

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial

TEMA:

Utilización de compuestos fenólicos de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao*) como agentes inhibidores de *Salmonella spp.* en queso fresco

AUTOR:

MEDRANO LOOR PABLO ALEXANDER

TUTOR:

PhD. STALIN SANTACRUZ TERÁN

MANTA - MANABÍ - ECUADOR

2019

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DE GRADO

“UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DEL CACAO (*Theobroma cacao*) COMO AGENTES INHIBIDORES DE *SALMONELLA SPP.* EN QUESO FRESCO”

Sometida a consideración del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias como requisito para obtener el Título de

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Aprobado por la comisión:

PhD. Stalin Santacruz Terán

TUTOR DE TESIS

Ing. Roy Barre Zambrano, Mg.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Sayonara Reyna Arias, Mg.

MIEMBRO TRIBUNAL

Ing. Christian Rivadeneira Barcia, Mg.

MIEMBRO TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En calidad de docente tutor de la Facultad de ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de proyecto de investigación, cuyo tema del proyecto es **“Utilización de compuestos fenólicos de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao*) como agentes inhibidores de *Salmonella spp.* en queso fresco”**. el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

La autoría del tema desarrollado corresponde a: Medrano Loor Pablo Alexander, estudiante de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, período académico 2018 (2) – 2019 (1), quien se encuentra apto para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Lugar, Manta 12 de Agosto del 2019.

Lo certifico,

PhD. Stalin Gustavo Santacruz Terán

Docente Tutor

Área: Agroindustria

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Yo MEDRANO LOOR PABLO ALEXANDER con C.I. 131689159-5, de la facultad Ciencias Agropecuarias, especialidad Agroindustria, junto con el PhD Stalin Santacruz como tutor, declaro de forma libre y voluntaria que el trabajo sobre **UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DEL CACAO (*Theobroma cacao*) COMO AGENTES INHIBIDORES DE *SALMONELLA SPP.* EN QUESO FRESCO** y las expresiones vertidas son autoría del abajo firmante y que se han realizado las correspondientes investigaciones en base a la bibliografía datos en internet y revistas científicas. En consecuencia, asumo la responsabilidad de la originalidad de la misma que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se han respetado las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigente

MEDRANO LOOR PABLO ALEXANDER

PhD. STALIN GUSTAVO SANTACRUZ TERÁN

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme fortaleza, salud y perseverancia por permitirme culminar esta etapa

A mi familia por su confianza, ánimo y apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

A mi tutor el Dr. Stalin Santacruz Terán por ofrecerme su valiosa ayuda, brindando sus conocimientos, orientación y paciencia para el desarrollo del presente proyecto de investigación

A la Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, Facultad de Ciencias Agropecuarias, especialidad ingeniería agroindustrial, al personal docente que con sus conocimientos adquiridos en clases han colaborado en mi formación profesional.

DEDICATORIA

Dedico el presente proyecto de investigación a Dios por haberme dado la vida y darme la oportunidad de llegar hasta esta etapa. A mi familia y amigos en general quienes están pendientes de mí dándome ánimos para poder culminar con el mayor de los éxitos este trabajo, y nuevas metas establecidas

INDICE GENERAL

CAPITULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MARCO TEÓRICO	3
1.1.1 Cacao	3
1.1.2 Cáscara de cacao	3
1.1.3 Compuestos fenólicos	4
1.1.4 Compuestos fenólicos presentes en el cacao	4
1.1.5 <i>Salmonella spp.</i>	4
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
1.3 JUSTIFICACIÓN	8
1.4 HIPÓTESIS	9
1.5 OBJETIVOS	10
1.5.1 Objetivo general	10
1.5.2 Objetivos específicos	10
CAPITULO II	11
2. METODOLOGÍA	11
2.1 LOCALIZACIÓN	11
2.2 VARIABLES	11
2.2.1 Variable independiente (Diseño experimental 1. Poder inhibitorio sobre <i>Salmonella spp.</i>)	11
2.2.2 Variable dependiente	11
2.2.3 Variable independiente (Diseño experimental 2. Aplicación de compuestos fenólicos en queso fresco)	12
2.2.4 Variables dependientes	12
2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	12
2.3.1 Tipo de diseño	12
2.3.2 Análisis estadístico	13
2.3.3. Tratamientos	13

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS	14
2.4.1 Obtención de las cáscaras de cacao	14
2.4.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos totales	15
2.4.4 Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos <i>in vitro</i> en <i>Salmonella spp.</i>	15
2.4.5 Curva de crecimiento de los compuestos fenólicos en <i>Salmonella spp.</i>	15
2.4.6 Obtención del queso fresco Manaba	16
2.4.7 Inmersión de la mejor concentración de los compuestos fenólicos en queso	16
2.4.8 Análisis de presencia o ausencia de <i>Salmonella spp.</i> en queso fresco.	16
2.4.9 Análisis de <i>Salmonella spp.</i> del queso fresco	17
2.4.10 Análisis de textura instrumental	17
2.4.11 Análisis de color instrumental	18
2.5 Métodos de análisis sensoriales	18
2.5.1 Prueba dúo-trío	18
2.5.2 Prueba hedónica verbal de cinco puntos	18
CAPITULO III	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	19
3.1 Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos <i>in vitro</i> en <i>Salmonella spp.</i>	19
3.2 Curva de crecimiento de los compuestos fenólicos en <i>Salmonella spp.</i> .	20
3.3 Análisis de presencia o ausencia de <i>Salmonella spp.</i> en queso fresco. .	23
3.4 Análisis de <i>Salmonella spp.</i> del queso fresco	23
3.5 Análisis de textura instrumental	24
3.6 Análisis de color instrumental	25
3.7 Análisis sensorial	27

3.7.1 Prueba dúo trio	27
3.7.2 Prueba hedónica verbal de cinco puntos	27
CAPITULO IV	29
4.1 CONCLUSIONES	29
4.2 RECOMENDACIONES	30
BIBLIOGRAFÍAS	31
ANEXOS	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. De análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental No1.....	13
Tabla 2. De análisis de varianza (anova) del diseño experimental no2	13
Tabla 3. Tratamientos de estudio del diseño experimental No1	14
Tabla 4. Resultados del poder inhibitorio de <i>Salmonella spp.</i> en concentraciones de compuestos fenólicos de cáscara de cacao	19
Tabla 5. resultados de las ufc en diferentes concentraciones	20
Tabla 6. Resultados de las ufc en intervalos de tiempos	21
Tabla 7. Resultados de análisis microbiológicos de queso fresco previamente sometido a inmersión en solución de compuestos fenólicos a una concentración de 1%	24
Tabla 8. Resultados de análisis de dureza (análisis instrumental).....	25
Tabla 9. Resultados de prueba tukey de color de L, A y B	26

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de crecimiento con soluciones de compuestos fenólicos: () concentración de compuestos fenólicos al 0.5%, () concentración de compuestos fenólicos al 1%, () concentración de compuestos fenólicos al 1.5%, () control de la cepa <i>Salmonella spp.</i>	22
Gráfico 2. Resultados de prueba hedónica verbal de cinco puntos	28

RESUMEN

La cáscara del cacao es un producto de desecho, sin embargo los compuestos fenólicos que éste presenta puede ser una alternativa para preservar la calidad microbiológica de los alimentos. Basándose en estos aspectos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el poder inhibitorio de compuestos fenólicos provenientes de la cáscara de cacao a concentraciones de 0.5, 1 y 1.5% frente a *Salmonella spp.*

Mediante una prueba de ponderación se escogió la mejor concentración para luego ser aplicada en queso fresco Manaba, cuyos análisis microbiológicos y físicos fueron monitoreados por 8 días. Los análisis del poder inhibitorio mostraron como mejor resultado la concentración del 1.5%, con una media de 11,8 mm de diámetro de halo de inhibición. Por otro lado se evaluaron tiempos de acción de los compuestos fenólicos de 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas mediante el conteo de unidades formadoras de colonias de *Salmonella spp.*, pudiéndose presenciar que no existieron diferencias significativas en las unidades formadoras de colonias al 1 y 1,5 %; mientras que en factor tiempo, las unidades formadoras de colonias a 0.5 y 1 hora fueron estadísticamente iguales y mayores que los demás tiempos. Dando como resultados estadísticamente iguales las concentraciones al 1 y 1,5%.

En el queso fresco Manaba se evidenció la presencia de *Salmonella*, sin embargo, al aplicarle la concentración al 1% de concentración y realizarle análisis microbiológico al día 0, los resultados evidenciaron la ausencia de *Salmonella*; y a través de una escala hedónica verbal de cinco puntos, los atributos organolépticos tuvieron una calidad sensorial aceptable.

ABSTRACT

The cocoa shell is a waste product, however the phenolic compounds it presents can be an alternative to preserve the microbiological quality of food. Based on these aspects, the objective of this work was to evaluate the inhibitory power of phenolic compounds from cocoa shells at concentrations of 0.5, 1 and 1.5% against *Salmonella spp.*

By means of a weighting test, the best concentration was chosen and then applied to Manaba fresh cheese, whose microbiological and physical analyses were monitored for 8 days. The inhibitory power analysis showed as best result the concentration of 1.5%, with an average of 11.8 mm of inhibition halo diameter. On the other hand, action times of phenolic compounds of 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 24 hours were evaluated through the count of *Salmonella spp.* colony forming units, being able to witness that there were no significant differences in the colony forming units at 1 and 1.5 %; while in time factor, the colony forming units at 0.5 and 1 hour were statistically equal and greater than the other times. Resulting in statistically equal concentrations of 1 and 1.5%.

In the fresh cheese Manaba the presence of *Salmonella* was evidenced, however, when applying the concentration to 1% and performing microbiological analysis to day 0, the results evidenced the absence of *Salmonella*; and through a verbal hedonic scale of five points, the organoleptic attributes had an acceptable sensory quality.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

El árbol del cacao en su mayoría es cultivado en los países tropicales que poseen ambientes calientes y húmedos. Países como Brasil, Ecuador, Ghana, Nigeria, Camerún e Indonesia son los más destacados por su alto volumen de cultivo. (Stoler, 2012)

El cacao representa un producto articulado al sector agroindustrial siendo el tercero más importante en el Ecuador, después de la floricultura y el cultivo del banano. Es una importante fuente de ingresos para el país ya que es reconocido mundialmente por sus características de aroma, color, calidad y finura sumamente apreciadas en la preparación de chocolates finos, revestimientos y coberturas. (Confitería Marqués, 2015)

La buena calidad del producto ecuatoriano depende del proceso post-cosecha al cual es sometido el cacao; con la incorporación de etapas de fermentación y secado. Las principales variedades de cacao que se producen y comercializan en el país son: Cacao Nacional Fino y de Aroma (Clones Nacionales EET, Estación Experimental Tropical Pichilingue), y Cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal). (Guerrero, 2015)

Las industrias del cacao generan un desecho muy importante que puede ser aprovechado en la elaboración de productos innovadores aportando con micronutrientes y macronutrientes en mínimas cantidades, como es el caso de la cascarilla del cacao. (Marina y García, 2012)

Por otro lado, los productos alimenticios están frecuentemente propensos a la contaminación causada por agentes patógenos, algunos de ellos generados durante el almacenamiento, el transporte o el procesamiento después de la

cosecha, lo que trae consigo pérdidas significativas en la calidad, cantidad y composición de nutrientes, con la consecuente reducción del valor en el mercado. (Argote *et al.*, 2017)

Muchas partes de plantas y sus extractos usados como especias y hierbas han mostrado efectos antimicrobianos contra bacterias y hongos. Dentro de las bacterias patogénicas afectadas por un amplio rango de compuestos presentes en esos condimentos se incluyen: *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. (Argote *et al.*, 2017)

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 Cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta de la familia Malvaceae, cultivada en las regiones tropicales del mundo y de cuyos frutos se obtienen almendras que son empleadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. (Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 2016)

El árbol del cacao puede llegar a medir entre 4 y 10 m de altura, en la fase de cosecha se obtiene de 10 a 15 mazorcas de 15 a 25 cm de largo de acuerdo a su variedad, las que pueden contener hasta 40 semillas. (Alberca, 2018)

Su fruto es una baya denominada mazorca que tiene un peso aproximado de 450 g en estado maduro. Su estado de maduración es durante todo el año, sin embargo se realizan dos cosechas: la principal, que involucra desde el principio hasta el final de la estación lluviosa y continúa hasta el inicio de la estación seca; y la intermedia, que es al principio del siguiente período de lluvias. Son necesarios de cinco a seis meses entre su fertilización y su recolección. La mazorca tiene una corteza rugosa de casi 4 cm de espesor, está rellena de una pulpa rosada viscosa, dulce y comestible, que encierra de 30 a 50 granos largos acomodados en filas en el enrejado que forma esa pulpa. (Plúas, 2008)

1.1.2 Cáscara de cacao

El principal uso que se le ha dado a la cáscara de cacao es en la fertilización de suelos, esto debido a su degradación que sirve como mejorador del mismo. Estudios revelan que la cáscara del cacao posee varias cualidades, entre ellas se encuentran: poseer un buen poder de absorción y de retención de agua, un alto contenido de grupos OH, provenientes de las ligninas y celulosas, y es altamente biodegradable. (Padrón, 2009)

1.1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están asociados a los procesos de maduración de plantas y tejidos, mecanismos de defensa, y características importantes de productos alimenticios derivados de plantas. En la actualidad estos compuestos suelen ser aplicados en el campo de la nutrición, la salud y la medicina, debido a las evidencias de que pueden actuar como potentes antioxidantes. (Niemenak et al., 2006)

1.1.4 Compuestos fenólicos presentes en el cacao

En el cacao se encuentran diferentes clases de compuestos polifenólicos, tales como: fenoles simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácido fenilacético, fenilpropenos, cumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, lignanos y ligninas. (Hii et al., 2009)

1.1.5 *Salmonella* spp.

Salmonella es un género de bacterias perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, que está integrada por células en forma de bacilo, no esporulados y habitualmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. (Hyeon et al., 2013)

Son bacterias Gram negativas, de metabolismo anaerobio facultativo, que reducen los nitratos a nitritos y que fermentan la glucosa produciendo ácido y gas. Las colonias se desarrollan en tiempos de 16 a 24 horas, su temperatura óptima de crecimiento va desde los 32 a 37°C, sin embargo, es capaz de desarrollarse en un rango de 6-46°C. (Odumeru y León, 2012).

La muerte del microorganismo aumenta durante el proceso de congelación siendo el intervalo de 0°C y -10°C más efectivo que entre -17°C a -20°C. Aunque

este proceso pueda dañar seriamente el estado de la bacteria, no garantiza su destrucción total en los alimentos. Para asegurar su muerte se tendría que sobrepasar una temperatura máxima de 49.5°C. El pH de crecimiento óptimo es de 6.5 y 7.5 y se desarrollan a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, pudiendo sobrevivir en alimentos secos con un aw menor de 0.2. (Odumeru y León, 2012).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ecuador es un importante productor de cacao y en la actualidad es reconocido a nivel mundial por proveer más del 60% de la producción de cacao de variedad fino de aroma. Sin embargo el aprovechamiento de la semilla del fruto ya sea este para la producción de chocolate, cosméticos, entre otros, supone una generación de 17 kg a 20 kg de subproductos por cada 100 kg de cacao. (García y Olmo, 2011)

La labor empresarial contribuye al crecimiento económico, sin embargo también ha sido parte de los principales generadores de daño ambiental. Los subproductos agroindustriales al no ser tratados pueden provocar impactos ambientales, por ejemplo en el caso del suelo el cultivo del cacao puede presentar un problema potencial de generar riesgos como la erosión y contaminación por agro insumos y otros residuos sólidos (Fedecacao, 2013)

Por otra parte, en nuestro país la comercialización y consumo de queso es cada vez mayor. Según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), la producción del queso en nuestro país es muy alta, actualmente la producción de leche en Manabí es de hasta 800 mil litros diarios, un 30% son destinados a la elaboración del queso fresco. (MAGAP, 2017).

Conociendo que gran parte de la elaboración de queso, se realiza en áreas rurales en donde las condiciones higiénicas sanitarias no son lo suficientemente aptas para la obtención de productos de calidad comercial, además, a sabiendas que el queso es un producto perecedero y que por su composición está susceptible a sufrir alteraciones orgánicas que conllevan a su deterioro, especialmente por el desarrollo de microorganismos patógenos, la importancia de esta investigación radica en la posibilidad de disminuir los niveles de microorganismos patógenos como *Salmonella spp.* en queso.

La Gaceta epidemiológica del Ministerio de Salud Pública del Ecuador notifica que entre los años 2015 al 2018 en la provincia de Manabí, las infecciones por *Salmonella* fueron de 1991 casos totales, ubicando a la provincia de Manabí en la segunda ubicación más afectada por dicha bacteria a nivel nacional solo por debajo de la provincia del Guayas que reportó 2080 casos.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las cáscaras de cacao son producto de desecho, conllevando a un gran problema para las industrias al no saber cómo deshacerse de él. El contenido de teobromina limita su consumo, por esta razón es necesario implementar tecnologías para aprovechamiento de los desechos agrícolas de la actividad cacaotera (Sánchez, 2013)

El queso fresco por ser un alimento perecedero debido a sus características propias, así como también en muchas ocasiones, las condiciones inadecuadas a las que este se almacena hacen de ello un sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos que puedan causar intoxicaciones en el consumidor. Además, la composición química y el grado de hidratación de este tipo de productos son factores que van a favorecer el desarrollo de patógenos de importancia sanitaria por su impacto en la salud pública. (Arguello *et al.*, 2015)

Por esta razón es necesario implementar nuevas tecnologías alimentarias, como es la de disminuir la presencia de *Salmonella* que habitualmente está presente en alimentos cuyas condiciones no son los más favorables. El empleo de antimicrobianos naturales puede ser una alternativa importante para preservar la calidad microbiológica de los alimentos y garantizar la seguridad del consumidor (Abdalla *et al.*, 2007).

En esta investigación se pretende reducir la presencia de *Salmonella spp.* en queso fresco mediante la aplicación de compuestos fenólicos extraídos de la cáscara del cacao

1.4 HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao*) serán agentes inhibidores de *Salmonella spp.* en queso fresco

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Utilizar los compuestos fenólicos de la cáscara del cacao como agentes inhibidores de *Salmonella spp.* en queso fresco

1.5.2 Objetivos específicos

1. Determinar, mediante análisis *in vitro*, si los compuestos fenólicos obtenidos con extracción alcohólica presentan poder inhibitorio sobre *Salmonella spp.*
2. Realizar la curva de crecimiento de *Salmonella spp.* ante diferentes concentraciones de compuestos fenólicos
3. Aplicar el mejor resultado de los objetivos 1 y 2 en queso fresco haciendo un seguimiento del desarrollo de UFC de *Salmonella pp.*
4. Elaborar estudios de análisis sensorial mediante las pruebas dúo-trío y de satisfacción escala hedónica verbal de cinco puntos al queso tratado con la mejor concentración de compuestos fenólicos resultante del estudio en ausencia de *Salmonella spp.*

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de alimentos y tecnología de lácteos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, ubicada en la ciudad de Manta, con latitud sur 0°57'10" y longitud oeste 80°44'43" con una altitud promedio de 20 msnm.

2.2 VARIABLES

2.2.1 Variable independiente (Diseño experimental 1. Poder inhibitorio sobre *Salmonella* spp.)

Concentración de compuestos fenólicos

- ✓ 0.5%
- ✓ 1%
- ✓ 1.5%

2.2.2 Variable dependiente

- ✓ Zona de inhibición
- ✓ UFC de *Salmonella* (curva de crecimiento)

2.2.3 Variable independiente (Diseño experimental 2. Aplicación de compuestos fenólicos en queso fresco)

Compuestos fenólicos a la mejor condición del diseño 1.

- ✓ 1 %

2.2.4 Variables dependientes

- ✓ UFC de *Salmonella spp.*
- ✓ Análisis sensorial

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.1 Tipo de diseño

Para la investigación de estudio se utilizaron dos diseños completamente al azar con arreglo unifactorial con tres repeticiones.

Como variable del primer diseño experimental se estableció la concentración de compuestos fenólicos extraídos por alcohol (etanol), para luego evaluar la zona de inhibición y la curva de crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC) de los compuestos fenólicos ante la presencia de *Salmonella spp.* En el segundo diseño experimental se aplicó la concentración de los compuestos fenólicos que dió mejores resultados de inhibición de *Salmonella* en queso fresco obtenido del centro comercial nuevo Tarqui de Manta, para posteriormente cuantificar las UFC de *Salmonella spp* por un período de 8 días y realizar un análisis sensorial de prueba dúo-trío y prueba hedónica verbal de cinco puntos

2.3.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ADEVA al 5% y la prueba de comparación de acuerdo al test de Tukey al 5% para ambos diseños, y todos los datos fueron analizados por triplicado y los resultados procesados por el programa Infostat 2016.

TABLA 1. DE ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL DISEÑO EXPERIMENTAL NO1

Fuente de variación		G.L
Total	$(t*r-1)$	8
Tratamientos	$(t-1)$	2
Repetición	$(r-1)$	2
Error experimental	$(t-1) (r-1)$	4

Autor: Medrano. P. 2018

TABLA 2. DE ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL DISEÑO EXPERIMENTAL NO2

Fuente de variación		G.L
Total	$(t*r-1)$	2
Tratamientos	$(t-1)$	0
Repetición	$(r-1)$	2
Error experimental	$(t-1) (r-1)$	0

Autor: Medrano. P. 2018

2.3.3. Tratamientos

En la Tabla N°3 se muestran los 9 tratamientos del primer diseño experimental, con el factor de estudio: Concentraciones

TABLA 3. TRATAMIENTOS DE ESTUDIO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL No1

Tratamientos	Concentraciones	Tipo de bacteria
1	0,5 %	<i>Salmonella spp.</i>
2	0,5 %	<i>Salmonella spp.</i>
3	0,5 %	<i>Salmonella spp.</i>
4	1 %	<i>Salmonella spp.</i>
5	1 %	<i>Salmonella spp.</i>
6	1 %	<i>Salmonella spp.</i>
7	1,5 %	<i>Salmonella spp.</i>
8	1,5 %	<i>Salmonella spp.</i>
9	1,5 %	<i>Salmonella spp.</i>

Autor: Medrano. P. 2018

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.4.1 Obtención de las cáscaras de cacao

Las cáscaras de cacao (*Theobroma cacao*) fino y de aroma se colectaron en la finca Alegría ubicada en el Cantón Junín de la provincia de Manabí, las cáscaras fueron secadas, molidas y almacenadas para futuros análisis.

2.4.2 Extracción alcohólica de los compuestos fenólicos

Para la extracción mediante solvente alcohólica se empleó el método propuesto por Slinkard y Singleton (1977). La obtención de la cascarilla de cacao en polvo de variedad fino de aroma fue tomado por un trabajo previo propuesto por Mieles y Ramírez (2018), del cual se hizo uso del método secado al sol por 15 días. Se tomaron 15 g de la muestra en polvo y se disolvieron con 150 ml de etanol (95%) con agitación constante por 24 horas a temperatura de 20 °C. Se obtuvo un filtrado del cual fue evaporado hasta alcanzar un residuo seco (Espinosa y Santacruz, 2017)

2.4.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos totales

Los resultados fueron previamente obtenidos por Mieles y Ramírez (2018), que emplearon el método Folin- Ciocalteu propuesto por Mahmood *et al.* (2011)

2.4.4 Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos *in vitro* en *Salmonella spp.*

La actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos se determinó de acuerdo por la metodología planteada por Santacruz y Castro (2018) con el método propuesto por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Se inoculó *Salmonella spp.* en cajas Petri usando como medio de cultivo agar Salmonella-Shigella (HiMedia Laboratories, India), para la inoculación se usó 0,5ml de cultivo de microorganismo y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se sumergieron los discos de papel de filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro en solución compuestos fenólicos, los discos se colocaron en el centro de una placa de Petri que contenían *Salmonella spp.* incubadas a 37 °C durante 24 horas y se midió el área de la zona de inhibición en mm. (Santacruz y Castro, 2018)

2.4.5 Curva de crecimiento de los compuestos fenólicos en *Salmonella spp.*

Para la realización de la curva de crecimiento se empleó el método propuesto por Puupponen *et al.* (2001). Se inoculó 10 ml del medio de crecimiento con 1 o 5% del cultivo, los compuestos fenólicos se agregan al medio de cultivo en concentraciones de 0.5, 1 y 1.5%. Se tomaron muestras del crecimiento bacteriano cada cierto tiempo en un periodo de incubación de 24 horas. Las muestras se diluyeron con agua de peptona y las diluciones se las sembró en cajas Petri, garantizando su homogénea distribución sobre el medio de cultivo, mismas que se incubaron a 37°C por 24 horas para luego realizar los recuentos de bacterias.

Los efectos inhibitorios de los compuestos fenólicos sobre las bacterias se calcularon comparando con la curva de crecimiento control (sin adición de compuestos fenólicos).

2.4.6 Obtención del queso fresco Manaba

El queso fresco Manaba fue seleccionado en el centro comercial Nuevo Tarqui,

2.4.7 Inmersión de la mejor concentración de los compuestos fenólicos en queso

Las muestras de queso fueron sumergidas en la mejor concentración del diseño experimental 1, por 15 minutos. Posteriormente las muestras de queso fueron almacenadas durante toda la noche a condiciones de refrigeración y durante el día a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) por 8 días (Santacruz, 2018)

2.4.8 Análisis de presencia o ausencia de *Salmonella spp.* en queso fresco.

La presencia o ausencia de *Salmonella spp.* en queso fresco se la determinó de acuerdo a la norma NTE INEN 1529-15 :96. Se pesaron 25 g de queso fresco en un frasco con tapa rosca y se adicionaron 225 ml de agua de peptona para luego homogenizar por dos minutos. Se tapó el frasco y se lo dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 16 horas. Transcurrido el tiempo se ajustó la tapa y se mezcló el cultivo de pre-enriquecimiento, con la ayuda de una pipeta se traspasaron 10 ml en 100 ml de caldo verde brillante y se incubó a 37°C por 24 horas.

2.4.9 Análisis de *Salmonella spp.* del queso fresco

Para la determinación del análisis microbiológico de *Salmonella* se lo realizó de acuerdo al método por ISO 6579 (2002). Se tomó 10 gr de queso fresco y se depositó en funda estériles resellables (Ziploc) y se agregaron 90 ml de agua peptona, previamente elaborada y esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos, la muestra se homogenizó manualmente. Con la ayuda de una micropipeta se traspasó 1 ml de la muestra en 9 ml de agua peptonada en un tubo de ensayo obteniendo así la dilución 10^1 , de esa primera dilución se tomó 1 ml y se agregaron otros 9 ml de agua peptonada en otro tubo de ensayo obteniendo la dilución 10^2 , y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^4 . La siembra se realizó con la última dilución 10^4 , el procedimiento consistió en inocular 1 ml de la última dilución en cajas Petri las cuales contenían el medio de cultivo agar *Salmonella-Shigella* homogenizando por toda la superficie hasta lograr la incorporación del inóculo en el medio y se incubó a 37°C por 24 horas para su posterior conteo. La determinación del conteo de UFC en los quesos frescos se los examinó los días 0, 2, 4, 6 y 8 después de su elaboración.

- Fórmula para el conteo de colonias:

$$UFC = \frac{\text{No. de colonias por placa} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen inicial de la muestra sembrada}}$$

2.4.10 Análisis de textura instrumental

La adhesividad, gomosidad, cohesividad, masticabilidad y elasticidad se determinaron mediante análisis de perfil de textura (TPA), en muestras cúbicas 2 cm de lado, usando un texturómetro Shimadzu Universal Tester EZTest EZ-S (Tay, 1998)

2.4.11 Análisis de color instrumental

La determinación de color de los quesos se lo realizó con un colorímetro modelo Color Gard System/05 (Hunter Labs, Reston VA), previamente calibrado con el mosaico negro y el mosaico blanco. Las pruebas se realizaron por triplicado mediante los parámetros L , a , b . El parámetro L indica la variación en luminosidad (variando para 0 color negro y 100 color blanco), a indica si existe variación al color verde (-) y color rojo (+), y b si varía color amarillo (-) y si varia a color azul (+). (Novoa y Ramírez, 2012)

2.5 Métodos de análisis sensoriales

El análisis sensorial se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, el queso fresco Manaba fue sumergido por 15 minutos en solución de compuestos fenólicos a concentración del 1% para posteriormente realizar las respectivas pruebas.

2.5.1 Prueba dúo-trío

Para los análisis sensoriales se trabajó con 16 panelistas semi entrenados en dos sesiones. Se realizó una prueba dúo-trío para determinar si hubo diferencia entre las muestras tratadas y el control (International Standard ISO 10399:2004). Al tener los datos se cuenta el número de respuestas correctas y se lo consultó con el Anexo N°2

2.5.2 Prueba hedónica verbal de cinco puntos

El queso tratado con compuestos fenólicos fue evaluado con una escala de 5 puntos que va desde el me gusta mucho (5) hasta el disgusta mucho (1), en los atributos sensoriales de textura, color, olor y sabor. Para el desarrollo de esta prueba se usó la escala de Peryamm y Pilgrim (1957). Ver en Anexo N°3

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos *in vitro* en *Salmonella spp.*

Sí se observó diferencia estadística significativa en los halos de inhibición de soluciones de compuestos fenólicos al 0,5 y 1,5%. (Tabla 4)

TABLA 4. RESULTADOS DEL PODER INHIBITORIO DE *SALMONELLA SPP.* EN CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE CÁSCARA DE CACAO

Concentración	Medias	n	E.E		
0.5	7,78	9	0,97	A	
1,0	10,67	9	0,97	A	B
1,5	11,78	9	0,97		B

Autor: Medrano. P. 2019

Los resultados concuerdan con los de Nsor-atindana et al. (2012) quienes obtuvieron halos de inhibición en extracto etanólico entre 10,98 mm y 12,21 mm frente a *Salmonella*, *E. coli*, *S aureus*, *B cereus*, usando cáscaras de cacao con una concentración de 100 mg/ml.

De acuerdo a Orihuela (2016) los resultados pueden verse influenciado por el contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos como polifenoles, flavanoles, epicatequina y la catequina, asociándolos con actividad antimicrobiana ya que actúan contra la membrana de bacterias grampositivas dando como resultado la pérdida de estructura celular y la muerte celular. Por otra parte, Hernández et al. (2012) dice que la actividad antimicrobiana puede

variar de acuerdo a la cantidad de extracto utilizado, la fase de crecimiento en la que se encuentran las cepas y la cantidad específica utilizada del microorganismo

Se cree que los polifenoles son los principales compuestos presentes en el cacao con actividad antimicrobiana, debido a que poseen efectos contra bacterias y hongos además de su capacidad antioxidante. (Jail y Ismail, 2008).

3.2 Curva de crecimiento de los compuestos fenólicos en *Salmonella spp.*

En la Tabla 5 se observa que no existió diferencia significativa en las unidades formadoras de colonias a concentraciones de 1 y 1.5%, mientras que las unidades formadoras de colonias al aplicarse extracto de compuesto fenólico con concentración de 0.5% fueron mayores y estadísticamente diferentes a las otras dos concentraciones.

TABLA 5. RESULTADOS DE LAS UFC EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

Concentración	Medias	n	E.E	
1,5	0,57	21	0,16	A
1,0	0,77	21	0,16	A
0,5	1,95	21	0,16	B

Autor: Medrano, 2019

Como se muestra en la Tabla 6, las unidades formadoras de colonias de *Salmonella spp.* en los tiempos 0, 2, 4, 6 y 24 horas fueron menores y estadísticamente diferentes a las de los tiempos de 0,5 y 1 hora.

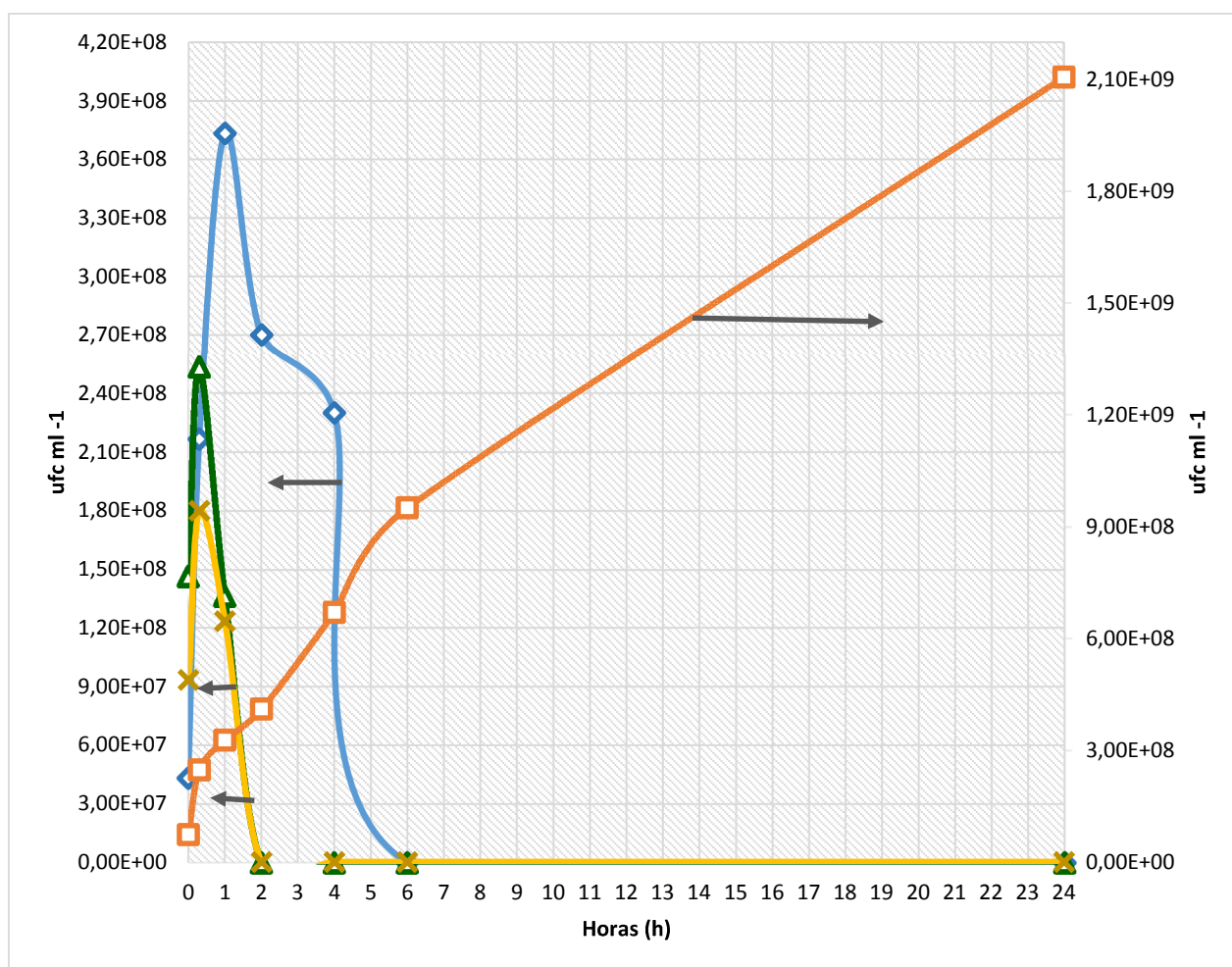
TABLA 6. RESULTADOS DE LAS UFC EN INTERVALOS DE TIEMPOS

Tiempo	Medias	n	E.E	
24,0	0,00	9	0,25	A
4,0	0,77	9	0,25	A
6,0	0,77	9	0,25	A
2,0	0,90	9	0,25	A
0,0	0,94	9	0,25	A
1,0	2,11	9	0,25	B
0,5	2,17	9	0,25	B

Autor: Medrano, 2019

En el Gráfico 1 se puede observar que la inhibición completa de *Salmonella spp.* en presencia de compuestos fenólicos de cáscara de cacao a concentraciones de 1 y 1.5% se realizó a un tiempo de 2 horas, mientras que a concentración de 0.5% la inhibición completa fue a las 6 horas. Por otro lado, en el control se observó un incremento de unidades formadoras de colonias a lo largo del tiempo.

Gráfico 1. Curva de crecimiento con soluciones de compuestos fenólicos: (◇) concentración de compuestos fenólicos al 0.5%, (△) concentración de compuestos fenólicos al 1%, (⊗) concentración de compuestos fenólicos al 1.5%, (□) control de la cepa *Salmonella spp.*



Autor: Medrano, 2019

El efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos puede deberse a afectaciones de la superficie celular de las bacterias. (Puupponen, 2001)

3.3 Análisis de presencia o ausencia de *Salmonella spp.* en queso fresco.

De acuerdo a la norma NTE INEN 1529-15:96 la unidad de colonias/g en 25 g de queso fresco se detecta por la ausencia de *Salmonella*, sin embargo en los resultados que se obtuvieron se evidenció la presencia de dicha bacteria.

En la obtención del queso fresco se deben seguir procesos meticulosos desde la obtención de la materia prima hasta su distribución. La leche cruda en el momento del ordeño llega a una temperatura que oscila entre los 32°C y un pH óptimo de 6,51, sin embargo cuando se encuentran alterados estos factores afectan la supervivencia y crecimiento de patógenos asociados a brotes. Millogo *et al.* (2010), indica que para el crecimiento de *Salmonella spp.*, la temperatura óptima es de 35 - 37°C y un pH de 7 - 7,5; estas condiciones son favorables para que *Salmonella spp.* pueda multiplicarse rápidamente en la leche, ya que este microorganismo puede sobrevivir por un largo tiempo en refrigeración.

Otros factores que pueden influir en la contaminación es la manipulación, por lo que es importante hacer una evaluación de la calidad microbiológica de la leche, así mismo los materiales que se utilizan para su elaboración (Arias *et al.*, 2010)

3.4 Análisis de *Salmonella spp.* del queso fresco

Los resultados microbiológicos del queso previamente sumergido en solución de compuestos fenólicos a una concentración de 1% mostró que en el día 0 hubo ausencia de *Salmonella*. (Tabla 7)

TABLA 7. RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE QUESO FRESCO PREVIAMENTE SOMETIDO A INMERSIÓN EN SOLUCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 1%

Parámetro	Método	Unidad	Resultados del queso fresco en inmersión de compuestos fenólicos al 1% de concentración al día 0
Salmonella	ISO 6579: 2002	UFC/g	Ausencia

Autor: Medrano, 2019

UFC/g: Unidad formadora de colonia por gramo

La ausencia de Salmonella en el queso se sustenta en los análisis de la curva de crecimiento que mostró que a las 2 horas de ser expuesta a compuestos fenólicos, estos fueron completamente inhibidos.

3.5 Análisis de textura instrumental

En base a la Tabla 8 se observa que la textura de los quesos al aplicarse inmersión en compuestos fenólicos fue similar en los días 4, 6 y 8, con valores comprendidos entre 1.92 y 1.99, mientras que fue superior y estadísticamente diferente para los días 0 y 2. Adicionalmente se observa que la dureza del queso control fue menor y estadísticamente diferente a los otros tratamientos.

TABLA 8. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE DUREZA (ANÁLISIS INSTRUMENTAL)

Días	Medias	n	E.E	
-1,0	1,03	3	0,09	A
4,0	1,92	3	0,09	B
8,0	1,96	3	0,09	B
6,0	1,99	3	0,09	B
0,0	3,31	3	0,09	C
2,0	3,39	3	0,09	C

Autor: Medrano, 2019

-1.0: Queso fresco Manaba sin compuestos fenólicos

De acuerdo a Osorio (2004), uno de los componentes que proporciona las diferencias en la dureza del queso, es su composición fisicoquímica, especialmente el contenido de grasa, proteínas y humedad. Efectivamente en el presente trabajo, la etapa de inmersión en solución de compuestos fenólicos pudo incrementar el contenido de agua del queso disminuyendo así su dureza.

3.6 Análisis de color instrumental

En la Tabla 9 se puede observar que la luminosidad (*L*) del queso sometido a una inmersión en solución de compuestos fenólicos al 1% de concentración se redujo, siendo el día 2 y 8, 83,41 y 75,48 respectivamente. El valor del queso fresco sin inmersión fue de 84,62.

Por otra parte, el valor *a* indica que el queso fresco independientemente del tratamiento fue estadísticamente igual en los días 0, 2, 4 y 6 y menores que el del día 8. El queso fresco sin inmersión fue estadísticamente igual al sometido a inmersión hasta el día 4 de almacenamiento. Con respecto al valor de *b* los días 2 y 4 fueron estadísticamente iguales al queso fresco sin inmersión, siendo éstos

mayores al tratado por inmersión para los días de almacenamiento 0, 6 y menores al del día 8.

TABLA 9. RESULTADOS DE PRUEBA TUKEY DE COLOR DE L, A Y B

Días	Medias	n	E.E			
8	75,33	3	0,74	A		
6	80,87	3	0,74		B	
4	81,99	3	0,74		B	C
2	83,41	3	0,74		B	C
-1	84,62	3	0,74			C D
0	87,74	3	0,74			D

Parámetro de color (L)

Días	Medias	n	E.E			
-1	-7,38	3	0,26	A		
2	-7,01	3	0,26	A	B	
4	-6,66	3	0,26	A	B	
0	-6,55	3	0,26	A	B	
6	-5,86	3	0,26		B	
8	-4,06	3	0,26			C

Parámetro de color (a)

Días	Medias	n	E.E			
0	20,97	3	0,34	A		
6	29,53	3	0,34		B	
-1	31,48	3	0,34			C
4	32,54	3	0,34			C
2	32,65	3	0,34			C
8	35,79	3	0,34			D

Parámetro de color (b)

-1: Queso fresco sin inmersión de la concentración de compuestos fenólicos

El valor de L en base a compuestos fenólicos se reduce gradualmente provocando una pérdida de brillo en los días de almacenamiento, siendo la humedad el factor principal de la reducción del brillo. El brillo puede verse afectado por el ángulo de luz y propiedades intrínsecas. Con respecto al valor de a , su comportamiento se debe al almacenamiento del empaque, y el valor b depende de la concentración de la solución esta será la cantidad absorbida para formar la capa protectora en la superficie del alimento (Trezza y Krochta, 2004).

3.7 Análisis sensorial

3.7.1 Prueba dúo trio

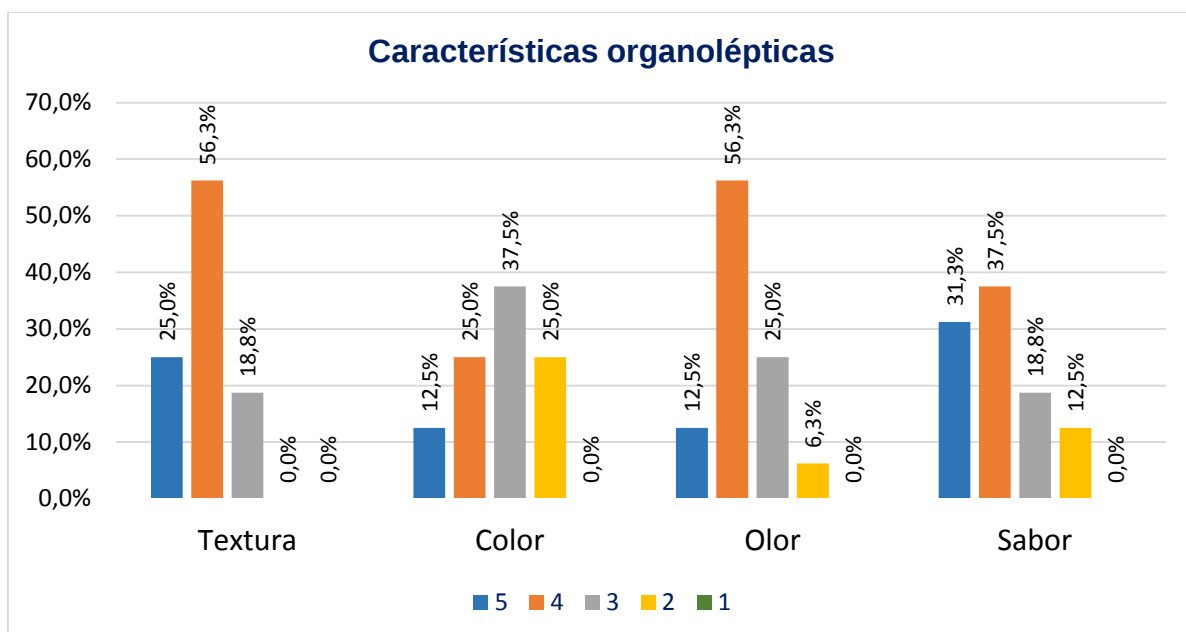
El número de respuestas correctas fue de 15 con un total de 16 juicios, y en base al Anexo N°2 se tiene un nivel de significancia del 0.1%

3.7.2 Prueba hedónica verbal de cinco puntos

Las características sensoriales en inmersión de compuestos fenólicos al 1% de concentración se evaluaron a los 3 días posteriores de almacenamiento, puesto que se observó la ausencia de *Salmonella* del queso fresco.

En el gráfico 2 se reflejan las respuestas de los catadores respecto la aceptación organoléptica. De acuerdo a los resultados obtenidos, de los cuatro parámetros evaluados. La textura fue el más aceptado (81,3%), interpretando como una calidad muy buena por la mayoría de los catadores. Se calificó al olor y sabor (68,8%) del queso con un grado de aceptación buena. En cuanto al color (25,0%) del queso, algunos catadores indicaron la no aceptación, esto probablemente a que los compuestos fenólicos de la cáscara del cacao le confirieron un tono amarillo-anaranjado

GRÁFICO 2. RESULTADOS DE PRUEBA HEDÓNICA VERBAL DE CINCO PUNTOS



Autor: Medrano, 2019

Donde:

- 5:** Me gusta mucho
- 4:** Me gusta
- 3:** Ni me gusta, ni me disgusta
- 2:** Me disgusta
- 1:** Me disgusta mucho

CAPITULO IV

4.1 CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se puede concluir que:

1. Las soluciones de compuestos fenólicos en concentraciones de 0,5, 1 y 1,5% presentaron halos de inhibición (7.8, 10.7 y 11.8 mm respectivamente) ante la presencia de *Salmonella spp.*
2. Mediante la curva de crecimiento se pudo observar que entre mayor sea la concentración de compuestos fenólicos las unidades formadoras de colonias de *Salmonella spp.* serán menores y su inhibición total se realizará tiempo de 2 horas.
3. Soluciones de compuestos fenólicos al 1% aplicadas a queso fresco Manaba mostraron mediante análisis microbiológicos una ausencia de unidades formadoras de colonias de *Salmonella spp.* en el día 0 y posterior revisión a las 72 horas.
4. Mediante análisis sensorial se determinó con un nivel de significancia del 0.1% de confiabilidad que no existió diferencia entre el queso tratado por inmersión y el queso control; mientras que el análisis con una escala hedónica verbal de cinco puntos estableció el atributo textura como el más aceptable por los catadores, mientras que el color fue el atributo de menor agrado
- 5 Contestando a la hipótesis planteada, los compuestos fenólicos de la cáscara de cacao si presentan poder inhibitorio en *Salmonella*, y al aplicarlos en queso fresco Manaba estos reducen la carga microbiana

4.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda emplear diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos de la cáscara de cacao en bacterias Gramnegativas

Extender el presente trabajo por curva de crecimiento en bacterias Grampositivas

Aplicar los compuestos fenólicos para analizar las características de otros productos alimenticios

BIBLIOGRAFÍAS

- Abdalla, A.; Darwish, S; Ayad, E; y El-Hamahmy, R. 2007. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103(4), 1141-1152.
- Alberca, Y. 2018. Desarrollo de un té con cascarilla de la almendra del cacao (*Theobroma cacao*) fino de aroma y CCN-51. Universidad de las Américas. Facultad de ingeniería y ciencias aplicadas. Ecuador
- Archivo Latinoamericano de Nutrición. 2016. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. Volumen 66, No 3
- Argote, F; Suarez, Z; Tobar, M; Pérez, J; Hurtado, A; Delgado, J. 2017. Capacidad de evaluación inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Vol 15, pp. 52-60. Disponible en [http://dx.doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)edicionespecialn2.578](http://dx.doi.org/10.18684/bsaa(v15)edicionespecialn2.578)
- Arguello, P; Lucero, G; Escobar, S; Albuja, A; Gallegos, J; Carrascal, A. 2015. Microbiological quality of hand made cheeses produced in rural areas of Riobamba. Ecuador. *Revista Perspectiva*, 16(18), 65-74
- Arias, S; Loaiza, E; Restrepo, J; y Oliviera, M. 2010. Caracterización del ordeño manual e identificación de puntos críticos de control para la calidad higiénica de la leche en una finca del norte de Antioquia. *La sallista de investigación*. 7 (2): 35 – 46
- CLSI. 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44–A2.
- Confitería Marqués. 2015. El cultivo del cacao en el mundo. Consultado el 26 de junio del 2015. Disponible en: <http://www.confiteriamarques.com>
- Espinosa, A y Santacruz, S. 2017. Phenolic compounds from the peel of *Musa cavendish*, *Musa acuminata* and *Musa cavandanaish*, Ecuador. *Revista Politécnica*. Vol. 38, No2
- FEDECACAO. 2013. Guía ambinetal para el cultivo del cacao. Colombia. vol. 2
- Gaceta epidemiológica del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (s, f). Enfermedades transmitidas por alimentos, infecciones debido a *Salmonella*

- García, R y Olmo, E. 2011. Proceso de elaboración de chocolate. Universidad Politécnica de Catalunya
- Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo ambiental. 2010. Vigilancia y Control en Salud Pública. La Habana
- Guerrero, A. 2015. Sinagap. Disponible en http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/panorama_agroeconomico_ecuador2015.pdf
- Hernandez, J; Cubillos, J; y Milian, P. 2012. Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.* asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de microbiología tropical, 2(2), 51-56
- Hii, C; Law, C; Suzannah, S; Misnawi, y Cloke, M. 2009. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). As. J. Food ag-ind. 2(4), pp. 702-722.
- Hyeon, J; Chon, J; Park. J; Kim, M; Oh, Y; Choi, I; Seo, K. 2013. A comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates. Obtained from Food and Human Sources. Osong Public Health and Research Perspectives
- International Standard ISO 10399:2004, Sensory analysis: Methodology: Duotrio test, Second Edition. 19p
- Jail, A., y Ismail, A. 2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health. Molecules, 13(9), 2190-2219
- MAGAP. 2017. Manabí; baja producción de leche provoca aumento en el precio del queso. Ecuador
- Marina, L y García, N. 2012. Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas de *Theobroma cacao* L. de una industria chocolatera colombiana. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia
- Millogo, V; Svennersten, K; Ouédraogo, G; y Agenas, S. 2010. Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina faso. Food Control. 21 (7): 1070-1074
- Niemenak, N; Rohsius, Ch; Elwers, S; Ndoumou, D; Lieberei, R. 2006 Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. J Food Composition Analysis

- Norma International Standard ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN. 1529–15:1996. Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*. Método de detección
- Novoa, D y Ramírez, J. 2012. Caracterización colorimétrica de manjar blanco del valle. *Revista Bio. Agro.* 10:54-60
- Nsor-atindana, J; Zhong, F; y Mothibe, K. 2012. Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean *Ahells*, 11(7), 574-579
- Odumeru, J; y León, C., 2012. *Salmonella* detection methods for food and food ingredients, *Salmonella – A dangerous foodborne pathogen*. Editorial InTech. Capítulo 17, p. 373-392. ISBN: 978-953-307-782-6.
- Orihuela, J. 2016. Actividad inhibitoria del extracto etanolico de *Theobroma cacao* L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario. Universidad Mayor de San Marcos.
- Osorio, J; Ciro, H; y Mejía, L. 2004. Caracterización textural y fisicoquímica del queso Edam. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. Vol. 57, no. 1.
- Padrón, G; Romero, G; Benavides, A; Ramírez, H; Maiti, R. 2009. *Crop Research*. 26, No. 2, 291-302.
- Plúas, C. 2008. Diseño de una Línea Procesadora de Pasta de Cacao Artesanal. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
- Puupponen, R; Nohynek, L; Meier, C; Kahkonen, M; Heinonen, M; Hopia, A; y Oksman, K. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494-507
- Sánchez, J. 2013. Evaluación energética de cáscaras de cacao nacional. Universidad de Cuenca. Ecuador
- Santacruz, S y Castro, M. 2018. Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese, Manta, Ecuador. *Food Science and Technology* 93, 570–572

Stoler, M. 2012.El justo sabor del cacao: Desafíos y ventajas del comercio justo del cacao. Universidad Andina Simón Bolívar. Ecuador

ANEXOS

Anexo N° 1 Formato para prueba sensorial dúo- trío

NOMBRE: _____ FECHA: _____

NOMBRE DEL PRODUCTO: Queso fresco Manaba

Frente a usted hay tres muestras de queso fresco, una de referencia marcada con "R" y dos codificadas.

Una de las muestras codificadas es igual a la de "R"

¿Marque con una "X" la muestra que usted considera diferente a la de referencia?

MUESTRAS	MUESTRA IGUAL A LA REFERENCIA
221	_____
384	_____

COMENTARIOS:

Anexo N° 2 Significancia para pruebas sensorial dúo-trío

Número de juicios	Pruebas bilaterales* Nivel de probabilidad			Pruebas unilaterales** Nivel de probabilidad		
	5%	1%	0.1%	5%	1%	0.1%
5	-	-	-	5	-	-
6	-	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	11
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	10	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	13	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	27	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	31
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	34	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55
* Número mínimo de juicios coincidentes necesario para establecer diferencia significativa						
** Número mínimo de respuestas correctas necesario para establecer diferencia significativa						

Anexo N° 3. Escala hedónica verbal de cinco puntos

NOMBRE: _____ FECHA: _____

NOMBRE DEL PRODUCTO: Queso fresco Manaba

Pruebe el producto que se presenta a continuación. Por favor marque con una "X" la casilla que esta junto a la frase que mejor describa

Puntaje	Descripción	Textura	Color	Olor	Sabor
5	Me gusta mucho				
4	Me gusta				
3	Ni me gusta, ni me disgusta				
2	Me disgusta				
1	Me disgusta mucho				

COMENTARIOS:

Anexo N° 4. Análisis de varianza del poder inhibitorio en concentraciones de compuestos fenólicos frente a *Salmonella spp.*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Poder inhibitorio	27	0,27	0,21	29,02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	76,74	2	38,37	4,49	0,0221
Concentración	76,74	2	38,37	4,49	0,0221
Error	205,11	24	8,55		
Total	281,85	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,44153

Error: 8,5463 gl: 24

Concentración	Medias	n	E.E.
0,5	7,78	9	0,97 A
1,0	10,67	9	0,97 A B
1,5	11,78	9	0,97 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 5. Análisis de varianza de la curva de crecimiento en concentraciones de 0.5, 1 y 1% de compuestos fenólicos y en intervalos de tiempos incubados frente a *Salmonella spp.*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	63	0,65	0,60	68,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56,30	8	7,04	12,70	<0,0001
Concentracion	23,39	2	11,70	21,11	<0,0001
Tiempo	32,91	6	5,48	9,90	<0,0001
Error	29,92	54	0,55		
Total	86,22	62			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55360

Error: 0,5541 gl: 54

Concentracion	Medias	n	E.E.
1,5	0,57	21	0,16 A
1,0	0,77	21	0,16 A
0,5	1,95	21	0,16 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,07448

Error: 0,5541 gl: 54

Tiempo	Medias	n	E.E.
24,0	0,00	9	0,25 A
4,0	0,77	9	0,25 A
6,0	0,77	9	0,25 A
2,0	0,90	9	0,25 A
0,0	0,94	9	0,25 A
1,0	2,11	9	0,25 B
0,3	2,17	9	0,25 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 6. Análisis de varianza de dureza del queso fresco Manaba en inmersión de la concentración de compuestos fenólicos al 1%

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Textura	18	0,98	0,97	7,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,51	5	2,50	96,32	<0,0001
Días	12,51	5	2,50	96,32	<0,0001
Error	0,31	12	0,03		
Total	12,82	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,44195

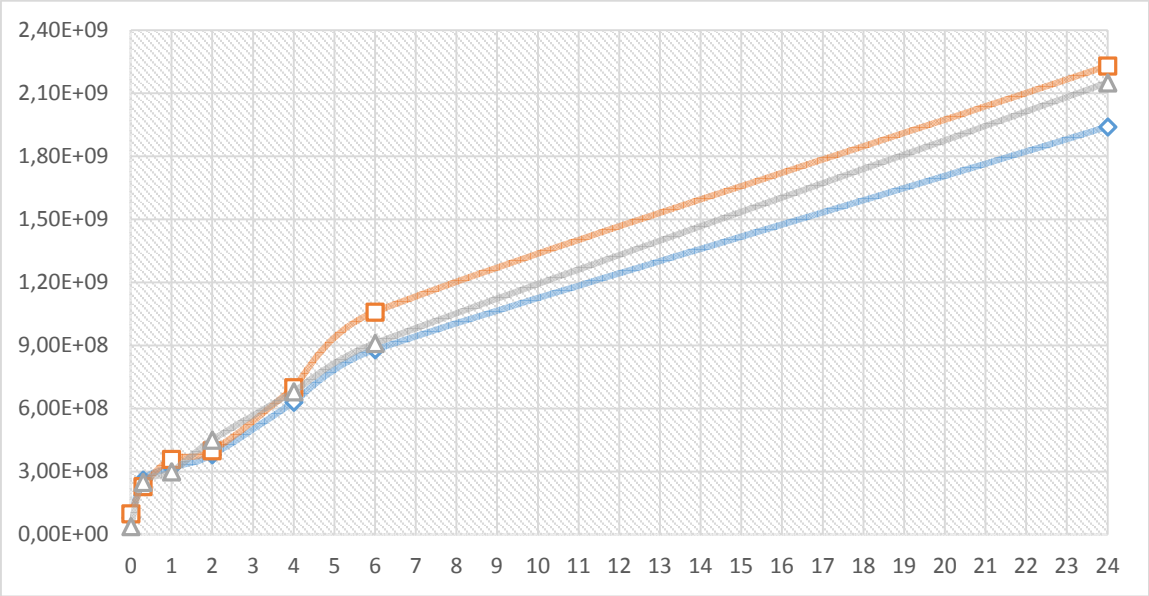
Error: 0,0260 gl: 12

Días	Medias	n	E.E.	
-1,0	1,03	3	0,09	A
4,0	1,92	3	0,09	B
8,0	1,96	3	0,09	B
6,0	1,99	3	0,09	B
0,0	3,31	3	0,09	C
2,0	3,39	3	0,09	C

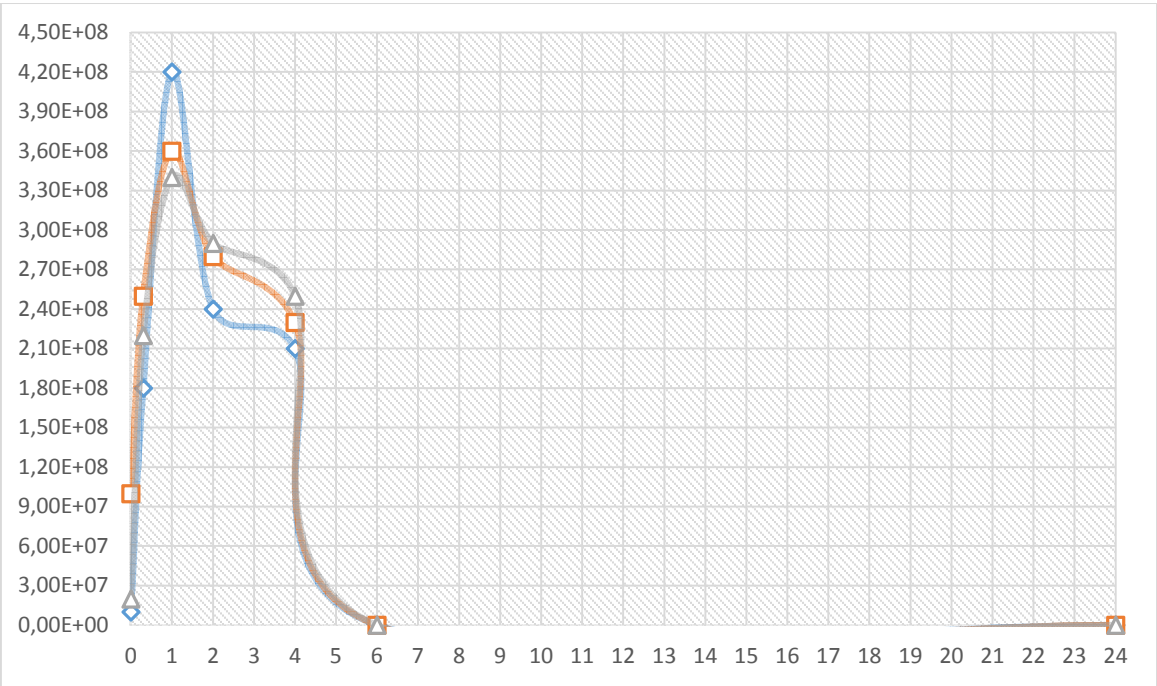
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

-1: Queso fresco control

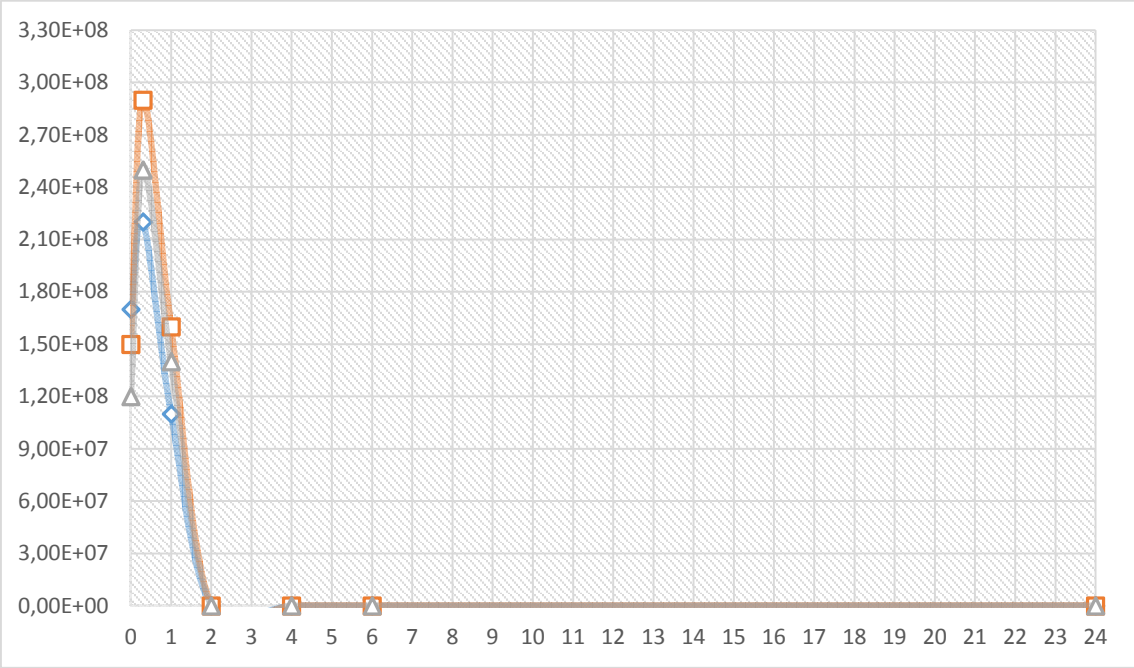
Anexo N° 7. Representación gráfica por triplicado de la curva de crecimiento control con *Salmonella spp.*



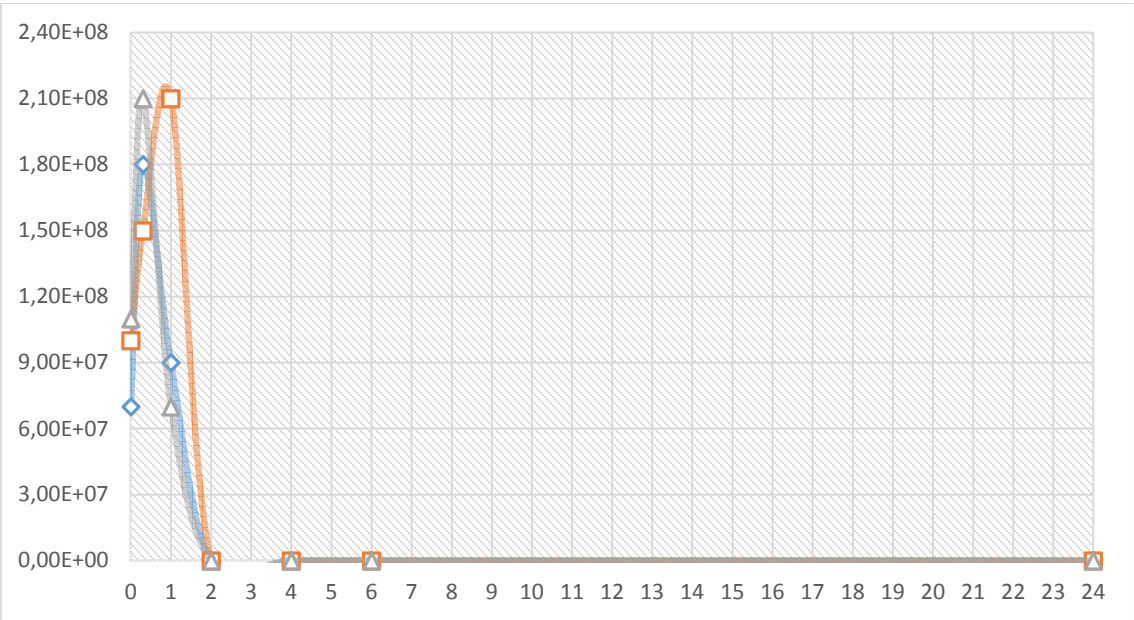
Anexo N° 8. Representación gráfica de triplicado de la curva de crecimiento con concentración de 0.5% de compuestos fenólicos frente a *Salmonella spp.*



Anexo N° 9. Representación gráfica de triplicado de la curva de crecimiento con concentración de 1% de compuestos fenólicos frente a *Salmonella spp.*



Anexo N° 10. Representación gráfica de triplicado de la curva de crecimiento con concentración de 1.5% de compuestos fenólicos frente a *Salmonella spp.*



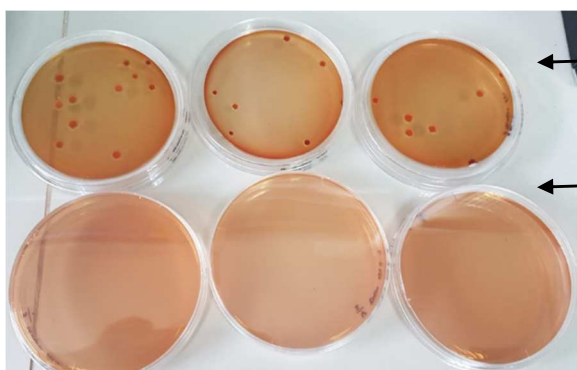
Anexo N° 11. Análisis de textura instrumental en queso fresco



Anexo N° 12. Análisis de colorimetría en queso, inmersión al 1% de concentración de compuestos fenólicos



Anexo N° 13. Análisis microbiológico de *Salmonella* de queso fresco



← Presencia de *Salmonella* en queso fresco Manaba obtenido del Nuevo Tarqui

← Ausencia de *Salmonella* en queso fresco Manaba con la inmersión de concentración de compuestos fenólicos en el día 0

Anexo N° 14. Análisis sensorial, prueba dúo-trío con catadores semi entrenados

