



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Proyecto de Investigación,
previo a la obtención del título
de Ingeniero en Alimentos

**“EMPLEO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DEL
MUCÍLAGO DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao* L.) PARA LA
CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE RES”**

AUTOR:

Diego Albán Rodríguez

Director del Proyecto de Investigación:

Ing. Ángel Fernández Escobar

Quevedo- Los Ríos-Ecuador.

2017



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **ALBÁN RODRÍGUEZ DIEGO JOSÉ**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

ALBÁN RODRÍGUEZ DIEGO JOSÉ

CI. 120523895-7



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. **ÁNGEL FERNÁNDEZ ESCOBAR**, docente de la Facultad de Ciencia Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

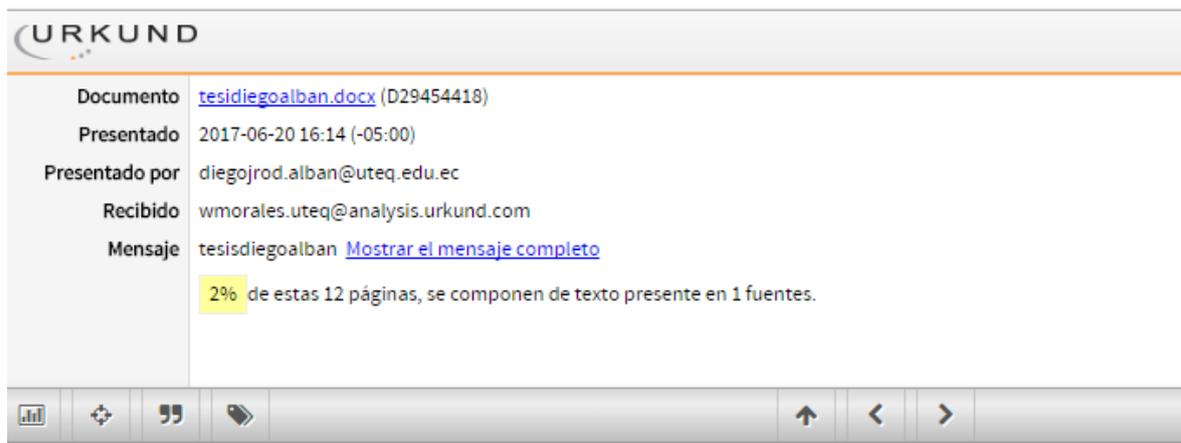
CERTIFICO: Que el señor Diego José Albán Rodríguez, realizó el Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos titulado: **“EMPLEO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DEL MUCILAGO DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao* L.) PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE RES”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Ángel Fernández Escobar
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Ing. **Ángel Fernández Escobar**, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado: **“EMPLEO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DEL MUCILAGO DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao* L.) PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE RES”**, me permito manifestarle a usted y por medio del Consejo Académico lo siguiente:

Que, el señor **Diego José Albán Rodríguez**, egresado de la Facultad de Ciencias Pecuarias, ha cumplido con las correcciones pertinentes, de acuerdo al Reglamento de Graduación de Pregrado de la UTEQ, he ingresado el Proyecto de Investigación al sistema **URKUND**, tengo bien certificar la siguiente información sobre el informe del sistema reflejando un porcentaje del 2%.



The screenshot displays the URKUND interface with the following information:

Documento	tesidiegoalban.docx (D29454418)
Presentado	2017-06-20 16:14 (-05:00)
Presentado por	diegojrod.alban@uteq.edu.ec
Recibido	wmorales.uteq@analysis.arkund.com
Mensaje	tesidiegoalban Mostrar el mensaje completo

2% de estas 12 páginas, se componen de texto presente en 1 fuentes.

The interface includes a navigation bar at the bottom with icons for document view, zoom, and navigation.

Ing. Ángel Fernández Escobar M.Sc.
Director del Proyecto de Investigación



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EMPLEO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DEL
MUCÍLAGO DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao* L.) PARA
LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE DE RES”**

**Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título
de Ingeniero en Alimentos.**

Aprobado por:

Ing. Román Soria V.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Verónica Puente

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Piedad Yépez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2017

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por haberme guiado por el camino del conocimiento, por la fortaleza para superar obstáculos y dificultades que se presentaron durante la trayectoria, por permitirme de esta manera llegar a este momento tan esperado en mi vida.

A Irma mi madre, por confiar en mi cada día, por el apoyo y paciencia en toda meta propuesta de manera incondicional, convirtiéndose así en pilar fundamental tanto en mi vida. A mi abuelita Orestila y demás familiares por tener siempre los mejores deseos de superación hacia mí.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por haberme abierto las puertas y permitirme desarrollar profesionalmente en esta noble institución. A cuerpo docente por compartir sus conocimientos para mi formación.

También agradezco a mi director de Tesis, Ing. Ángel Fernández por su valiosa orientación y apoyo para culminación del presente Proyecto de Investigación.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a todos quienes estuvieron vinculados de alguna manera a este proyecto, de manera especial a la Ing. Lourdes y a Guadalupe por su apoyo, consejos y compañía para seguir adelante en los momentos difíciles de esta etapa.

Gratitud eterna!

Diego Albán Rodríguez

DEDICATORIA

A Dios por darme fortaleza para seguir adelante y superar adversidades de la vida sin desfallecer.

A mi madre, sin ella esto no habría sido posible, a lo largo de mi vida velando por mi bienestar y educación, siendo apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un segundo de mi capacidad e inteligencia.

Con mucho cariño, para ti Irma.

Diego Albán Rodríguez

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología, ubicado en la Finca Experimental “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en el km 7 ½ de la vía Quevedo – El Empalme, Recinto San Felipe; Cantón Mocache, Provincia de Los Ríos. La misma que tuvo como objetivo evaluar el crecimiento de microorganismos mesófilos en la carne de res mediante la acción de bacterias ácido lácticas para aumentar el tiempo de vida útil en condiciones medio ambientales. Se realizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y tres observaciones, los resultados obtenidos fueron analizados en el programa estadístico SPSS, aplicando la prueba de normalidad para conocer la distribución normal o no de los datos, empleando el test Shapiro-Wilk con 5% de probabilidad, donde se demostró que los resultados obtenidos no se distribuyen de manera normal, se utilizaron los test no paramétricos Friedman y Holm, los cuales dieron como resultado que: “Al utilizar mucílago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res existe diferencias microbiológicas entre tratamientos”, destacándose el tratamiento T₃ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C.) con referencia al tratamiento patrón T₁. En la inspección de calidad presentó mejor color el T₄, mientras que el T₃ fue el tratamiento que tuvo mejor olor.

Palabras claves: Mucílago, Bacterias ácido lácticas, conservación, microbiológicos

ABSTRACT

The present investigation was carried out in Bromatología's Laboratory, located in the Experimental Estate " The Maria " of the Technical State University of Quevedo, located in the km 7 ½ of the route Quevedo - The Junction, Enclosure San Philip; Canton Mocache, Province of The Rivers Mocache. The same one that had as objective to evaluate the growth of mesófilos microorganisms in the beef by the action of lactic acid bacteria, to increase the time of useful life in conditions I happen environmental. A design was realized completely at random by six treatments and three observations, the obtained results were analyzed in the statistical program SPSS, applying the test of normality to know the normal distribution or not of the data, using the test Shapiro-Wilk with 5 % of probability, where there was demonstrated that the obtained results are not distributed in a normal way, the test used not paramétricos Friedman and Holm, which gave as result that: "Using mucilage of cacao Nacional (Thebroma cacao L.)" as a preservative in beef It exists microbiological differences between treatments T3", highlighting the treatment (100g of meat + 10 mL mucilage cooled to 5 ° C.) With reference to pattern treatment T1. In the quality inspection I present better color T4, While T3 was the treatment that had better smell.

Key words: Mucilage, Lactic acid bacteria, conservation, microbiological

INDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
CERTIFTRIBENTACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN.	1
CAPÍTULO I	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1.1. Planteamiento del problema.	4
1.1.2. Formulación del problema.	5
1.1.3. Sistematización del problema.	5
1.2. Objetivos.	6
1.2. Objetivo General.	6
1.2.1. Objetivos Específicos.	6
1.3. Hipótesis.	6
1.4. Justificación.	7
CAPÍTULO II	8
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1. Marco conceptual	9
2.2. Marco Referencial.	11
2.2.1. Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	11
2.1.2. Mucílago de cacao.	11
2.1.3. Bacterias ácido lácticas.	12
2.2.2. La carne de res.	16
2.1.3. Conservación de la carne.	17

CAPÍTULO III	20
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	20
3.1. Localización.	21
3.2. Tipo de investigación.	21
3.2.1. Investigación exploratoria.	21
3.2.2. Investigación descriptiva.	21
3.2.3. Análisis Documental.	21
3.3. Método de investigación.	22
3.3.1. Método inductivo – deductivo.	22
3.3.2. Método de observación	22
3.4. Recolección del mucílago.	22
3.4.2. Métodos estadísticos.	23
3.5. Fuentes de recopilación de la investigación.	23
3.6. Diseño de la investigación.	23
3.6.1. Periodos de evaluación.	25
3.7. Instrumentos de la investigación.	25
3.7.1. Análisis fisicoquímicos.	25
3.7.2. Análisis microbiológico.	25
3.7.3. Inspección de Calidad.	26
3.8. Tratamiento de los datos.	27
3.9. Recursos humanos y materiales.	27
3.9.1. Materiales y equipos.	27
CAPÍTULO IV	28
RESULTADOS Y DISCUSION	28
4.1. Inspección de calidad.	29
4.1.1. Control visual (color).	29
4.1.2. Control de olor.	30
4.1.3. Análisis Microbiológicos.	31
4.1.4. Análisis físico-químico (pH).	45
4.2. Discusión de resultados.	49
4.2.1. Control de calidad.	49

4.2.2. Análisis microbiológico de carne conservada con mucilago de cacao Nacional durante tres periodos.	50
4.2.3. Valoración física-química (pH) de la carne aplicada mucílago de cacao Nacional durante el período de investigación.	53
CAPITULO V	54
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN	54
4.1. Conclusiones.	55
4.2. Recomendaciones	56
5. Bibliografía.	58
CAPITULO VII	62
ANEXOS	62

Índice de tablas

Tabla N° 1: Bacteriocinas y microorganismo productor.	15
Tabla N° 2: Requisitos de la carne de res para el consumo.	16
Tabla N° 3: Periodos de evaluación de las muestras.	25
Tabla N° 4: Recursos utilizados en la investigación.	27
Tabla N° 5: Prueba de Normalidad Día 0 de valores microbiológicos.	32
Tabla N° 6: Prueba de Normalidad Día 4 de valores microbiológicos.	33
Tabla N° 7: Prueba de Normalidad día 8 de valores microbiológicos.	34
Tabla N° 8: Test de Friedman para los resultados del día 0 de valores microbiológicos.	35
Tabla N° 9: Test de Friedman para resultados del día 4 de valores microbiológicos.	35
Tabla N° 10: Test de Friedman para los resultados del día 8 de valores microbiológicos.	36
Tabla N° 11: Resultados de test de Holm ($\alpha=0,05$) pertenecientes al día 0.	36
Tabla N° 12: Resultados de test de Holm ($\alpha=0,05$) pertenecientes al día 4.	37
Tabla N° 13: Resultados de test de Holm ($\alpha=0,05$) pertenecientes al día 8.	37
Tabla N° 14: Resultados microbiológicos.	39
Tabla N° 15: Prueba de normalidad tiempo (t_0) de valores de pH.	45
Tabla N° 16: Prueba de normalidad tiempo (t_1) de valores de pH.	46
Tabla N° 17: Prueba de normalidad tiempo (t_2) de valores de pH.	46
Tabla N° 18: Rango de resultados del test de Friedman tiempo (t_0).	47
Tabla N° 19: Rango de resultados del test de Friedman tiempo (t_1).	47
Tabla N° 20: Rango de resultados del test de Friedman tiempo (t_2).	48
Tabla N° 21: Resultados pH.	48

INDICE ANEXOS

ANEXO 1 : Ficha para la evaluación sensorial de empleo de bacterias ácido láctica provenientes de mucilago de cacao nacional en carne de res.	63
ANEXO 2: NTE INEN 2346 Carne y menudencias comestibles de animales de abasto. Requisitos.	65
ANEXO 3: NTE INEN 1529-5 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos <i>aerobios mesófilos</i> Rep.	71
ANEXO 4: NTE INEN 1529-14 Control microbiológico de los alimentos. <i>Staphylococcus aureus</i> . Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.	78
ANEXO 5: NTE INEN 783 Carne y productos cárnicos. Determinación de pH.	85
ANEXO 6: Guía de interpretación. Placas petrifilm para recuento de <i>E. Coli/ Coliformes</i>	89
ANEXO 7: Resultados de análisis realizados.	95
ANEXO 8: Resultados estadísticos de test de Friedman y Holm del día 0.	97
ANEXO 9: Resultados estadísticos de test de Friedman y Holm del día 4.	100
ANEXO 10: Resultados estadísticos de test de Friedman y Holm del día 8.	102
ANEXO 11: Evidencias del desarrollo de la investigación.	105

Introducción.

El cacao es originario de la selva amazónica, su nombre científico es (*Theobroma cacao* L), que significa “comida de los dioses”. En el Ecuador el cacao tiene una gran diferencia en relación con otras producciones (1). Su grano está cubierto por una pulpa mucilaginosa blanca (conocida por mucílago) que recubre a la almendra de cacao que es obtenida al partir la mazorca, este exudado es eliminado sin darle uso por parte de los agricultores y asociaciones cacaoteras del país (2).

El mucílago ofrece excelentes condiciones de vida para algunos microorganismos que juegan un importante papel en la fermentación, transformando los azúcares en alcohol etílico, seguidamente el alcohol etílico se convierte en ácido acético por acción de las bacterias lácticas y acéticas (3,4). Con la finalidad de alargar la vida útil de los alimentos es utilizado en la biopreservación, que no es otra cosa que un método de conservación en el que se utilizan bacterias ácido lácticas (BAL). Estas funcionan como cultivos bioprotectores contrarrestando el crecimiento de bacterias no deseadas (5).

En el caso de la carne por tener un alto contenido de proteínas, grasas, vitaminas y minerales se convierte en un medio rico para el crecimiento de microorganismos que están en la carne reduciendo considerablemente el tiempo de vida útil (6).

Esto ha obligado al desarrollo de modernos sistemas de refrigeración, para alargar la vida útil y así poder garantizar la calidad de la carne. Entre ellos se encuentra la biopreservación, un método que por medio de la microflora natural y de sus productos antimicrobianos logran aumentar la seguridad de los alimentos y específicamente en cárnicos (6).

En el Ecuador existe un alto índice de enfermedades de estómago por ejemplo la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), que también está relacionada con algunos tipos de linfoma de estómago conocido como linfoma del tejido linfático asociado con la mucosa (MALT), dentro de las causas estaría el consumo de comidas que poseen conservante sintéticos (7).

Por los antecedentes antes mencionados se hace importante el uso de conservantes en la carne, sin embargo estos pueden causar daño a la salud, el consumidor se ha vuelto cada vez más exigente en la búsqueda de productos que no contengan preservantes y aditivos químicos para disminuir efectos adversos. Esta investigación fue direccionada a la búsqueda de una alternativa, que sería el uso de bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao Nacional aplicado como conservante en la carne de res que es consumida en el Cantón Quevedo.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

En el Ecuador, la carne de res es un alimento fundamental en la nutrición humana para el desarrollo físico y mental, ya que proporciona gran cantidad de nutrientes, debido a su aporte de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. Estos mismo nutrientes la convierten en un medio rico para el crecimiento de microorganismos tales como: *Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli*, que conjuntamente con la actividad de agua (Aw) y pH ideal para el desarrollo de microorganismos mesófilos que deterioran o descomponen acortando el tiempo de vida útil de la misma, razón por la cual se hace importante la aplicación de algún conservante natural para garantizar la calidad de la carne de res sin perjudicar la salud del consumidor.

Diagnóstico.

La carne al ser alimento perecedero debido a su gran cantidad de nutrientes, ha obligado a la utilización de conservantes para alargar su vida útil, generalmente estos conservantes son de origen químico, que pueden ocasionar un efecto adverso a la salud del consumidor, generando exigencias sobre el uso de conservantes naturales. La presente investigación es una propuesta de utilizar el mucílago de cacao Nacional como conservante en la carne de res como alternativa a los métodos tradicionales de conservación.

Pronóstico.

El principal ingreso en la provincia de Los Ríos es la agricultura, teniendo entre los principales productos el Cacao, en el centro de acopio de la Asociación de productores de cacao “la Cruz” ubicado en el cantón Mocache se comercializa únicamente el Cacao Nacional orgánico, generando una gran cantidad de mucílago que no es aprovechado, causando contaminación. Datos de la literatura demuestra que el mucílago fermentado de cacao contiene bacterias ácido lácticas que producen bacteriocinas, creando la posibilidad de ser utilizadas como conservantes biológicos puros, de una manera innovadora alargando

el tiempo de vida útil de este alimento. Generando ingresos adicionales por la venta de conservantes naturales, como el mucílago de cacao que actualmente se desperdicia.

1.1.2. Formulación del problema.

¿Cuál sería el tratamiento de aplicación de mucílago fermentado de cacao Nacional que se debe usar para conservar la carne de res faenada en la ciudad de Quevedo, manteniendo parámetros microbiológicos (*Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli*) que aseguren la calidad para el consumo humano?

1.1.3. Sistematización del problema.

Una vez formulado el problema de investigación, permite disgregar en otras interrogantes que tributan a formular objetivos; estos son:

¿Qué tratamiento físico debe recibir el mucílago de cacao Nacional antes de ser aplicado a la carne de res?

¿Cómo se deberá aplicar el mucílago de cacao Nacional para lograr alargar el tiempo de vida útil de la carne de res?

¿Cuánto tiempo puede conservarse la carne añadiendo mucílago?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

Evaluar el crecimiento de microorganismos mesófilos en la carne de res mediante la acción de bacterias ácido lácticas para aumentar el tiempo de vida útil en condiciones medio ambientales.

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Analizar las características organolépticas (color y olor) de la carne de res conservada con mucílago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) mediante una inspección de calidad en los diferentes periodos durante la investigación.
- Realizar un conteo bacteriano (*Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli*) por determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en la carne de res durante el estudio.
- Medir posibles cambios físico-químico (pH) en la carne de res en los diferentes periodos de investigación.

1.3. Hipótesis.

H₁: La carga microbiana en la carne de res conservada 8 días recubierta con mucílago de cacao Nacional cumple con los estándares de calidad establecidos INEN.

H₀: La carga microbiana en la carne de res conservada 8 días recubierta con mucílago de cacao Nacional no cumple con los estándares de calidad establecidos por el INEN.

1.4. Justificación.

La conservación de carne de res con bacteriocinas producidas por bacterias ácido láctica presentes en la mucílago del cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) se presentó como una alternativa a los métodos tradicionales, extendiendo la vida útil y aumentando la seguridad alimentaria, ya que son preservantes naturales. Además de existir la posibilidad de sustituir el uso de componentes químicos, que pueden poner en riesgo la salud del consumidor.

Con la ejecución de este trabajo y resultados se aporta con información científica para la generación de nuevas tecnologías y poder aprovechar el mucílago de cacao Nacional.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

Cacao “CCN-51”: Es un híbrido doble, fue obtenido por el Agrónomo Homero Castro Zurita con la Colección Castro Naranjal 51. Investigó desde 1952 las diversas variedades del grano hasta que en 1962 desarrolló un clon de material genético Trinitario y Forastero de origen amazónico (8).

Cacao “Nacional”: Son producto del cruzamiento natural de la variedad local con materiales introducidos desde Venezuela y Trinidad (9). Su producción varía entre 180-260 kg/ha/año, sus semillas poseen aroma fino y suave (10).

Fermentación.- Es un proceso en el que ocurren cambios bioquímicos que permiten el desarrollo de las almendras mejorando los factores de calidad principalmente sabor y aroma, proporciona mejores características al producto final. La fermentación tiene dos etapas: Etapa anaeróbica y aeróbica (11).

Etapa anaeróbica.- Tiene una duración de 48 horas, una vez colocado el cacao en la unidad de fermentación; la pulpa del grano es separada por levaduras, fermentos y transformado en alcohol sin aire (12).

Etapa aeróbica.- Es la continuidad de la anaeróbica, ocurren reacciones bioquímicas producidas por bacterias (*Acetobacter*), transformando el alcohol en ácido acético, causando cambios físico y químico, como: hinchamiento, fisuramiento de la almendra, elevación de temperatura y cambio de color interno (12).

Teaflavinas.- Son polímeros de alto peso molecular, resultantes de la oxidación y polimerización de las catequinas con facilidad de unión con las proteínas (13).

Tearrubiginas.- Son un grupo de pigmentos fenólicos, pertenecientes a las catequinas, con un peso molecular de 700 a 40000 Da (13).

Mucílago.- Sustancia viscosa que contiene el cacao, compuesto por el 80% de agua, de 10 a 15 % de glucosa y fructosa, hasta el 5% de ácidos no volátiles. Suelen confundir con gomas y pectinas, diferenciándolas por sus características físicas (14).

ATP.- Adenosín-trifosfato, es una coenzima fosforilante, compuesta por adenina, ribosa y tres fosfatos. Su función es de servir de reservorio de la energía que se obtiene de sustancias como carbohidratos, grasas, proteínas cuando son oxidadas (15).

FDA.- *U. S. Food and Drug Administration*; Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos. Es una Agencia Federal que se encarga de proteger la salud pública mediante la regulación de los medicamentos, alimentos, suplementos dietéticos, productos que emitan radiaciones (16).

GRAS.- *Generally Recognized As Safe*. Es una Agencia que pertenece al FDA y es el responsable de garantizar que los componentes químicos presentes en alimentos, medicamentos, cosméticos sean internacionalmente reconocidos y seguros (16).

NTE INEN 783.- Norma Técnica Ecuatoriana; Instituto Ecuatoriano de Normalización; Carnes y productos cárnicos. Determinación de pH (17).

NTE INEN 1529-5.- Norma Técnica Ecuatoriana; Instituto Ecuatoriano de Normalización; Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos *aerobios mesófilos* (18).

NTE INEN 1529-8.- Norma Técnica Ecuatoriana; Instituto Ecuatoriano de Normalización; Control microbiológico de los alimentos. Determinación de Coliformes fecales y *E.coli* (19).

NTE INEN 1529-14.- Norma Técnica Ecuatoriana; Instituto Ecuatoriano de Normalización; Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. (20).

2.2. Marco Referencial.

2.2.1. Cacao (*Theobroma cacao* L.).

El cacao es originario de la selva amazónica, su nombre científico es (*Theobroma cacao* L), que significa “comida de los dioses”. Su árbol para producir frutos tarda de 4 a 5 años dependiendo de las condiciones de la zona, considerando que su temperatura ideal sería entre 25-28 °C (1).

El árbol del cacao (*Theobroma cacao* L., familia *Sterculiaceae*) alcanza entre 4 y 8 metros de altura. La nuez (fruto) puede llegar a medir de 15-25 cm de longitud, cada fruto contiene aproximadamente 40-60 semillas en dependencia del genotipo (21).

El grano de cacao está cubierto por una pulpa mucilaginosa blanca, descartando el mucílago encontramos la cascarilla de la semilla de color rosado en forma de envoltura. La forma podría variar dependiendo del número de semillas de la mazorca y de situaciones ambientales (14). Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) en la Norma Técnica 176:2006, en el Ecuador se clasifica el cacao en dos tipos: Trinitario y Nacional.

2.1.2. Mucílago de cacao.

Se llama mucílago a la membrana de color blanco que recubre a la almendra de cacao que es obtenida al partir la mazorca. Este exudado es eliminado sin darle uso por parte de los agricultores y asociaciones cacaoteras del país.

Es de origen vegetal con peso y estructura molecular desconocidas. Tienen semejanzas con las gomas y pectinas por estar conformados por polisacáridos celulósicos con la misma cantidad de azúcares. La diferencia está en las propiedades físicas, por un lado las pectinas se gelifican con el agua, las gomas se hincha para formar dispersiones coloidales gruesas, mientras que los mucílagos producen coloides pocos viscosos, que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados (2).

También se la denomina fermentación acética, ya que el etanol pasa por una fase de oxidación con la constante producción de ácido acético. Esta etapa dura 48 horas, concordando con la primera (3).

Entre las bacterias acéticas más importantes que se han aislado en esta etapa de la fermentación son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Actobacter pasteurianus*.

El mucílago constituye un medio rico para el desarrollo microbiano ya que contiene 82-87% de agua, azúcares 12%, ácido cítrico 1-2%. (14).

Las enzimas polifenoloxidasas son causantes del pardeamiento, produciendo la oxidación de los polifenoles incoloros, en una primera etapa en compuestos color amarillos denominados teaflavinas y luego tearrubiginas de colores marrones y rojos.

Para evitarlo se aplican técnicas tales como: estabilización térmica mediante vapor de agua a 92 °C por 60 y 120 segundos; estabilización química con meta bisulfito de sodio y ácido ascórbico. Esta efectividad es verificada mediante la prueba de guayacol.

Debido a su sabor tropical ha sido utilizado en la elaboración de productos entre los más conocidos: Vinagre, jalea de cacao, alcohol, nata y pulpa procesada. También puede ser disipada fresca en forma de jugos o batidos, también ser empleada para dar sabor a helados y yogures (4,22)

2.1.3. Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas son organismos con un conjunto de características metabólicas, fisiológicas y morfológicas poco corriente. Al mismo tiempo sintetizan Adenosin Trifosfato (ATP) a través de fermentaciones de carbohidratos que dan ácido láctico como principal y a veces como producto final. En general las bacterias ácido lácticas (BAL) son cocos o bacilos Gram positivos, que producen ácido láctico como único o principal producto de fermentación de carbohidratos (23).

Desde hace décadas las BAL son utilizadas como conservantes o bioconservantes, debido a la acción antibacteriana que permite la producción de bacteriocinas y otras sustancias evitando la descomposición de los alimentos. Además de aportar sabor y textura y en casos mejorando su valor nutricional (24).

Las BALs son clasificadas en diferentes géneros por su morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), crecimientos a diferentes temperaturas y su capacidad de crecer en altas concentraciones de sal y tolerancia ácida o alcalina. Existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Canocaterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (25). Dentro de la familia de las BALs se encuentran las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos producidos principalmente por el grupo de las bacterias ácido lácticas. Se las utiliza para extender la vida útil, controlar fermentaciones y la acción antimicrobiana, ya que actúan contra microorganismos causantes de la descomposición de los alimentos y causantes de enfermedades (26).

En las BAL se encuentran proteínas o péptidos antimicrobianos que son llamadas bacteriocinas, su función es atacar la membrana celular de las bacterias para evitar la reproducción. Las bacteriocinas originadas por las BAL se presentan en forma de extracto crudo tienen un alto potencial de conservación, siendo una alternativa en la industria alimentaria brindando mejores resultados en los productos conservados naturalmente (27,28).

Las BALs se agrupan en cuatro clases, cada una posee diferentes características, por ejemplo la nisina, que es la más estudiada no necesita un receptor unido a la membrana para la formación de poros. Las plantaricinas obedecen la acción de dos péptidos a, b y consecuente disipación del potencial de la membrana (29). Las bacteriocinas originadas por las BAL se agrupan en cuatro clases:

Clase I: Formada por los antibióticos de amplio espectro, de bajo peso molecular y modificaciones post-tradicionales. En este grupo la más tradicional es la nisina.

Clase II: Conformada por péptidos termoestables de bajo peso molecular sin modificaciones, son de actividad Antilisterial.

Clase III: Compuesta por péptidos de mayor tamaño, termolábiles. En este grupo la más representativa es la helveticina.

Clase IV: En este grupo se encuentran las moléculas complejas con fracciones de lípidos y carbohidratos (30).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas ocurre de diferente manera, dependiendo de la especie bacteriana y sus condiciones de crecimiento, se podría considerar complejo el modo de acción. La mayor parte del tiempo las bacteriocinas destruyen a la membrana citoplasmática por la formación de poros, alterando la fuerza motriz de protones que producen la energía y síntesis de proteínas o en otros casos dejando escapar pequeñas cantidades de compuestos (29). Tales bacteriocinas son producidas por diferentes microorganismos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla N° 1: Bacteriocinas y microorganismo productor.

Bacteriocinas	Productor	Espectro de inhibición	Tamaño (número de aminoácidos)
Clase I: Lantibióticos			
Nisina (AyZ)	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	34
Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	27
Lactocina S	<i>Lactobacillus Sake</i>	Amplio	37
Carnocina U149	<i>Carnobacterium Piscícola</i>	Amplio	35-37
Clase II: No lantibioticos: Termoestables			
Lactococcina A	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	54
Lactococcina B	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	47
Lacticin F	<i>Lactobacillus johsonii</i>	Estrecho	57-48
Plantaricina	<i>Lactobacillus planctarum</i>	Amplio	34
Sakacina P	<i>Lactobacillus Sake</i>	Amplio	41
Pediocina AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Amplio	44
Divergicina M35	<i>Carnobacterium divergens</i>	Amplio	43
Enterocina P	<i>Enterococcus faecium</i>	Estrecho	44
Clase III : Mayor tamaño, termolábiles			
Helveticina J	<i>Lactobacillus Helveticus</i>	Estrecho	333
Clase IV: Moléculas complejas			
Cicularina A	<i>Geobacillus kautophilus</i>	-	76

FUENTE: AGUDELO; TORRES (30).

De estas bacterias podemos destacar la nisina que es la única reconocida por la *Food and Drug Administration* (FDA) con la categoría GRAS (*Generally Recognized As Safe*), siendo producida en algunos lácteos de forma natural, su aplicación en la industria alimentaria es como aditivo de productos lácteos para contra bacterias Gram positivas.

Esta bacteriocina es un péptido de 34 aminoácidos, de síntesis compleja que requiere de procesos de transcripción, traducción modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento y señales de transducción. Existen dos tipos de nisina; la nisina A y la nisina Z, teniendo como diferencia el aminoácido 27, la histidina en la nisina A y asparagina en la nisina Z (24).

2.2.2. La carne de res.

Se llama carne al tejido muscular de animal después del sacrificio, por su valor nutritivo y comestible es preferido para la alimentación del hombre. La carne de res posee proteínas de alta calidad por que contienen todos los aminoácidos esenciales, así también sus minerales de elevada biodisponibilidad (6).

La carne para ser apta para el consumo humano tiene que cumplir ciertos requisitos organolépticos tales como color, consistencia, olores propios y características del producto. Un pH que debe estar en rangos de >5.5 y < 7 , como también deben cumplir con ciertos requisitos microbiológicos indicados en la Tabla 2 (17).

Tabla N° 2: Requisitos de la carne de res para el consumo. NTE INEN 2346

Fisicoquímicos			m	M	Método de ensayo	
pH			5,5	7,0	NTE INEN 783	
Microbiológicos		n	C	m	M	Método de ensayo
<i>Aerobios mesófilos UFC/g</i>	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5	
<i>Escherichia coli UFC/g</i>	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1529-8	
<i>Staphilococcus aureus</i> UFC/g	5	1	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	NTE INEN 1529-14	

FUENTE: INEN, 2010 (17)

Dónde:

n = números de unidades de muestras.

c = número de unidades defectuosas que se acepta.

m = nivel de aceptación.

M = nivel de rechazo.

2.1.3. Conservación de la carne.

La conservación de la carne pretende alargar la vida útil y evitar deterioro. La carne por tener un alto contenido de carbono, nitrógeno, vitaminas, etc. se convierte en un medio rico para el crecimiento de microorganismos que conjuntamente con la temperatura, la actividad de agua, pH, ayudan a la reproducción de los microorganismos, que disminuyen la vida útil y su calidad organoléptica convirtiéndose en un producto muy perecible (6).

Operaciones previas a la conservación de la carne como el troceado, la cocción, entre otros podrían acelerar este proceso de deterioro, por ruptura de la membrana de la célula muscular, permitiendo que la oxidación de lípidos acelere su proceso afectando sus atributos, generando rancidez en la carne (31).

Considerando el alto porcentaje de pérdidas, debido a la daño oxidativo de la carne se ha generado diversos métodos de conservación resultando un gran reto, resultando algunos ser polémicos por su efecto tóxico en la salud (31). Esto ha obligado al desarrollo de nuevas alternativas o complementos con el conocido método de refrigeración, para alargar la vida útil y así poder garantizar la calidad de la carne. Entre ellos se encuentra la biopreservación, un método que por medio de la microflora natural y de sus productos antimicrobianos logrando aumentar la seguridad de los alimentos y específicamente en cárnicos. Otra alternativa sería el uso de las bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao Nacional (6).

A continuación, tenemos los principales métodos de conservación para carnes y productos cárnicos:

- Refrigeración de la carne
- Envasado al vacío
- Marinado Industrial/ casero
- Envasado activo con materiales plásticos
- Envasado activo con materiales biodegradables
- Biopreservación.

2.1.3.1. pH de la carne.

El pH del animal vivo es prácticamente 7 (neutro), luego de la muerte del mismo desciende por acción del ácido láctico producido por el glucógeno, después de 24 horas post-sacrificio desciende lentamente hasta alcanzar el pH final. Este pH se mantiene constante hasta la putrefacción y es de 5,4 – 5,5. Los valores de pH de la carne fresca que favorece el desarrollo de mohos y levadura como consecuencia de las reacciones químicas post-mortem es aproximadamente entre 5.4 – 5.6, el pH se incrementa hasta alcanzar valores neutro entre 6.5 – 7.0 favoreciendo así el crecimiento microbiano, cuando los valores de pH son bajos 5.2 o menos, el crecimiento microbiano es muy escaso en relación con el que tiene rangos normales (32).

2.1.3.1. Biopreservación.

Con la finalidad de alargar la vida útil de los alimentos es utilizado la biopreservación, que no es otra cosa que un método de conservación en el que se utiliza bacterias ácido lácticas (BAL). Estas funcionan como cultivos bioprotectores contrarrestando el crecimiento de bacterias no deseadas (5). Existen cuatro métodos básicos: dos *in situ* (1, 2), dos *ex situ* (3,4).

1. Añadiendo un cultivo puro BAL viables productoras de bacteriocina.
2. Ácidos lácticos mesófitas como protección contra el abuso de temperatura.
3. Aplicando preparaciones de bacteriocina cruda (extracto crudo), licor fermentado o concentrados obtenido por el crecimiento de BAL.
4. Adicionando sustancias antagónicas puras o semi puras como las bacterocinas productoras por BAL (33).

El uso de la biopreservación en alimentos cárnicos ha expuesto variedad de antagonismos microbianos, como en la prolongación de vida útil del alimento. La influencia de las bacterocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* en carne de bovino refrigerada, amplió su vida útil por tres días en comparación con el control. Mientras que el *Clostridium perfringens* LMG 11264 fue inhibido por la *Plantaricina* UG1, por esto se

sugieres que la plantaricina es más efectiva que la nisina en la aplicación en alimentos, debido a sus amplios rangos de temperatura y su actividad en medio ácido (34,35).

La biopreservación debe aplicarse como medida adicional a las buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento, almacenamiento y distribución de las carnes (36).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología, ubicado en la Finca Experimental “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en el km 7 ½ de la vía Quevedo – El Empalme, Recinto San Felipe; Cantón Mocache, Provincia de Los Ríos.

Entre las coordenadas geográficas de 01°06´ de latitud Sur y 79°29´ de longitud Oeste a una altura de 120 msnm con una temperatura media de 25.8 °C.

3.2. Tipo de investigación.

3.2.1. Investigación exploratoria.

Debido a no tener muchos antecedentes para recopilación de información previa para el siguiente trabajo se aplicó una investigación exploratoria para la obtención de los datos requeridos.

3.2.2. Investigación descriptiva.

Mediante este tipo de investigación se utiliza el método de análisis, se logró caracterizar un objeto de estudio o una situación concreta, señalar sus características y propiedades, sirve para ordenar, agrupar o sintetizar los objetos involucrados en el trabajo. La investigación descriptiva responde a preguntas tales como: quién, qué, dónde, cuándo y cómo.

3.2.3. Análisis Documental.

Se obtuvo fuentes de información de carácter primario con la medición directa de los datos experimentales, también se revisamos fuentes secundarias en las cuales se utilizó revistas online, libros, artículos científicos con información confiable.

3.3. Método de investigación.

3.3.1. Método inductivo – deductivo.

Se aplicó este tipo de investigación, ya que se parte de un problema hacia una posible solución, el mismo que permitió obtener una tecnología adecuada para conseguir los datos requeridos.

3.3.2. Método de observación

Mediante este método se analizó los cambios del mucílago durante su fermentación, como también el efecto que tiene en la carne de res durante el periodo de evaluación.

3.4. Recolección del mucílago.

El mucílago de cacao Nacional fue obtenido del centro de acopio de la asociación “La Cruz” del Cantón Mocache, provenientes de frutos maduros y sanos. Tomando en cuenta que luego de la recolección se dejó fermentar por 48 horas.

El mucílago recogido registro un pH de 3.7, luego fue dividido en dos partes, la mitad sometida a calentamiento (70 °C por 10 min) con el objetivo de inactivar microorganismos y enzimas; y la otra mitad sometida a refrigeración en un envase de plástico para controlar la multiplicación de microorganismos y la fermentación, de esta manera las bacterias no mueren pero paran su actividad para posterior uso.

3.4.1.1. Recepción de la carne de res.

La carne de res (lomo de falda o salón), se recibió del camal municipal del Cantón Quevedo, con menos de 24 horas después del sacrificio, manteniendo buenas características organolépticas para asegurar el desarrollo de la investigación.

3.4.1.2. Modo de aplicación.

Se preparó muestras de 100 g. de carne en rebanadas c/u, donde se aplicó seis tratamientos con tres observaciones cada una.

Los tratamientos T_1 , T_2 considerados como controles, mientras que en los tratamientos T_3 , T_4 , T_5 , T_6 se aplicó 10 mL de mucilago con una jeringa a cada una de las muestras dentro de fundas de polietileno y fueron analizadas microbiológicamente en el día 0, 4, 8.

3.4.2. Métodos estadísticos.

Con la ayuda de un software, se cuantifico, se tabulo y ordeno los datos obtenidos mediante análisis, los mismos que permitieron encontrar los resultados de la investigación.

3.5. Fuentes de recopilación de la investigación.

El presente trabajo de investigación utilizo las siguientes fuentes:

- Consultas directamente a la fuente, expertos.
- Investigación en el laboratorio.
- Revisión bibliográfica.
- Internet.

3.6. Diseño de la investigación.

La presente investigación se realizó con un diseño completamente al azar con seis tratamientos y tres observaciones, los resultados obtenidos fueron analizados en el programa estadístico SPSS, se realizó la prueba de normalidad para juzgar la distribución muestral, como esta investigación tiene datos inferiores a 50 se contrasto esta prueba con Shapiro-Wilk, el nivel de significancia fue fijado en $p > 0,05$.

Una breve explicación de la funcionalidad de cada test no paramétrico utilizado en la presente investigación:

Test de Friedman

Es un test de varianza para variables de carácter no paramétrico. Mediante algoritmos los resultados son asignados un orden para cada función, donde al mejor le asignan el orden 1, mientras que al peor el orden k. las hipótesis nula se formulara suponiendo que los resultados de los algoritmos son equivalentes, resultando un ranking similar. En este test los grados de libertad se distribuye acorde a X^2 con $K-1$, siendo $R_j = \frac{1}{N} \sum_i r_i^j$, y N el número de casos. Cuando $N > 10$ y $K > 5$ se podría concluir que los valores estadísticos críticos de Friedman coinciden con los parámetros de la distribución X^2 (37).

Test de Holm

Este test prueba las hipótesis según su significancia de manera ordenada. Estos valores de p son ordenados p_1, p_2, \dots , de tal forma que $p_1 \leq p_2 \leq \dots \leq p_k - 1$. Holm comprar desde el valor de mayor significancia. Si p_1 es menor que $\alpha/(k-1)$, se rechazara la hipótesis correspondiente permitiendo hacer una comparación entre p_2 con $\alpha/(k-2)$. en caso de ser rechazada esta segunda hipótesis se continua con las comparaciones siguientes. Si una de las hipótesis no puede ser rechazada todas las restantes se mantienen como aceptadas. El

algoritmo de comparación es: $Z = (R_i - R_j) / \sqrt{\frac{k(k+1)}{6N}}$

A continuación se presentan los tratamientos a ser estudiados en el presente trabajo:

T₁: 100g de carne control.

T₂: 100g de carne + 0.02 g de nitrito como control positivo.

T₃: 100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C¹.

T₄: 100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C diluido con agua 1:1.

T₅: 100g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento 70 ° C por 10 min².

T₆: 100g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento diluido agua 1:1.

¹ Datos sugeridos por el Dr. Julio Vinueza Galarraga, Doctor en alimentos y nutrición – área de enzimología de la Universidad Estatal Paulista Julio de Mesquita Filho, Brasil.

² Datos sugeridos por el Dr. Julio Vinueza Galarraga, Doctor en alimentos y nutrición – área de enzimología de la Universidad Estatal Paulista Julio de Mesquita Filho, Brasil.

3.6.1. Periodos de evaluación.

A continuación en la Tabla 3 se observa los días de los periodos de revisión que se realizó durante el presente experimento.

Tabla N° 3: Periodos de evaluación de las muestras.

Tiempo	N° muestras
Día cero	18
Día cuatro	18
Día ocho	18
Total	54

ELABORADO: AUTOR

3.7. Instrumentos de la investigación.

3.7.1. Análisis fisicoquímicos.

Los análisis físico-químicos fueron realizados evaluando los valores de pH, de acuerdo con las Normas Técnicas Ecuatorianas (INEN 0783).

Determinación de pH.- La determinación fue realizada por duplicado sobre la misma muestra, pesado 10 g de carne y colocados en un vaso de precipitación de 250 mL. Se agregó 90 mL de agua destilada, agitando y macerando por 1 hora. Después de ese periodo el pH se analizó en un pHmetro.

3.7.2. Análisis microbiológico.

Los análisis microbiológicos se realizaron evaluando el número de UFC en cada muestra respectivamente. Estos análisis fueron efectuados de acuerdo con las Normas Técnicas Ecuatorianas respectivamente; *Aerobios mesófilos* NTE INEN 1529-5, *Escherichia Coli* NTE INEN 1529-8, *Staphylococcus aureus* NTE INEN 1529-14.

Aerobios mesófilos.- En cada una de las cajas Petri se depositó 1 cm³ de cada dilución. Inmediatamente verter en cada placa inoculada aproximadamente 20 cm³ de agar para recuento en placa-PCA, fundido y templado a 45 °C ± 2 °C. Cuidadosamente, mezclar el

inoculo de siembra con el medio cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén. Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. Luego invertir las cajas e incubarlas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas. Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias utilizando un contador de colonias (18).

Escherichia Coli.- Agregar 1 mL de suspensión inicial a 9 mL de caldo lauril sulfato (medio de enriquecimiento selectivo) de concentración simple. Incubar los tubos a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, si no se observa opacidad ni producción de gas inocular hasta $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. los tubos que presentaron opacidad o presencia de gas se debe subcultivar, inoculando con asa de muestreo un tubo que contiene Caldo EC (medio líquido selectivo) e incubarlos en el baño de agua o en la incubadora a $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Si no se observa presencia de gas extender la incubación hasta $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ h}$ (19).

Staphylococcus aureus.- A partir de la dilución 10^{-1} , pipetear por duplicado volúmenes de 0.1 cm^3 de la muestra en las placas. Inocular por duplicado volúmenes de 1 cm^3 de la muestra madre (10^{-1}). Incubar entre $35\text{ y }37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $32 \pm 2\text{ h}$. elegir las placas que contengan entre 15 y 150 colonias típicas y/o atípicas, desechar las placas que presenten crecimiento invasivo en más de la mitad de la superficie, si contienen más de 150 colonias con placas inoculadas con menos cantidad de muestra. Escoger de cada una de las muestras seleccionadas al azar las bien aisladas, en un número equivalente a la raíz cuadrada del número de colonias contadas en la placa. Tocar en el centro de cada colonia elegida e inocularla individualmente, incubar los tubos a 43 ± 1 durante 6 a 18 h. los tubos q presenten crecimiento hacer un frotis y teñirlo por el método Gram (20).

3.7.3. Inspección de Calidad.

La inspección de calidad fue realizada por 5 panelistas, evaluando los cambios de color y olor en los días cero, cuatro y ocho durante la investigación. Para el mejor entendimiento de los cambios en la carne de res se usó una escala numérica en la hoja de evaluación sensorial presentada en el anexo N°1.

3.8. Tratamiento de los datos.

A continuación se detalla los tratamientos en la investigación de mucílago de cacao como conservante en la carne de res.

T₁: 100 g de carne control.

T₂: 100 g de carne + 0.02 g de nitrito como control positivo.

T₃: 100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 °C.

T₄: 100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 °C diluido con agua 1:1

T₅: 100 g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento 70 °C por 10 min.

T₆: 100 g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento diluido agua 1:1.

3.9. Recursos humanos y materiales.

3.9.1. Materiales y equipos.

La Tabla 4 contiene la lista de recursos utilizados en la investigación.

Tabla N° 4: Recursos utilizados en la investigación.

Materia Prima	Materiales	Equipos
Mucílago de cacao	Fundas de polietileno	Mufla
Carne de res	Tubos de ensayo	Estufa
	Pipeta	Autoclave
	Matraz	Balanza analítica
	Crisoles	pHmetro
	Desecadores	Cámara fotográfica
	Pinzas	Computadora
	Placas petrilm	Refrigeradora
	Guantes	

ELABORADO: AUTOR

CAPÍTULO IV

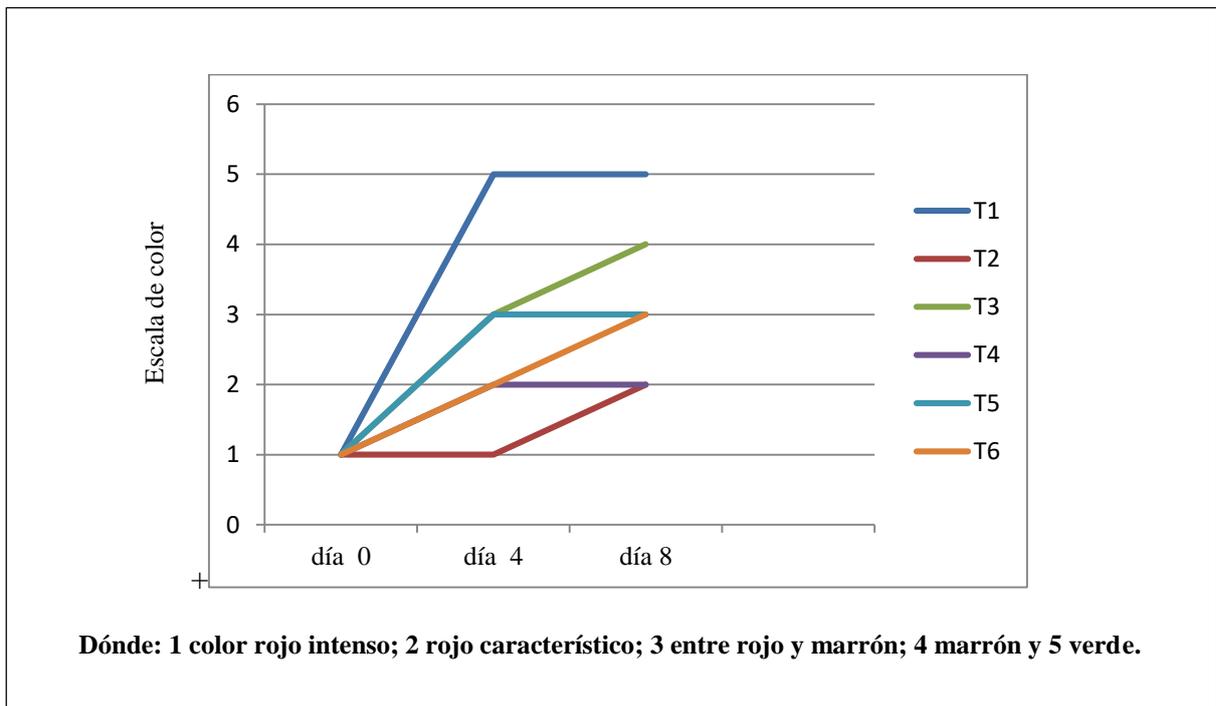
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Inspección de calidad.

4.1.1. Control visual (color).

El control visual de las muestras permitió observar el cambio de color en las muestras de carnes de res conservadas con mucílago de cacao Nacional, en los días 0, 4 y 8 del periodo de investigación. (Ver ficha en el anexo 1).

Figura 1: Control visual de color en la carne de res conservada con mucílago.



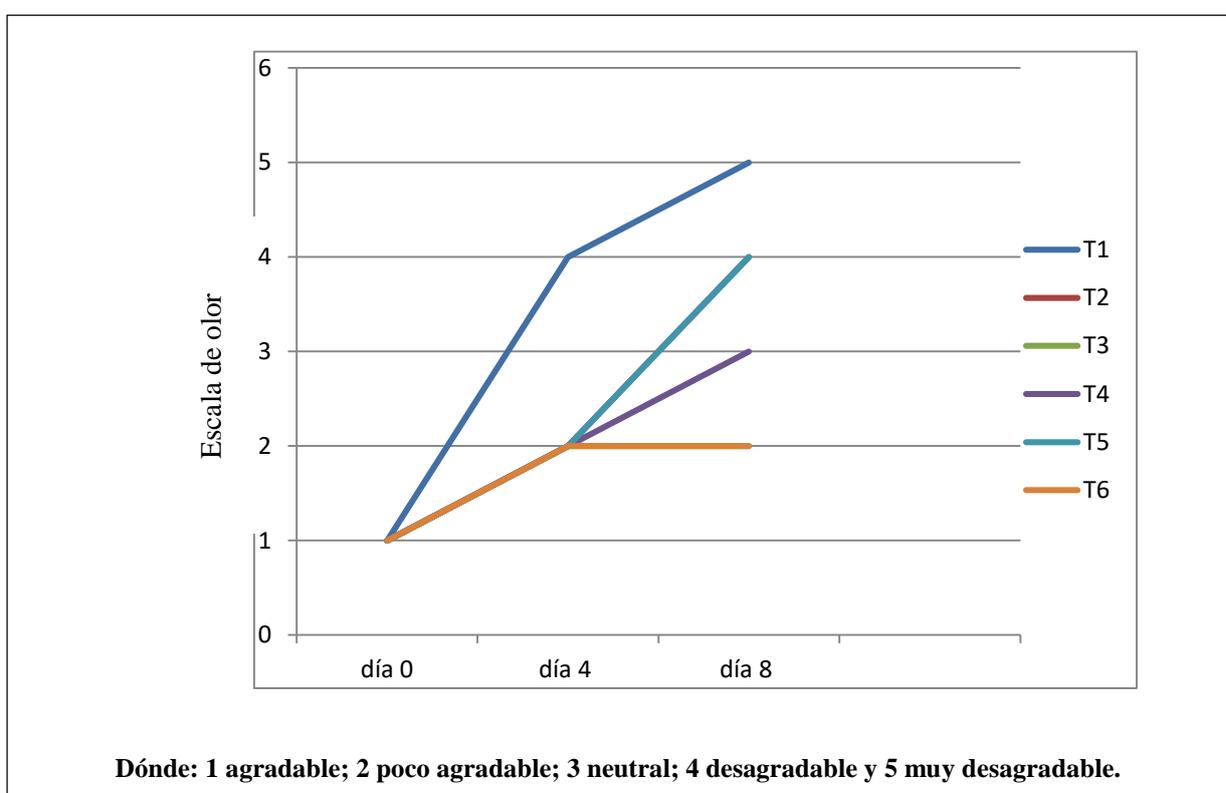
Las muestras presentaron un color rojo característico al iniciar la investigación, el color cambio durante el periodo de evaluación, el tratamiento T₁ (patrón) paso de color rojo a verde al día cuatro, manteniéndose así hasta el día ocho; el T₂ (carne + nitritos como control positivo) el color rojo se reflejó más intenso en el cuarto día, volviéndose más pálido al día ocho; el T₃ (100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C.) presento colores entre rojo y marrón en el día cuatro, luego su color marrón fue intenso en el día ocho; el T₄ (100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C diluido con agua 1:1) no presento cambios en los días en estudio, manteniéndose en un color rojo característico; mientras que el T₅ (100 g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento 70 ° C por 10 min.) su color disminuyo a rojo pálido en el día cuatro, presentando en el día ocho colores entre rojo y marrón; finalmente el T₆ (100 g de carne + 10 mL mucílago inactivado

por calentamiento diluido agua 1:1.) presentó una coloración rojo pálido en el día cuatro, mientras que cambio de color a rojo y marrón en el día ocho.

4.1.2. Control de olor.

El control facilitó evaluar el cambio de olor en la muestras de carne de res adicionada mucílago de cacao Nacional, durante el tiempo que duro la investigación. (Ver ficha en el Anexo 1).

Figura 2: Control de olor en la carne de res conservada con mucílago.



Cabe aclarar que el tratamiento T₂ lleva la misma trayectoria que el T₅; de igual manera el tratamiento T₃ con el T₆, por lo que no se puede apreciar sus líneas en el gráfico.

El cambio de olor fue evidente a medida que pasaba el tiempo, inicio con olor característico a carne fresca en todas las muestras, en el tratamiento T₁ (patrón) los olores de descomposición se hicieron presentes tanto en el día cuatro, como en el día ocho; el T₂ (carne + nitritos como control positivo) presento en el día cuatro olor poco agradable, termino el día 8 con olor desagradable; T₃ (100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a

5 ° C.) al día cuatro y ocho se conservó con olores poco agradables; T₄ (100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C diluido con agua 1:1) en el día cuatro el olor fue poco agradable, mientras que para el día ocho cambio a neutro; el T₅ paso a un olor poco agradable en el día 4, siendo para el día ocho su olor desagradable, el T₆ mantuvo un olor poco agradable en el día cuatro y ocho.

4.1.3. Análisis Microbiológicos.

4.1.3.1. Análisis microbiológico de la carne aplicado mucílago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) como conservante, evaluado en tres periodos la investigación.

Los resultados parten de análisis estadístico (prueba de normalidad), para definir el uso de técnicas paramétricas o no paramétricas.

Hipótesis a comprobarse

H₀: Los resultados microbiológicos de la conservación de carne de res con mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) se distribuyen de manera normal.

H₁: Los resultados microbiológicos de la conservación de carne de res con mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

Pruebas de Normalidad de los resultados microbiológicos.

La tabla 5 se muestra los resultados del test de normalidad en los análisis microbiológicos de la carne en los tres periodos.

Tabla N° 5: Prueba de Normalidad Día 0 de valores microbiológicos.

Pruebas de normalidad^{b,c}

	Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
AM	T ₁	0,221	3	.	0,986	3	0,775
	T ₂	0,336	3	.	0,855	3	0,255
	T ₃	0,376	3	.	0,771	3	0,047
	T ₄	0,200	3	.	0,995	3	0,860
	T ₅	0,292	3	.	0,923	3	0,463
	T ₆	0,286	3	.	0,931	3	0,491
SA	T ₁	0,363	3	.	0,802	3	0,120
	T ₂	0,238	3	.	0,976	3	0,700
	T ₃	0,177	3	.	1,000	3	0,961
	T ₄	0,349	3	.	0,832	3	0,194
	T ₅	0,256	3	.	0,962	3	0,626
	T ₆	0,378	3	.	0,768	3	0,041
ColiformesEc	T ₁	0,175	3	.	1,000	3	1,000
	T ₂	0,175	3	.	1,000	3	1,000
	T ₃	0,175	3	.	1,000	3	1,000
	T ₅	0,311	3	.	0,898	3	0,379

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₄. Se ha omitido.

c. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₆. Se ha omitido.

FUENTE: AUTOR

Conclusión día 0: los resultados obtenidos muestran valores de significancia mayores a 0,05, por lo que la hipótesis nula (H₀) es rechazada, es decir Los resultados microbiológicos de la conservación de carne de res con mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

La tabla 6 se muestra los resultados del test de normalidad en los análisis microbiológicos de la carne.

Tabla N° 6: Prueba de Normalidad Día 4 de valores microbiológicos.

Pruebas de normalidad^{b,c,d}

	Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
AM	T ₁	0,369	3	.	0,789	3	0,090
	T ₂	0,175	3	.	1,000	3	0,992
	T ₃	0,291	3	.	0,925	3	0,470
	T ₄	0,360	3	.	0,809	3	0,136
	T ₅	0,332	3	.	0,864	3	0,278
	T ₆	0,182	3	.	0,999	3	0,938
SA	T ₁	0,361	3	.	0,807	3	0,132
	T ₂	0,378	3	.	0,766	3	0,036
	T ₃	0,202	3	.	0,994	3	0,851
	T ₄	0,378	3	.	0,768	3	0,039
	T ₅	0,377	3	.	0,769	3	0,042
	T ₆	0,222	3	.	0,985	3	0,768
ColiformesEc	T ₁	0,208	3	.	0,992	3	0,826
	T ₂	0,340	3	.	0,848	3	0,235
	T ₅	0,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₃. Se ha omitido.

c. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₄. Se ha omitido.

d. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₆. Se ha omitido.

FUENTE: AUTOR

Conclusión día 4: Los resultados obtenidos muestran valores de significancia mayores a 0,05, por lo que la hipótesis nula (H_0) es rechazada, es decir Los resultados microbiológicos de la conservación de carne de res con mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

La tabla 7 se muestra los resultados del test de normalidad en los análisis microbiológicos de la carne día 8.

Tabla N° 7: Prueba de Normalidad día 8 de valores microbiológicos.

Pruebas de normalidad^{b,c,d}

	Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
AM	T ₁	0,198	3	.	0,996	3	0,872
	T ₂	0,295	3	.	0,919	3	0,450
	T ₃	0,260	3	.	0,958	3	0,607
	T ₄	0,323	3	.	0,878	3	0,319
	T ₅	0,307	3	.	0,904	3	0,397
	T ₆	0,177	3	.	1,000	3	0,968
SA	T ₁	0,368	3	.	0,790	3	0,091
	T ₂	0,175	3	.	1,000	3	0,992
	T ₃	0,253	3	.	0,964	3	0,637
	T ₄	0,176	3	.	1,000	3	0,980
	T ₅	0,365	3	.	0,797	3	0,107
	T ₆	0,379	3	.	0,765	3	0,033
ColiformesEc	T ₁	0,355	3	.	0,820	3	0,162
	T ₂	0,175	3	.	1,000	3	1,000
	T ₃	0,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₄. Se ha omitido.

c. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₅. Se ha omitido.

d. ColiformesEc es constante cuando Tratamientos = T₆. Se ha omitido.

FUENTE: AUTOR

Conclusión día 8: los resultados obtenidos muestran valores de significancia mayores a 0,05, por lo que la hipótesis nula (H₀) es rechazada, es decir Los resultados microbiológicos de la conservación de carne de res con mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

Por los resultados obtenidos se procedió a utilizar un test no paramétrico para identificar el mejor tratamiento.

A partir de la hipótesis planteada tenemos el resultado del test de Friedman, ordenados en un ranking mostrando sus valores.

A continuación en la tabla N° 8 se presenta el ranking del test de Friedman, con la finalidad de encontrar el mejor tratamiento en los análisis realizados en el día 0.

Tabla N° 8: Test de Friedman para los resultados del día 0 de valores microbiológicos.

Tratamientos	Ranking
T ₁	5.666666666666667
T ₂	3.666666666666667
T ₃	3.0
T ₄	1.166666666666665
T ₅	5.0
T ₆	2.5

FUENTE: AUTOR

El valor computado en el test de Friedman es 0.03891954219637195. Cuyo valor es menor a p 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula (H₀) por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa H_a anteriormente planteada “al utilizar mucilago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res existe diferencias microbiológicas entre tratamientos” En esta tabla también podemos observar en ranking de los tratamientos en los análisis realizados en el día 0 (inicio) donde T₄ resulta ser mejor pero no significativamente.

En la tabla N° 9 se observan los resultados del test de Friedman, análisis realizados en el día 4 de la investigación.

Tabla N° 9: Test de Friedman para resultados del día 4 de valores microbiológicos.

Tratamientos	Ranking
T ₁	5.666666666666667
T ₂	3.0
T ₃	2.333333333333333
T ₄	3.333333333333335
T ₅	2.666666666666665
T ₆	3.999999999999996

FUENTE: AUTOR

El test de Friedman para los resultados analizados en el día 4 de la investigación presenta 0.2837358035279435 cuyo valor es mayor a 0,05 por lo que se acepta la hipótesis nula H_0 anteriormente planteada “al utilizar mucilago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res no existe diferencias microbiológicas entre tratamientos”. También podemos observar en esta tabla que en el segundo periodo de análisis el mejor tratamiento resulto ser T_3 , fue mejor que los otros pero no significativamente.

Tabla N° 10: Test de Friedman para los resultados del día 8 de valores microbiologicos.

Tratamientos	Ranking
T_1	6.0
T_2	4.66666666666667
T_3	2.0
T_4	3.66666666666665
T_5	2.33333333333333
T_6	2.333333333333

FUENTE: AUTOR.

Para el último día de análisis es valor computado por el test de Friedman fue 0.05529012781517184 que es mayor a p 0,05 por lo que se acepta la hipótesis nula H_0 anteriormente planteada “al utilizar mucilago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res no existe diferencias microbiológicas entre tratamientos”. En este análisis se pudo observar que resulto que el T_3 obtuvo mejores resultados pero sin ser significativa esa diferencia.

Al resultar el valor computado mayor que el valor de p 0,05 se procederá a realizar el test de Holm para comprobar si existe diferencia significativa entre los mejores tratamientos resultantes durante la investigación en tres periodos.

En la tabla N° 11 se presenta los resultados del test de holm para el día 0 de la investigación.

Tabla N° 11: Resultados de test de Holm ($\alpha=0,05$) pertenecientes al día 0.

i	Algoritmo	P	Holm
5	T_1	0.0032197326909218166	0.01
4	T_5	0.012090025148399745	0.0125
3	T_2	0.10170693003109325	0.1666666666666666
2	T_3	0.23006229802639663	0.025
1	T_6	0.38273308888522606	0.05

FUENTE: AUTOR

Este test ordena a los tratamientos de forma descendente teniendo en cuenta su magnitud.

En la Tabla N° 11 se puede observar los valores de p y Holm en donde T₁, T₅, T₂ presentan un p menor a Holm, esto lleva a concluir que T₄ es mejor, pero no es significativamente mejor que los obtenidos por los tratamientos T₆ y T₃, es decir no existe diferencia significativa.

En la tabla N° 12 se observa los resultados del test de holm para el día 4 de la investigación.

Tabla N° 12: Resultados de test de Holm ($\alpha=0,05$) pertenecientes al día 4.

i	Algoritmo	P	Holm
5	T ₁	0.02909633174125223	0.01
4	T ₆	0.2752335240748343	0.0125
3	T ₄	0.5126907602619233	0.016666666666666666
2	T ₂	0.6625205835400573	0.025
1	T ₅	0.8272593465627112	0.05

FUENTE: AUTOR

En la tabla N° 12 se presenta que todos los tratamientos, es decir T₁, T₆, T₄, T₂, T₅ tienen un valor p menor a Holm, eso quiere decir que T₃ es mejor que los tratamiento, pero no es significativamente mejor.

En la tabla N° 13 se puede ver los resultados del test de holm para el día 8 de la investigación.

Tabla N° 13: Resultados de test de Holm ($\alpha=0,05$) pertenecientes al día 8.

i	Algoritmo	P	Holm
5	T ₁	0.08828760952818603	0.01
4	T ₂	0.08085559837005224	0.0125
3	T ₄	0.2752335240748343	0.016666666666666666
2	T ₅	0.8272593465627115	0.025
1	T ₆	0.8272593465627115	0.05

FUENTE: AUTOR

En la tabla N° 13 se detalla los valores de p y Holm, en todos los casos el valor de p es mayor que el de Holm, por lo que se podría decir q no existe tratamiento que sea significativamente mejor que el T₃.

4.1.3.2. Resultados microbiológicos

En la tabla N° 14 se presenta los datos obtenidos durante la investigación para Aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus* y Coliformes- E.coli, donde se los compara con los requisitos exigidos por la norma NTE INEN 2346.

Tabla N° 14: Resultados microbiológicos.

Trat	<i>AEROBIOS MESÓFILOS</i>			<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>			<i>COLIFORMES-E.COLI</i>		
	Requisito máximo de la norma NTE INEN 2346	Resultado obtenido en la investigación*	Observación	Requisito máximo de la norma NTE INEN 2346	Resultado obtenido en la investigación*	Observación	Requisito máximo de la norma NTE INEN 2346	Resultado obtenido en la investigación*	Observación
DIA 0									
T ₁	1,0 * 10 ⁷	3,11 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	1,32 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	8,76 * 10 ⁴	No cumple
T ₂	1,0 * 10 ⁷	1,39 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	1,14 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	5,00 * 10 ⁴	No cumple
T ₃	1,0 * 10 ⁷	1,36 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	5,07 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	8,33 * 10 ⁴	No cumple
T ₄	1,0 * 10 ⁷	1,24 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	1,78 * 10 ⁴	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
T ₅	1,0 * 10 ⁷	2,08 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	5,43 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	6,75 * 10 ⁶	No cumple
T ₆	1,0 * 10 ⁷	2,01 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	2,40 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
DIA 4									
T ₁	1,0 * 10 ⁷	1,25 * 10 ⁷	No cumple	5,0 * 10 ²	6,56 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	9,85 * 10 ⁶	No cumple
T ₂	1,0 * 10 ⁷	1,90 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	2,64 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	7,78 * 10 ⁶	No cumple
T ₃	1,0 * 10 ⁷	1,65 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	1,16 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	6,67 * 10 ³	No cumple
T ₄	1,0 * 10 ⁷	2,17 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	1,05 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
T ₅	1,0 * 10 ⁷	1,86 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	9,51 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	4,00 * 10 ⁴	No cumple
T ₆	1,0 * 10 ⁷	2,16 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	7,19 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
DIA 8									
T ₁	1,0 * 10 ⁷	2,34 * 10 ⁷	No cumple	5,0 * 10 ²	1,48 * 10 ⁷	No cumple	1,0 * 10 ³	1,83 * 10 ⁷	No cumple
T ₂	1,0 * 10 ⁷	1,17 * 10 ⁷	No cumple	5,0 * 10 ²	1,84 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	9,33 * 10 ⁴	No cumple
T ₃	1,0 * 10 ⁷	1,47 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	1,67 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
T ₄	1,0 * 10 ⁷	1,20 * 10 ⁷	No cumple	5,0 * 10 ²	3,89 * 10 ⁶	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
T ₅	1,0 * 10 ⁷	6,06 * 10 ⁶	Cumple	5,0 * 10 ²	7,51 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple
T ₆	1,0 * 10 ⁷	1,08 * 10 ⁷	No cumple	5,0 * 10 ²	6,66 * 10 ⁵	No cumple	1,0 * 10 ³	0,00	Cumple

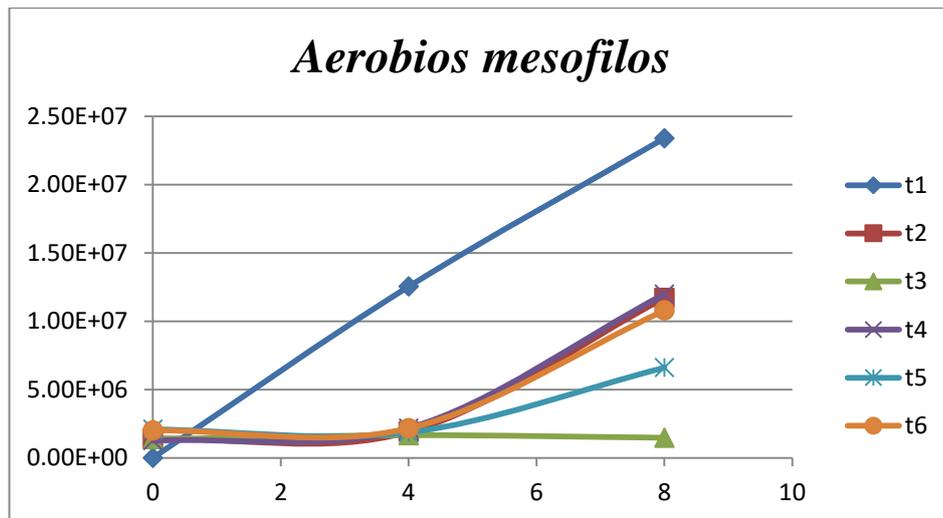
ELABORADO: AUTOR

* promedio obtenido de los resultados de tres repeticiones

4.1.3.3. Gráficos de tendencia de los resultados microbiológicos.

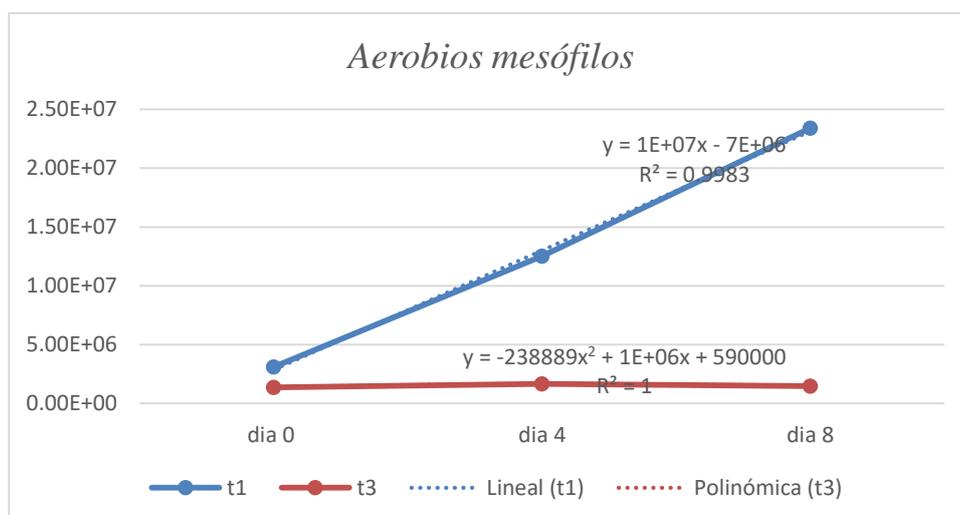
En los siguientes gráficos se puede observar la tendencia de crecimiento de la carga microbiana durante la investigación por el tiempo de 8 días.

Figura 3: Grafico de tendencia de crecimiento microbiano para Aerobios mesófilos.



En el figura N° 3 podemos apreciar el incremento de *aerobios mesófilos* en todos los tratamientos durante los 8 días de investigación, a continuación se compara en el gráfico N° 4 el mejor tratamiento resultante (T₃) vs. Muestra patrón.

Figura 4 Comparación muestra patrón vs mejor tratamiento.



Dónde: T₁ muestra patrón; T₃ mejor tratamiento.

Calculo del crecimiento microbiano de la muestra patrón y tratamiento que resulto mejor en los análisis para Aerobio mesófilos.

	día 0	día 8	Variación porcentual
T ₁	3107777	2338444	752.4 %
T ₃	1361111	1470000	108.00 %
	1746666	21914444	

$$VPCM = \frac{[Nt]}{[N0]} * 100$$

$$VPCM = \frac{[2338444]}{[3107777]} * 100$$

$$VPCM = 752.45 \%$$

Dónde:

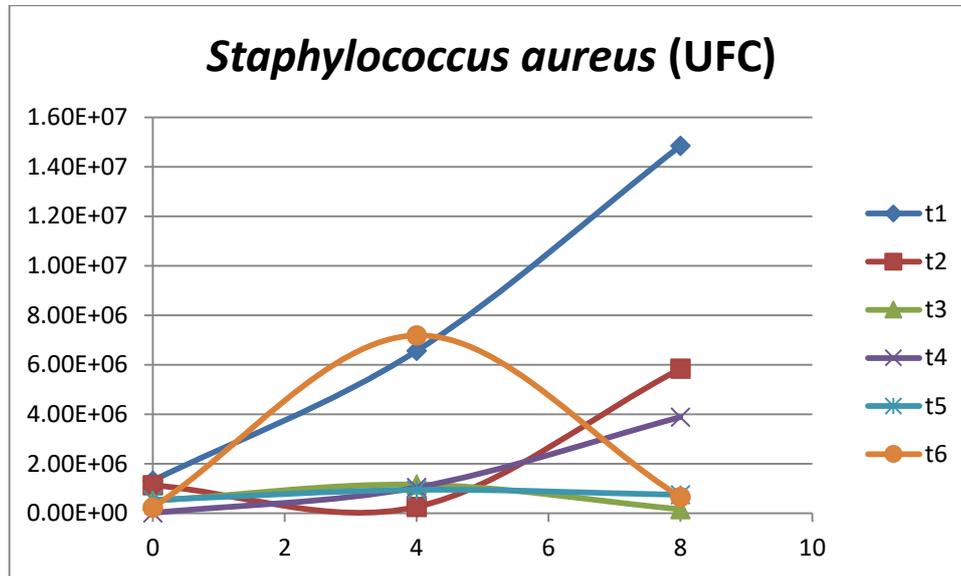
VPCM = Variación porcentual del crecimiento microbiana.

[Nt] = Carga microbiana al tiempo t.

[N₀] = Carga microbiana inicial.

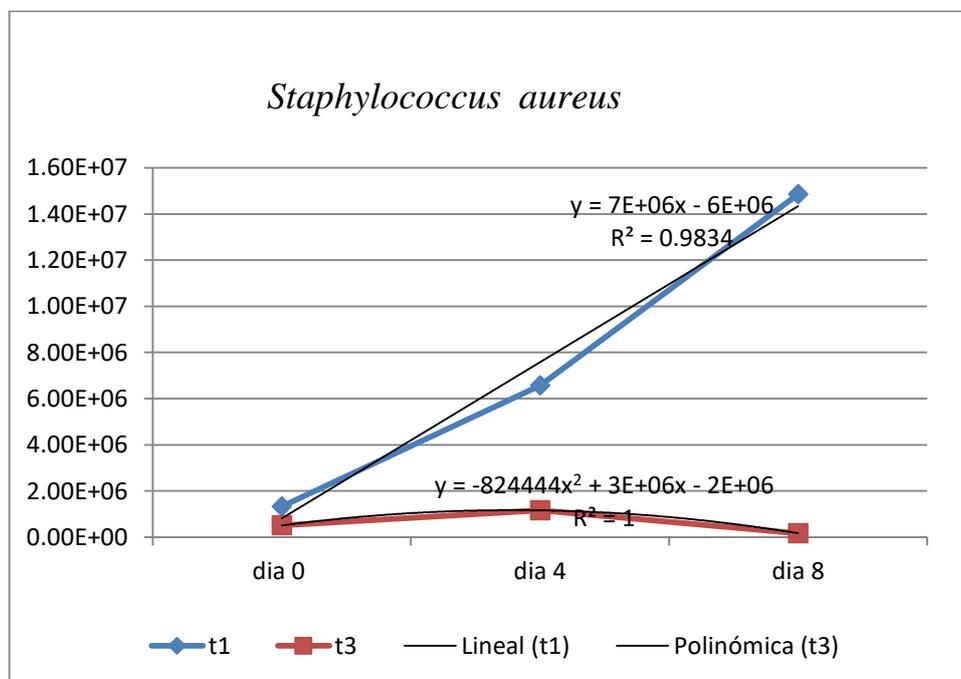
Como se puede observar en el grafico el crecimiento microbiano de la muestra patrón incremento 752.44% en relación a lo registrado en el día 0; mientras que en el T₃ que fue el de menor incremento de carga microbiana fue 108,00%

Figura 5: gráfico de tendencia de crecimiento microbiano para *Staphylococcus aureus*.



En la figura N° 5 se observa el incremento de población microbiana para *Staphylococcus aureus* durante el periodo de investigación.

Figura 6 Comparación muestra patrón vs mejor tratamiento



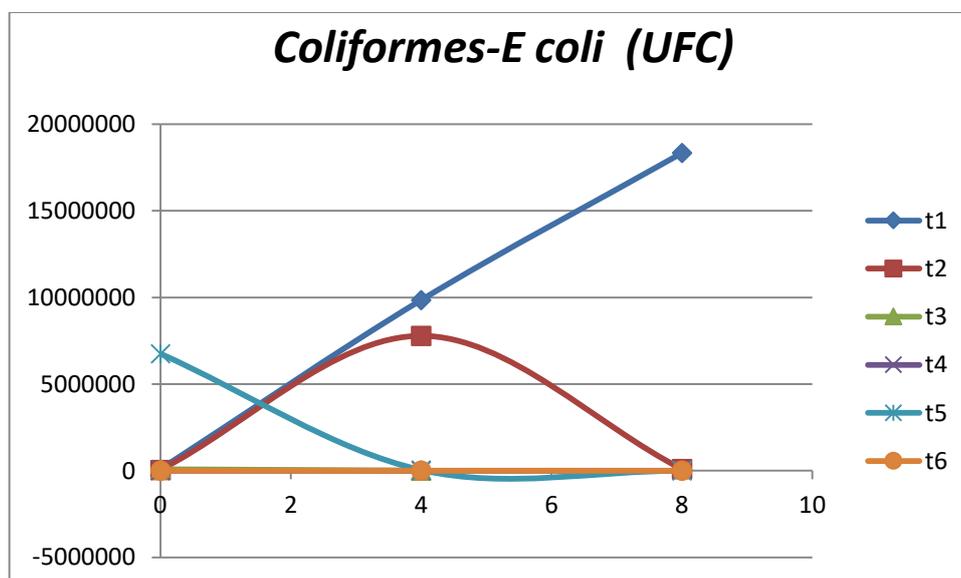
Dónde: T₁ muestra patrón; T₃ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C) mejor tratamiento.

A continuación el cálculo del crecimiento microbiano de la muestra patrón con el mejor tratamiento para *Staphylococcus aureus*.

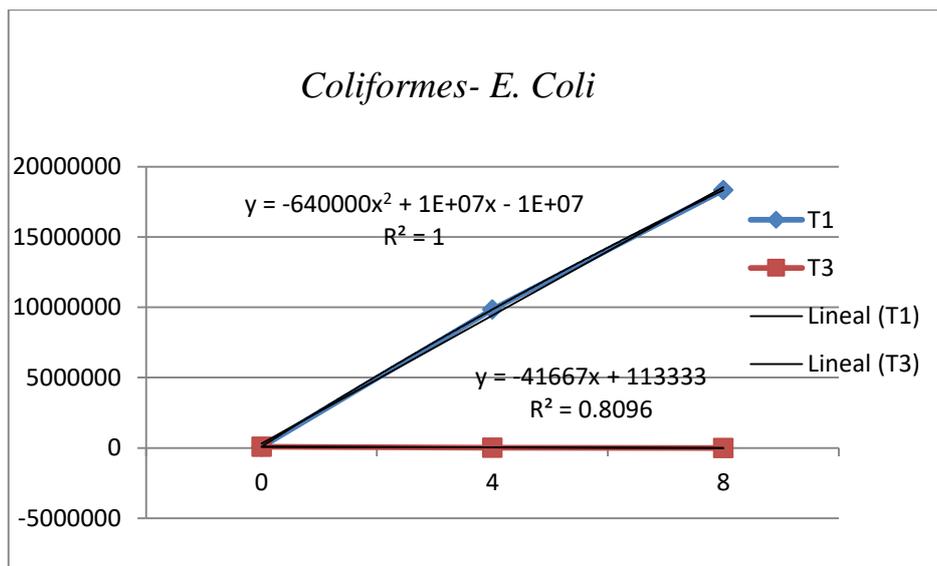
	día 0	día 8	Variación %
t1	1324444	14848888	1121.14 %
t3	506666	166666	32 %
	817777	14682222	

Se puede ver como la muestra patrón tuvo un crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* en un 1121.14% de los análisis del día 0 a los análisis realizados en el día 8, mientras que el T₃ incremento la carga microbiana en un 32% durante la investigación, sin embargo no cumplen con los parámetros establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana.

Figura 7: Grafico de tendencia de aumento de carga microbiana para Coliformes-E. Coli.



En la figura 7 se observa la variación de la carga microbiana en Coliformes- *E coli*, T₃, T₄ y T₆ fueron los tratamientos con resultados aceptables durante la investigación. Pero el T₃ fue elegido como el mejor tratamiento por que presento buenos resultados en las variables anteriores.



Dónde: T₁ es la muestra patrón, T₃ tratamiento con mejor resultado.

A continuación calculamos el incremento microbiano para *Coliformes- E. Coli* en la muestra patrón, y para el mejor tratamiento que en este caso mantuvieron ausencia durante la investigación.

	dia 0	dia 8	Variación %
T ₁	86667	18333333	21153 %
T ₃	83333	0,00	Ausencia

La población microbiana de *Coliformes-Ecoli* aumento 21153 % en la muestra patrón, mientras que en la muestra del T₃ al final del periodo de investigación no existió presencia microbiana.

4.1.4. Análisis físico-químico (pH).

4.1.4.1. Análisis físico-químico (pH) de la carne aplicada mucílago de cacao Nacional durante el período de investigación.

Los datos obtenidos del análisis de pH fueron sometidos a un análisis estadístico (prueba de normalidad para determinar si los paramétricas o no paramétricas las técnicas q se emplearan.

Hipótesis a comprobar:

H₀: Los resultados de pH de la carne de res conservada con aplicación mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) se distribuyen de manera normal.

H₁: Los resultados de pH de la carne de res conservada con aplicación mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

A continuación se observan las pruebas de normalidad.

Tabla N° 15: Prueba de normalidad tiempo (t₀) de valores de pH.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
T ₁	0,219	3	.	0,987	3	0,780
T ₂	0,175	3	.	1,000	3	1,000
T ₃	0,219	3	.	0,987	3	0,780
T ₄	0,175	3	.	1,000	3	1,000
T ₅	0,253	3	.	0,964	3	0,637
T ₆	0,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

FUENTE: AUTOR

Conclusión: En la presente tabla se puede observar que los valores de significancia en el test de Shapiro-Wilk son mayores a 0,05 por lo que es rechazada la hipótesis nula (H₀), entonces: Los resultados de pH de la carne de res conservada con aplicación mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

Tabla N° 16: Prueba de normalidad tiempo (t₁) de valores de pH.**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
T ₁	0,175	3	.	1,000	3	1,000
T ₂	0,175	3	.	1,000	3	1,000
T ₃	0,292	3	.	0,923	3	0,463
T ₄	0,292	3	.	0,923	3	0,463
T ₅	0,253	3	.	0,964	3	0,637
T ₆	0,175	3	.	1,000	3	1,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

FUENTE: AUTOR

Conclusión: Como se observa en la tabla N° 16 en el test de Shapiro-Wilk los valores de significancia son mayores a 0,05 por lo que es rechazada la hipótesis nula (H₀), entonces: Los resultados de pH de la carne de res conservada con aplicación mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

Tabla N° 17: Prueba de normalidad tiempo (t₂) de valores de pH.**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
T ₁	0,376	3	.	0,771	3	0,048
T ₂	0,219	3	.	0,987	3	0,780
T ₃	0,175	3	.	1,000	3	1,000
T ₄	0,175	3	.	1,000	3	1,000
T ₅	0,219	3	.	0,987	3	0,780
T ₆	0,253	3	.	0,964	3	0,637

a. Corrección de significación de Lilliefors

FUENTE: AUTOR

Conclusión: La tabla N° 17 muestra el resultados de significancia en el test de Shapiro-Wilk los valores son mayores a 0,05 por lo que es rechazada la hipótesis nula (H₀), entonces: Los resultados de pH de la carne de res conservada con aplicación mucilago de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) no se distribuyen de manera normal.

Se aplicó un test no paramétrico debido a los resultados de normalidad para conocer si existe o no diferencia entre tratamientos, mediante el test de Friedman podremos observar un ranking donde están ubicados todos los tratamientos.

Tabla N° 18: Rango de resultados del test de Friedman tiempo (t₀).

Rangos	
	<u>Rango promedio</u>
T ₁	5,00
T ₂	3,67
T ₃	1,33
T ₄	4,17
T ₅	5,17
T ₆	1,67

FUENTE: AUTOR

Los resultados obtenidos en el periodo (t₀) de esta investigación fue de 0,037 este valor de significancia es menor a 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula (H₀) y se acepta la hipótesis alternativa (H_a) “al utilizar mucilago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res existe diferencias microbiológicas entre tratamientos”. También podemos observar en esta tabla que en el segundo periodo (t₁) de análisis el mejor tratamiento resulto ser T₃, fue mejor que los otros pero no significativamente.

Tabla N° 19: Rango de resultados del test de Friedman tiempo (t₁).

Rangos	
	<u>Rango promedio</u>
T1	6,00
T2	5,00
T3	2,67
T4	4,00
T5	1,00
T6	2,33

FUENTE: AUTOR

Los resultados obtenidos en el periodo (t_1) de esta investigación fue de 0,012 este valor de significancia es menor a 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa (H_a) “al utilizar mucilago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res existe diferencias microbiológicas entre tratamientos”. También podemos observar en esta tabla que en el segundo periodo (t_1) de análisis el mejor tratamiento resulto ser T₃, fue mejor que los otros pero no significativamente.

Tabla N° 20: Rango de resultados del test de Friedman tiempo (t_2).

Rangos	
	Rango promedio
T ₁	5,33
T ₂	5,33
T ₃	2,00
T ₄	4,33
T ₅	1,00
T ₆	3,00

FUENTE: AUTOR

En esta investigación se obtuvo resultados para el periodo (t_2) de 0,017 este valor de significancia es menor a 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alternativa (H_a) “al utilizar mucilago de cacao Nacional (*Thebroma cacao* L.) como conservante en la carne de res existe diferencias microbiológicas entre tratamientos”. Podemos observar en esta tabla los resultado del segundo periodo (t_2) de análisis, el mejor tratamiento resulto ser T₅, fue mejor que los otros pero no significativamente.

Tabla 21: Resultados pH.

Tratamientos	Requisito NTE INEN 2346	Día 0	Día 4	Día 8
T ₁	5,5 -7,0	5,85	6.52	7.31
T ₂	5,5 -7,0	5.83	6.33	7.2
T ₃	5,5 -7,0	5.72	5.13	6.15
T ₄	5,5 -7,0	5.84	5.32	6.73
T ₅	5,5 -7,0	5.84	4.95	5.05
T ₆	5,5 -7,0	5.75	5.13	6.36

ELABORADO: AUTOR

En la Tabla 21 podemos observar los datos registrados de pH en las muestras estudiadas, donde T₃, T₄, T₆ se mantuvieron dentro del rango establecido por el INEN entre 5.5 – 7.0, mientras que la muestra patrón rebasó dicho límite.

4.2. Discusión de resultados.

4.2.1. Control de calidad.

4.2.1.1. Control visual.

Quilo S. en su trabajo de carne de res molida adicionado lactato de potasio, ácido peracético y cloruro de sodio logró observar que a lo largo de siete días de almacenaje a bajas temperaturas de refrigeración, presento valores mayores a los de la muestra testigo a los 7 días de vida útil (38).

En este trabajo la muestra que mejor color presento fue el tratamiento T₄ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C diluido con agua 1:1.) en el que se observó un color rojo pálido y apariencia muy parecido a las características iniciales de la carne, manteniéndose así durante los periodos t₁ como también los días restantes hasta llegar al periodo t₂ sin presentar señas de putrefacción o descomposición. Las muestras restantes a pesar de no igualar a T₄ mostraron buen olor en relación a la muestra patrón.

4.2.1.2. Control de olor.

Como lo dice Fadda *et al.* una de las propiedades más importantes para reconocer descomposición en las muestras de carne es el olor fétido y desagradable que presentar, que puede ser causado por la acción de enzimas proteolíticas y al desarrollo de bacterias oxidativas que generan amoníaco, hidrogeno sulfurado y otros compuestos que dan lugar a olores y sabores repugnantes en controles sensoriales (39).

Para Vásquez *et al* los microorganismos psicrófitos y mesófilos están relacionados con la ausencia de olores pútridos fuertes y por esto se asume una aceptación superior, para ello se investigó con muestras de solomo redondo que no obtuvieron valores elevados que afecten las características sensoriales (40).

Los resultados del control de olor para todos los tratamientos fueron buenos en relación a la muestra patrón que ya presentaba olores fétidos señas de descomposición, en este caso existió tres tratamientos que resaltaron de los otros T₃ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 °C); T₆ (1100g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento 70 ° C por 10 min diluido agua 1:1.) mostrando mejores olores diferentes a los de la putrefacción.

4.2.2. Análisis microbiológico de carne conservada con mucilago de cacao Nacional durante tres periodos.

En el estudio fue realizado por el lapso de 8 días, se tomaran 3 muestras, así:

- $t_0 = 0$ días
- $t_1 = 4$ días
- $t_2 = 8$ días

4.2.2.1. Aerobios mesófilos.

Según Gómez *et al.* reveló que en el conteo microbiano de *aerobios mesófilos* en hamburguesas tratadas con antimicrobianos como la nisina se encontró niveles por debajo de lo permitido en carnes crudas, máximo $7 \log_{10}$ UFC/g. (41). Mientras que el dato final para la investigación de Suarez *et al.*, presenta un conteo final de $7,4 \log_{10}$ UFC/g (42).

Vázquez afirma que las muestras analizadas con extracto de bacterocinas disminuyó el conteo de mesófilos a $4,03 \log_{10}$ UFC/g, esto sucedió durante el día tres, manteniendo el desarrollo mesófilos en pequeñas cantidades debido a las bajas temperaturas de la refrigeración que acompaña este proceso (43).

En Ecuador haciendo una comparación con la Norma Técnica INEN correspondiente a Carnes y menudencias comestibles de animales de abasto, las muestras deben cumplir con rangos entre $1,0 * 10^6$ UFC/ hasta un máximo de $1,0 * 10^7$ UFC/g (17).

En la esta investigación el que presento menor carga microbiana fue el tratamiento T₃ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C.), que al ser comparado con los resultados de la muestra patrón existió gran diferencia. La muestra patrón partió de $3.11 * 10^6$ UFC registrando después de 8 días $2,34 * 10^7$ UFC, es decir aumentó 652%, mientras que el mejor tratamiento tuvo $1,36 * 10^6$ UFC inicial, para el final de la investigación se pudo contar $1.47 * 10^6$ UFC, resultado que está dentro del límite máximo permitido por el INEN en su norma NTE INEN 2346.

4.2.2.2. *Staphylococcus aureus*.

Xavier *et all* reportó en su investigación niveles elevados de *Staphylococcus aureus* en un 80% de las muestras, los datos registrados estaban en un rango de 10^4 a 10^7 UFC/g, en gran parte de las muestras de carne bovina (44).

Por otro lado Silva realizó un experimento tomando muestras en establecimientos inspeccionados obteniendo datos de $5,9 \log_{10}$ UFC/g, mientras que en locales que no eran inspeccionados frecuentemente registro 6,78 UFC/g, la conclusión en este caso fue que al ser superior a 5 log UFC que establece la agencia de Vigilancia Sanitaria – ANVISA se podría decir que representa un riesgo sanitario (45).

El INEN establece en la NTE INEN 2346 para *Staphylococcus aureus* valores permitidos para ser apto para el consumo humano, el mínimo es $1,0 * 10^2$ UFC/g hasta un máximo $5,0 * 10^2$ UFC/g (17).

La presente investigación registro $5,07 * 10^5$ UFC/g en tiempo inicial, estos datos son pertenecientes al tratamiento T₃ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C.) que resultó ser el que menor carga microbiana tenía al final de la investigación con $1,67 * 10^5$ UFC/g, es decir redujo la carga microbiana en un 68 %, este tratamiento aun estando fuera de los rangos dispuestos por el INEN para *Staphylococcus aureus*, sigue mostrando diferencia con el resultado de la muestra tratamiento patrón $1,32 * 10^5$ UFC/g, tuvo un crecimiento microbiano que alcanzó $1,48 * 10^7$ UFC/g, que dando muy lejos de los límites permitidos por el INEN.

4.2.2.3. Coliformes-*E. coli*.

Finalmente para Coliformes – *E. Coli* mejor Gómez *et al* .en su investigación conservando hamburguesas de carne de res con aplicación de nisina y ácidos orgánicos durante 8 días refrigeración obtuvo un conteo de $3.74 \log_{10}$ UFC/g, considerando que el conteo inicial en el día 0 fue $7.03 \log_{10}$ UFC/g, se produjo una reducción de $3.29 \log_{10}$ UFC/g (41).

Gutiérrez *Et al* asevera que el extracto de *Lactobacillus brevis* en crecimiento in vitro de *E. coli* mostró inhibición mayor a temperaturas de 25°C, y que presento resultados que con temperaturas de refrigeración y congelación los podría ser mejor (46).

Los parámetros para *E coli* que catalogaría como apto para el consumo humano se encuentra entre 1.0×10^2 UFC/g es de 1.0×10^3 UFC/g, datos establecidos en la norma técnica de INEN 2 346 (17).

Para este trabajo el tratamiento T₃ (100g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C.). En los análisis de Coliformes-*E.coli* hubo ausencia al final de la investigación, a pesar de haber iniciado en el día cero con $8.33 * 10^4$, es decir redujo la carga microbiana debido al mucílago de cacao nacional, mientras que en la muestra patrón si existió incremento considerable de la carga microbiana donde registro 8.67×10^4 UFC/g. en los análisis iniciales, y mostrando un resultado de $1,83 * 10^7$ UFC/g. Se puede decir que para *Coliformes-E.coli* también cumple la norma NTE INEN 2346.

4.2.3. Valoración física-química (pH) de la carne aplicada mucílago de cacao Nacional durante el período de investigación.

El pH es uno de los indicadores para medir el poder conservante del mucílago de cacao Nacional aplicado en la carne de res, en la presente investigación durante ocho días realizaron controles en los días 0, 4 y 8.

Según la teoría de Torres la carne reduce a 5,81 y 5,26 después de haber sido sometidos a tratamiento A (melaza de caña de azúcar) y tratamiento B (solución de ácido láctico) del 6,07 inicial, toda esta variación se produjo durante el proceso de almacenamiento en condiciones de refrigeración por un lapso de 15 días (47).

Por otro lado Fiorentini *et al* asegura que, el pH supera los valores de 6,0 después del 6 día en condiciones normales, mientras que en su investigación en la que empleo ácidos orgánicos a partir del día 9, se asume que el por efecto de las BAL la existió poca variabilidad, debido a la degradación de proteínas cárnicas que producen compuestos que contrarrestan en parte al ácido generado, evitando la acidificación de la carne (48,49).

Mientras que las norma INEN 2346 nos dice que los rangos para que la carne sea considerada de óptimas condiciones deberán estar entre 5,5 y 7,0 (17). Razón por la cual podríamos decir que las muestras no cumplen con el requisito de pH ya que en el periodo (t₁) 5.32 obtuvimos en el mejor de los casos que para los parámetros del INEN no cumplen. Mientras en el tiempo (t₂) el tratamiento T₅ obtuvo el menor pH 5,05 quedando fuera de los parámetros, mientras T₃ obtuvo 6,15; T₄ registro 6,73 y T₆ un valor de 6,36 estando dentro de los requisitos del INEN.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

4.1. Conclusiones.

- Según la inspección visual realizada en los diferentes tratamientos aplicados a la carne de res, se puede manifestar que el mucílago de cacao Nacional funcionó como conservante en un tratamiento para cada tributo. Presentando mejor resultado de color T₄ (100 g de carne + 10 mL mucílago inactivado por calentamiento diluido agua 1:1.) mantuvo el rojo característico de la carne de res, mientras que en el control de olor el tratamiento que sobresalió fue T₃ (100 g de carne + 10 mL mucílago refrigerado a 5 ° C).
- El crecimiento bacteriano incremento durante el periodo de estudio en aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus* y Coliformes- *Escherichia Coli*, aunque en todos los casos se pudo observar menor presencia que en la muestra patrón. No se puede dar una conclusión definitiva sobre la efectividad del método, ya que excedió los parámetros requeridos para *Staphylococcus aureus* que indica la norma NTE INEN 2346. Esto se atribuye a que el método usado para la conservación debió ser combinado con otros métodos físicos o químicos.
- Al medir el cambio físico-químico (pH) en esta investigación se concluye que las muestras bajaron de pH a los 8 días del proceso de conservación, los tratamientos que registraron valores que están dentro del rango establecido por la norma INEN 2346 son T₃, T₄, T₆.

4.2. Recomendaciones

- Realizar análisis microbiológicos previos a carne de res y mucilago.
- Realizar otras investigaciones en las cuales se combine el mucilago de cacao Nacional con otro método de conservación, este sea físico o químico
- Se sugiere en próximas investigaciones emplear otra variedad de mucílago.
- Utilizar mucílago con diferente tiempo de fermentación y temperaturas al momento de inactivar.
- Para futuras investigaciones se recomienda tener en cuenta la temperatura ambiental o la época del año.

CAPITULO VI
BIBLIOGRAFÍA

5. Bibliografía.

1. Ministerio DE Agricultura GyP(, Alimentacion OdINUplAy. Diagnostico de la cadena de valor del Cacao en el Ecuador. 2010..
2. Barén Cedeño CL. "Utilización del mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la obtención de dos jaleas". Tesis Grado. Quevedo: Universidad Tecnica Estatal de Quevedo; 2013.
3. Bravo N, Mingo F. Valoración de tres metodos de fermentación y secado para mejorar la caliad y rentabilidad del cacao fino de aroma (*Teobroma cacao* L). Tesis. Loja: Universidad Nacional de Loja; 2011.
4. Márquez A, Salazar. Análisis de los niveles de desperdicio de mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible. Tesis. Milagro: Universidad Estatal de Milagro; 2015.
5. Chen H, Hoover D. Bacteriocins and their Food Applications. *Food Sci Food Saf.* 2003; 2(82-100).
6. Betancourt J. Estudio Investigativo sobre carnes curadas de cerdo y su aplicación en las gastronomía. Tesis Grado. Quito: Universidad Tecnologica Equinoccial; 2014.
7. Braunwald E, al. e. Harrison. Principios de la Medicina Interna. 15th ed. Mexico: Mc Graw - Hill Interamericana; 2002.
8. Guaman C. Estudio de factibilidad para el cultivo de "cacao 51" en la parroquia Cristóbal Colon de la ciudad de Santo Domingo de los Colorados y su comercialización, Escuela Politécnica Nacional del. 2007..
9. Agama J, Quiroz. Programa de Capacitación en la Cadena del Cacao, Ecuador Quito: Camara Ecuatorina del libro; 2006.
10. Biotrade. Diagnóstico del Cacao Sabor Arriba. In Diagnóstico del Cacao Sabor Arriba; 2010 diciembre; Quito.
11. Moreno L, Sánchez J. Beneficio del Cacao. Fundación Hondureñas de investigciones Agrícolas. 1985; 6(26).
12. Palencia G, Mejía L. Manejo integrado del cultiuvo de cacao Bucaramanga, Colombia: Litografia y Topografia LA BAASTILLA Ltda; 2000.
13. Staszewski , Von. Impacto de la interrelación entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biolóicas y funcionales de las mezclas. Tesis Doctoral. Buenos Aires: Universwidad de Buenos Aires, Departamento de Industrias; 2011.

14. Braudeau. El cacao. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona, España: Blumé; 2001.
15. Abate JD. Biología Aplicada. tercera ed. San José, Costa Rica : Universidad Estatal a Distancia ; 1999.
16. (FDA) FaDA. Codigos de Alimentos. 2009..
17. INEN. Carne y menudencias comestibles de animales de abastos. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana. Quito: INEN; 2010. Report No.: 2 346 : 2010.
18. INEN. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Norma Técnica Ecuatoriana. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización; 2006. Report No.: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
19. INEN. Determinación de Coliformes fecales y *E Coli*. Norma Técnica Ecuatoriana. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización; 2002. Report No.: 1 529-8.
20. INEN. Control Microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Norma Técnica Ecuatoriana. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización; 2016.
21. Alarcon T. Aprovechamiento de subproductos de cacaoCCN-51 para la elaboración de bebida alcohólica a partir del exudado de mucilago con adición de cascarillas irradiadas con UV-C. Tesis. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial; 2013.
22. Suárez D, Castillo M, Villate A, Camargo R. Pardeamiento Enzimático. Duitama: CEDEAGRO, Centro de Desarrollo Agronindustrial; 2009.
23. Jhoanna A. Utilización de bacterias lácticas termorresistentes como probióticos en la elaboración de salchichas. Tesis Grado. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad Ciencias de la Ingeniería; 2013.
24. Gonzales Martinez , Gomez Treviño , Jiménez Salazar Z. Cultivos probióticos y protectores, propiedades funcionales y valor agregado en derivados lácteos. Revista salud pública y nutrición. 2003 Abril-Junio; 4(2).
25. Carr FJ. The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical Reviews in Microbiology. 2002; 28.
26. Castillo M, Dimitrov S, Gombossy de Melo , De Souza. Novel biotechnological applications of bacteriocins. Food Control. 2013; 32(134-142).
27. Gálvez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol. 2007; 120(51-70).

28. Moreira Do Santos L. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *pidiococcus* sp347 de origen cárnico. Tesis Doctorados. Madrid - España : Universidad Complutense de Madrid , Nutricion y Bromatología III.
29. González Martínez B, Gómez Treviño M, Jiménez Salas Z. Bacterocinas de probióticos. RESPYN (Revista Salud Publica Y Nutricion). 2003 abril; 4(2).
30. Agudelo Londoño N, Torres-Taborda , Alvarez López , Vélez Acosta L. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. Alimentos hoy. 2015 junio; 23(36).
31. Valenzuela C, Pérez M. P. Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. Chilena de nutriucion. 2015 Septiembre; 4(2).
32. Prado Barragán. Factores que influyen en la conservacion de los productos procesados. Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana, Tecnología y procesamiento de productos cárnicos.
33. Vásquez , Suarez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservacion de la carne. Revista Chilena de nutrición. 2009 Marzo; 36(1).
34. Fiorentini , Franco BD, Sant´anna E, Mazo. Influencia de las bacterocinas producidas por el *Lactobacillus plantarum* en el período de conservación de la carne bovina refrigerada. Brazilian J. Mcriobol. 2001; 32(42-46).
35. Enan G. Inhibition of *Clostridium perfringens* LGM 11264 in meat samples of chicken, turkey and beef by the Bacteriocin Plantaricin UG! International J Poultry Sci. 2006; 5(195-200).
36. Catellano P , Belfiore C , Faddas S , Vignolo G. A review of bacteriocinogenetic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argetina. Meat Sci. 2008; 79(483-499).
37. A. F. Comparison of alternative test of significance for the problem of ranking : Annal of mathematical statics ; 1940.
38. Quilo SA, Pohlman F, Brown A, Crandall P, Baublits R, Aparicio J. Efectos de lactato de potasio, metasilicato de sodio, ácido peroxiacético, y clorito de sodio acidificado en física, química, y propiedades sensoriales de las empanadas de carne molida. Meat Sci. 2009; 82(44-52).
39. Fadda S, Chambón c, Talón R, Vignolo G. *Lactobacillus* durante el acondicionamiento de refrigerado y-envasados al vacío carne argentina. Meat Sci. 2008; 79.

40. Vázquez S, Suarez , Montoya O. Efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales del Solomo Redondo (*Longissimus dorsi*) empacada al vacío. *Vitae*. 2009 may/ sep ; 6(2).
41. Gómez Cárdenas , Ponce E, Freitas Macedo R, Rubio Lozano M. Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 2013 septiembre; 4(3).
42. Suarez H, Jiménez , Díaz C. Determinación de los parámetros microbiológicos y sensoriales de filetes de pescado con propóleos conserva en refrigeración. *MVZ Córdoba*. 2014 sep/dic; 19(3).
43. Vázquez M. M, Suárez M. H, Montoya O. Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. *Revista chilena de nutrición*. 2009 septiembre ; 36(3).
44. Xavier , Goldschmidt V, Joele , Sarkis Peixoto. Avaliação das condições higiênicosanitárias. *Higiene Alimentar*. 2004; 18(125).
45. Silva N, all e. *Manual de Métodos de Análise São Paulo: Livraria Varela*.
46. Gutierrez Ramírez A, Montoya Campuzano , Ruiz Villadiego. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 2005; 36.
47. Torres , Sant`Anna. RCO crecimiento de *Pediococcus acidilactici* de azúcar de caña blackstrap melaza. *Rev. Microbiol*. 1998; 29(202-207).
48. Vázquez , Suárez H, Montoya O. Efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de solomo redondo (*longissimus dorsi*) empacado al vacío. *Vitae*. 2009 may/sep; 16(2).
49. Fiorentini M, Sant`Anna , Porto C, Mazo Z, Franco D. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* in the shelf—life of refrigerated bovine meat. *Braz J Microbiol*. 2001; 32(42-46).

CAPITULO VII

ANEXOS

**ANEXO 1 : Ficha para la evaluación sensorial de empleo de bacterias ácido láctica
provenientes de mucilago de cacao nacional en carne de res.**

**UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIA PECUARIAS
INGENIERIA EN ALIMENTOS**

PRUEBA DESCRIPTIVA

Nombre _____

Fecha: _____

Periodo: _____

Frente a Ud. hay seis muestras diferentes las cuales deberá evaluar la apariencia, color y olor marcando con una X en el cuadro que crea conveniente según la escala explicada al final de la hoja.

Color

T1	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T2	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T3	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T4	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T5	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T6	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>

Dónde: 1 color rojo intenso; 2 color rojo; 3 entre rojo y marrón; 4 marrón y 5 verde.

Olor

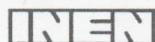
T1	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T2	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T3	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T4	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T5	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
T6	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>

Dónde: 1- Muy Bueno (Carne Fresca); 2- Bueno (Sin cambio notable); 3- Normal (Poco cambio); 4- Regular (Con cambio notable); 5- Pésima (Podrido).

Comentarios:

¡MUCHAS GRACIAS!

ANEXO 2: NTE INEN 2346 Carne y menudencias comestibles de animales de abasto. Requisitos.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2 346:2010
Primera revisión

CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS.

Primera Edición

MĒAT AND EATABLE VISCERA. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, carne y productos cármicos, menudencias comestibles frescas, requisitos.
AL 03.02-413
CDU: 637.5
CIU : 3111
ICS: 67.120.10

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS.	NTE INEN 2 346:2010 Primera revisión 2010-01
<p>1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir la carne y las menudencias comestibles de animales de abasto.</p> <p>2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma se aplica a la carne y a las menudencias comestibles frescas y congeladas de animales de abasto destinados a consumo humano en puntos de comercialización.</p> <p>3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para los efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Animales de abasto o para consumo humano.</i> Son las especies animales destinadas para consumo humano, criados bajo controles veterinarios y/o zootécnicos debidamente comprobados, sacrificados técnicamente en plantas de faenamiento autorizados; incluye a los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, camélidos y por extensión a las aves de corral, cobayos, conejos y otras especies permitidas por la autoridad competente.</p> <p>3.1.2 <i>Carne.</i> Tejido muscular estriado en fase posterior a su rigidez cadavérica (post – rigor), comestible, sano y limpio, de animales de abasto que mediante la inspección veterinaria oficial antes y después del faenamiento son declarados aptos para consumo humano. Además se considera carne el diafragma y músculos maceteros de cerdo, no así los demás subproductos de origen animal.</p> <p>3.1.3 <i>Canal (carcasa).</i> Es el cuerpo del animal faenado, desangrado, eviscerado, sin genitales y en las hembras sin ubres; de acuerdo a la especie animal con o sin cabeza, piel, patas, diafragma y médula espinal.</p> <p>3.1.3.1 <i>Canal de bovino.</i> Cuerpo del animal desangrado al cual se le han retirado durante su faenamiento (beneficio) la cabeza, piel o cuero, las manos, patas y vísceras.</p> <p>3.1.3.2 <i>Canal de porcino.</i> Cuerpo del animal desangrado al cual se le han retirado durante su faenamiento (beneficio) las vísceras, con o sin riñón.</p> <p>3.1.3.3 <i>Canal de aves de corral.</i> Cuerpo del animal, desangrado y desplumado al cual se le han retirado durante su faenamiento (beneficio) las patas, el cuello, cabeza y vísceras.</p> <p>3.1.4 <i>Media canal.</i> Es cada una de las dos partes resultantes de dividir la canal, lo más próximo posible a la línea media de la columna vertebral, sin médula espinal.</p> <p>3.1.5 <i>Cuartos de canal.</i> Son las partes producto del seccionamiento transversal de las medias canales a través del quinto al séptimo espacio intercostal.</p> <p>3.1.6 <i>Cortes primarios.</i> Los cortes primarios son los brazos, piernas, chuletero y costillar.</p> <p>3.1.7 <i>Cortes secundarios.</i> Son los cortes con o sin hueso, obtenidos a partir de los cortes primarios, tales como: pulpas, salón, lomos, chuleta, etc.</p> <p>3.1.8 <i>Faenamiento.</i> Es todo el proceso desde que el animal en pie ingresa a la planta de faenamiento hasta su pesaje en canales.</p>		

3.1.9 Plantas de faenamiento (Matadero). Todo establecimiento registrado y aprobado por la autoridad competente, utilizado para el sacrificio de animales destinados al consumo humano.

3.1.10 Carne fresca. Es la definida en 3.1.2 sometida a refrigeración (entre 0 °C y 4°C en el centro del corte) y que conserva sus características naturales.

3.1.11 Carne congelada. Es la carne que en el centro del corte alcanza y se mantiene a una temperatura inferior a -18°C.

3.1.12 Carne madurada de bovino. Es la carne que luego del faenamiento y de alcanzado el rigor mortis, es almacenada entre 0°C y 7°C como mínimo siete días, para permitir la resolución del rigor, condición en las que adquiere características especiales de color, aroma, sabor y textura.

3.1.13 Carne no apta para el consumo humano. Es la carne procedente de animales con enfermedades zoonóticas, en estado de descomposición, en las cuales es evidente la alteración de sus características organolépticas (color, olor, consistencia), igualmente aquellas contaminadas por microorganismos, parásitos, insectos, larvas; también la procedente de nonatos (fetos) o la tratada con colorantes, sustancias antisépticas, hormonas y otras alteraciones verificadas mediante las disposiciones legales vigentes.

3.1.14 Carne magra. Es aquella que se le retira el tejido adiposo superficial y con poca grasa intramuscular.

3.1.15 Carne grasa (gorda). Es aquella carne que contiene abundante tejido adiposo visible.

3.1.16 Carne pálida, suave y exudativa (PSE). En la condición PSE el pH baja bruscamente y se mantiene por debajo de 5,5 debido a la transformación rápida del glucógeno en ácido láctico; es pálida, suave y exudativa debido a la desnaturalización de las proteínas musculares que pierden su capacidad de retención de agua.

3.1.17 Carne oscura, firme y seca (DFD). En la condición DFD el pH está entre 5,8 y 6,5 debido a los bajos contenidos de glucógeno al momento del faenamiento; es más oscura, es dura y más sensible a la contaminación bacteriana.

3.1.18 Grasa. Tejido adiposo comestible de los animales de abasto.

3.1.19 Menudencias (vísceras). Subproductos de origen animal comestibles constituidos por los órganos torácicos y abdominales y se clasifican en:

- a) *Menudencias (Vísceras) blancas.* Conjunto de componentes del tracto digestivo, páncreas, estómagos e intestinos (tripas naturales), excepto de las aves.
- b) *Menudencias (Vísceras) rojas.* Corazón, lengua, hígado excluyendo la vesícula biliar, pulmón excluyendo el de las aves de corral, riñones, bazo, molleja limpia sin cutícula.

4. DISPOSICIONES GENERALES

4.1 Los animales que ingresan a las plantas de faenamiento deben tener la guía de movilización y siempre su estado de salud con los Registros (historias) de salud, cumplir con el Reglamento de Buenas Prácticas Pecuarias; la alimentación de estos animales no debe incluir a nutrientes provenientes de rumiantes y el transporte desde los centros de producción debe hacerse en condiciones que aseguren el bienestar animal.

4.2 Se debe verificar el estado de salud de todos los animales que ingresan a la planta de faenamiento (matadero); la verificación se la debe realizar en base de los documentos, registros veterinarios y/o zootécnicos de los centros de producción (fincas de crianza) y a la inspección veterinaria en pie (inspección ante mortem).

4.3 Antes de ser sometidos a faenamiento el animal debe haber permanecido en reposo (el tiempo de

4.4 Las operaciones y prácticas de manipulación, matanza, faenamiento, elaboración posterior y distribución deben garantizar la aplicación del Reglamento de buenas prácticas de manufactura para alimentos procesados.

4.5 El faenamiento debe realizarse en establecimientos destinados para esos efectos, que cuenten con la infraestructura necesaria para evitar la contaminación de la carne y que cumplan con las disposiciones de la Ley de mataderos.

4.6 Las canales y las menudencias antes de salir de las plantas de faenamiento deben pasar la inspección post mortem, para ser declarados aptos para consumo humano.

4.7 La carne y las menudencias comestibles deben mantenerse bajo cadena de frío desde la planta de faenamiento hasta su expendio.

4.8 A más de estas disposiciones, la carne y las menudencias comestibles, deben cumplir con todas las otras estipuladas en la Leyes nacionales que se apliquen (Ley de Mataderos y su Reglamento, Ley Orgánica de la Salud y su Reglamento).

4.9 La conservación de la carne a temperatura superior a la de congelación (-18°C) reduce el tiempo de vida útil del producto.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Al examen organoléptico, la carne y las menudencias comestibles deben tener color, consistencia, olores propios y características del producto.

5.1.2 No deben contener residuos de plaguicidas en cantidades superiores a las permitidas en el Codex Alimentarius (CAC/MRL 1-2001).

5.1.3 No deben contener residuos de medicamentos veterinarios en cantidades superiores a las permitidas en el Codex Alimentarius (CAC/MRL 2-2008).

5.1.4 La carne y las menudencias comestibles deben mantenerse en refrigeración o congelación durante su transporte, almacenamiento y expendio.

5.1.5 Sólo se podrá comercializar la carne y las menudencias comestibles que hayan sido aprobadas como aptas para consumo humano en el examen post mortem y de calidad.

5.1.6 El pH de la carne debe estar en rangos de $> 5,5$ y $\leq 7,0$ (ver NTE INEN 783)

5.1.7 La carne y las menudencias comestibles deben cumplir con los requisitos microbiológicos indicados en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos microbiológicos para la carne, aves y sus menudencias comestibles

	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>	Método de ensayo
Aerobios mesófilos ufc/g	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	NTE INEN 1 529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1 529-8
<i>Staphilococcus aureus</i> ufc/g	5	1	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-14
Clostridium sulfito reductores ufc/g	5	1	$3,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-18
Salmonella/ 25 g	5	---	AUSENCIA	---	NTE INEN 1 529-15

Donde:

- n = número de unidades de la muestra
- c = número de unidades defectuosas que se acepta
- m = nivel de aceptación
- M = nivel de rechazo

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo

6.1.1 El muestreo a nivel de plantas de faenamiento (mataderos) debe realizarse en las canales, con el método de hisopado, en un área mínima de 100 cm², en tres puntos.

6.1.2 El muestreo a nivel de expendio se debe realizar de acuerdo con las NTE INEN 776, NTE INEN 1 529-2 y NTE INEN -ISO 2859-1

6.2 Criterios de aceptación y rechazo

6.2.1 Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos indicados en esta norma, se rechazará el lote.

7. ROTULADO

7.1 Cuando la carne y las menudencias comestibles se expendan empacados, deben cumplir con los requisitos que se establece en el artículo 14 de la Ley orgánica de Defensa al consumidor y en el RTE INEN 022.

7.2 Se debe indicar claramente la manera de conservar el producto (refrigeración o congelación)

APENDICE Z

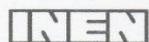
Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 776	<i>Carne y Productos cárnicos. Muestreo</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 783	<i>Carne y productos cárnicos. Determinación del pH</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2	<i>Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-5	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de microorganismos aeróbicos mesófilos REP</i>
Norma Técnica ecuatoriana NTE INEN 1529-8	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y escherichia coli.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de Staphylococcus aureus.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15	<i>Control microbiológico de los alimentos. Salmonella método de detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-18	<i>Control microbiológico de los alimentos. Clostridium perfringens. Recuento en tubo por siembra en masa.</i>
NTE INEN-ISO 2859-1:	<i>Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte 1. Programas de muestreo clasificados por el nivel aceptable de calidad (AQL) para inspección lote a lote</i>
RTE INEN 022	<i>Reglamento técnico Ecuatoriano. Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empacados. Requisitos</i>
Codex Alimentario CAC/MRL 1-2001	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Plaguicidas</i>
Codex Alimentario CAC/LMR 02-2008	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios</i>
Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura	<i>para alimentos procesados Decreto Ejecutivo 3253, Registro Oficial 696 de 4 de Noviembre del 2002.</i>
Ley de Mataderos.	<i>Decreto Supremo No. 502 expedido el 10 de marzo de 1964. Registro Oficial No. 221 de 7de abril de 1964.</i>
Reforma a la Ley de Mataderos.	<i>Decreto Supremo No. 407 expedido el 3 de Junio de 1966. Registro Oficial No. 52 del 10 de Junio de 1966.</i>
Reglamento a la Ley de Mataderos	<i>Decreto Ejecutivo No. 3873 expedido el 5 de Junio de 1996. Registro Oficial No. 964 del 11 de Junio de 1996.</i>
Ley Orgánica de Defensa del Consumidor	<i>Ley No. 21 de 4 de julio del 2000 y publicado en el Registro Oficial No. 116 de 10 de julio del 2000.</i>
Ley Orgánica de la Salud	<i>Ley No. 2006-67 de 22 de diciembre del 2006, publicado en el suplemento de Registro Oficial No. 423</i>
Reglamento de alimentos	<i>Decreto Ejecutivo 4114 Publicado en el Registro Oficial 984 del 22 de julio de 1988</i>

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1217:2006 *Carne y productos cárnicos. Definiciones* Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, 2006.

ANEXO 3: NTE INEN 1529-5 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos *aerobios mesófilos* Rep.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1529-5:2006

Primera revisión

FECHA DE CONFIRMACIÓN: 2012-10-29

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

Primera Edición

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

First Edition

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

Norma Técnica
Ecuatoriana
Voluntaria

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

**NTE INEN
1529-5:2006
Primera revisión
2006-01**

1. OBJETIVO

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

2. ALCANCE

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

3. DEFINICIONES

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

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

4. RESUMEN

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

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

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

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

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

5. DISPOSICIONES GENERALES

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

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

(Continúa)

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.

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

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

6. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Materiales

6.1.1 Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 cm³ y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

6.1.2 Cajas Petri de 90 mm x 15 mm,.

6.1.3 Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

6.1.4 Tubos de 150 mm x 16 mm

6.1.5 Gradillas

6.1.6 Contador de colonias

6.1.7 Balanza de capacidad no superior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad.

6.1.8 Baño de agua regulado a 45°C ± 1°C.

6.1.9 Incubador regulable (25°C - 60°C)

6.1.10 Autoclave.

6.1.11 Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo

6.1.12 Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15°C a -20°C

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Agar para recuento en placa (Plate Count Agar). Preparación (ver Agares en la NTE INEN 1529-1)

6.2.2 Agua peptonada al 0,1 % (diluyente). Preparación (ver diluyentes en la NTE INEN 1 529-1)

7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

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

8. PROCEDIMIENTO

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

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

(Continúa)

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

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

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

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

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

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

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

8.10 Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.

9. CALCULOS

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

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

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

En donde:

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

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

Ejemplo:

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

(Continúa)

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

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

$$N = 20136$$

Redondeando:

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

9.2 Recuentos estimados

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

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

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

V = volumen inoculado en cada placa;

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

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

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados:

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

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

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

$$N_E = 1250$$

Redondeando:

$$N_E = 1300$$

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

En los productos líquidos, $N_E = m$

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

$$N_E \leq 1/d$$

En donde:

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

10. INFORME DE RESULTADOS

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

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

- N de microorganismos/g o $\text{cm}^3 = 2,0 \times 10^4$

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

- N_E de microorganismos/g ó $\text{cm}^3 = 1,3 \times 10^3$

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

- N_E de microorganismos/g ó $\text{cm}^3 \leq 1,0/d$

(Continúa)

APENDICE Z**Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR**

- | | |
|---|---|
| Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:1999 | <i>Control microbiológico de los alimentos.
Preparación de medios de cultivo.</i> |
| Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:1999 | <i>Control microbiológico de los alimentos.
Preparación de muestras.</i> |

Z.2 BASES DE ESTUDIO

International Standard ISO 7218:1996 and Amendment 1:2001 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations*. International Organization for Standardization, Geneva, 1996.

ANEXO 4: NTE INEN 1529-14 Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.



Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1529-14:2013
Primera revisión

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
STAPHYLOCOCCUS AUREUS. RECUENTO EN PLACA DE
SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE**

Primera edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. STAPHYLOCOCCOUS AUREUS. SEED PLATE COUNT BY SURFACE EXTENSION

First edition

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, control microbiológico, staphylococcus aureus
AL 01.05-312
CDU: 614.31:579.672:579.86
CIU: 9320
ICS: 07.100.30

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS STAPHYLOCOCCUS AUREUS. RECUENTO EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE	NTE INEN 1529-14:2013 Primera revisión 2013-09
---	--	---

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie para determinar el número de células viables de *S aureus* coagulase positivos, presentes en un gramo o centímetro cubico de muestra de alimento.

2. ALCANCE

2.1 Este método es indicado para productos de consumo humano y de alimentación animal que contengan una alta carga de estafilococos coagulasa positivos.

3. DEFINICIONES

3.1 Para efectos de esta norma, se adoptan las siguientes definiciones:

3.1.1 *Staphylococcus aureus*: Especie bacteriana perteneciente a la familia Micrococcaceae y al género *Staphylococcus*, cuyos miembros tienen la forma de cocos que generalmente se agrupan formando racimos, inmóviles, Gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, temperatura óptima 37°C. producen un pigmento amarillo dorado, son halotolerantes. Poseen las enzimas coagulasa, fosfatasa y desoxirribonucleasa que le distinguen de otros estafilococos. Producen exotoxinas: hemolisina y entero toxina.

3.1.2 *Recuento de Staphylococcus aureus*: Es la determinación del número de células viables de *Staphylococcus aureus* presentes en un gramo o centímetro cubico de muestra, utilizando medios selectivos.

3.1.3 *Coagulasa*: Enzima que coagula el plasma sanguíneo de conejo o humano.

3.1.4 *Termonucleasa*: Enzima termoestable que degrada al ácido desoxirribonucleico hasta nucleótido.

4. METODO DE ENSAYO

4.1 Fundamento

4.1.1 Para el objeto de esta norma se utiliza el agar Baird-Parker. Este método se basa en el acentuado paralelismo que existe entre la producción de coagulasa por parte del *S.aureus* y su capacidad de utilizar la lipoproteína de la yema de huevo y de reducir el telurito a telurio. Las capas que presenten una reacción negativa de la coagulasa, o débilmente positiva, pueden ser distinguidas de otras bacterias mediante un ensayo adicional, por ejemplo, la detección de termonucleasa.

4.2 Equipos

4.2.1 Microscopio

4.2.2 Estufa de secado, con regulador de temperatura.

4.2.3 Incubadoras, con regulador de temperatura, para cultivos a 37°C y 43°C.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, control microbiológico, *staphylococcus aureus*.

4.3 Reactivos y materiales

4.3.1 Requisitos básicos: Para que haya uniformidad en los resultados, es necesario que los componentes de los medios sean de una calidad uniforme y de grado analítico o, a su vez se debe utilizar medios completos deshidratados, reconstituir y utilizarlos según las instrucciones del fabricante

4.3.2.1 Composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos, ver NTE INEN 1 529-1.

4.3.2.2 Agar azul de O-toluidina-DNA (ácido desoxirribonucleico)

4.3.2.3 Agar Baird Parker

4.3.2.3 Caldo infusión cerebro corazón (ICC) o caldo triptona soya (TSB).

4.3.2.4 Agua peptona al 0,1 %

4.3.2.5 Plasma de conejo con heparina o EDTA

4.3.2.6 Caldo modificado Giolitti y Cantoni

4.3.3 Materiales

4.3.3.1 Pipetas Pasteur.

4.3.3.2 Pipetas bacteriológicas de boca ancha graduadas en 1/10 de cm³.

4.3.3.3 Placas Petri de vidrio o desechables de 90 mm x 10 mm y de 140 mm x 10 mm.

4.3.3.4 Tubos de ensayo de 120 mm x 12 mm.

4.3.3.5 Tubos de 75 mm x 7 mm.

4.3.3.6 Tubos capilares de 3 mm de diámetro.

4.3.3.7 Varillas de vidrio en forma de L.

4.3.3.8 Aguja de inoculación, hecha preferiblemente de alambre de nicron o de platino-iridico.

4.4 Preparación de la muestra

4.4.1 La unidad analítica debe provenir de una unidad de muestra de por lo menos 100 g, según la NTE INEN 1529-2 y ser preparada según esta norma.

4.4.2 Las unidades de muestras perecederas que llegan al laboratorio deben mantenerse en refrigeración de 0°C a 5°C, por no más de 24 h. En general, las muestras deben mantenerse en las condiciones adecuadas al producto, hasta el momento del examen.

4.5 Procedimiento

4.5.1. Siembra

4.5.1.1 Transferir, por medio de una pipeta estéril, 0,1 ml de la muestra, si es líquido, o 0,1 ml de la suspensión inicial (10⁻¹ dilución) en el caso de otros productos, a cada una de las dos placas de agar. Repita el procedimiento para la dilución 10⁻² y para otras diluciones decimales si es necesario.

4.5.1.2 Si, se conoce que el producto, puede poseer un bajo conteo de estafilococos coagulasa positivos, de los límites de detección; se puede inocular 1,0 ml de la muestra, si es líquido, o 1,0 ml de la suspensión inicial para otros productos, ya sea en la superficie de una placa de agar grandes (140 mm) o en la superficie de tres pequeñas placas de agar (90 mm). En ambos casos, preparar duplicados mediante el uso de dos.

4.5.1.3 Abra cuidadosamente el inóculo lo más rápidamente posible sobre la superficie de la placa de agar, tratando de no tocar los lados del plato, con el separador o varilla en L. Dejar que las placas se sequen con sus tapas durante alrededor de 15 min en el laboratorio temperatura.

4.5.1.4 Invertir de las e incubar entre 35°C y 37°C durante 24 h ± 2 h. las placas de productos fermentados o maduros en los que, los micrococcos son mucho más abundantes que los estafilococos, es mejor que sean incubadas a 42°C durante 18 a 40 h.

4.5.2. Recuento de las colonias de *S. aureus* presuntivos

4.5.2.1 Elegir las placas de dos diluciones consecutivas que contengan entre 15 y 150 colonias típicas y/o atípicas. Las primeras se caracterizan por ser de forma regular, negras u oscuras intensas, brillantes, convexas, con un estrecho borde blanco, rodeadas por un halo de medio transparente. Las colonias atípicas de *S. aureus* yema de huevo negativas son sin halo transparente.

4.5.2.2 En cada una de las placas, contar las colonias sospechosas típicas o atípicas y, sin una misma placa hay desarrollo de estos dos tipos, contarlas separadamente.

4.5.2.3 Desechar las placas que en más de la mitad de la superficie presentan crecimiento invasivo. Si menos de la mitad de la superficie está cubierta, contar las colonias en la parte clara y extrapolar de tal manera que, el número corresponda a la superficie total de la placa.

4.5.2.4 Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra.

4.5.3 Selección y purificación de colonias: Los ensayos confirmatorios deben realizarse a partir de colonias previamente seleccionadas y purificadas.

4.5.3.1 De cada una de las placas seleccionadas (4.5.2), escoger al azar, las bien aisladas, en un número equivalente a la raíz cuadrada del número de colonias contadas en la placa, con un mínimo de cinco. Si en una misma placa hay desarrollo de colonias con y sin halo transparente, tomar por separado la raíz cuadrada del número total de cada tipo de colonias contadas en la placa, mínimo cinco de cada tipo.

4.5.3.2 Evitando cualquier roce, tocar en el centro de cada una de estas colonias elegidas e inocularlas individualmente, en tubos que contengan aproximadamente 5 cm³ de caldo infusión cerebro corazón (ICC) o caldo soya tripton (TSB).

4.5.3.3 Incubar los tubos a 43°C ± 1°C durante (6 a 18) h.

4.5.3.4 De los tubos que presenten crecimiento, hacer un frotis y teñirlo por el método de Gram. Verificar la presencia de solo cocos Gram positivos agrupados en racimo.

4.5.2.5 Con cada uno de estos cultivos, realizar la prueba de la coagulasa y termonucleasa, numeral 7.4.

4.5.4 Pruebas confirmatorias

4.5.4.1 Prueba de la coagulasa, ver Anexo A.

- a) En tubos de 75 mm x 7 mm que contengan 0,5 cm³ de plasma -EDTA de conejo, inocular individualmente 0,1 cm³ de cada uno de los cultivos de presuntos *S. aureus* (7.3.4) y, en el tubo control, pipetear 0,1 cm³ de ICC y 0,5 cm³ de plasma.
- b) Incubar los tubos en un baño de agua de (35 a 37)°C por (4 a 6)h.
- c) A cada hora, inclinar delicadamente los tubos y observar la presencia de coágulos.
- d) Si al iniciar el tubo, casi horizontalmente, sobresale un coagulo, considerar que la prueba es positiva 2+.
- e) La formación de un coagulo bien diferenciado que ocupe más de los ¾ del volumen original del líquido, constituye una prueba de la coagulasa positiva 3+.

- f) Se tiene una prueba de la coagulasa positiva 4 +, cuando la coagulación es total y el coagulo no se disloca al invertir el tubo, siendo necesario agitar el tubo delicadamente.
- g) Diferenciar los coágulos verdaderos de los falsos, agitando suavemente el tubo para que los pseudocoagulos se deshagan.
- h) En el tubo control, el plasma debe permanecer inalterado.
- i) Considerar como *S. aureus* cogulasa positivos a aquellos que han producido una coagulación de 3 + o 4 +.

4.5.4.2 Prueba de la termonucleasa

- a) Distribuir en portaobjetos aproximadamente 3 cm³ de agar azul de toluidina O-acido desoxirribonucleico (DNA) fundido o volúmenes de 10 cm³ en placas Petri de 9 cm de diámetro. Dejar solidificar el agar.
- b) Con un capilar estéril, hacer orificios de 3 mm de diámetro; (en cada portaobjetos puede haber 10 a 12 orificios).
- c) Calentar los cultivos en ICC en baño de agua hirviendo durante 15 minutos.
- d) Utilizando pipetas Pasteur o tubos capilares, depositar pequeñas alícuotas de estos cultivos en cada orificio.
- e) Incubar las placas o los portaobjetos entre 35 y 37°C, en ambiente húmedo, durante 4 h.
- f) La reacción es positiva, cuando alrededor de los pocitos aparece un halo rosa brillante fuerte de al menos 1 mm de ancho.

4.6 Cálculos

4.6.1 Cálculos del número de colonias de *S. aureus* por placas

4.6.1.1 En cada placa, calcular el número de *S.aureus* relacionando el número de colonias típicas sometidas a confirmación que dieron coagulasa positiva con el total de las colonias típicas contadas.

4.6.1.2 Si en las placas seleccionadas para el recuento se han desarrollado colonias típicas y atípicas (7.2 y 7.3.1), realizar los cálculos por separado, luego, sumar estos dos valores para obtener el número de *S. aureus* por placa.
(Continúa)

4.6.1.3 Cuando por lo menos el 80% de las colonias típicas y atípicas sometidas a confirmación son coagulasa positiva, tomar el número de *S. aureus* presuntivos contados en 7.2 como el número de *S.aereus* por placa.

4.6.2 Cálculo del número, (N) de unidades formadoras de colonias (UFC), de *S. aureus* por centímetro cúbico o gramo de muestra.

4.6.2.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias. El número N de UFC de *S. aereus* se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\text{Número total de colonias calculadas}}{\text{Cantidad total de muestras sembradas}} \quad (1)$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad (2)$$

En donde:

- $\sum C$ = suma de las colonias de *S. aureus* calculadas en todas las placas elegidas;
 n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;
 n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;
 d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo 10^{-2} ;
 V = volumen del inoculo sembrado en cada placa.

Ejemplo:

Volumen sembrado: 0,1 cm³;

Dilución 10^{-2} : Placa a) 120 colonias típicas y 20 atípicas;
 : Placa b) 100 colonias típicas y 30 atípicas;

Dilución 10^{-3} : Placa a) 20 colonias típicas y cero atípicas;
 : Placa b) 15 colonias típicas y cero atípicas;

Cálculo:

a) Dilución 10^{-2} :

a.1) Placa a: 120 típicas y 20 atípicas:

- Siete de las 11 colonias típicas seleccionadas, fueron coagulasa positiva, por tanto, 76 colonias son consideradas de *S. aureus*.
- Dos de las cinco colonias atípicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, luego, ocho de las 20 colonias típicas son consideradas *S. aureus*.
- Total de colonias, típicas y atípicas: 76 + 8=84

a.2) Placa b: 100 típicas y 30 atípicas

- Seis de las 10 colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, luego 60 de las 100 son consideradas de *S. aureus*.
- Dos de las cinco colonias atípicas fueron coagulasa positiva, por tanto, 12 de las 30 atípicas son de *S. aureus*.
- Total de colonias, típicas y atípicas: 60 + 12 = 72

b) Dilución 10^{-3} :

b.1) Placa a: 20 colonias típicas y cero atípicas:

- Tres de las cinco colonias seleccionadas fueron coagulasa positiva, luego, 12 de las 20 colonias son consideradas de *S. aureus*.
- Total de colonias típicas:12

b.2) Placa b: 15 colonias típicas y cero atípicas:

- Cuatro de las cinco colonias (80%) fueron coagulasa positiva, luego, las 15 son consideradas de *S. aureus*.
- Total de colonias típicas: 15

$$N = \frac{84 + 72 + 12 + 15}{0,1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$$

$$= \frac{183}{0,002}$$

$$= 83\ 181,1 \text{ expresar como } 8,3 \times 10^4$$

4.6.2.2 Estimación de números pequeños

a) Productos líquidos: si en las placas sembradas con muestra no diluida (producto original líquido) se han desarrollado menos de 15 colonias de *S. aureus*, realizar los cálculos utilizando la siguiente fórmula:

$$N_E = m \times \frac{1}{V_i} \quad (3)$$

En donde:

N_E = número estimado de colonias por centímetro cúbico o gramo de muestra;
 m = media de las colonias confirmadas en ambas placas;
 V_i = volumen inoculado

Productos sólidos: si las placas sembradas con la dilución (suspensión) más concentrada presentan menos de 15 colonias de *S. aureus*, realizar los cálculos con la siguiente fórmula:

$$N_E = m \times \frac{1}{V_i} \times f \quad (4)$$

En donde:

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

4.6.3 Redondeo de números: El valor obtenido redondear a dos cifras significativas, de la siguiente manera (NTE INEN 52):

4.6.3.1 Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menos de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 83 181, redondearlo a 83 000 y expresar como $8,3 \times 10^4$. Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito. Por ejemplo, si el valor obtenido fuere 83 681 redondearlo a 84 000 y expresar como $8,4 \times 10^4$.

4.6.3.2 Si el tercer dígito empezando por la izquierda es igual a cinco y es seguido de por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fuere 83 581, redondearlo a 84 000 y expresar como $8,4 \times 10^4$, si el tercer dígito es igual a cinco y no le sigue otro(s) dígito(s), o lo es solo por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si este es impar, si es par o cero, conservando inalterado. Ejemplo, 83 500 redondear a 84 000 y expresar como $8,4 \times 10^4$; 82 500 redondear a 82 000 y expresar como $8,2 \times 10^4$.

4.6.4 Presentación de resultados

4.6.4.1 Presentar el resultado como número, N , de unidades formadoras de colonias, UFC, de *Staphylococcus aureus* por cm^3 o g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^x , donde x es la respectiva potencia de 10.

4.6.4.2 Si las placas inoculadas con la dilución o suspensión más concentrada no contienen colonias de *S. aureus*, expresar los resultados como: número estimado N_E de UFC de *S. aureus* menor que ($<$) $1,0$ multiplicado por $1/V_i$ y por el respectivo factor de dilución " f ". Ejemplo, si se sembró alícuotas de $0,1 \text{ cm}^3$ de la dilución 10^{-1} , expresar el resultado así:

$$\frac{N_E \text{ de UFC de } S. \text{ aureus}}{\text{cm}^3 \text{ o g}} \Rightarrow 1,0 \times 10^2 \quad (5)$$

Si no hay desarrollo de colonias de *S. aureus* en las placas inoculadas con alícuotas no diluidas (producto original líquido), expresar el resultado como:

N_E de UFC de *S. aureus* $< 1,0 \times 1/V_i$.

ANEXO 5: NTE INEN 783 Carne y productos cárnicos. Determinación de pH.

Norma Técnica Ecuatoriana	CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS DETERMINACION DEL pH	INEN 783 1985-05
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece el método para determinar el pH en carne y productos cárnicos.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Se establecen dos procedimientos, uno para productos que pueden ser homogenizados y otro para productos que no pueden ser homogenizados.</p> <p style="text-align: center;">3. TERMINOLOGIA</p> <p>3.1 pH de la carne y productos cárnicos. Es el resultado de las mediciones realizadas de acuerdo al procedimiento descrito en esta norma (ver nota 1).</p> <p style="text-align: center;">4. RESUMEN</p> <p>4.1 Se mide la diferencia de potencial entre un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, que son colocados en la muestra de carne o del producto cárnico a analizar.</p> <p style="text-align: center;">5. INSTRUMENTAL</p> <p>5.1 Potenciómetro, con electrodos de vidrio (o pincha carne), con precisión de $\pm 0,05$ unidades de pH.</p> <p>5.1.1 <i>Electrodo de vidrio.</i> Se pueden usar electrodos de vidrio de diversas formas geométricas, por ejemplo: esféricos, cónicos, cilíndricos o de forma de aguja.</p> <p>5.1.2 <i>Electrodo de referencia.</i> Por ejemplo electrodo de calomel o electrodo de cloruro de plata conteniendo una solución saturada de cloruro de potasio.</p> <p>5.2 Picadora mecánica de carne (molino). Tipo de laboratorio, provisto de una placa cribada con orificios de un diámetro máximo de 4 mm, u otro equipo que produzca una pasta homogénea.</p> <p>5.3 Balanza analítica, sensible a 0,1 g.</p> <p>NOTA 1. Debido a que el contenido electrolítico de la fase acuosa de muchos productos cárnicos es relativamente alto y al hecho de que el potenciómetro es calibrado con soluciones amortiguadoras de 1 contenido electrolítico bajo, en general, el valor medido no puede ser identificado con el valor teórico del pH.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-3999 - Baquerizo Moreno EB-29 y Almagro - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

5.4 Vasos de precipitación, de 250 cm³.

5.5 Vasos de precipitación, de 100 cm³.

5.6 Papel absorbente.

6. REACTIVOS

6.1 Líquidos para la limpieza de los electrodos.

6.1.1 *Etanol*, al 95% (V/V).

6.1.2 *Eter dietílico*, saturado con agua.

6.1.3 *Agua destilada*, o de pureza equivalente.

6.2 Soluciones para calibración del potenciómetro.

6.2.1 *Solución amortiguadora de pH 4,00 a 20°C*. Pesar 10,211 g de biftalato ácido de potasio, con aproximación a 1 mg, y disolver en agua destilada, llevando a 1 000 cm³. El biftalato ácido de potasio debe ser previamente secado a 125°C, hasta masa constante. (El pH de esta solución es 4,00 a 10°C y 4,01 a 30°C).

6.2.2 *Solución amortiguadora de pH 5,45 a 20°C*. Mezclar 500 cm³ de solución acuosa 0,2N de ácido cítrico con 375 cm³ de solución acuosa 0,2N de hidróxido de sodio. (El pH de esta solución es 5,42 a 10°C y 5,48 a 30°C).

6.2.3 *Solución de pH 6,88 a 20°C*. Pesar 3,402 g de ortofosfato diácido de potasio y 3,549 g de ortofosfato ácido de sodio, pesados con aproximación a 1 mg, y disolver en agua destilada, diluyendo a 1 000 cm³. (El pH de esta solución es de 6,92 a 10°C y 6,85 a 30°C).

6.2.4 *Solución saturada de cloruro de potasio*.

6.2.5 *Solución reguladora a pH 7*.

7. CALIBRACIÓN DEL APARATO

7.1 Limpiar los electrodos del potenciómetro frotándoles con trozos de algodón humedecido con éter dietílico y etanol, luego lavarlos con agua destilada.

7.2 Calibrar el potenciómetro con una de las soluciones indicadas en 6.2, procurando hacerlo con la solución cuyo pH sea más cercano al de la muestra y trabajando a 20 ± 2°C (o corrigiendo la temperatura mediante tablas).

8. PREPARACION DE LA MUESTRA

8.1 La preparación de la muestra se realizará de acuerdo a lo indicado en la norma INEN 776. *Carne y productos cárnicos. Muestreo.*

9. PROCEDIMIENTO

9.1 La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra, preparada.

9.2 Pesar aproximadamente 10g de carne o productos cárnicos preparado y colocar en el vaso de precipitación de 250 cm³.

9.3 Agregar 90 cm³ de agua destilada. Agitar y dejar en maceración durante 1 hora.

9.4 Introducir los electrodos del potenciómetro (previamente calibrado) en la muestra, que debe encontrarse a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y efectuar la lectura respectiva.

9.4.1 Si no se trabaja a 20°C , debe hacerse la corrección de temperatura correspondiente.

9.5 En caso de trabajar con pincha carne, efectuar dos mediciones adicionales sucesivas en distintos puntos de la muestra, para obtener un valor promedio.

9.6 Cuando se trate de carnes en canales o en piezas, la lectura se realizará directamente.

9.7 Caso de no disponer de potenciómetro, se usarán soluciones múltiples.

9.8 Una vez concluido el ensayo, limpiar los electrodos y colocarlos en un vaso de precipitación de 100 cm³ que contenga agua destilada.

9.9 Cuando el ensayo ha concluido, limpiar bien los electrodos y colocarlos en un vaso de precipitación de 100 cm³ que contenga agua destilada.

10. ERRORES DE METODO

10.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,1 unidades de pH; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

11. INFORME DE RESULTADOS

11.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación.

11.2 En el informe de resultados, debe indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

11.3 Debe incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

APENDICE Z**Z.1 NORMAS A CONSULTAR**

INEN 776. *Carne y productos cárnicos. Muestreo.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Manual de laboratorio de la Industria Cárnica. CITECA. *pH determinación potenciométrica.* Centro de Investigación y Tecnología de Carnes, INTI, Buenos Aires, 1982.

Norma Cubana NC 79-06. *Productos cárnicos. Carne y productos cárnicos. Métodos de ensayo. Determinación del índice de pH. Método potenciométrico.* Comité Estatal de Normalización. Nivel Central. Habana, 1982.

Norma Centro Americana ICAITI 34125 h 8. *Carne y productos cárnicos. Medición del pH.* Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. Guatemala, 1977.

Proyecto de Norma COPANT 7:13-008. *Carne y sus productos. Medición del pH. Método de referencia.* Comisión Panamericana de Normas Técnicas. Buenos Aires, 1976.

Norma Francesa NF V 04-408. *Viandes et produits a base de viande. Mesurage du pH.* Association Française de Normalisation (AFNO R). París. 1964.

ANEXO 6: Guía de interpretación. Placas petrifilm para el recuento de E. Coli/ Coliformes

3M

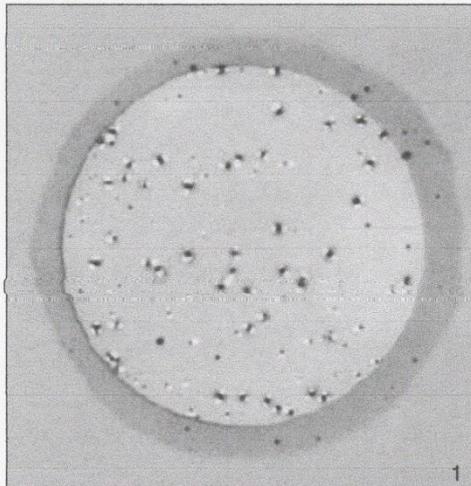
Guía de interpretación

Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli/Coliformes

Esta guía lo familiarizará con los resultados de las Placas Petrifilm™ para el Recuento de E.coli/Coliformes. Para mayor información, contacte al representante autorizado de productos de 3M Microbiología más cercano.

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de E.coli/Coliformes (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC Internacional y el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos gram-negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.



La identificación de la *E. coli* puede variar de país a país (ver en "Recomendaciones de uso" tiempos de incubación y temperaturas).

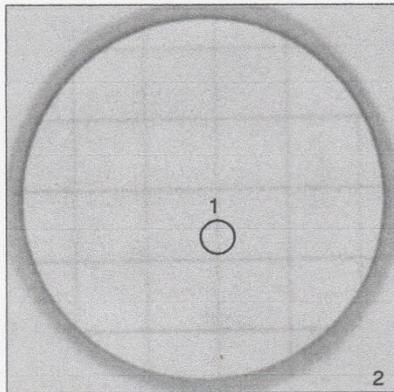
Método validado por la AOAC Internacional

***E. coli* = 49** (colonias azules con gas)

Total coliformes = 87 (colonias rojas y azules con gas)

(NO use esta placa sola para la detección de *E. coli* O157. Como la mayoría de otros medios para enumeración de *E. coli* coliformes, esta placa no señalará específicamente si está presente algún O157).

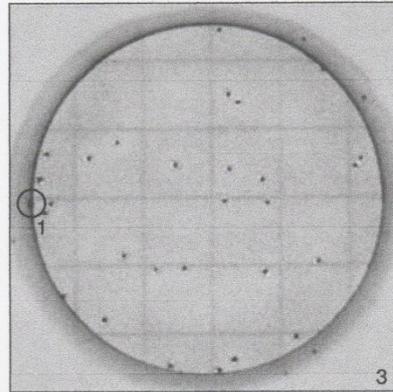
3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli* / Coliformes



No crecimiento = 0

Observe el cambio de color del gel de las figuras 2 a 8. Mientras el recuento de *E. coli* o coliformes aumenta, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado.

Las burbujas del fondo son características del gel y no son el resultado del crecimiento de *E. coli* o coliformes. Ver el círculo 1.

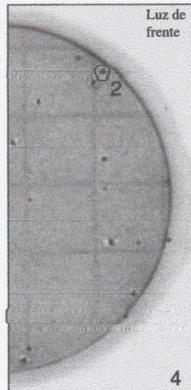
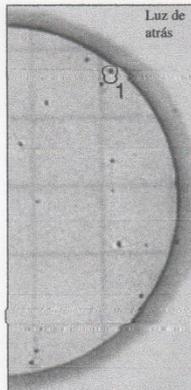


Recuento de *E. coli* = 13

Total de recuento de coliformes = 28

El rango de recuento de la población en las Placas Petrifilm EC es de 15 a 150.

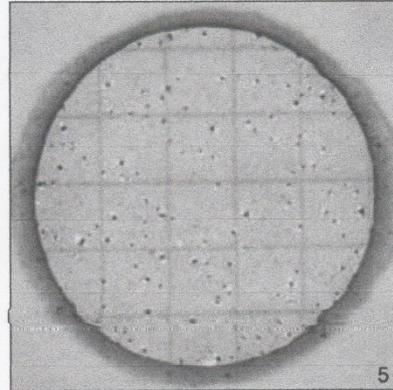
No cuente las colonias que aparecen sobre la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo. Ver el círculo 1.



Recuento de *E. coli* = 3

Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia.

El círculo 1 muestra una colonia rojo-azul cuyo conteo se hizo con luz de atrás. El círculo 2 muestra la misma colonia con luz de frente. El azul precipitado es más evidente en el círculo 2.

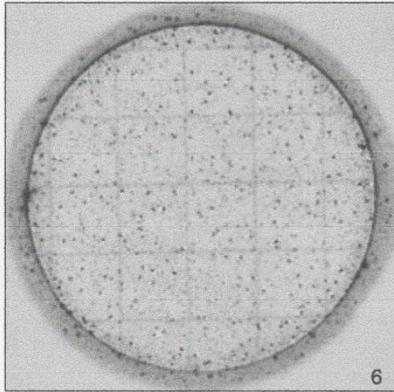


Recuento de *E. coli* = 17

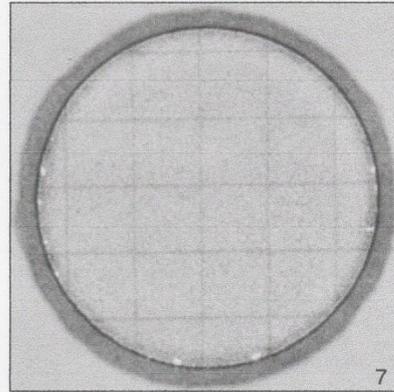
Recuento total estimado de coliformes = 150

El área circular de crecimiento es de aproximadamente 20 cm². El recuento estimado se puede hacer en las placas que contienen más de 150 colonias, al contar el número de colonias en uno o más de los cuadrados representativos y al determinar el promedio por cuadrado. Multiplique el número promedio por 20 y determine el conteo estimado por placa.

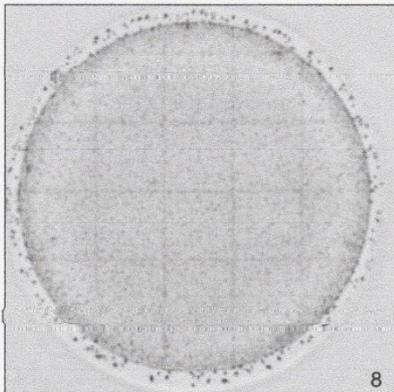
MNPC (Muy Numerosas Para Contar): para obtener un recuento más preciso, diluya más la muestra



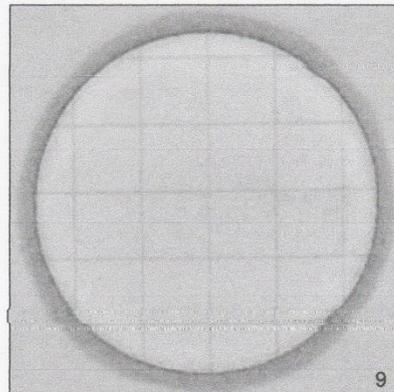
Recuento actual aprox. $\sim 10^6$
Las Placas Petrifilm EC con colonias que son MNPC, tienen una o más de las siguientes características: Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y el oscurecimiento del gel de un color rojo a un azul púrpura.



Recuento actual aprox. $\sim 10^8$
Una alta concentración de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se haga azul púrpura.

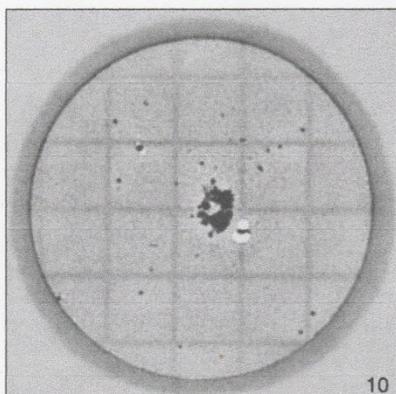


Recuento presuntivo de *E. coli* ~ 8
Recuento total estimado de coliformes aprox. $\sim 10^8$
Cuando existen cifras altas de coliformes (10^8), algunos tipos de *E. coli* presuntiva pueden producir menos gas y las colonias azules pueden ser menos definitivas. Cuente todas las colonias azules sin gas y/o zonas azules como *E. coli*. Si es necesaria la confirmación, aisle las colonias azules con gas para su posterior identificación.



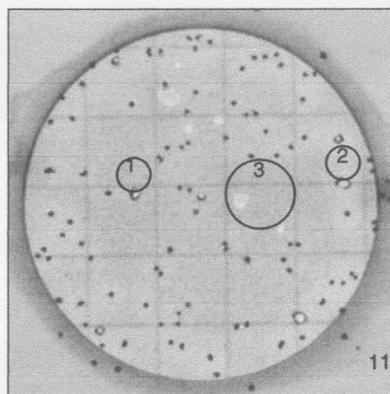
Recuento actual aprox. de $\sim 10^8$
Cuando un número alto de organismos no-coliformes, como las *Pseudomonas*, estén presentes en las Placas Petrifilm EC, el gel puede volverse amarillo.

Burbujas



Recuento total de coliformes = 3

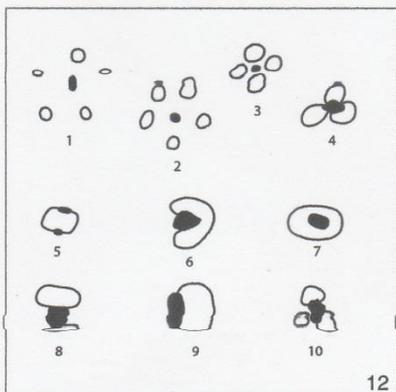
Las partículas de alimento tienen forma irregular y no tienen burbujas de gas.



Recuento total de coliformes = 78

Los patrones de burbujas pueden variar. El gas puede romper la colonia y así, esta última 'delinea' a la burbuja. Vea los círculos 1 y 2.

Las burbujas pueden aparecer como resultado de una inoculación impropia o de aire atrapado dentro de la muestra. Tienen forma irregular y no se asocian con una colonia. Vea el círculo 3.

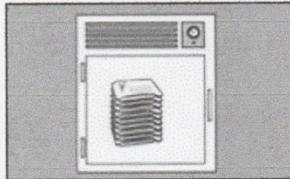


Los ejemplos 1 a 10 muestran varios patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Todas deben ser enumeradas.

3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli / Coliformes Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

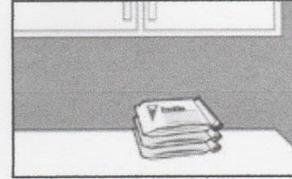
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura -8°C (46°F). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlas. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ (57°F) y una humedad relativa $\leq 50\%$. **No refrigere** los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo un mes después de abierto el paquete.

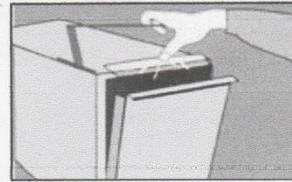
Preparación de la muestra



4 Prepare una dilución de una muestra de alimento.* Pese o pipeteo la muestra en un recipiente adecuado, como una bolsa Stomacher, una botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado. *Vea las indicaciones para Productos Lácteos y Jugos.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptonada al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); *buffer* de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.



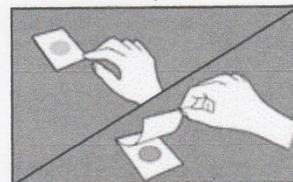
6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

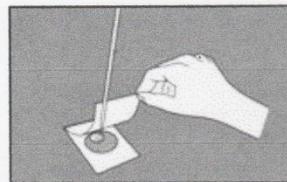
- Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
- Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice *buffers* que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, porque pueden *inhibir el crecimiento*.

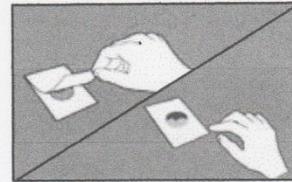
Inoculación



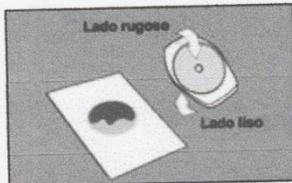
7 Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.



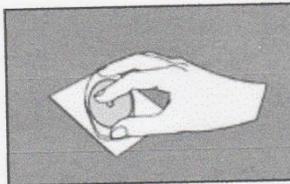
8 Con la Pipeta Electrónica 3M™, o una pipeta equivalente **perpendicular** a la Placa Petrifilm, coloque 1 mL de la muestra en el centro de la película inferior.



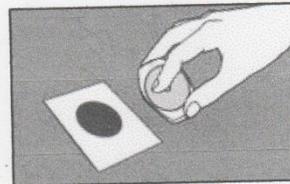
9 Baje con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire. **No** la deje caer.



10 Con el lado liso hacia abajo, coloque el dispersor en la película superior sobre el inóculo.

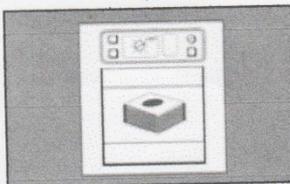


11 Presione suavemente el dispersor para distribuir el inóculo sobre el área circular. No gire ni deslice el dispersor.



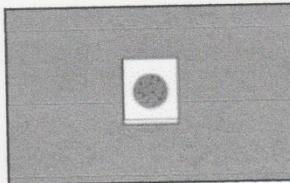
12 Levante el dispersor. Espere, por lo menos un minuto, a que solidifique el gel.

Incubación

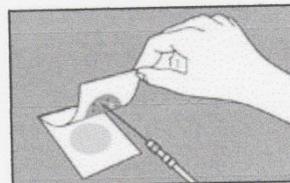


13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de Interpretación para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su posterior identificación. Levante la película superior y tome la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método.

Los métodos aprobados más conocidos son:

• **AOAC método oficial 991.14**

Para coliformes:
Incubar 24 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C.
Para *E. coli*:
Incubar 48 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C.

• **AOAC método oficial 998.08**

Para *E. coli* (carnes, aves, marinos):
Incubar 24 h \pm 2 h a 35 °C \pm 1 °C.

• **Método NMKL (147.1993)**

Para coliformes:
Incubar 24 h \pm 2 h a 37 °C \pm 1 °C.

Para *E. coli*:
Incubar 24 h \pm 2 h a 37 °C \pm 1 °C.

Comentarios adicionales

- Nota: Recuerde inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente placa.
- Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: www.3m.com/microbiology
- Para servicio técnico en Latinoamérica, contacte la dirección serviciotecnomicro@mmm.com o llame al 5255-5270-2223.



3M Microbiology
3M Center, Bldg. 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000
USA
1800-228-3957
microbiology@mmm.com
www.3m.com/microbiology

3M México
Av. Santa Fe 190
Col. Santa Fe, C.P. 01210
México, D.F.
Tel. (55-52) 5270-0454
01 800-712-2527
microbiologiamx@mmm.com

3M Argentina
Olga Cossetini 1031
Buenos Aires,
CP C1107CEA
Argentina
Tel. (54-11) 4339-2400
microbiologia-ar@mmm.com

Petrefilm es una marca registrada de 3M.
Impreso en México.
Revisión: 2006-01
Referencia: 70-2008-8105-3.

ANEXO 7: Resultados de análisis realizados.

tratamientos	días	repeticiones	PH	Aerobios mesofilos	Stahylococcus Aureus	coliformes -Ecoli
T1	0	r1	5,88	2420000	2030000	130000
T1	0	r2	5,83	3006667	933333	43333
T1	0	r3	5,85	3896667	1010000	86666
T1	4	r1	6,5	11193333	7530000	760000
T1	4	r2	6,54	10956666	4366667	12350000
T1	4	r3	6,52	15443333	7793333	9600000
T1	8	r1	7,64	26076667	16816667	17750000
T1	8	r2	7,67	23183333	17170000	19350000
T1	8	r3	6,62	20893333	10560000	17900000
T2	0	r1	5,83	1556667	1570000	56666
T2	0	r2	5,82	1493333	780000	43333
T2	0	r3	5,84	1116666	1066667	50000
T2	4	r1	6,33	1466666	416667	7500000
T2	4	r2	6,35	1896666	190000	8250000
T2	4	r3	6,31	2333333	185000	7600000
T2	8	r1	7,2	8453333	5366667	90000
T2	8	r2	7,22	10356667	6313333	96666
T2	8	r3	7,25	16270000	5843333	93333
T3	0	r1	5,73	15866667	783333	80000
T3	0	r2	5,7	1606667	513333	86666
T3	0	r3	5,75	890000	223333	833333
T3	4	r1	5,13	1693333	633333	3333
T3	4	r2	5,16	1753333	1206667	10000
T3	4	r3	5,12	1516666	1643333	6666
T3	8	r1	6,15	1546666	160000	0
T3	8	r2	6,16	1113333	165000	0
T3	8	r3	6,14	1750000	175000	0
T4	0	r1	5,82	1626666	36667	0
T4	0	r2	5,86	1213333	6667	0
T4	0	r3	5,84	893333	10000	0
T4	4	r1	5,32	2040000	1516667	0
T4	4	r2	5,35	2250000	823333	0
T4	4	r3	5,31	2233333	806667	0
T4	8	r1	6,71	12780000	4726667	0
T4	8	r2	6,73	13436666	3043333	0
T4	8	r3	6,75	9730000	3900000	0
T5	0	r1	5,83	1850000	493333	7380000
T5	0	r2	5,85	2410000	786667	7056666
T5	0	r3	5,86	1990000	350000	5826666
T5	4	r1	4,95	1780000	866667	366667

T5	4	r2	4,97	1813333	1126667	43333
T5	4	r3	4,94	1993333	860000	40000
T5	8	r1	5,08	6246666	673333	0
T5	8	r2	5,03	6433333	656667	0
T5	8	r3	5,05	7106666	923333	0
T6	0	r1	5,77	1650000	110000	0
T6	0	r2	5,75	2270000	100000	0
T6	0	r3	5,73	2106666	510000	0
T6	4	r1	5,11	2943333	6863333	0
T6	4	r2	5,15	1403333	5043333	0
T6	4	r3	5,13	2130000	9660000	0
T6	8	r1	6,35	9610000	780000	0
T6	8	r2	6,37	11930000	443333	0
T6	8	r3	6,38	10803333	773333	0

ANEXO 8: Resultados estadísticos de test de Friedman y Holm del día 0.

Results Dia 0

May 4, 2017

1 Tables of Friedman, Bonferroni-Dunn, Holm, Hochberg and Hommel Tests

Table 1: Average Rankings of the algorithms

Algorithm	Ranking
t1	5.666666666666667
t2	3.666666666666667
t3	3.0
t4	1.166666666666665
t5	5.0
t6	2.5

Friedman statistic considering reduction performance (distributed according to chi-square with 5 degrees of freedom: 11.714285714285717. P-value computed by Friedman Test: 0.03891954219637195.

Iman and Davenport statistic considering reduction performance (distributed according to F-distribution with 5 and 10 degrees of freedom: 7.130434782608703. P-value computed by Iman and Davenport Test: 0.00437460039023807.

Table 2: Holm / Hochberg Table for $\alpha = 0.05$

i	algorithm	$z = (R_0 - R_i) / SE$	p	Holm/Hochberg/Hommel
5	t1	2.945961518183867	0.0032197326909218166	0.01
4	t5	2.5095057377139125	0.012090025148399745	0.0125
3	t2	1.636634176769943	0.10170993003109325	0.016666666666666666
2	t3	1.200198396297958	0.23006229862639663	0.025
1	t6	0.8728715609439696	0.38273308888522606	0.05

Bonferroni-Dunn's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.016666666666666666$.

Hochberg's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.0125 .

Hommel's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.016666666666666666$.

Bonferroni-Dunn's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.02 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.033333333333333333$.

Hochberg's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.025 .

Hommel's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.016666666666666666$.

Table 3: Holm / Hochberg Table for $\alpha = 0.10$

i	algorithm	$z = (R_0 - R_i) / SE$	p	Holm/Hochberg/Hommel
5	t1	2.945941518185897	0.0032197326909218166	0.02
4	t5	2.5095057377139125	0.012090025148399745	0.025
3	t2	1.636634176769943	0.10170693003109325	0.03333333333333333
2	t3	1.200198396297958	0.23006229802639663	0.05
1	t6	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.1

Table 4: Adjusted p-values

i	algorithm	unadjusted p	P_{Bonf}	P_{Holm}	P_{Hoch}	P_{Hommel}
1	t1	0.0032197326909218166	0.016098663454609082	0.016098663454609082	0.016098663454609082	0.016098663454609082
2	t5	0.012090025148399745	0.06045012574199872	0.04836010059359898	0.04836010059359898	0.04836010059359898
3	t2	0.10170693003109325	0.5085346501554663	0.3051207909327975	0.3051207909327975	0.3051207909327975
4	t3	0.23006229802639663	1.150311490131983	0.46012459605279327	0.3827330888522606	0.3827330888522606
5	t6	0.3827330888522606	1.913665444261303	0.46012459605279327	0.3827330888522606	0.3827330888522606

Table 5: Holm / Shaffer Table for $\alpha = 0.05$

i	algorithms	$z = (R_0 - R_i) / SE$	p	Holm	Shaffer
15	t1 vs. t4	2.945941518185897	0.0032197326909218166	0.0033333333333333335	0.0033333333333333335
14	t4 vs. t5	2.5095057377139125	0.012090025148399745	0.0035714285714285718	0.005
13	t1 vs. t6	2.0739699572419278	0.03816576945883005	0.0038461538461538464	0.005
12	t1 vs. t3	1.7457431218879391	0.0808555837005224	0.0041666666666666667	0.005
11	t2 vs. t4	1.636634176769943	0.10170693003109325	0.0045454545454545456	0.005
10	t5 vs. t6	1.6366341767699428	0.1017069300310933	0.005	0.005
9	t1 vs. t2	1.3093073414159542	0.1904302638252422	0.0055555555555555556	0.0055555555555555556
8	t3 vs. t5	1.3093073414159542	0.1904302638252422	0.00625	0.00625
7	t3 vs. t4	1.200198396297958	0.23006229802639663	0.0071428571428571435	0.0071428571428571435
6	t4 vs. t6	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.0083333333333333333	0.0083333333333333333
5	t2 vs. t5	0.8728715609439692	0.3827330888522634	0.01	0.01
4	t2 vs. t6	0.7637626158259735	0.4450087187467361	0.0125	0.0125
3	t1 vs. t5	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.016666666666666666	0.016666666666666666
2	t2 vs. t3	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.025	0.025
1	t3 vs. t6	0.32732683535398854	0.7434206976952524	0.05	0.05

Nemenyi's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.0033333333333333335$.
 Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.0035714285714285718$.
 Shaffer's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.0033333333333333335$.
 Bergmann's procedure rejects these hypotheses:

- t1 vs. t4

Table 6: Holm / Shaffer Table for $\alpha = 0.10$

i	algorithms	$z = (R_0 - R_i) / SE$	p	Holm	Shaffer
15	t1 vs. t4	2.945941518185897	0.0032197326909218166	0.0066666666666666667	0.0066666666666666667
14	t4 vs. t5	2.5095057377139125	0.012090025148399745	0.0071428571428571435	0.01
13	t1 vs. t6	2.0739699572419278	0.03816576945883005	0.007692307692307693	0.01
12	t1 vs. t3	1.7457431218879391	0.0808555837005224	0.0083333333333333333	0.01
11	t2 vs. t4	1.636634176769943	0.10170693003109325	0.0090909090909090909	0.01
10	t5 vs. t6	1.6366341767699428	0.1017069300310933	0.01	0.01
9	t1 vs. t2	1.3093073414159542	0.1904302638252422	0.0111111111111111112	0.0111111111111111112
8	t3 vs. t5	1.3093073414159542	0.1904302638252422	0.0125	0.0125
7	t3 vs. t4	1.200198396297958	0.23006229802639663	0.014285714285714287	0.014285714285714287
6	t4 vs. t6	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.0166666666666666666	0.0166666666666666666
5	t2 vs. t5	0.8728715609439692	0.3827330888522634	0.02	0.02
4	t2 vs. t6	0.7637626158259735	0.4450087187467361	0.025	0.025
3	t1 vs. t5	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.0333333333333333333	0.0333333333333333333
2	t2 vs. t3	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.05	0.05
1	t3 vs. t6	0.32732683535398854	0.7434206976952524	0.1	0.1

Nemenyi's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.0033333333333333335$.
 Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.0071428571428571435$.
 Shaffer's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.0066666666666666667$.

Table 7: Adjusted p -values

i	hypothesis	unadjusted p	P_{Nemen}	P_{Holm}	P_{Shof}	P_{Berg}
1	t1 vs .t4	0.0032197326909218166	0.04829599036382725	0.04829599036382725	0.04829599036382725	0.0
2	t4 vs .t5	0.012090025148399745	0.18135037722599617	0.16926035207759643	0.12090025148399744	0.0
3	t1 vs .t6	0.03816576945883005	0.5724865418824507	0.4961550029647907	0.3816576945883005	0.0
4	t1 vs .t3	0.08085559837005224	1.2128339755507835	0.9702671804406269	0.8085559837005224	0.0
5	t2 vs .t4	0.10170693003109325	1.5256039504663987	1.118776230342026	1.0170693003109326	0.0
6	t5 vs .t6	0.1017069300310933	1.5256039504663994	1.118776230342026	1.017069300310933	0.0
7	t1 vs .t2	0.19043026382552422	2.8564539573828633	1.713872374429718	1.3330118467786696	0.0
8	t3 vs .t5	0.19043026382552422	2.8564539573828633	1.713872374429718	1.3330118467786696	0.0
9	t3 vs .t4	0.23062229802639663	3.4509344703959495	1.713872374429718	1.6104369861847754	0.0
10	t4 vs .t6	0.38273308888522606	5.74099633278391	2.2963985333113563	2.2963985333113563	0.0
11	t2 vs .t5	0.38273308888522634	5.74099633278395	2.2963985333113563	2.2963985333113563	0.0
12	t2 vs .t6	0.4450087187467361	6.675130781201041	2.2963985333113563	2.2963985333113563	0.0
13	t1 vs .t5	0.6625205835400573	9.937808753100859	2.2963985333113563	2.2963985333113563	0.0
14	t2 vs .t3	0.6625205835400573	9.937808753100859	2.2963985333113563	2.2963985333113563	0.0
15	t3 vs .t6	0.7434206976952524	11.151310465428786	2.2963985333113563	2.2963985333113563	0.0

ANEXO 9: Resultados estadísticos de test de Friedman y Holm del día 4.

Results *Day 4*

May 4, 2017

1 Tables of Friedman, Bonferroni-Dunn, Holm, Hochberg and Hommel Tests

Table 1: Average Rankings of the algorithms

Algorithm	Ranking
t1	5.666666666666667
t2	3.0
t3	2.333333333333333
t4	3.333333333333333
t5	2.666666666666665
t6	3.999999999999996

Friedman statistic considering reduction performance (distributed according to chi-square with 5 degrees of freedom: 6.238095238095244. P-value computed by Friedman Test: 0.2837358035279435.

Iman and Davenport statistic considering reduction performance (distributed according to F-distribution with 5 and 10 degrees of freedom: 1.4239130434782634. P-value computed by Iman and Davenport Test: 0.2960565351050902.

Table 2: Holm / Hochberg Table for $\alpha = 0.05$

i	algorithm	$z = (R_i - R_1) / SE$	p	Holm/Hochberg/Hommel
5	t1	2.182178902359924	0.0290963174125223	0.01
4	t6	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.0125
3	t4	0.0940030707879774	0.5120907902019233	0.01866666666666665
2	t3	0.43643878047198405	0.6625205835400573	0.025
1	t5	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.05

Bonferroni-Dunn's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Hommel's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Bonferroni-Dunn's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.02 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.02 .

Hommel's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Nemenyi's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.003333333333333335$.

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.003333333333333335$.

Table 3: Holm / Hochberg Table for $\alpha = 0.10$

i	algorithm	$z = (R_0 - R_1)/SE$	p	Holm/Hochberg/Hommel
5	t1	2.182178902359924	0.02909633174125223	0.02
4	t6	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.025
3	t4	0.6546536707079774	0.5126907602619233	0.0333333333333333
2	t2	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.05
1	t5	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.1

Table 4: Adjusted p-values

i	algorithm	unadjusted p	P_{Bonf}	P_{Holm}	P_{Hoch}	P_{Hommel}
1	t1	0.02909633174125223	0.14548165870626115	0.14548165870626115	0.14548165870626115	0.14548165870626115
2	t6	0.2752335240748343	1.3761676203741715	1.009340962993373	0.8272593465627112	0.8272593465627112
3	t4	0.5126907602619233	2.6534538013096164	1.5380722807857699	0.8272593465627112	0.8272593465627112
4	t2	0.6625205835400573	3.3126029177002865	1.5380722807857699	0.8272593465627112	0.8272593465627112
5	t5	0.8272593465627112	4.136296732813555	1.5380722807857699	0.8272593465627112	0.8272593465627112

Table 5: Holm / Shaffer Table for $\alpha = 0.05$

i	algorithms	$z = (R_0 - R_1)/SE$	p	Holm	Shaffer
15	t1 vs. t3	2.182178902359924	0.02909633174125223	0.0333333333333333	0.0333333333333333
14	t1 vs. t5	1.9639610121239317	0.049534613435626755	0.003714285714285718	0.003714285714285718
13	t1 vs. t2	1.7457431218870391	0.0808550837005224	0.0038461538461538464	0.0038461538461538464
12	t1 vs. t4	1.5278252316519468	0.12663045794761715	0.004166666666666667	0.004166666666666667
11	t1 vs. t6	1.0910894511799623	0.2752335240748342	0.004545454545454545	0.004545454545454545
10	t3 vs. t6	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.005	0.005
9	t5 vs. t6	0.8272593465627112	0.3827330888522634	0.005555555555555556	0.005555555555555556
8	t3 vs. t4	0.546536707079774	0.5126907602619233	0.00625	0.00625
7	t2 vs. t6	0.6546536707079769	0.5126907602619236	0.0071428571428571435	0.0071428571428571435
6	t2 vs. t3	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.008333333333333333	0.008333333333333333
5	t4 vs. t5	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.01	0.01
4	t4 vs. t6	0.43643578047198424	0.6625205835400577	0.0125	0.0125
3	t2 vs. t4	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.01666666666666666	0.01666666666666666
2	t2 vs. t5	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.025	0.025
1	t3 vs. t5	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.05	0.05

Bergmann's procedure rejects these hypotheses:

Table 6: Holm / Shaffer Table for $\alpha = 0.10$

i	algorithms	$z = (R_0 - R_1)/SE$	p	Holm	Shaffer
15	t1 vs. t3	2.182178902359924	0.02909633174125223	0.09666666666666667	0.09666666666666667
14	t1 vs. t5	1.9639610121239317	0.049534613435626755	0.0071428571428571435	0.0071428571428571435
13	t1 vs. t2	1.7457431218870391	0.0808550837005224	0.007692307692307693	0.007692307692307693
12	t1 vs. t4	1.5278252316519468	0.12663045794761715	0.008333333333333333	0.008333333333333333
11	t1 vs. t6	1.0910894511799623	0.2752335240748342	0.009090909090909092	0.009090909090909092
10	t3 vs. t6	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.01	0.01
9	t5 vs. t6	0.8272593465627112	0.3827330888522634	0.011111111111111112	0.011111111111111112
8	t3 vs. t4	0.546536707079774	0.5126907602619233	0.0125	0.0125
7	t2 vs. t6	0.6546536707079769	0.5126907602619236	0.014285714285714287	0.014285714285714287
6	t2 vs. t3	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.01666666666666666	0.01666666666666666
5	t4 vs. t5	0.43643578047198495	0.6625205835400573	0.02	0.02
4	t4 vs. t6	0.43643578047198434	0.6625205835400577	0.025	0.025
3	t2 vs. t4	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.03333333333333333	0.03333333333333333
2	t2 vs. t5	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.05	0.05
1	t3 vs. t5	0.21821789023599247	0.8272593465627112	0.1	0.1

Nemenyi's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.0033333333333333 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value $\leq 0.006666666666666667$.

Table 7: Adjusted p-values

i	hypothesis	unadjusted p	P_{Nemen}	P_{Holm}	P_{Shaf}	P_{Berg}
1	t1 vs. t3	0.02909633174125223	0.4364449761187834	0.4364449761187834	0.4364449761187834	0.0
2	t1 vs. t5	0.049534613435626755	0.7430192015344014	0.693484589087746	0.49534613435626756	0.0
3	t1 vs. t2	0.0808550837005224	1.212833975507835	1.0511227788106792	0.808550837005224	0.0
4	t1 vs. t4	0.12663045794761715	1.899458692142573	1.5105654953714057	1.2663045794761716	0.0
5	t1 vs. t6	0.2752335240748342	4.128502861122513	3.0275687648231764	2.752335240748342	0.0
6	t3 vs. t6	0.2752335240748343	4.128502861122515	3.0275687648231764	2.752335240748343	0.0
7	t5 vs. t6	0.3827330888522634	5.74099333278305	3.444597739967037	2.752335240748343	0.0
8	t3 vs. t4	0.5126907602619233	7.690361403928849	4.10152682095386	3.588835321834363	0.0
9	t2 vs. t6	0.5126907602619236	7.690361403928854	4.10152682095386	3.588835321834365	0.0
10	t2 vs. t3	0.6625205835400573	9.937808753100859	4.10152682095386	3.9751235012403434	0.0
11	t4 vs. t5	0.6625205835400573	9.937808753100859	4.10152682095386	3.9751235012403434	0.0
12	t4 vs. t6	0.6625205835400577	9.937808753100866	4.10152682095386	3.9751235012403434	0.0
13	t2 vs. t4	0.8272593465627112	12.408890198440668	4.10152682095386	3.9751235012403434	0.0
14	t2 vs. t5	0.8272593465627112	12.408890198440668	4.10152682095386	3.9751235012403434	0.0
15	t3 vs. t5	0.8272593465627112	12.408890198440668	4.10152682095386	3.9751235012403434	0.0

ANEXO 10: Resultados estadísticos de test de Friedman y Holm del día 8.

Results ~~D~~ B

May 4, 2017

1 Tables of Friedman, Bonferroni-Dunn, Holm, Hochberg and Hommel Tests

Table 1: Average Rankings of the algorithms

Algorithm	Ranking
t1	6.0
t2	4.666666666666667
t3	2.0
t4	3.666666666666665
t5	2.333333333333333
t6	2.333333333333333

Friedman statistic considering reduction performance (distributed according to chi-square with 5 degrees of freedom: 10.809523809523812. P-value computed by Friedman Test: 0.05529012781517184.

Iman and Davenport statistic considering reduction performance (distributed according to F-distribution with 5 and 10 degrees of freedom: 5.159090909090914. P-value computed by Iman and Davenport Test: 0.013426396195942214.

Table 2: Holm / Hochberg Table for $\alpha = 0.05$

i	algorithm	$z = (R_0 - R_i) / SE$	p	Holm/Hochberg/Hommel
5	t1	2.618614682819083	0.008828760952818603	0.01
4	t2	1.7457431218879391	0.08085559837005224	0.0125
3	t3	2.09149949311799918	0.27233329240748343	0.010666666666666666
2	t4	0.21821780023560217	0.8272593465627115	0.025
1	t5	0.21821780023599217	0.8272593465627115	0.05

Bonferroni-Dunn's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.0125 .

Hochberg's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.01 .

Hommel's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.0125 .

Bonferroni-Dunn's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.02 .

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.025 .

Hochberg's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.02 .

Hommel's procedure rejects those hypotheses that have a p-value ≤ 0.0125 .

Table 3: Holm / Hochberg Table for $\alpha = 0.10$

<i>i</i>	algorithm	$z = (R_0 - R_i)/SE$	<i>p</i>	Holm/Hochberg/Hommel
5	t1	2.6186146828319083	0.008828760952818603	0.02
4	t2	1.7457431218879391	0.0808559837005224	0.025
3	t4	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.03333333333333333
2	t5	0.21821789023599217	0.8272593465627115	0.05
1	t6	0.21821789023599217	0.8272593465627115	0.1

Table 4: Adjusted *p*-values

<i>i</i>	algorithm	unadjusted <i>p</i>	<i>P</i> _{Holm}	<i>P</i> _{Holm}	<i>P</i> _{Hoch}	<i>P</i> _{Hommel}
1	t1	0.008828760952818603	0.04414380476409302	0.04414380476409302	0.04414380476409302	0.04414380476409302
2	t2	0.0808559837005224	0.4042779918502612	0.32342239348020896	0.32342239348020896	0.32342239348020896
3	t4	0.2752335240748343	1.37616762037417115	0.82570057224593	0.82570057224593	0.82570057224593
4	t5	0.8272593465627115	4.136296732813557	1.654518693125423	0.8272593465627115	0.8272593465627115
5	t6	0.8272593465627115	4.136296732813557	1.654518693125423	0.8272593465627115	0.8272593465627115

Table 5: Holm / Shaffer Table for $\alpha = 0.05$

<i>i</i>	algorithms	$z = (R_0 - R_i)/SE$	<i>p</i>	Holm	Shaffer
15	t1 vs. t3	2.6186146828319083	0.008828760952818603	0.0033333333333333335	0.0033333333333333335
14	t1 vs. t5	2.400396792595916	0.016377308341494885	0.0035714285714285718	0.0035714285714285718
13	t1 vs. t6	2.400396792595916	0.016377308341494885	0.0038461538461538464	0.0038461538461538464
12	t2 vs. t3	1.7457431218879391	0.0808559837005224	0.0041666666666666667	0.0041666666666666667
11	t2 vs. t5	1.527525231651947	0.12663045794761707	0.0045454545454545456	0.0045454545454545456
10	t2 vs. t6	1.527525231651947	0.12663045794761707	0.005	0.005
9	t3 vs. t4	1.5275252316519468	0.12663045794761715	0.0055555555555555556	0.0055555555555555556
8	t3 vs. t5	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.00625	0.00625
7	t4 vs. t5	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.0071428571428571435	0.0071428571428571435
6	t4 vs. t6	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.0083333333333333333	0.0083333333333333333
5	t5 vs. t6	0.8728715609439692	0.3827330888522604	0.01	0.01
4	t2 vs. t4	0.6546536707079774	0.5126907602619233	0.0125	0.0125
3	t3 vs. t5	0.21821789023599217	0.8272593465627115	0.0166666666666666666	0.0166666666666666666
2	t3 vs. t6	0.21821789023599217	0.8272593465627115	0.025	0.025
1	t5 vs. t6	0.0	1.0	0.05	0.05

Nemenyi's procedure rejects those hypotheses that have a *p*-value $\leq 0.0033333333333333335$.

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a *p*-value $\leq 0.0033333333333333335$.

Bergmann's procedure rejects these hypotheses:

Table 6: Holm / Shaffer Table for $\alpha = 0.10$

<i>i</i>	algorithms	$z = (R_0 - R_i)/SE$	<i>p</i>	Holm	Shaffer
15	t1 vs. t3	2.6186146828319083	0.008828760952818603	0.0066666666666666667	0.0066666666666666667
14	t1 vs. t5	2.400396792595916	0.016377308341494885	0.0071428571428571435	0.0071428571428571435
13	t1 vs. t6	2.400396792595916	0.016377308341494885	0.007692307692307693	0.007692307692307693
12	t2 vs. t3	1.7457431218879391	0.0808559837005224	0.0083333333333333333	0.0083333333333333333
11	t2 vs. t5	1.527525231651947	0.12663045794761707	0.009090909090909092	0.009090909090909092
10	t2 vs. t6	1.527525231651947	0.12663045794761707	0.01	0.01
9	t3 vs. t4	1.5275252316519468	0.12663045794761715	0.011111111111111112	0.011111111111111112
8	t3 vs. t5	1.0910894511799618	0.2752335240748343	0.0125	0.0125
7	t4 vs. t5	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.014285714285714287	0.014285714285714287
6	t4 vs. t6	0.8728715609439696	0.3827330888522606	0.0166666666666666666	0.0166666666666666666
5	t5 vs. t6	0.8728715609439692	0.3827330888522634	0.02	0.02
4	t2 vs. t4	0.6546536707079774	0.5126907602619233	0.025	0.025
3	t3 vs. t5	0.21821789023599217	0.8272593465627115	0.03333333333333333	0.03333333333333333
2	t3 vs. t6	0.21821789023599217	0.8272593465627115	0.05	0.05
1	t5 vs. t6	0.0	1.0	0.1	0.1

Nemenyi's procedure rejects those hypotheses that have a *p*-value $\leq 0.0033333333333333335$.

Holm's procedure rejects those hypotheses that have a *p*-value $\leq 0.0066666666666666667$.

Table 7: Adjusted *p*-values

<i>i</i>	hypothesis	unadjusted <i>p</i>	<i>P</i> _{Nme}	<i>P</i> _{Holm}	<i>P</i> _{Shaf}	<i>P</i> _{Berg}
1	l1 vs l3	0.00882876092818603	0.13243141429227906	0.13243141429227906	0.13243141429227906	0.0
2	l1 vs l5	0.016377308341494886	0.2466962512242326	0.2466962512242326	0.16377308341494884	0.0
3	l1 vs l6	0.016377308341494886	0.2466962512242326	0.2466962512242326	0.16377308341494884	0.0
4	l2 vs l3	0.0808559837005224	1.2128339705507836	0.9702071804406269	0.8085559837005224	0.0
5	l2 vs l5	0.12663045794761707	1.899456869214256	1.3929350374237877	1.2663045794761707	0.0
6	l2 vs l6	0.12663045794761707	1.899456869214256	1.3929350374237877	1.2663045794761707	0.0
7	l1 vs l4	0.12663045794761715	1.8994568692142573	1.3929350374237877	1.2663045794761707	0.0
8	l3 vs l4	0.2752335240748343	4.128502861122515	2.201868192998745	1.9266346685238492	0.0
9	l4 vs l5	0.3827330888522606	5.74099633278391	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0
10	l4 vs l6	0.3827330888522606	5.74099633278391	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0
11	l1 vs l2	0.3827330888522604	5.74099633278395	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0
12	l2 vs l4	0.5126907602619233	7.690361403928849	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0
13	l3 vs l5	0.8272593465627115	12.408890198440673	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0
14	l3 vs l6	0.8272593465627115	12.408890198440673	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0
15	l5 vs l6	1.0	15.0	2.679131622196582	2.679131622196582	0.0

ANEXO 11: Evidencias del desarrollo de la investigación.



Calentamiento del mucílago



Preparación de muestras



Empacado de muestras



Muestras listas para estudio



Muestras para medir pH



Medición de pH



Materiales para análisis microbiológicos



Siembra análisis microbiológicos



Incubación



Conteo UFC



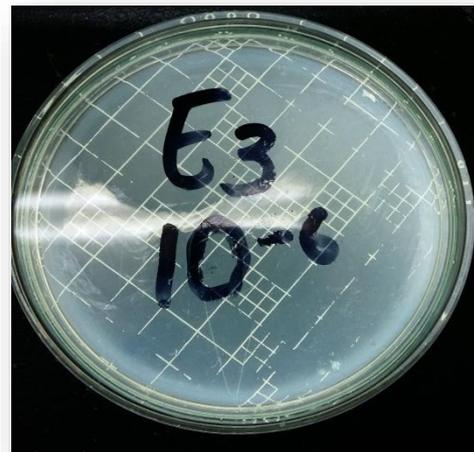
Aerobios mesófilos día 4



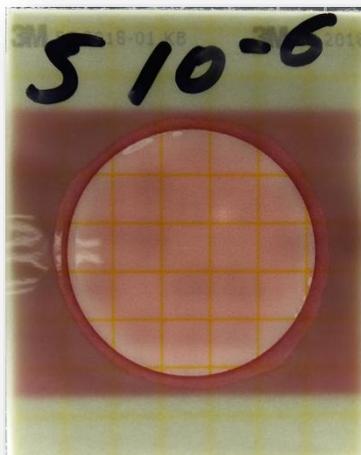
Aerobios mesófilos día 8



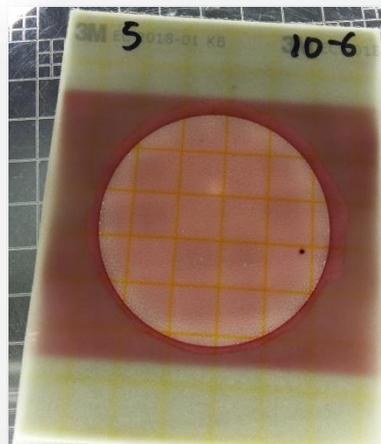
Staphylococcus aureus día 4



Staphylococcus aureus día 8



E. Coli/Coliformes día 4



E. Coli/Coliformes día 8