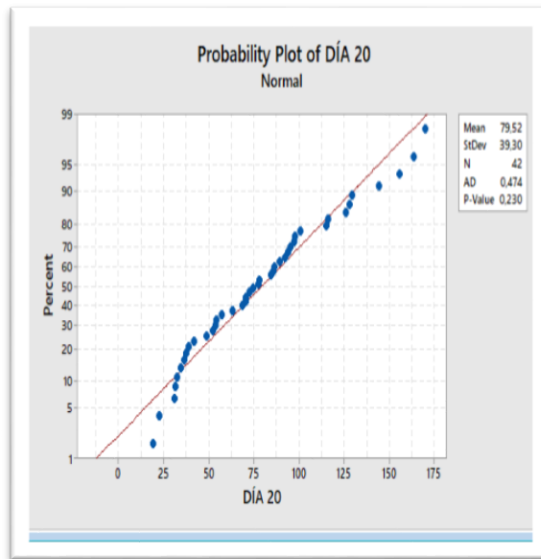


Figura 44: Distribución normal día 20 *A. mesófilos*

Fuente: Elaboración propia

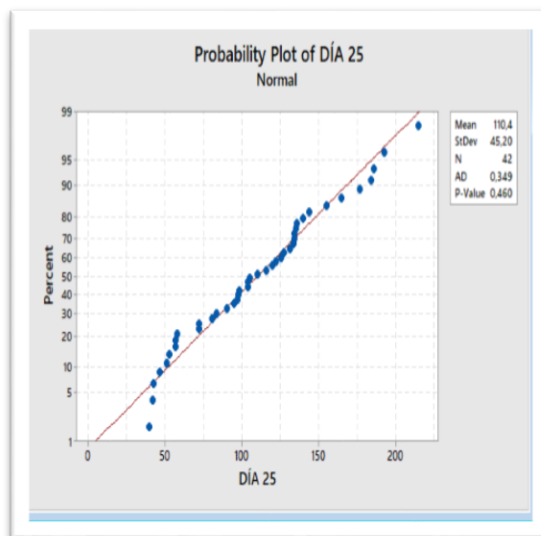


Figura 45: Distribución normal día 25 *A. mesófilos*

Fuente: Elaboración propia

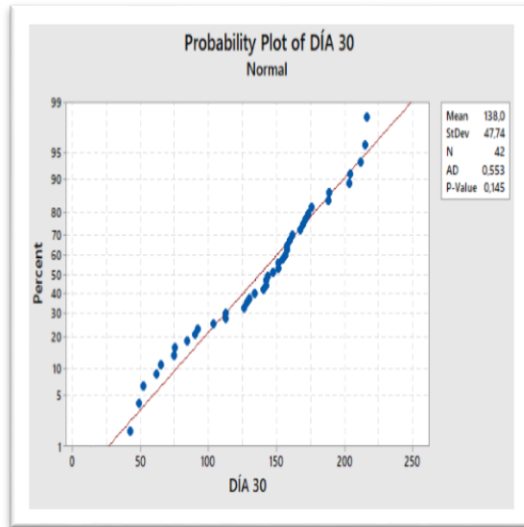


Figura 46: Distribución normal día 30 A. mesófilos

Fuente: Elaboración propia

2. Prueba de varianzas iguales

Hipótesis

Ho: Las varianzas son iguales.

Ha: Las varianzas no son iguales.

Tabla 616: Prueba de varianzas iguales S. aureus

Fuente de variación	P-valor
Día 0	0,085
Día 5	0,123
Día 10	0,156
Día 15	0,196
Día 20	0,200
Día 25	0,205
Día 30	0,251

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar, en la Tabla 66 todos los valores del p-valor para los datos *S. aureus* son mayores que 0,05, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula; eso quiere decir que los datos tienen varianzas iguales.

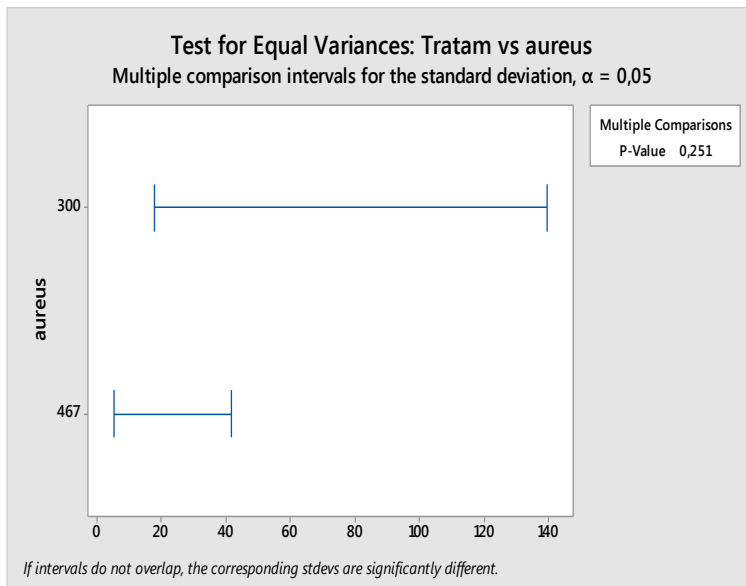


Figura 47: Varianzas iguales para *S. aureus*

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 627: Varianzas iguales *A. mesófilos*

Fuente de variación	P-valor
Día 0	0,085
Día 5	0,123
Día 10	0,156
Día 15	0,196
Día 20	0,200
Día 25	0,205
Día 30	0,251

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar, en la Tabla 67 todos los valores del p-valor para los datos *S. aureus* son mayores que 0,05, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula; eso quiere decir que los datos tienen varianzas iguales.

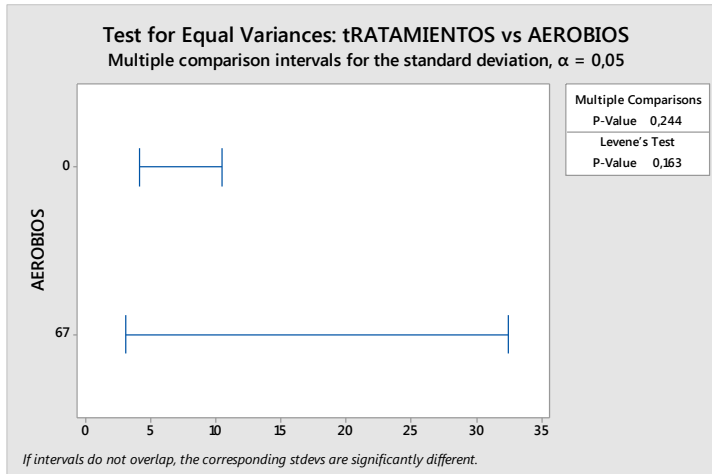


Figura 48: Varianzas iguales para *A. mesófilos*

Fuente: Elaboración propia

Tabla 638: Varianzas iguales peróxidos

Fuente de variación	P-valor
Día 0	0,076
Día 5	0,099
Día 10	0,112
Día 15	0,143
Día 20	0,223
Día 25	0,245
Día 30	0,251

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar, en la Tabla 68 todos los valores del p-valor para los datos *S. aureus* son mayores que 0,05, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula; eso quiere decir que los datos tienen varianzas iguales.

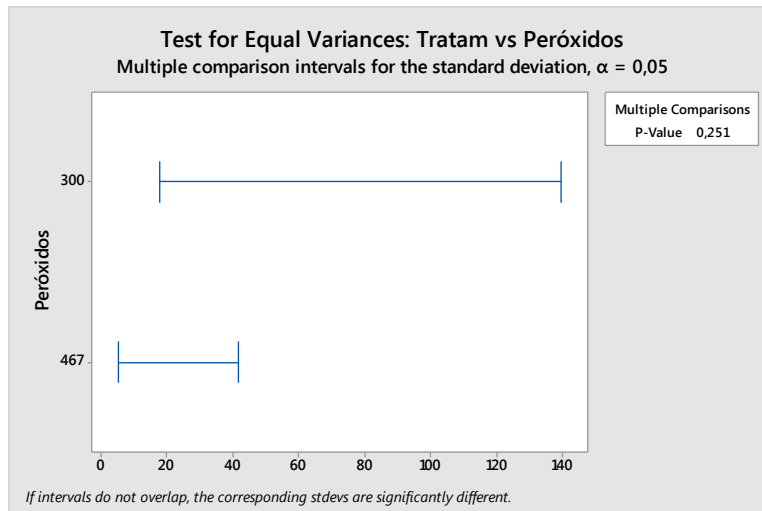


Figura 49: Varianzas iguales para peróxidos

Fuente: Elaboración propia

3. Independencia de datos

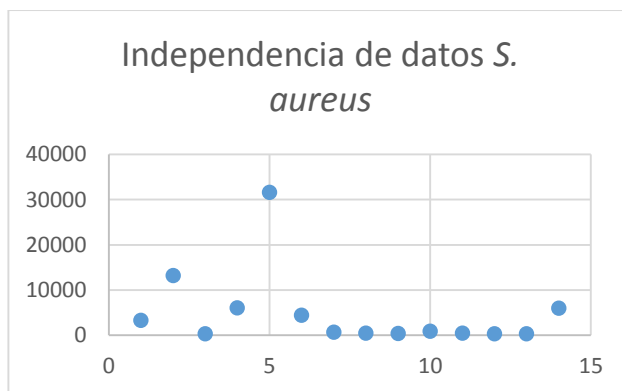


Figura 50: Intependencia de datos para *S. aureus*

Fuente: Elaboración propia

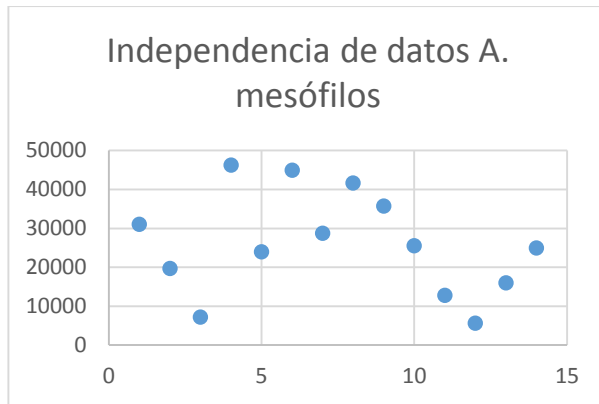


Figura 51: Independencia de datos para S. aureus

Fuente: Elaboración propia

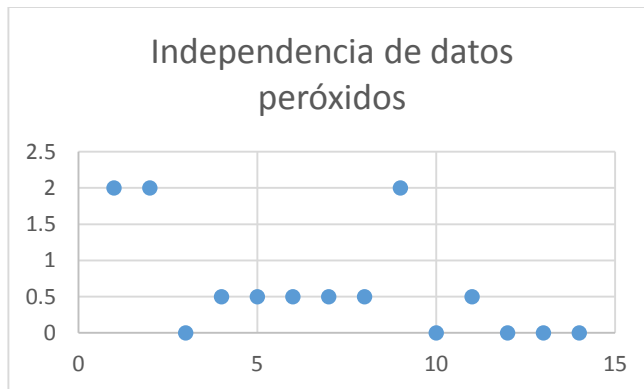


Figura 52: Independencia de datos para S. aureus

Fuente: Elaboración propia