



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

MODALIDAD INVESTIGACIÓN

TEMA:

**APLICACIÓN DE EXTRACTO DE PROPÓLEO COMO AGENTE
CONSERVANTE EN CARNE DE RES MOLIDA QUE SE
EXPENDEN EN EL MERCADO DE SAUCES IV
DE LA CIUDAD DE GUAYAQUIL.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO
PARA OPTAR AL GRADO DE QUÍMICO Y FARMACÉUTICO.**

AUTORES:

**ANA MARÍA MACÍAS PICO
ESAÚ FERNANDO YUNDA GUACHO**

TUTORA:

Q.F. MARÍA AUXILIADORA ALARCÓN PERASSO, Mg.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutora del Trabajo de Titulación, Certifico: Que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es: "Aplicación de extracto de propóleo como agente conservante en carnes de res molida que se expenden en el mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil", presentado por Ana María Macías Pico con cédula de ciudadanía N° 093087274-2 y Esaú Fernando Yunda Guacho con cédula de ciudadanía N° 094018269-4, previo a la obtención del título de Químico y Farmacéutico.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Antiplagio del programa URKUND. Lo Certifico.-

Guayaquil, Noviembre 2015.


Q.F. Ma. Auxiliadora Alarcón Perasso, Mg.

INFORME DE ANÁLISIS **CERTIFICADO DEL TRIBUNAL**

Acta de Registro de la Sustentación Final

El Tribunal de Sustentación del Trabajo de Titulación de la Srta. ANA MARÍA MACÍAS PICO y del Sr. ESAÚ FERNANDO YUNDA GUACHO, después de ser examinado en su presentación, memoria científica y de defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación.


Q.F. LEILA PRIAS MOGRO, M.Sc.
 DECANA - PRESIDENTE DEL TRIBUNAL




Q.F. JACQUELINE CARRILLO

DOCENTE – Oponente
 MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Q.F. GIOMARA QUIZHPE

DOCENTE – Oponente
 MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Ing. RAÚL DÍAZ, PhD.

DOCENTE
 MIEMBRO DEL TRIBUNAL


ING. NANCY VIVAR CÁCERES
 SECRETARIA ENCARGADA



INFORME DE ANTI-PLAGIO DEL PROGRAMA URKUND

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS MODALIDAD INVESTIGACIÓN TEMA:
 APLICACIÓN DE EXTRACTO DE PROPÓLEO COMO AGENTE CONSERVANTE EN CARNE DE RES MOLIDA QUE SE
 EXPENDEN EN EL MERCADO DE SAUCES IV DE LA CIUDAD DE GUAYAQUIL. TRABAJO DE TITULACIÓN
 PRESENTADO COMO REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL GRADO DE QUÍMICO Y FARMACÉUTICO. AUTORES:
 ANA MARÍA MACÍAS PICO ESAÚ FERNANDO YUNDA GUACHO TUTORA: Q.F. MARÍA AUXILIADORA ALARCÓN
 PERASSO, Mg. GUAYAQUIL - ECUADOR 2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutora del Trabajo de Titulación, Certifico: Que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de
 titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es: Aplicación de

extracto de propóleo como agente conservante en carnes de res molida que se expenden en el mercado de
 Sauces IV de la ciudad de Guayaquil presentado

por Ana Maria Macias Pico con cédula de ciudadanía N° 093087274-2 y Esau Fernando Yunda Guacho con
 cédula de ciudadanía N° 094018269-4, previo a la obtención del título de Químico y Farmacéutico.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Anti- plagio del programa URKUND.
 Lo Certifico - Guayaquil, Noviembre 2015 Q.F. Ma. Auxiliadora Alarcón Perasso, Mg. INFORME DE ANTI-PLAGIO
 DEL PROGRAMA URKUND Guayaquil, Noviembre 2015.

Por la presente certifico que el proyecto "

Por la presente certifico que el proyecto "Aplicación de extracto de propóleo
 como agente conservante en carnes de res molida que se expenden en el
 mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil", ha sido revisado en el
 programa Urkund y que demuestra el 6% de similitud.

Lo certifico.


 Q.F. Ma. Auxiliadora Alarcón Perasso, Mg.

CERTIFICADO DE REVISION DE LA REDACCION Y ORTOGRAFÍA

Yo, **KLEINER ELLINDORFF ARAGUNDI PÉREZ**, certifico: que he revisado la redacción y ortografía del contenido del Proyecto Educativo: “**APLICACIÓN DEL EXTRACTO DE PROPOLEO COMO AGENTE CONSERVANTE EN CARNE DE RES MOLIDA QUE SE EXPENDEN EN EL MERCADO DE SAUCES IV DE LA CIUDAD DE GUAYAQUIL**”, elaborado por los egresados: Ana María Macías Pico, con cédula de ciudadanía N° 0930872742 y Esaú Fernando Yunda Guacho, con cédula de ciudadanía N° 0940182694.

Para el efecto, he procedido a leer y analizar de manera profunda el estilo y la forma del contenido del texto:

- Se denota pulcritud en la escritura en todas sus partes.
- La acentuación es precisa.
- Se utilizan los signos de puntuación de manera acertada.
- En todos los ejes temáticos se evita los vicios de dicción.
- Hay concreción y exactitud en las ideas.
- No incurre en errores en la utilización de las letras.
- La aplicación de la Sinonimia es correcta.
- Se maneja con conocimiento y precisión la morfosintaxis.
- El lenguaje es pedagógico, académico, sencillo y directo, por lo tanto de fácil comprensión.

Por lo expuesto, y en uso de mis derechos como Dr. En Ciencias de la Educación, Especialización Literatura y Español, recomiendo la validez ortográfica del presente proyecto, previo a la obtención del Título de Químico Farmacéutico.

Atentamente,



Dr. Kleiner Aragundi Pérez

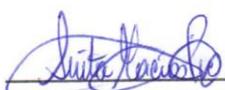
N° de Reg. 1030-02-11795

CARTA DE AUTORÍA DE TITULACIÓN

Guayaquil, Noviembre 2015.

Nosotros, Ana María Macías Pico y Esaú Fernando Yunda Guacho, autores de este trabajo declaramos ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este TRABAJO DE TITULACIÓN, nos corresponde a nosotros exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaramos también es de nuestra autoría, que todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además, ratificamos que este trabajo no ha sido presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad Nacional, ni Extranjera.



Ana María Macías Pico

C.I.: 093087274-2



Esaú Fernando Yunda Guacho

C.I.: 094018269-4

AGRADECIMIENTO

Como prioridad en mi vida, agradezco a DIOS, por haberme brindado una segunda oportunidad y poder demostrar a las personas que un día no confiaron en mí que todo es posible de la mano de Él.

Gracias a mi madre por haberme levantado el ánimo cuando caí, por apoyarme cuando no podía continuar en la carrera, por alentarme en los momentos difíciles, sin duda alguna fue un pilar fundamental en mi vida.

Un agradecimiento muy especial a mi tutora de trabajo de titulación Q.F. María Auxiliadora Alarcón, por su ayuda y dedicación, quien con sus conocimientos, paciencia y experiencia nos supo direccionar de manera correcta para cumplir con los objetivos de nuestra tesis, ayudando así a mi formación como investigador.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi amiga y futura colega, compañera de Tesis y aula desde el Pre-Universitario, Ana Macías, por haberme tenido la paciencia necesaria y brindarme su amistad.

A cada uno de mis docentes, que a lo largo de la carrera universitaria me impartieron sus conocimientos, y depositaron en mí todas sus enseñanzas para poder crecer profesionalmente.

Quiero agradecer a la facultad de Ciencias Químicas que me abrió las puertas para ser persona útil para sí mismo, para la sociedad y la familia; además quiero agradecer a mis buenos compañeros Amanda, Arianna, Ana, Lady, Jenny, Enrique y Luiggi, que hoy tengo el gusto de llamarlos amigos.

Esaú Yunda.

AGRADECIMIENTO

Principalmente a Dios, porque sin Él no hubiese sido posible nada.

A mis padres, Mariano y Rocío, y hermanas Gaby y Luisa por estar siempre pendientes de mí, brindándome su apoyo en todo momento de manera incondicional.

A mis tías, Martha y Carmen Pico, quienes siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí durante toda mi carrera de estudiante, dándome ánimos para continuar a la obtención de mi carrera como Química y Farmacéutica.

A mi madrina, Irma Ruiz, quien siempre ha estado ahí dándome sus sabios consejos y ánimos para poder culminar esta carrera.

A mi tutora de tesis, Q.F. Ma. Auxiliadora Alarcón, por su asesoría, apoyo y mucha paciencia, quien nos supo guiar en este trabajo de investigación.

A mi amigo y compañero de tesis, Esaú Yunda, por ser mi apoyo en momentos complejos al realizar este trabajo.

A la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas, el haberme permitido culminar mi carrera profesional con mucho éxito. También debo agradecer a mis amigos, en especial Majo, Jenny y Lady, quienes en su momento me brindaron su gran amistad incondicional dándome aliento y ánimo para continuar con mi meta deseada.

Ana Macías.

DEDICATORIA

El presente trabajo es una fidedigna evidencia que con perseverancia, sacrificio y deseos de superación, se alcanza a lograr los sueños y anhelos en esta vida.

Dedico esta tesis a DIOS, por brindarme salud y la fuerza necesaria para pasar cada obstáculo sin desmayar.

A mi madre, Jazmín Guacho, quien ha sido mi mayor motivación, quien formó mi carácter, mis valores y principios, que me brindó su apoyo incondicional para poder culminar mi carrera que hace 5 años parecía algo inconcebible y hoy se torna real.

A mi padre, Fernando Yunda, por el ejemplo y consejos que me dio, de quien siento gran admiración y respeto.

A mis hermanas, que tomen mi ejemplo y sigan superándose para que cumplan con todas sus metas, que recuerden que las oportunidades no ocurren, las creas tú.

Mis tías, Jenny Guacho y Janneth Guacho, quienes siempre me dieron ánimos y apoyo para poder seguir adelante y culminar con éxito mis estudios.

A mis abuelos, Ángela Cardona y Milton Guacho, por brindarme su amor, consejos y comprensión en todo momento, pese a no tenerlos viviendo cerca mío.

A mi enamorada, Liz León, fiel testigo de muchas de las necesidades que pase a lo largo de mi carrera universitaria, gracias por tu apoyo y amor incondicional.

A mis familiares y amigos, quienes con su valioso apoyo, han sido parte fundamental en todas las metas trazadas durante mi etapa estudiantil y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

Esaú Yunda.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, quien me guio espiritualmente para poder alcanzar y culminar esta meta que a veces parecía imposible.

A un ser muy especial que desde el cielo me ha guiado. Mi siempre querida y recordada tía Luchita.

A toda mi familia. A mis padres, quienes han sido guía y apoyo incondicional para poder alcanzar esta meta la de terminar la carrera, un tanto compleja, a veces.

A mi hermana Gaby, quien siempre ha estado apoyándome y dándome ánimo.

A mis queridos sobrinos, Gabriel, Nicolás y Benjamín, ser ejemplo de superación para ellos. Que sepan que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

Ana Macías.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Págs.
APROBACIÓN DEL TUTOR	i
CERTIFICADO DEL TRIBUNAL.....	ii
INFORME DE ANTI-PLAGIO DEL PROGRAMA URKUND	iii
CERTIFICADO DE REVISIÓN DE LA REDACCIÓN Y ORTOGRAFÍA.....	iv
CARTA DE AUTORÍA DE TITULACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xvii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xviii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xix
ABSTRACT	xx
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Formulación del problema	4
Justificación.....	5
Objetivos	6

Objetivo General	6
Objetivos Específicos.....	6
Hipótesis.....	6
Variables, conceptualización e indicadores	7
CAPÍTULO I	8
MARCO TEÓRICO	8
1.1. Antecedentes	8
1.2. Fundamentos teóricos	11
1.2.1. Propóleo.....	11
1.2.1.1. Definición	11
1.2.1.2. Generalidades del propóleo	12
1.2.1.3. Recolección del propóleo	12
1.2.1.4. Características organolépticas	13
1.2.1.5. Características fisicoquímicas	13
1.2.1.6. Propiedades del propóleo.....	15
1.2.1.7. Composición química del propóleo	15
1.2.1.8. Características microbiológicas.....	17
1.2.1.9. Usos del propóleo.....	18
1.2.1.10. Mecanismo de acción del propóleo.....	19
1.2.2. Carne.....	20
1.2.2.1. Definición de carne molida	20
1.2.2.2. Clasificación	20

1.2.2.3. Características	20
1.2.3. Contaminación de la carne	21
1.2.4. Técnica de muestreo para carne según NTE INEN 776	23
1.2.4.1. Disposiciones generales de muestreo	23
1.2.4.2. Procedimiento	24
1.2.4.3. Preparación de muestras para análisis	24
Anexo A Preparación de la Muestra	24
1.2.4.4. Preparación de la suspensión inicial o dilución primaria según la NTE INEN 1529-2.....	25
1.2.4.5. Transporte y almacenaje de las muestras	26
1.2.5. Escherichia coli	26
1.2.5.1. Clasificación científica	26
1.2.5.2. Características	26
1.2.5.3. Clasificación	28
1.2.5.4. Factores de transmisión	30
1.2.6. Contaminación de alimentos	30
1.2.7. Enfermedades transmitidas por alimentos	31
1.2.8. Medidas de control y prevención.....	32
1.2.9. Análisis sensorial	33
1.3. Glosario	34
CAPÍTULO II	36
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	36
2.1. Lugar de la investigación	36

2.2. Universo y muestra	36
2.3. Métodos científicos de la investigación	36
2.4. Diseño de la investigación	36
2.5. Metodología	37
2.6. Análisis Sensorial.....	44
CAPÍTULO III	45
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	45
Entrevista a los expendedores de carnes	55
CAPÍTULO IV	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1. Conclusiones.....	57
4.2. Recomendaciones	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	66
Anexo I: Solicitud de la cepa de E. coli ATCC 25922	67
Anexo II: Carta de entrega de la cepa de E. coli ATCC 25922	68
Anexo III: Estado higiénico de los puestos de venta de carne molida	69
Anexo IV: Elaboración del extracto alcohólico de propóleo.....	70
Anexo V: Siembra de la cepa de E. coli 25922	72
Anexo VI: Preparación de la dilución 0.6%	74
Anexo VII: Preparación de la dilución 0.8%	75
Anexo VIII: Preparación de la dilución 1.0%	76

Anexo IX: Imágenes de los materiales y equipos utilizados	77
Anexo X: Imágenes del procedimiento para los análisis de las muestras.....	78
Anexo XI: Imágenes de los resultados de los Petrifilm	81
Anexo XII: Hoja de Evaluación Sensorial	82
Anexo XIII: Degustación de las muestras	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Conceptualización e indicadores de las variables.....	7
Tabla II: Características organolépticas que permiten evaluar la calidad del propóleo	13
Tabla III: Características fisicoquímicas que permiten evaluar la calidad del propóleo	14
Tabla IV: Composición del propóleo	16
Tabla V: Características microbiológicas que permiten evaluar la calidad del propóleo	17

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I: Requisitos microbiológicos para la carne molida	21
Cuadro II: Concentración y temperatura usadas en las muestras a diferentes intervalos de tiempo	40
Cuadro III: Esquema de la metodología	41
Cuadro IV: Descripción de proceso del Extracto Alcohólico de Propóleo	42
Cuadro V: Descripción del análisis de la carne.....	43
Cuadro VI: Resultados microbiológicos.....	45
Cuadro VII: Resultados microbiológicos de las muestras A	46
Cuadro VIII: Resultados microbiológicos de las muestras B	47
Cuadro IX: Resultados microbiológicos de las muestras C	48
Cuadro X: Color de las carnes tratadas vs las no tratadas.....	49
Cuadro XI: Sabor de las carnes tratadas vs las no tratadas.....	50
Cuadro XII: Textura de las carnes tratadas vs las no tratadas	51
Cuadro XIII: Jugosidad de las carnes tratadas vs las no tratadas.....	53
Cuadro XIV: Aceptación general de las carnes tratadas vs las no tratadas ..	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico I: Resultados microbiológicos de las muestras A.....	46
Gráfico II: Resultados microbiológicos de las muestras B.....	47
Gráfico III: Resultados microbiológicos de las muestras C	48
Gráfico IV: Atributo color.....	49
Gráfico V: Atributo sabor	50
Gráfico VI: Atributo textura	52
Gráfico VII: Atributo jugosidad.....	53
Gráfico VIII: Atributo aceptación general	54

RESUMEN EJECUTIVO

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la acción del extracto de propóleo como agente conservante en carnes de res molida para lo cual se caracterizó las mismas con análisis microbiológicos. Para tal estudio se utilizaron 47 muestras de carne de res molida que fueron obtenidas del mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil las cuales fueron tratadas con extracto alcohólico de propóleo al 1% a diferentes intervalos de tiempo pero a la misma temperatura. La metodología microbiológica utilizada fue el conteo de *E. coli* por el método de Petrifilm, y para el control de calidad y efectividad del método se empleó las cepas control de *E. coli* ATCC 25922. Además se hizo uso de las técnicas de entrevista y encuesta, esta última para saber el grado de aceptación que tienen las carnes de res molida tratadas con el extracto alcohólico de propóleo basándose en la escala hedónica para lo cual se midieron ciertos atributos como: color, sabor, textura, jugosidad y aceptación general. En cuanto a los resultados microbiológicos, las muestras B tuvieron el porcentaje de reducción más alto 78% de UFC frente a las muestras C que tuvieron un 66% de UFC y las muestras A con un 56% de UFC. Siendo el día 14 el día que menos UFC presentaron las muestras con lo cual se llega a la conclusión que mientras más días está el propóleo en contacto con la carne, más va a inhibir el crecimientos de microorganismos. Respecto a los resultados de los análisis sensoriales, no hubo mayor discrepancia entre las dos muestras (carne tratada y carne no tratada). Se realizó esta investigación con la finalidad de tener un conocimiento más exacto del uso de propóleo en carnes de res molida como conservante y conocer su incidencia en la calidad sanitaria.

Palabras claves: carnes molida, escala hedónica, *Escherichia coli*, extracto de propóleo, Petrifilm, propóleo.

ABSTRACT

This research aimed to determine the action of propolis extract as a preservative in meat ground beef agent for which the same microbiological analysis was characterized. For this study 47 samples of ground beef that were obtained in Saucos IV Market in the city of Guayaquil which were treated with alcoholic extract of propolis 1% at different intervals of time but at the same temperature were used. The microbiological methodology used was E. coli count per Petrifilm method and quality control method and effectiveness of the control E. coli strain ATCC 25922 was used also made use of interview and survey methods, the latter to determine the degree of acceptance with ground beef meat treated with the alcoholic extract of propolis based on the hedonic scale for which certain attributes were measured: color, taste, texture, juiciness and overall acceptance. As for microbiological results, samples B had the highest percentage of 78% reduction of CFU compared to samples C were 66% UFC and samples A to 56% of CFU. Being the 14th day showed fewer signs with UFC which it concludes that the more days propolis is in contact with the meat, most will inhibit the growth of microorganisms. Regarding the results of sensory analysis, there were no major discrepancies between the two samples (treated and untreated meat). This research was conducted in order to have a more exact knowledge of the use of propolis in ground beef as a preservative and know their impact on health quality.

Keywords: ground meats, hedonic scale, *Escherichia coli*, propolis extract, Petrifilm propolis.

INTRODUCCIÓN

Todos los alimentos están expuestos a la contaminación microbiana presente normalmente en el ambiente y debido al carácter orgánico están sujetos a la degradación si las condiciones de almacenamiento se prestan para esto. Según la cantidad de agua, forma de almacenamiento y procesamiento son más susceptibles a la acción de los microorganismos.

El propóleo es un producto resinoso producido por las abejas, de consistencia viscosa, color verde pardo, sabor amargo y olor agradable. Tiene diversas propiedades siendo las más importantes su actividad antimicrobiana y antioxidante, propiedades atribuidas por los compuestos que contiene como los flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres y cetonas.

Existen diferentes métodos para la conservación de alimentos como el empleo de sal, nitritos y nitratos e incluso tratamientos térmicos. Los países desarrollados han optado por implementar el uso de conservantes naturales como extractos de plantas, aceites esenciales y el propóleo.

En Ecuador existen pocos estudios acerca del uso del propóleo como antimicrobiano en alimentos, sólo es conocido su uso en medicina, por tal motivo se empleó extracto alcohólico de propóleo en carnes de res molida como un producto innovador.

La finalidad que tuvo este proyecto radicó en ofrecer un producto cárnico de buena calidad mediante el uso de un extracto alcohólico de propóleo con una concentración idónea como una alternativa natural, ayudando con esto a inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos sin que se vea afectada las características organolépticas de la carne molida, aumentando el periodo de vida útil de las mismas y que tenga gran aceptación en los consumidores.

La metodología microbiológica utilizada fue el conteo de Coliformes totales por el método de Petrifilm y para el Control de Calidad y efectividad del método se empleó las cepas control de *E. coli* ATCC 25922.

Para saber el grado de aceptación por parte de los consumidores, se empleó encuestas basadas en la escala hedónica.

PROBLEMA

Planteamiento del problema

La carne de res, es todo tejido animal compuesto principalmente de tejido muscular, conectivo y adiposo que sea apto para el consumo humano (Arroyo Llantín, 2008); en especial la molida, la cual es un producto de tejido animal que ha sido dividido finamente por procedimientos mecánicos formando partes más pequeñas y sin aditivo alguno (NTE INEN 1 346, 2010), motivo por el cual tiende con mucha facilidad a adquirir microorganismos ya sean patógenos o inoos, debido a la cantidad de procesos a la que es sometida como es al momento de sacrificar al animal, la cantidad de microorganismos, presentes en el medio ambiente en el que habita el animal, los utensilios que se utilizan para manipular la carne y su procesado para la venta al público (López Hernández & Ferreyro Davis, 2014). Los productos cárnicos de origen vacuno, pueden ser susceptibles de contaminación en cualquiera de las etapas de proceso, ya que estos son un reservorio natural de microbiota intestinal y patógenos para el ser humano.

Entre los microorganismos que es posible encontrar en la carne de res molida, destacan la: *Escherichia coli*, *Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* (López Hernández & Ferreyro Davis, 2014).

A pesar de que la mayoría de los microorganismos se encuentran en la carne por su alto contenido de agua y nutrientes, existen también otros factores que favorecen la proliferación bacteriana como la mala manipulación o una cocción incorrecta, aumentando el crecimiento de microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales. (López Hernández & Ferreyro Davis, 2014)

El crecimiento microbiano y la decoloración, se debe en parte a la oxidación, siendo las principales causas del deterioro de la calidad de la carne fresca, y que el color rojo de la carne es uno de los factores más decisivos para el consumidor al momento de su adquisición. Por lo cual, para la industria representa un reto prolongar el mayor tiempo posible la calidad de la carne fresca a través del uso de nuevas tecnologías. (Centro de investigación en alimentación y desarrollo (CIAD), 2013)

La contaminación con bacterias patógenas a través de la carne molida es de gran preocupación. Bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 puede colonizar el intestino del animal y ser transmitida a la carne durante el procesamiento del animal (Arroyo Llantín, 2008). La calidad microbiológica de los alimentos ha sido la gran preocupación de la industria alimentaria, porque la acción de los microorganismos sobre los alimentos causa deterioro y afecta la salud de los consumidores. (Gutiérrez Cortés & Suarez Mahecha, 2012)

Cada vez los países promueven el uso de sustancias naturales como nueva alternativa para las industrias, obteniendo beneficios mutuos tanto para el alimento como para el consumidor. El problema es que en el Ecuador existen pocos estudios de la aplicación del propóleo en productos cárnicos, siendo este el enfoque principal de esta investigación, determinando así la efectividad del propóleo como conservante y antioxidante, beneficiando a la calidad microbiológica del producto, su inocuidad y por lo tanto la seguridad en la salud de los ecuatorianos.

Formulación del problema

¿La adición de extracto alcohólico de propóleo puede mejorar la calidad sanitaria de la carne molida de res, sin que se vea afectada las características organolépticas de las mismas?

Justificación

La carne es uno de los alimentos más perecederos que existen por el alto contenido de agua y nutrientes que favorece el crecimiento de microorganismos. La carne molida tiende a presentar mayor contaminación que la carne fresca debido al proceso de molido donde los microorganismos que estaban en la superficie contaminan el interior.

El motivo de este estudio se presenta ante la escasa calidad sanitaria de la carne de res molida que se expende en un mercado del norte de la ciudad de Guayaquil, lo que representa un riesgo para la salud de los consumidores. *Ver Anexo III.*

Los productos cárnicos como es la carne de res molida tiene un periodo de vida corto, esto se debe al deterioro que se produce por diversos cambios, principalmente en respuesta al crecimiento y metabolismo de microorganismos, la exposición, la cantidad y tipo de luz que recibe la carne, la oxidación de lípidos y pigmentos. (López Hernández, Braña Varela, & Hernández Hernández, 2013)

El enfoque de este proyecto se centró en la bioconservación como alternativa natural para productos cárnicos utilizando un extracto alcohólico de propóleo (*propolis*) y disminuyendo así el crecimiento de microorganismos y por ende alargar la vida útil, contribuyendo así la calidad del producto, inocuidad y seguridad para el consumidor y por ende al buen vivir de los ecuatorianos.

Objetivos

Objetivo General

- ❖ Determinar la acción del extracto de propóleo como agente conservante en carnes molidas de res.

Objetivos Específicos

- ❖ Desarrollar una concentración de extracto alcohólico de propóleo que actúe como conservante ideal en carnes molidas de res.
- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana del conservante como una alternativa natural para combatir los indicadores de contaminación fecal.
- ❖ Caracterizar la aceptación y preferencia sensorial de la carne molida de res con extracto de propóleo y sin él.

Hipótesis

El extracto alcohólico de propóleo va a actuar como agente conservante natural en carnes molidas.

Variables, conceptualización e indicadores

Tabla I: *Conceptualización e indicadores de las variables.*

VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADORES	
	Análisis sensorial	Es el análisis de alimentos y otros materiales por medio de los sentidos.	Color, sabor, textura, jugosidad, aceptación general.
Dependiente	Calidad sanitaria	Son las características que debe cumplir un producto alimentario para asegurar que su consumo no implica un riesgo de salud para el consumidor.	E. coli
	Extracto alcohólico de propóleo	Se obtiene de macerar por algunos días el propóleo en alcohol.	
Independiente	Porcentaje añadido	Cantidad que, de manera proporcional, refiere a una parte del total o al grado de rendimiento útil que 100 unidades de una determinada cosa tienen en condiciones normales.	0.6% 0.8% 1.0%
	Tiempo	El Tiempo es una magnitud física fundamental, el cual puede ser medido utilizando un proceso periódico, entendiéndose como un proceso que se repite de una manera idéntica e indefinidamente.	0, 3, 7, y 14 días.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO.

1.1. Antecedentes

El propóleo es un producto apícola resinoso y complejo, con una variable apariencia física, recogido y transformado por las abejas *Apis mellifera* (Peña C., 2008).

Un estudio realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico en la Universidad de Carabobo - Venezuela, se demostró que la actividad bacteriostática y bactericida ejercida por la tintura de propóleo sobre las bacterias enteropatógenas evaluadas son similares entre sí, debido a que *S. sonnei*, *S. paratyphi B*, *S. typhi* y *E. coli* (O 157:H7) obtuvieron los mismos resultados. En este estudio también se evidenció que *E. coli* O157:H7, a pesar de ser más patógena que *Shigella flexneri*, muestra ser más sensible in vitro a la tintura de propóleo. Esto representa un dato importante, ya que *E. coli* O157:H7 no posee tratamiento farmacológico eficaz, sin efectos adversos. (Alvarado, Arias, Blumenthal, Gil, & Perelli, 2012)

El estudio "Acción in vitro del propóleo frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*" tuvo como objetivo comprobar el efecto antibacteriano del propóleo in vitro de la región del Cusco, según el método de Kirby Bauer modificado y mediante curvas de crecimiento bacteriano, concluyendo que la cantidad mínima de propóleo con acción antibacteriana es de 32 mg/ml o 3.2% para *Staphylococcus aureus* ATCC y para *Escherichia coli* ATCC de 128 mg/ml o 12.8%. (Puente Calderon, 2010)

En un estudio realizado en la Universidad Nacional de Colombia fue posible demostrar actividad antibacteriana en un 75% de las muestras estudiadas con

propóleo frente a *E. coli*, obteniendo halos de inhibición entre 10,5 y 18,5 mm (Alves Ferreira, Figueroa, Guzmán, Oliveira, & Tello, 2011).

(Gutiérrez Cortés & Suarez Mahecha, 2012) afirma:

En el laboratorio de carnes de la Universidad Nacional de Colombia (UN) inició la etapa de elaboración de chorizos tratados con sales de nitrógeno, propóleo y control (sin ningún tipo de tratamiento), para empezar un estudio comparativo que los aproximara a su objetivo. Inicialmente hicieron pruebas in vitro para ver qué concentraciones de propóleo podían ayudar a inhibir el crecimiento de microorganismos dentro de los chorizos. Se los enfrentó a los que normalmente son patógenos en las carnes y se observó que sí había inhibición por parte del propóleo.

El extracto etanólico de propóleo (EEP) fue utilizado en una prueba de difusión para determinar su capacidad inhibitoria frente a *Salmonella sp*, *Clostridium sp*, *E. coli*, y *Staphylococcus aureus* in vitro. Se observó inhibición para todos los microorganismos con las concentraciones de EEP utilizadas. Se elaboró chorizos con conservantes diferentes: a) EEP 8 mg/ml; b) 0,2 g/Kg de nitrito de sodio; c) alcohol etanólico 96% (control). EEP y el nitrito mostraron efecto similar sobre bacterias mesófilas, psicrófilas, coliformes totales y fecales ($p > 0,05$), se observó actividad bacteriostática. El propóleo podría reemplazar a los nitritos, ya que el comportamiento de los tratamientos fue muy similar. (Gutiérrez Cortés & Suarez Mahecha, 2012).

Se ha podido constatar la efectividad del propóleo como antioxidante y antimicrobiano en productos cárnicos procesados. En su estudio (Fatma H. Ali, Gehan, M. Kassem & Osama A. Atta-Alla, 2010) utilizaron extracto de propóleo en etanol en un producto cárnico procesado confirmando que puede ser utilizado como antioxidante y antimicrobiano natural en reemplazo de productos químicos normalmente utilizados en la industria como preservantes (Ayala Fernández & Macay Hernández, 2010).

Respecto a estudios realizados para probar la actividad antimicrobiana en alimentos, In-Suk et al (2002) evaluaron el efecto de extractos etanólicos de propóleo (EEP) en salchichas de cerdo, sobre la cuenta total de mesófilos y Coliformes. Las salchichas fueron almacenadas a 20°C durante siete días, encontrándose una reducción muy importante de la carga bacteriana a partir del tercer día de almacenamiento. (Sánchez-Escalante, Torrescano-Urrutia, & Vargas-Sánchez, 2013)

El efecto del propóleo sobre una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos, virus y levaduras) ha sido ampliamente comprobado y se ha demostrado que el efecto es dependiente de la composición química. Además de las propiedades antimicrobianas del propóleo, su actividad antioxidante también depende de la composición, pudiendo éstas propiedades ser aprovechadas para alargar la vida de anaquel de algunos productos alimenticios, ya que los principales factores que afectan la vida útil de un alimento son las reacciones de oxidación de lípidos y la contaminación por bacterias y hongos patógenos. (Sánchez-Escalante, et al., 2013)

Además de esto el propóleo también ha sido utilizado en el área veterinaria, a principio de los años 80, el Dr. José A. Fraga introduce a Cuba la experiencia Europea, elaborando el primer producto cubano de propóleo "Propolina", era una solución alcohólica que a pesar de haber sido creada para uso veterinario, comenzó a ser estudiada por numerosos facultativos en su aplicación humana, que luego en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana se llevó a cabo la verificación de las propiedades antimicrobianas. (Castellanos Figueredo, Tan Guevara, Tan Castellanos, & Carlisle Green, 2011)

1.2. Fundamentos teóricos

1.2.1. Propóleo

Esta sustancia elaborada por las abejas, es conocida por el hombre desde tiempos remotos (Jimeno Benito & Pérez Arquillúe, 1997). El propóleo es conocido desde la antigüedad y ha sido utilizado por las diferentes culturas egipcias, griega, romana, maya e inca (Sánchez-Escalante, et al., 2013).

Galeno en el Siglo II, menciona el propóleo en sus trabajos y el famoso médico y filósofo persa Avicena, en el siglo XI, dice del mismo: «Tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas, vivifica, limpia fácilmente y ablanda fuertemente. Los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y en el continente europeo se utilizó por los franceses en los siglos XVIII y XIX para el tratamiento de llagas. Su máximo empleo se dio durante la guerra de los Boers, en África del Sur, alrededor de 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante. (Jimeno Benito & Pérez Arquillúe, 1997)

Este producto resinoso es producido por abejas a partir de diversas partes de plantas como brotes, botones florales, corteza y exudados resinosos. Estos constituyentes son biotransformados por la adición de cera y por acción de la enzima 1,3-glicosidasa, producida en las glándulas salivares de abejas. (Alves Ferreira et al., 2011)

1.2.1.1. Definición

El término propóleo proviene del griego “pro” que significa para o en la defensa, y “polis” que significa la ciudad; dando como resultado la palabra Propolis que significa para la defensa de la colmena (Puente Calderon, 2010).

1.2.1.2. Generalidades del propóleo

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica, de consistencia viscosa, de color verde pardo, sabor amargo, olor agradable y dulce (Carrillo M., y otros, 2008), que las abejas obtienen de las yemas de los árboles y de algunos vegetales, a través de sus mandíbulas, para luego terminar de procesarla al interior de la colmena con sus secreciones como ceras y secreciones salivares, convirtiéndola en un potente antibiótico con el fin de combatir las bacterias, virus y hongos (Luna Limaico, 2011). Su color es variable, de amarillo claro a marrón oscuro, pasando por una gran cantidad de tonos castaño (Sánchez-Escalante, et al., 2013).

1.2.1.3. Recolección del propóleo

Todo depende de la cantidad de própolis que produce una colmena y también de la raza de abeja, así como de su ubicación. Se ha observado que las colmenas situadas en bosques o al lado de ríos donde hay árboles contienen más própolis que las situadas en zonas llanas. La cantidad media que se puede producir por colmena y año oscila entre los 150 y los 300 gramos. Las abejas propolizan durante todo el año, pero a final de verano y otoño son las de mayor cuantía. El apicultor deberá recolectar el própolis pasado el invierno. La recogida se efectúa mediante una espátula, desprendiendo el própolis de aquellas zonas donde se encuentra adherido. (Sisa, 2010)

Otra forma de recogida consiste en colocar sobre los cuadros de la colmena una parrilla de plástico o una lámina metálica perforada, que rápidamente será propolizada por las abejas, siendo el própolis obtenido fácilmente raspado. Para facilitar su recogida se introduce la parrilla en el congelador hasta que quede rígido y así se desprenderá mucho mejor. El própolis recogido se introduce en agua hirviendo de manera que separe la cera y las astillas y abejas muertas. El própolis obtenido tendrá una consistencia parecida al chicle y con un buen aroma. No deberá tener más de dos años de envejecimiento. El própolis debe conservarse en recipientes de vidrio al abrigo

de la luz y el aire. No deben utilizarse bolsas de plástico para su conservación. (Sisa, 2010)

1.2.1.4. Características organolépticas

Tabla II: Características organolépticas que permiten evaluar la calidad del propóleo.

PARÁMETRO	CALIDAD BUENA	CALIDAD MEDIA	CALIDAD INFERIOR
PRESENTACIÓN	Escamas y gránulos	Bloques o pelotas	Polvo
ASPECTO	Al corte, difieren color externo e interno	Leve diferencia de color al Corte	Sin diferencia de color al corte
COLOR	Verdoso, amarillo, naranja o con tintes del mismo color	Marrón	Oscuro
OLOR	Resinoso aromático	Resinoso	Inodoro
SABOR	Picante o resinoso	Resinoso leve	Insípido

Fuente: (Farré R., Frasquet I., & Sánchez A., 2004).

1.2.1.5. Características fisicoquímicas

El propóleo varía con la temperatura; por debajo de los 4°C es duro y quebradizo, hacia los 15°C es duro y friable, alrededor de los 30°C se va convirtiendo en una masa blanda y maleable y a medida que se va elevando la temperatura se hace pegajosa, viscosa y se derrite alrededor de los 60-70°C, aunque el punto de fusión puede alcanzar los 100°C o más. (Telmo Martínez, 2010)

Tiene baja solubilidad en agua, se lo puede disolver con alcohol etílico ya que es más recomendado porque permite extraer con más eficiencia los principios activos y bajas concentraciones de cera (Aguirre Tobar, 2015).

Tabla III: *Características fisicoquímicas que permiten evaluar la calidad del propóleo.*

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL PROPÓLEO	
Extracto seco	Mínimo 10%
Índice de oxidación	Máximo 22 segundos
Compuestos fenólicos (mg AG/ml)	Mínimo 0.25 – 5%
Flavonoides	Mínimo 0.25 – 0.5%
Espectrograma UV-VIS	Máximo de absorción entre 270 y 315 nm
Metales pesados: plomo y arsénico	Máximo 2 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente
Residuos de plaguicidas y antibióticos	Ausente
Humedad	Máximo 8%
Cenizas	Máximo 5%
Cera	Máximo 30%
Impurezas mecánicas	25-30%
Índice de yodo	Mínimo 35%
Solubilidad en etanol	30 – 35%

Fuente: (Sánchez-Escalante, et al., 2013).

1.2.1.6. Propiedades del propóleo

El propóleo posee una gran variedad de propiedades que van a depender de su origen botánico, composición química, estación climática, método de extracción, edad y zona geográfica de recolección (Sánchez Escalante, et al., 2013).

Una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antibacteriana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, éster bencil del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeíco (Sisa, 2010).

En otros ensayos se ha estudiado el efecto inhibitorio del propóleo frente a algunos virus de las plantas. La mayor sensibilidad se ha encontrado con relación al virus de la necrosis del tabaco, y la más reducida frente al virus del mosaico del pepino. El propóleo no sólo disminuye el número de lesiones en las hojas infectadas por el virus, sino que también inhibe la reproducción del virus en toda la planta. (Sisa, 2010)

1.2.1.7. Composición química del propóleo

La composición exacta del propóleo puro varía de acuerdo con la región, planta proveedora de resina y especie de abeja recolectora, reflejando la diversidad de actividades biológicas que este producto presenta. La composición química básica es una mezcla de ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen, destacándose la presencia de compuestos bioactivos tales como ácido cinámico, compuestos fenólicos y flavonoides, terpenos, ácidos aromáticos, derivados del ácido cafeico, ácidos grasos y aminoácidos. (Alves Ferreira, et al., 2011)

Manrique (2000) manifiesta que el propóleo es una sustancia soluble en solventes orgánicos como: alcohol, benceno, acetona y éter, su composición es

muy compleja, ya han sido identificados más de 150 constituyentes. La actividad antimicrobiana está relacionada con la presencia de compuestos flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres.

Tabla IV: *Composición del propóleo.*

COMPOSICIÓN DEL PROPÓLEO	
Flavonoides	Antimicrobiano
	Antiinflamatorio
	Antioxidante
	Disminuye permeabilidad
	Acción estabilizadora del colágeno
	Acción antihemorrágica
Crisina	Proporciona color a la cera
	Efecto citotóxico sobre células cancerosas
	Efectiva contra <i>Helicobacter pylori</i>
Apigenina	Acción cicatrizante sobre úlceras del estómago
	Acción antihistamínica
	Acción antivírica
	Acción protectora de la pared de los capilares
	Acción anticancerosa
Kaempferides	Acción espamolítica
	Acción antimicótica
Galangina	Acción bacteriostática
	Acción antimicrobiana
	Acción antimicótica
Pinocembrina	Acción bacteriostática
	Acción antimicrobiana y antimicótica
	Acción anestésica local

Pinobanksina	Acción antimicrobiana
	Acción antimicótica
Pinobanksina-3-acetato	Acción antimicrobiana
	Acción antimicótica
Pinostrobina	Acción anestésico local
3',4'-dihidroxi flavonoides	Tonifica las paredes de los capilares sanguíneos
Flavan-3-oles	Tonifica las paredes de los capilares sanguíneos
Pectolinarigenina	Acción espamolítica
Luteolina	Acción antivírica
	Acción cicatrizante
Artepillina C	Acción anticancerosa
	Acción antileucémica
Ácido ferúlico	Acción antibacteriana
	Efecto colagénico
Derivados del ácido cinámico	Activan los procesos de cicatrización y regeneración epitelial
Ácido cafeico	Acción antivírica
	Acción antibacteriana
	Acción antiinflamatoria

Fuente: (Stangaciu, 1998).

1.2.1.8. Características microbiológicas

Tabla V: Características microbiológicas que permiten evaluar la calidad del propóleo.

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL PROPÓLEO	
Bacterias mesófilas (UFC/g)	<10.000
Coliformes fecales (UFC/g)	<100

<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	100
Hongos (UFC/g)	1-1000

Fuente: (Sánchez Escalante, et al., 2013).

1.2.1.9. Usos del propóleo

El propóleo tiene múltiples usos para su aplicación en variadas industrias:

- Farmacéutica (tanto en medicina humana como en medicina veterinaria)
- Agrícola
- Alimentaria (Sisa, 2010).

En medicina humana se han encontrado resultados positivos al usar propóleo en el tratamiento de procesos tales como catarrros de las vías respiratorias altas, gripe, sinusitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica, tuberculosis pulmonar (Sisa, 2010).

En odontología se utiliza para el tratamiento de abscesos bucales. En el área dermatológica es donde más aplicación encuentra, principalmente para procesos tales como abscesos, forúnculos, supuraciones diversas, sabañones, grietas, verrugas, callosidades, eczemas y psoriasis, entre otros (Sisa, 2010).

En medicina veterinaria se ha demostrado su acción positiva en el tratamiento de fiebre aftosa, necrosis bacilar, bronconeumonía, dispepsia tóxica, paratífus, mamitis estafilocócica, etc. El propóleo también se utiliza como anestésico local, siendo muy estimado por su acción cicatrizante y antihemorrágica. (Sisa, 2010)

Actualmente la industria agroalimentaria enfrenta continuamente problemas derivados de la falta de estabilidad de los alimentos, siendo la principal causa la oxidación de los mismos; así el uso de antioxidantes naturales puede resultar una alternativa, tal es el caso del propóleo, ya que debido a su composición química es una fuente natural de antioxidante. (Sánchez Escalante, et al., 2013)

El propóleo ha sido propuesto como preservante en diferentes productos alimenticios gracias a sus características convenientes para la tecnología de alimentos, por ejemplo en productos cárnicos y como germicida e insecticida en empaques de alimentos; y también como preservativos en productos cárnicos y se ha observado que son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli*. (Gutiérrez Cortés & Suarez Mahecha, 2012)

En los últimos años la atención se ha centrado en el uso del propóleo como un suplemento alimenticio adecuado para los consumidores en los países desarrollados y como una alternativa al uso de productos químicos para el control de hongos, los que ocasionan diversos problemas ecológicos. (Sánchez Escalante, et al., 2013)

1.2.1.10. Mecanismo de acción del propóleo

La actividad antimicrobiana del propóleo está íntimamente relacionada a los compuestos químicos que lo constituyen, siendo atribuida a la presencia de compuestos flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, así como aldehídos fenólicos y cetonas, a través de inhibición de la enzima RNA polimerasa o actividad sobre la estructura química de la pared celular. (Alves Ferreira, et al., 2011)

1.2.2. Carne

Se denomina carne a la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conectivo, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano (SENASICA, 2011).

1.2.2.1. Definición de carne molida

(NTE INEN 1 346, 2010) afirma “es la carne apta para el consumo humano, dividida finamente por procedimientos mecánicos y sin aditivo alguno”.

1.2.2.2. Clasificación

De acuerdo con el contenido de grasa la carne molida se clasifica en tres tipos.

- Tipo I
- Tipo II
- Tipo III (NTE INEN 1 346, 2010).

1.2.2.3. Características

La carne molida es un producto cárnico proveniente principalmente de tejido muscular que incluye, además, tejidos blandos (adiposo, epitelial, nervioso) picado finamente por una máquina trituradora de carne. Generalmente, la carne molida procede del pecho, pecho centro, pecho punta y falda del ganado vacuno. Al ser la mayoría proveniente de tejido muscular provee proteínas y lípidos necesarios en la dieta humana. (Arroyo Llantín, 2008)

La carne molida contiene especies de bacterias no patogénicas esto incluye hasta un 10^6 de aeróbicos totales, 10^2 de Coliformes por gramo y 10^2 de *E. coli* por gramo de muestra (Arroyo Llantín, 2008). La carne molida, debe conservarse

a nivel de expendio en refrigeración a 0°- 4° C o en congelación a -18° C (NTE INEN 1 346, 2010).

Cuadro I: Requisitos microbiológicos para la carne molida.

	n	C	m	M	Método de ensayo
Aerobios mesófilos ufc/g	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	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>Staphylococcus 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

Fuente: (NTE INEN 1 346, 2010).

1.2.3. Contaminación de la carne

Los microorganismos que alteran la carne, llegan a ella por infección del animal vivo -contaminación endógena- o por invasión posmortem -contaminación exógena-. Aunque ambas son de gran importancia, la alteración de la carne a consecuencia de la contaminación exógena es la más frecuente, así, el hombre puede sufrir graves infecciones o intoxicaciones por el consumo de carne procedente de animales sanos. (Restrepo Molina, Arango Mejía, & Restrepo Digiammarco, 2001)

La contaminación con bacterias patogénicas a través de la carne molida es de gran preocupación. Bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 puede colonizar el intestino del animal y ser transmitida a la carne durante el procesamiento del animal (Arroyo Llantín, 2008).

De acuerdo al Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos *Escherichia coli* O157:H7 puede ser encontrada en carne molida de res. Esto se

debe a que la bacteria puede colonizar el intestino de los rumiantes y pasar al tejido muscular durante la matanza. *Escherichia coli* O157:H7 ha sido identificada como una cepa más resistente que la bacteria no patogénica *E. coli* porque puede llegar a producir una enterotoxina dañina. *Escherichia coli* O157:H7 es reconocida mundialmente como causante del síndrome urético hemolítico que puede llegar a causar fallo renal y muerte. Generalmente las enfermedades transmitidas a través de alimentos con *Escherichia coli* O157:H7 se deben al consumo de alimentos no cocidos adecuadamente, haciendo la reducción de esta bacteria una prioridad para la industria de la carne. (Arroyo Llantín, 2008)

Sensorial y nutricionalmente, la grasa juega un papel relevante en la calidad de los productos cárnicos. Es un componente muy dinámico, que puede variar en su composición en función de la especie animal y del alimento que reciba; además, se puede alterar mediante reacciones de oxidación, lo que repercute en las propiedades nutricionales y sensoriales. (López Hernández, et al., 2013)

La oxidación de los compuestos lipídicos de un alimento, es una de las reacciones que modifica en forma más importante la calidad de la carne, ya que aun teniendo cuidado de no contaminar el alimento con microorganismos, este fenómeno ocurre por reacciones químicas en muchos de los casos de forma espontánea. El proceso de oxidación, es lo que da la característica de rancidez, la cual puede ser positiva o negativa, puesto que, ayuda a hacer más fuertes los sabores y olores, mejorando o empeorando un alimento. (López Hernández, et al., 2013)

La rancidez es iniciada por radicales libre del oxígeno o por el ataque del oxígeno molecular a radicales libres pre-formados en los ácidos grasos poliinsaturados que constituyen a las grasas y aceites. Estas reacciones de oxidación dependerán de factores intrínsecos y extrínsecos a la carne. (López Hernández, et al., 2013)

Los factores intrínsecos incluyen principalmente los sistemas de alimentación a los que fueron sometidos los animales en vida, lo cual tiene un efecto en el tipo de grasa (perfil lipídico y grado de rancidez), así como la presencia y concentración de antioxidantes como son principalmente el nivel de vitamina E, C, de carotenoides; así como de minerales antioxidantes como el selenio o pro oxidantes como el cobre y el hierro. (López Hernández, et al., 2013)

Los factores extrínsecos se asocian con los sistemas de protección en la carne (sistemas de empaque y antioxidantes exógenos o añadidos), presencia de fuentes y tipo de luz, así como el manejo de temperaturas de conservación (López Hernández, et al., 2013).

1.2.4. Técnica de muestreo para carne según NTE INEN 776

(NTE INEN 776, 1985) afirma:

Muestra: Es un grupo de unidades extraídas de un lote que sirve para obtener la información necesaria que permite apreciar una o más características de ese lote, lo cual servirá de base para tomar una decisión sobre dicho lote o sobre el proceso que lo produjo.

1.2.4.1. Disposiciones generales de muestreo

- a) *Muestras para análisis bacteriológico:* El equipo y recipiente de muestreo deberán ser limpios y estériles (NTE INEN 776, 1985).
- b) Los recipientes para tomar la muestra deben ser de material inerte al agua y las grasas; y susceptible de esterilizarse, de una capacidad de acuerdo al tamaño de la muestra a tomarse. (NTE INEN 776, 1985).

1.2.4.2. Procedimiento

(NTE INEN 776, 1985) afirma:

En locales de expendio, cualquiera que fuese su presentación comercial (fresca, oreada, refrigerada, congelada), y una vez realizada la inspección por la autoridad competente, el muestreo se realizará al azar y/o preferentemente de las zonas sospechosas, y su cantidad no excederá de 500 g.

1.2.4.3. Preparación de muestras para análisis

La preparación de muestras para análisis de los diferentes métodos de ensayo se realizará de acuerdo al Anexo A (NTE INEN 776, 1985).

Anexo A Preparación de la Muestra

A.1 Homogeneizar la muestra, mezclándola perfectamente, luego de haberla molido por lo menos dos veces (NTE INEN 776, 1985).

A.2 Si se trata de carne fresca, carne secada, carne curada, carne ahumada, etc., se tomarán porciones de diferentes zonas de la muestra en cantidad adecuada, separándolas de algún hueso presente si es necesario; y pasar tres veces a través de la máquina picadora (o batidora eléctrica), mezclándolas después de cada operación para homogeneizarlas bien. Transferir a un recipiente, el cual debe quedar completamente lleno y cerrado herméticamente. Almacenar en condiciones que se preserve de cualquier deterioro o cambio en su composición, debiendo analizables antes de las 24 horas posteriores a su preparación (NTE INEN 776, 1985).

1.2.4.4. *Preparación de la suspensión inicial o dilución primaria según la NTE INEN 1529-2*

- a) Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher") 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm³ de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10⁻¹) (NTE INEN 1529-2, 1999).

- b) Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto (NTE INEN 1529-2, 1999).

- c) Hacer funcionar el "stomacher" 1 o 2 minutos, según la naturaleza del producto (NTE INEN 1529-2, 1999).

- d) Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa (NTE INEN 1529-2, 1999).

- e) Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm³ o 0,1 g de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones (NTE INEN 1529-2, 1999).

1.2.4.5. Transporte y almacenaje de las muestras

- a) El transporte de las muestras debe realizarse tan rápido como sea posible después del muestreo, a la temperatura a la que necesariamente el producto debe almacenarse. Sin embargo, en el caso de productos que son refrigerados, transportar las muestras entre 0 a 2°C, hasta cuando lleguen al laboratorio, y conservarlas así dentro de las 24 horas de tomadas, o, de lo contrario, las muestras deben ser congeladas a -15°C, salvo aquellas que deben ser sujetas a análisis físico o sensorial (NTE INEN 776, 1985).

- b) Evitar la exposición de la muestra a la luz directa durante el transporte (NTE INEN 776, 1985).

1.2.5. *Escherichia coli*

1.2.5.1. Clasificación científica:

Reino: Bacteria

Filo: Proteo bacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *E. coli* (Méndez Flores, 2012).

1.2.5.2. Características:

Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos periféricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto

del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Los serotipos se asocian con virulencia. Una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F). Se diferencia de las otras *Escherichia coli* en que no fermenta el sorbitol, no crece a 44 °C y no produce β -glucuronidasa. (Méndez Flores, 2012)

El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo. El género *Escherichia* incluye siete especies: *E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli* (Molina López & Eslava Campos, 2015).

Es una bacteria común que vive en los intestinos de animales y humanos. Existen muchas cepas de *E. coli*, inofensivas en su mayoría, aunque existe una variedad, *E. coli* 0157:H7 que produce una potente toxina (Shiga) y puede ocasionar enfermedades graves como el Síndrome Urémico Hemolítico, que puede acabar en fallo renal. La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los marcadores específicos que se encuentran en su superficie y la distingue de otros tipos de *E. coli*. (Méndez Flores, 2012)

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente asociado a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica (CH) ocurridos en Oregon y Michigan, EE.UU., atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas. (Leotta G.A., Chinen I., Epszteyn S., Miliwebsky E., Melamed I.C., Motter M., Ferrer M., Marey E., Rivas M., 2005)

Escherichia coli 0157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de STEC que poseen los mismos marcadores de virulencia. Entre ellos, existen 5 serotipos (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM)

que fueron reconocidos por la Organización Mundial de la Salud por su potencial patogénico. (Leotta G.A., et al., 2005)

1.2.5.3. Clasificación

En la actualidad, se distinguen seis serotipos de *E. coli* que pueden producir gastroenteritis.

a) *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*: ETEC se caracteriza por incluir cepas que elaboran enterotoxinas ya sea termoestable (ST) y/o termolábil (LT). Las cepas ETEC son una causa importante de diarrea en niños menores de cinco años de edad y una de las causas más frecuentes de diarrea del viajero. (Molina López & Eslava Campos, 2015)

b) *Escherichia coli enteropatógena (EPEC)*: Se considera una de las principales etiologías de diarrea infantil en países en desarrollo. Presentan la capacidad de adherirse a células HEp-2 (línea celular de carcinoma faríngeo humana) formando microcolonias. Una vez formadas las microcolonias comienza una segunda fase de adherencia, con la destrucción de las microvellosidades intestinales, proceso al que se ha denominado como esfacelamiento. La falta de microvellosidades permite a las bacterias adherirse en forma íntima a receptores de la membrana presentes en la célula epitelial. EPEC se caracteriza por la lesión histopatológica de la superficie apical de los enterocitos, conocida como "Adherencia y y Esfacelamiento" (A/E). Afecta la mucosa intestinal al conducir a la disolución del borde en cepillo por vesiculación de las microvellosidades, con pérdida de disacaridasas, lo que a su vez altera la absorción y conduce a la producción de una diarrea secretora. (Molina López & Eslava Campos, 2015)

c) *E. coli enteroinvasiva (EIEC)*: Las cepas EIEC se internalizan y reproducen dentro del citoplasma de las células epiteliales, a las que destruyen. También penetran a los macrófagos. Estas cepas pertenecen a un grupo reducido de serotipos que se parecen bioquímica y antigénicamente al género *Shigella*. (Molina López & Eslava Campos, 2015)

d) *E. coli enterohemorrágica (EHEC)*: El grupo EHEC incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7, considerado como prototipo del grupo. Las cepas causantes de estos cuadros tienen la capacidad de elaborar una o más citotoxinas. Las citotoxinas que elabora el grupo EHEC originalmente se nombraron verotoxinas (VT), por el efecto citotóxico que causaban sobre cultivos de células Vero (línea celular de riñón de mono). Posteriormente y dado que anticuerpos obtenidos contra la toxina de *Shigella* (shiga toxin) neutralizaban su actividad, se les denominó toxinas semejantes a Shiga (SLT). (Molina López & Eslava Campos, 2015)

e) *E. coli enteroagregativa (EAEC)*: es heterogénea, se asocia con casos de diarrea aguda o persistente en niños y adultos a nivel mundial. Las cepas EAEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presentan en células HEp-2 en cultivo. Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con apariencia de ladrillos apilados ("stacked brick"), observados tanto sobre las células como en la superficie del vidrio de la preparación en biocapa. Esto no distingue entre cepas patógenas y no patógenas. (Molina López & Eslava Campos, 2015)

f) *E. coli Difusamente adherente (DAEC)*: las cepas DAEC generan un fenotipo inusual de adherencia celular sobre el cultivo de células HEp-2,

observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular (Riveros, y otros, 2011).

1.2.5.4. Factores de transmisión

Según la (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2005):

- Contaminación cruzada
- Alimentos provenientes de fuentes no inocuas
- Cocción inadecuada
- Temperatura de pasteurización insuficiente
- Equipos contaminados
- Falta de aseo personal
- Estado de salud de la persona que manipula los alimentos
- Calidad del agua

1.2.6. Contaminación de alimentos

La alimentación adecuada es fundamental para la salud y la pérdida de esta misma se debe muchas veces a ingerir alimentos contaminados, alterados o tóxicos, dependiendo del agente causal la contaminación de los alimentos puede ser de dos tipos:

- I. Contaminación biótica: provocada por la presencia de microorganismos patógenos, parásitos, virus y productos tóxicos de origen biológicos en los alimentos (Díaz Lorenzo, Valdés-Dapena Vivanco, Caballero Torres, & Monterrey Gutiérrez, 2011).

- II. Contaminación abiótica: provocada por la presencia en los alimentos de productos químicos o residuos y contaminantes radioactivos (Díaz Lorenzo, et al., 2011).

1.2.7. Enfermedades transmitidas por alimentos

Según la Food and Drug Administration (FDA), las enfermedades de origen alimentario pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas, las ETA's pueden presentarse de 3 formas:

- I. Infecciones transmitidas por alimentos: son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos (Castillo C. & Hualpa S., 2010).*

- II. Intoxicaciones causadas por alimentos: ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como en el caso de ciertos hongos y animales (Castillo C. & Hualpa S., 2010).*

- III. Toxiinfección causada por alimentos: es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos (Castillo C. & Hualpa S., 2010).*

El Comité de Expertos de la OMS plantea que la mayoría de las enfermedades por alimentos son de origen microbiano. Las enfermedades de origen biológico son producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Díaz Lorenzo, et al., 2011).

Las enfermedades virales transmitidas por los alimentos y el agua son mucho menos conocidas que las demás y estas pueden ser por: astrovirus, rotavirus,

adenovirus, enterovirus, virus de la hepatitis, entre otros (Díaz Lorenzo, et al., 2011).

- Bacterianas: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hidrophila*, *Plesiomonas shigelloide*, *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, infecciones por *vibrios* y *Clostridium*, *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, entre otros (Díaz Lorenzo, et al., 2011).

- Parasitarias: son producidas por *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, entre otras (Díaz Lorenzo, et al., 2011).

1.2.8. Medidas de control y prevención

La falta de conocimiento sobre las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) así como la escasa disponibilidad de información técnica complementaria repercute negativamente en la manipulación y preparación de alimentos tanto a nivel familiar como comercial (Díaz Lorenzo, et al., 2011).

La alta incidencia de estas enfermedades ha motivado que Organizaciones Internacionales como OMS y el Fondo de Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) hayan creado un plan de acción destinado a la prevención y control de las ETAs al que se le ha llamado Sistema de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (VETA) (Díaz Lorenzo, et al., 2011) utilizando Programas de Manejo Integrado de Plagas, Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Programas Operativos Estandarizados de Sanitización (POES) y el Sistema de Análisis de Peligros y de los Puntos Críticos de Control (APPCC, en inglés HACCP). (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2005)

1.2.9. *Análisis sensorial*

El análisis sensorial es la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído (Ramirez Navas, 2012).

Las pruebas de análisis sensorial permiten traducir las preferencias de los consumidores en atributos bien definidos para un producto. Las pruebas de aceptación también se conocen como de nivel de agrado (hedónicas). Se emplean para determinar el grado de aceptación de un producto por parte de los consumidores y según su tipo permiten medir cuánto agrada o desagradaba dicho producto. (Ramirez Navas, 2012)

1.3. Glosario

Antimicrobiano: Sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento.

Antioxidante: Cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.

Bactericida: Sustancia de origen natural o sintetizada químicamente que es capaz de destruir bacterias.

Carotenoides: Grupo de pigmentos orgánicos de tipo lipídico que sintetizan de forma natural las plantas, algas y algunas clases de microorganismos. Tienen una función antioxidante, protectora de los radicales libres.

Colmena: Receptáculo o recipiente, natural o fabricado, donde las abejas se alojan y forman los panales.

Compuestos bioactivos: Tipo de sustancia química que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos

Contaminación biótica: Está producida por organismos vivos (microorganismos, insectos) o sustancias procedentes de organismos vivos, como por ejemplo toxinas bacterianas.

Contaminación abiótica: Es la debida a sustancias generalmente de naturaleza química, como por ejemplo: metales pesados, insecticidas, pesticidas, etc.

Epitelizante: Que regulariza la secreción sebácea, produciendo una mejora en la estructura y el confort de la piel.

ETA: Enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes como para afectar la salud del consumidor.

Gastroenteritis: Enfermedad infecciosa que afecta al estómago y al intestino delgado produciendo síntomas caracterizados por diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal y fiebre.

Peritricos: Variedad de bacilos provistos de cilios vibrátiles en todo su contorno.

Preservantes: Sustancia utilizada como aditivo alimentario, que añadida a los alimentos detiene o minimiza el deterioro causado por la presencia de diferentes tipos de microorganismos.

Síndrome urémico hemolítico: Es un trastorno que ocurre generalmente cuando una infección en el aparato digestivo produce sustancias tóxicas que destruyen los glóbulos rojos, causando lesión a los riñones.

Toxinas: Son sustancias creadas por plantas y animales que son venenosas o tóxicas para los seres humanos. También incluyen medicamentos que son útiles en pequeñas dosis, pero tóxicos cuando se utilizan en grandes cantidades.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

1.1. Lugar de la investigación

Laboratorio de Análisis de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

1.2. Universo y muestra

Cuarenta y siete muestras de carne de res molida, de los cinco puestos que expenden en el mercado de Sauces IV de la Ciudad de Guayaquil.

1.3. Métodos científicos de la investigación

Descriptivo - Analítico.

1.4. Diseño de la investigación

Experimental. Además se hizo uso de las técnicas de entrevista y encuesta.

- a) **Entrevista:** para conocer el estado higiénico con el que se manipulan las carnes que se expenden en el mercado. *Ver Anexo III.*

- b) **Encuesta:** para saber el grado de aceptación que tienen las carnes de res molida tratadas con el extracto alcohólico de propóleo basándose en la escala hedónica.

1.5. Metodología

En el presente trabajo se utilizó cuarenta y siete muestras de carne de res molida obtenidas de cinco puestos del mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil, las cuales fueron tratadas con extracto alcohólico de propóleo a diferentes intervalos de tiempo pero a la misma temperatura.

Se pudo observar que los puestos no contaban con buena higiene. Los utensilios que emplean no son higiénicos. Las personas que expenden estos productos no tienen precaución al momento de manipularlos, lo hacen al contacto directo; sin utilizar equipos de protección como guantes, mascarilla, gorros, mandil. Los productos están expuestos al medio ambiente, no mantienen la cadena de frío. La carne fue triturada al momento pero se pudo observar que el equipo con el que realizan dicha operación no cuenta con buena higiene, ya que se observó restos de productos. *Ver Anexo III.*

Para el muestreo de las carnes molidas se siguió la Norma NTE INEN 776. Se utilizó bolsas de plástico estériles con una cantidad de muestra de aproximadamente 500 g las cuales fueron transportadas en un cooler lo más rápido posible hasta el lugar donde se realizaron los análisis, manteniéndolas a una temperatura óptima (0-10°C).

Para la preparación de las muestras se empleó materiales totalmente estériles. Primero se desinfectó el área de trabajo con alcohol y se trabajó con mechero a llama alta. Las muestras se mezclaron de manera que se homogenizaron perfectamente. Para abrir las fundas en las que se transportaron las muestras; estas se las desinfectó con alcohol, se cortó las puntas superiores y la abertura de las fundas. Una vez homogenizadas, cada una de las muestras, se cogió ejemplares de las esquinas y centro, y se volvió a homogenizar. De esa sub-muestra se cogió 10 gr para la preparación de la muestra final con la que se realizó los análisis. Se le agregó el extracto

alcohólico de propóleo, se dejó reposar las muestras, se añadió 90 ml de agua de peptona, se sembró en placas de Petrifilm, se inoculó y finalmente se hizo el recuento microbiano.

Para la elaboración del extracto alcohólico de propóleo, se partió de la metodología usada por (Fatma H. Ali, et al., 2010). El extracto se preparó pesando 100 g de propóleo en bruto, el cual se lo obtuvo en el cantón Yaguachi, en 200 ml de alcohol etílico de 96%. Se dejó macerar la solución por veintidós días en un frasco de vidrio color ámbar a 4°C, y cada doce horas se lo agitó por cinco minutos. Después de ese periodo, se filtró la solución con papel Whatman N°2. La solución de propóleo macerada fue almacenada en una fiola estéril a 4°C y protegiéndola de la luz hasta su posterior uso. *Ver Anexo IV.*

Se utilizó cepas control de *E. coli* ATCC 25922 que fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). *Ver Anexo V.*

Se realizaron numerosas pruebas para saber la dilución exacta que se utilizaría. Se empezó por usar una dilución de 0.6% de extracto alcohólico de propóleo. *Ver Anexo VI.* Para tal prueba se hicieron dos ensayos. Para el primero se utilizó 30 gr de carne de res molida que fueron pesadas en fundas ziploc, a las cuales se le añadieron 25 ml del extracto alcohólico de propóleo al 0.6%. Para la correcta distribución del extracto alcohólico de propóleo en la carne se homogenizó la misma durante tres minutos. Se cogió 10 gr de la muestra, se le añadió 90 ml de agua de peptona, se homogenizó por dos minutos en el agitador análogo MaxiMix y se sembró en placas de Petrifilm para *E. coli*. Se dejó incubar por 48 horas a 35°C ± 2°C en incubadora Memmert. Transcurrido el tiempo adecuado de incubación se realizó el respectivo conteo de colonias encontradas en las placas en un contador de colonias a contra luz y se recolectaron los datos. Se evidenció cambios físicos, la carne perdió su color característico y con un olor fuerte a alcohol. Se

realizaron dos ensayos con esta dilución porque se evidenció cambios en la apariencia de la carne, motivo por el cual se concluyó que esta dilución y volumen empleados no favorecen al análisis.

Para el segundo ensayo se utilizó 30 gr de carne de res molida que fueron pesadas en fundas ziploc, a las cuales se les añadió 3 ml de extracto alcohólico de propóleo al 0.6%. Se procedió de la misma manera que el ensayo anterior. Con esta dilución y volumen añadido se concluyó que si conserva las características físicas propias de la carne, pero en cuanto a los análisis microbiológicos no hubo suficiente inhibición microbiana. Se trabajaron diez muestras. En virtud de que esa dilución y volumen añadido de extracto alcohólico de propóleo no tuvo la respuesta que se esperaba, se hizo otro ensayo de extracto alcohólico de propóleo al 0.8%.

Se empleó la dilución 0.8% de extracto alcohólico de propóleo *Ver Anexo VII*, haciéndose referencia al trabajo realizado por (Gutiérrez Cortés & Suarez Mahecha, 2012). Para tal efecto, se hicieron dos ensayos a diferentes volúmenes, 0.5 ml y 1 ml (diez muestras para cada volumen de extracto alcohólico de propóleo). Se procedió de la misma manera que en los ensayos anteriores. Con esta dilución hubo mejores resultados que con la dilución 0.6%, sin embargo, aún hubo recuento microbiano alto. Para tal efecto se empleó una dilución más alta, la dilución 1% de extracto alcohólico de propóleo.

Con la dilución 1% del extracto alcohólico de propóleo *Ver Anexo VIII*, se partió del método usado por (Rojo Cortina, 2013) como base y con la adaptación de los autores de esta investigación. Se realizaron tres muestreos en días diferentes, tales muestras fueron designadas como Muestras A, Muestras B y Muestras C.

Cuadro II: *Concentración y temperatura usadas en las muestras a diferentes intervalos de tiempo.*

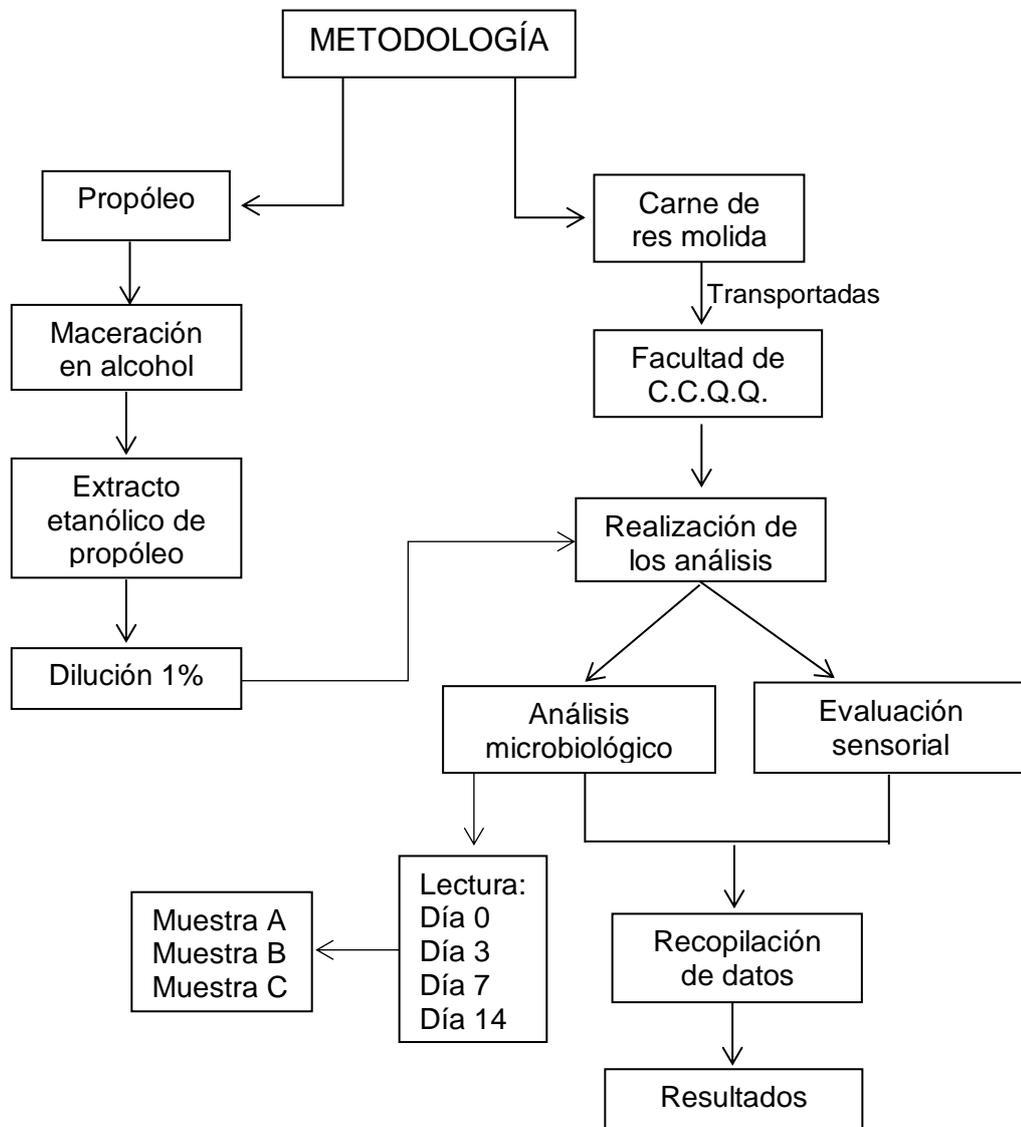
%	1%	1%	1%	1%
°T	4°C	4°C	4°C	4°C
Días	0	3	7	14

Fuente: Macías, A. y Yunda, E. (2015).

Se pesaron 10 gr de la muestra en fundas ziploc, se agregó 1 ml de la dilución 1% del extracto alcohólico de propóleo y se homogenizó por tres minutos. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4°C durante catorce días, realizándose los análisis a los días 0, 3, 7, y 14. Para los análisis del día 0 se dejó transcurrir una hora después de agregar el extracto alcohólico de propóleo al 1%. En los análisis de los días restantes (3, 7 y 14) se dejó las muestras en refrigeración a 4°C hasta el día de su análisis respectivo. Transcurrido el tiempo adecuado para cada muestra, se agregó 90 ml de agua de peptona, se homogenizó por dos minutos en el agitador análogo MaxiMix. Se procedió a realizar la siembra en placas Petrifilm para *E. coli* y se incubaron a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas en incubadora Memmert. Transcurrido el tiempo adecuado de incubación se realizó el respectivo conteo de colonias encontradas en las placas en un contador de colonias a contra luz y se recolectaron los datos.

Con el fin de evaluar la aceptabilidad de las carnes tratadas con el extracto alcohólico de propóleo al 1% por parte de los consumidores, se midieron los parámetros sensoriales por atributo (color, sabor, textura, jugosidad y aceptación general) dichos análisis se hicieron al llegar el día 14. Para tal ensayo participaron estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas, quienes evaluaron los atributos basándose en la escala hedónica de 9 puntos, siendo 1 me disgusta extremadamente y 9 me gusta extremadamente. A cada uno de los panelistas se les entregó una papeleta para que realicen su evaluación. *Ver Anexo XII.*

Cuadro III: Esquema de la metodología



Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

Cuadro IV: Descripción de proceso del Extracto Alcohólico de Propóleo.

ETAPA	OPERACIÓN	INSPECCIÓN	ALMACENAMIENTO	TRANSPORTE	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO
Abastecimiento de materia prima					Obtención del propóleo en bruto.
Transporte					Se lo transporta al laboratorio de Microbiología de C.C.Q.Q.
Preparación del material					Lavado del material que se va a emplear para eliminar sustancias adheridas.
Pesado					Pesaje del propóleo para la preparación del extracto.
Maceración					Adición de alcohol etílico al 96%.
Almacenamiento					Guardar en un frasco ámbar a 4°C.
Inspección					Se supervisa durante 21 días, agitando 5 min diarios la solución.
Filtración					Esta operación permite obtener todo el extracto alcohólico.
Etiquetado					Se etiqueta la solución madre para realizar las diferentes diluciones.

Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

Cuadro V: Descripción del análisis de la carne.

ETAPA	OPERACIÓN	INSPECCIÓN	ALMACENAMIENTO	TRANSPORTE	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO
Abastecimiento de materia prima					Obtención de carne molida de res en el Mercado de Sauces IV.
Transporte					Se transporta en una hielera, manteniendo la cadena de frío, al laboratorio de Microbiología de CCQQ.
Preparación del material y área de trabajo					Se esteriliza el mesón con alcohol y se enciende el mechero de Bunsen.
Pesado					Se pesa 10 g de carne para las diferentes muestras.
Aplicación del extracto alcohólico de propóleo					Se adiciona el extracto de propóleo para los diferentes días (0, 3, 7 y 14) a las carnes pesadas.
Adición					A las muestras del día 0 se le adiciona 90 ml de agua de peptona.
Agitación					Homogenizar por 2 minutos.
Adición					Se adiciona 1 ml de la muestra homogenizada del día 0 a las placas Petrifilm.
Incubación					Durante 48 horas a 35°C ± 2°C.
Almacenamiento					Se guardan las carnes del día 3, 7 y 14 a 4°C, para los respectivos análisis.
Inspección					Contaje de las UFC/g.

Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

1.6. Análisis Sensorial

Para el análisis sensorial se desarrolló un estudio basado en la escala hedónica dirigido a los estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas. Para seleccionar el número de personas a encuestar se hizo uso de la fórmula presentada a continuación obteniendo 271 personas a encuestar las cuales se procedieron a ejecutar.

$$n = \frac{N}{(E)^2 (N - 1) + 1}$$

En donde:

n = tamaño de la muestra

N = tamaño de la población

E = Error máximo admisible (0.05)

$$n = \frac{836}{(0.05)^2 (836 - 1) + 1}$$

$$n = \frac{836}{(0.0025)(835) + 1}$$

$$n = \frac{836}{2.0875 + 1}$$

$$n = \frac{836}{3.0875}$$

$$n = 271 \text{ encuestas}$$

CAPÍTULO III

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Este capítulo describe los resultados obtenidos de los datos recolectados, para mayor comprensión de los resultados se emplearon gráficos y cuadros estadísticos con la respectiva interpretación de su contenido.

Cuadro VI: Resultados microbiológicos.

MUESTRAS	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	% Reducción	M= Índice máximo permisible para identificar Nivel aceptable de calidad.
MUESTRAS A						
1A	1010 UFC	900 UFC	720 UFC	420 UFC	58	1000 UFC/g
2A	690 UFC	570 UFC	390 UFC	240 UFC	65	1000 UFC/g
3A	1380 UFC	1240 UFC	1100 UFC	930 UFC	33	1000 UFC/g
4A	660 UFC	480 UFC	280 UFC	150 UFC	77	1000 UFC/g
5A	1100 UFC	950 UFC	790 UFC	600 UFC	45	1000 UFC/g
MUESTRAS B						
1B	930 UFC	720 UFC	530 UFC	320 UFC	66	1000 UFC/g
2B	500 UFC	290 UFC	150 UFC	80 UFC	84	1000 UFC/g
3B	490 UFC	260 UFC	120 UFC	70 UFC	86	1000 UFC/g
4B	670 UFC	540 UFC	340 UFC	190 UFC	72	1000 UFC/g
5B	580 UFC	370 UFC	210 UFC	100 UFC	83	1000 UFC/g
MUESTRAS C						
1C	520 UFC	330 UFC	170 UFC	90 UFC	83	1000 UFC/g
2C	1200 UFC	1030 UFC	890 UFC	690 UFC	43	1000 UFC/g
3C	810 UFC	670 UFC	480 UFC	300 UFC	63	1000 UFC/g
4C	630 UFC	420 UFC	270 UFC	135 UFC	79	1000 UFC/g
5C	950 UFC	760 UFC	570 UFC	380 UFC	60	1000 UFC/g
					65	

Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

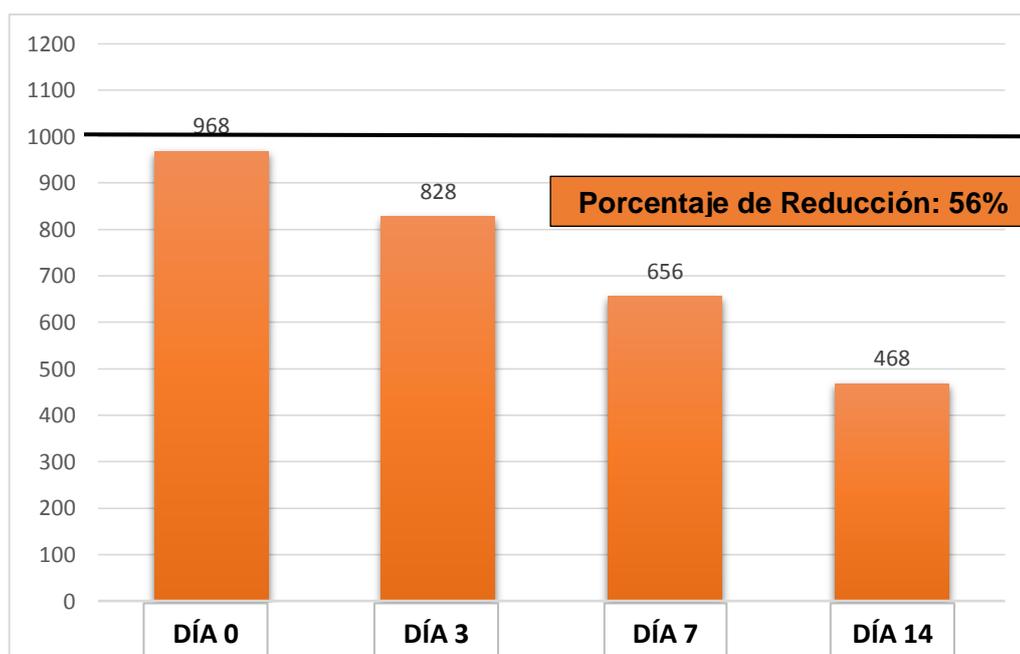
INTERPRETACIÓN 1: En el cuadro VI podemos visualizar que la carga microbiana de las muestras A, B, C, disminuyeron considerablemente al llegar al día catorce, todas las muestras están por debajo del índice máximo permisible para identificar el nivel aceptable de calidad que es 1000 UFC/g.

Cuadro VII: Resultados microbiológicos de las muestras A.

MUESTRAS A					
MUESTRAS	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	% Reducción
1A	1010	900	720	420	58
2A	690	570	390	240	65
3A	1380	1240	1100	930	33
4A	660	480	280	150	77
5A	1100	950	790	600	45
PROMEDIO	968 UFC	828 UFC	656 UFC	468 UFC	56

Fuente: Elaboración propia, (2015).

Gráfico I: Resultados microbiológicos de las muestras A.



Fuente: Elaboración propia, (2015).

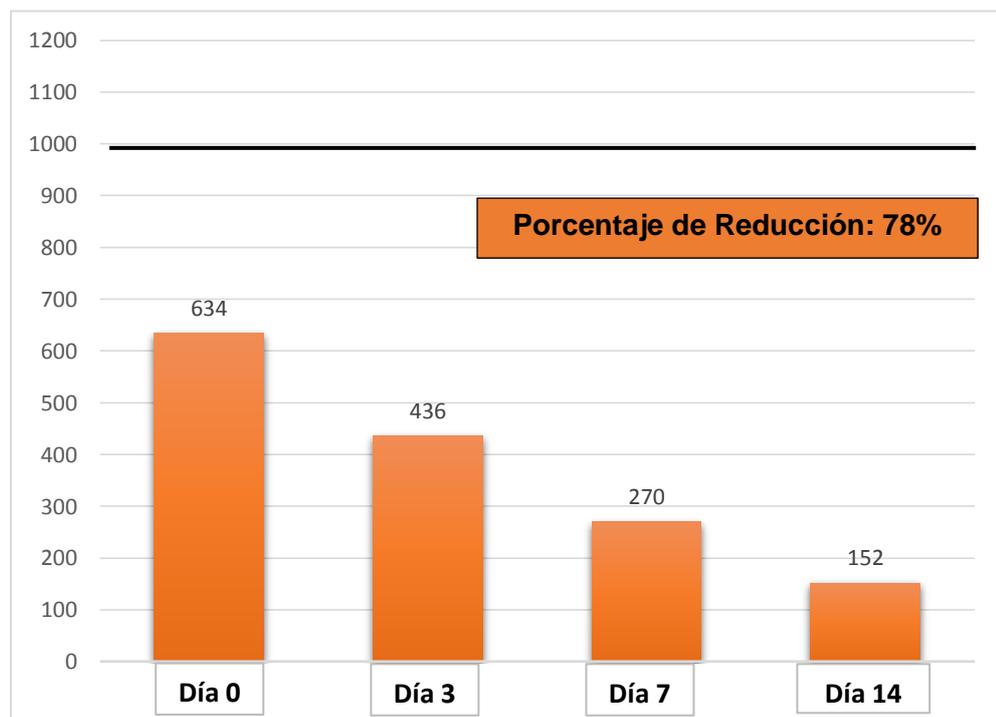
INTERPRETACIÓN 2: Podemos observar en el Gráfico I que el promedio de UFC de los 5 puestos, en el día cero tienen una carga microbiana alta, pero al llegar al día catorce disminuye, teniendo un promedio de porcentaje de reducción de 56%.

Cuadro VIII: Resultados microbiológicos de las muestras B.

MUESTRAS B					
MUESTRAS	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	% Reducción
1B	930	720	530	320	66
2B	500	290	150	80	84
3B	490	260	120	70	86
4B	670	540	340	190	72
5B	580	370	210	100	83
PROMEDIO	634 UFC	436 UFC	270 UFC	152 UFC	78

Fuente: Elaboración propia, (2015).

Gráfico II: Resultados microbiológicos de las muestras B.



Fuente: Elaboración propia, (2015).

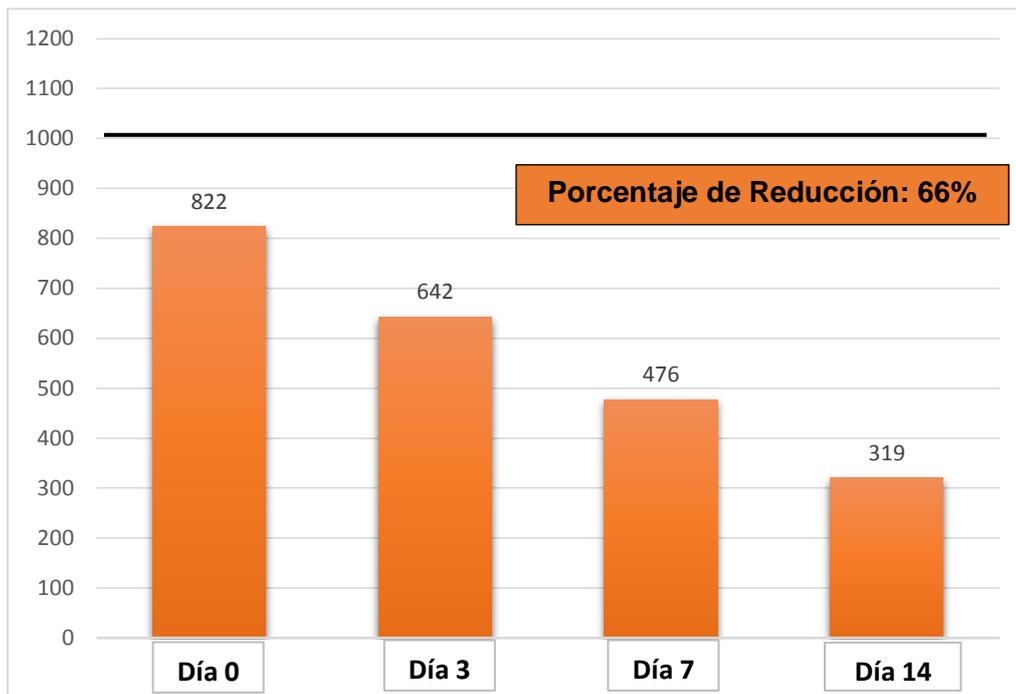
INTERPRETACIÓN 3: Podemos observar en el Gráfico II que el promedio de UFC de los 5 puestos, cumplen con los niveles aceptables de calidad, pero al adicionar el conservante durante los catorce días se evidencia una disminución de las UFC, obteniendo un promedio de porcentaje de reducción de 78%.

Cuadro IX: Resultados microbiológicos de las muestras C.

MUESTRAS C					
MUESTRAS	Día 0	Día 3	Día 7	Día 14	% Reducción
1C	520	330	170	90	83
2C	1200	1030	890	690	43
3C	810	670	480	300	63
4C	630	420	270	135	79
5C	950	760	570	380	60
PROMEDIO	822	642	476	319	66

Fuente: Elaboración propia, (2015).

Gráfico III: Resultados microbiológicos de las muestras C.



Fuente: Elaboración propia, (2015).

INTERPRETACIÓN 3: Podemos observar en el Gráfico III que el promedio de UFC de los 5 puestos, cumplen con los niveles aceptables de calidad, pero al adicionar el conservante durante los catorce días se evidencia una disminución de las UFC, obteniendo un promedio de porcentaje de reducción de 66%.

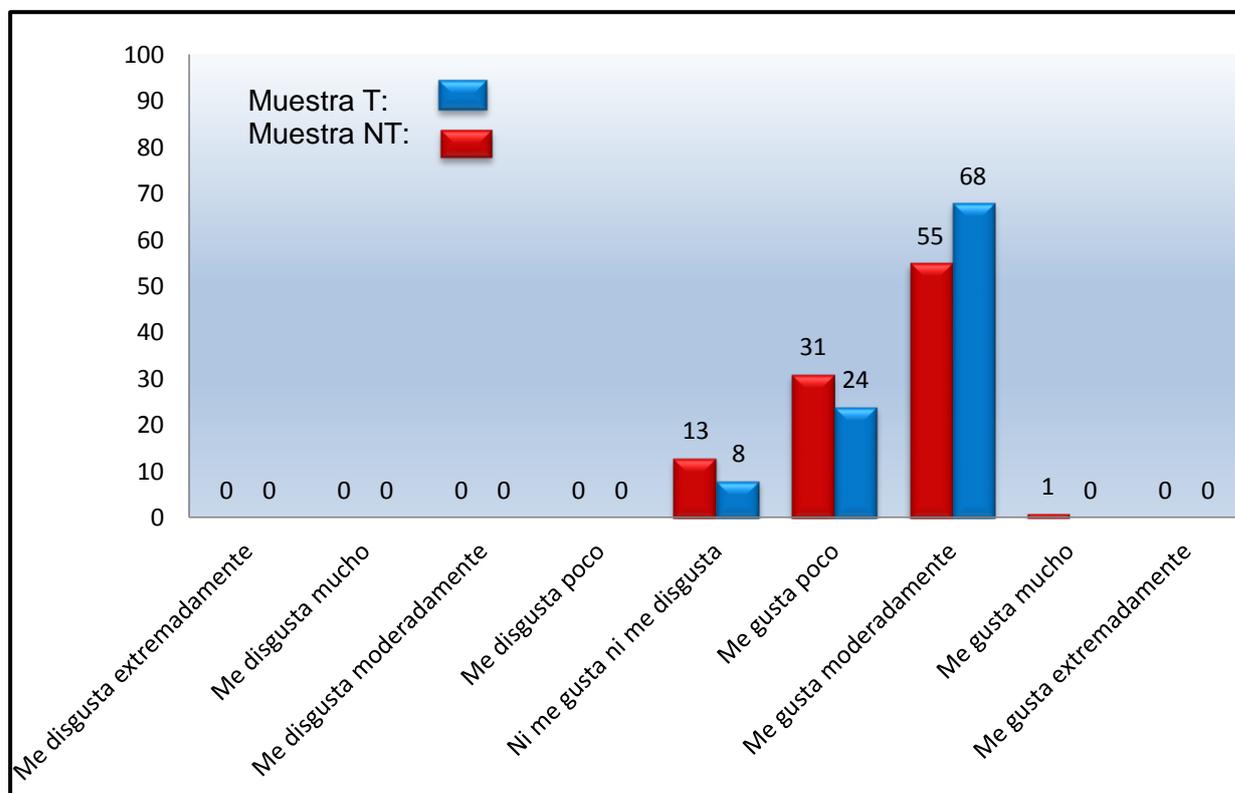
Encuesta para saber el grado de aceptación sensorial.

La cantidad de personas encuestadas se escogieron de manera aleatoria simple.

Cuadro X: Color de las carnes tratadas vs las no tratadas.

Categoría	Puntaje	Atributo: Color			
		Muestra T	%	Muestra NT	%
Me disgusta extremadamente	1		0		0
Me disgusta mucho	2		0		0
Me disgusta moderadamente	3		0		0
Me disgusta poco	4		0		0
Ni me gusta ni me disgusta	5	23	8	35	13
Me gusta poco	6	64	24	83	31
Me gusta moderadamente	7	184	68	150	55
Me gusta mucho	8		0	3	1
Me gusta extremadamente	9		0		0
		271 Personas		271 Personas	

Gráfico IV: Atributo color.



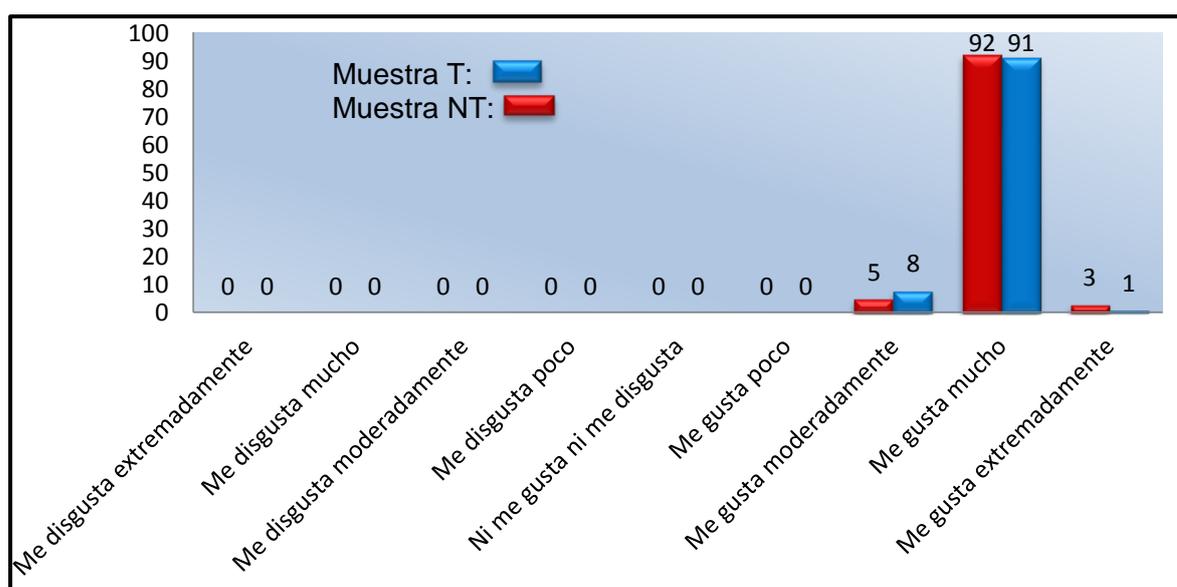
Fuente: Elaboración propia, (2015).

INTERPRETACIÓN 4: Podemos identificar que el 68 % de las personas encuestadas tienen una preferencia en cuanto aspecto visual de la carne tratada con propóleo frente a un 55% de la carne no tratada como se puede notar en el Gráfico IV. Esto representa una señal favorable para el proyecto, ya que se pretende comercializar el producto como una nueva alternativa para conservar las carnes.

Cuadro XI: Sabor de las carnes tratadas vs las no tratadas.

Categoría	Puntaje	Atributo: Sabor			
		Muestra T	%	Muestra NT	%
Me disgusta extremadamente	1		0		0
Me disgusta mucho	2		0		0
Me disgusta moderadamente	3		0		0
Me disgusta poco	4		0		0
Ni me gusta ni me disgusta	5		0		0
Me gusta poco	6		0		0
Me gusta moderadamente	7	21	8	13	5
Me gusta mucho	8	246	91	250	92
Me gusta extremadamente	9	4	1	8	3
		271 Personas		271 Personas	

Gráfico V: Atributo sabor.



Fuente: Elaboración propia, (2015).

INTERPRETACIÓN 5: Esta es una de los atributos más críticos que presenta el estudio, ya que por las características que posee el propóleo puede afectar al sabor de las carnes. En el Gráfico V se observa que el 91% de los encuestados indicaron que “les gustó mucho” las muestras tratadas con el extracto alcohólico de propóleo, frente a un 92% de las muestras sin tratar, se puede notar una similitud en cuanto a sabor lo que hace factible este proyecto puesto que la concentración del extracto alcohólico de propóleo no afectó en casi nada al sabor normal de las carnes, obteniendo así un producto de buena calidad y baja carga microbiana.

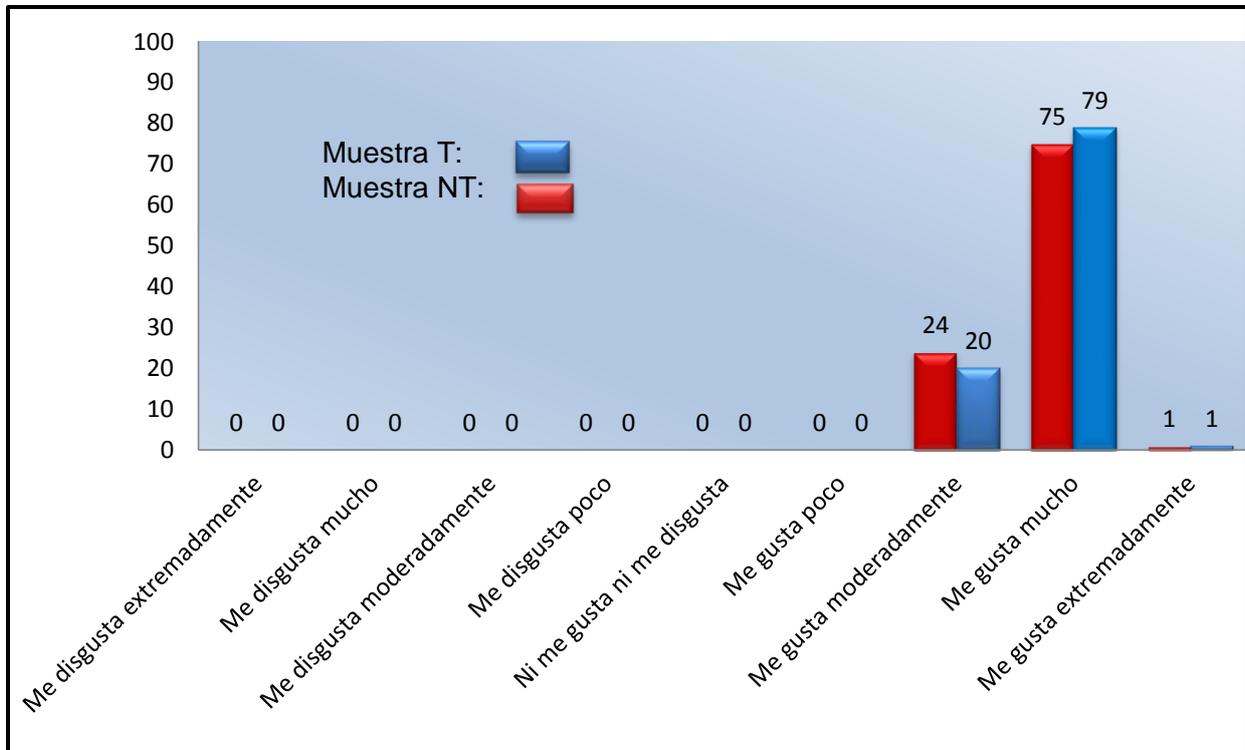
El 4% de los encuestados indicaron que les gustaba extremadamente el sabor de las muestras tratadas y el 21 % que le gustaba moderadamente, teniendo así resultados positivos ya que ninguno de los encuestados manifestaron que no les agradaba el sabor de las carnes tratadas.

Cuadro XII: *Textura de las carnes tratadas vs las no tratadas.*

Categoría	Puntaje	Atributo: Textura			
		Muestra T	%	Muestra NT	%
Me disgusta extremadamente	1		0		0
Me disgusta mucho	2		0		0
Me disgusta moderadamente	3		0		0
Me disgusta poco	4		0		0
Ni me gusta ni me disgusta	5		0		0
Me gusta poco	6		0		0
Me gusta moderadamente	7	56	20	66	24
Me gusta mucho	8	213	79	203	75
Me gusta extremadamente	9	2	1	2	1
		271 Personas		271 Personas	

Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

Gráfico VI: *Atributo textura.*



Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

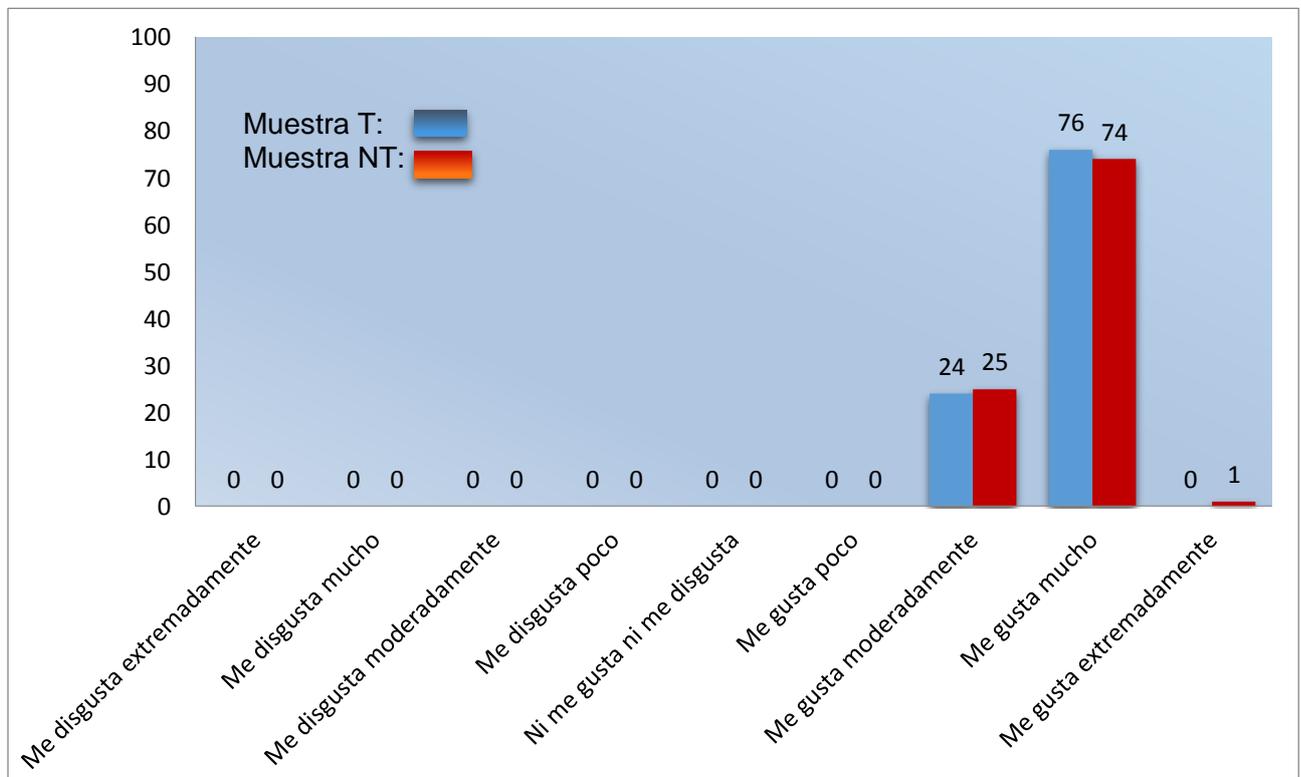
INTERPRETACIÓN 6: En las respuestas por parte de los encuestados, un 79 % indicaron que le gustaba mucho la textura que presentaban las carnes tratadas con el extracto alcohólico de propóleo y un 75 % indicó lo mismo pero con las muestras sin tratar, lo que demuestra que ambas muestras tienen similitud en cuanto a textura.

Cuadro XIII: Jugosidad de las carnes tratadas vs las no tratadas.

Categoría	Puntaje	Atributo: Jugosidad			
		Muestra T	%	Muestra NT	%
Me disgusta extremadamente	1		0		0
Me disgusta mucho	2		0		0
Me disgusta moderadamente	3		0		0
Me disgusta poco	4		0		0
Ni me gusta ni me disgusta	5		0		0
Me gusta poco	6		0		0
Me gusta moderadamente	7	66	24	68	25
Me gusta mucho	8	205	76	201	74
Me gusta extremadamente	9		0	2	1
		271 Personas		271 Personas	

Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

Gráfico VII: Atributo jugosidad.



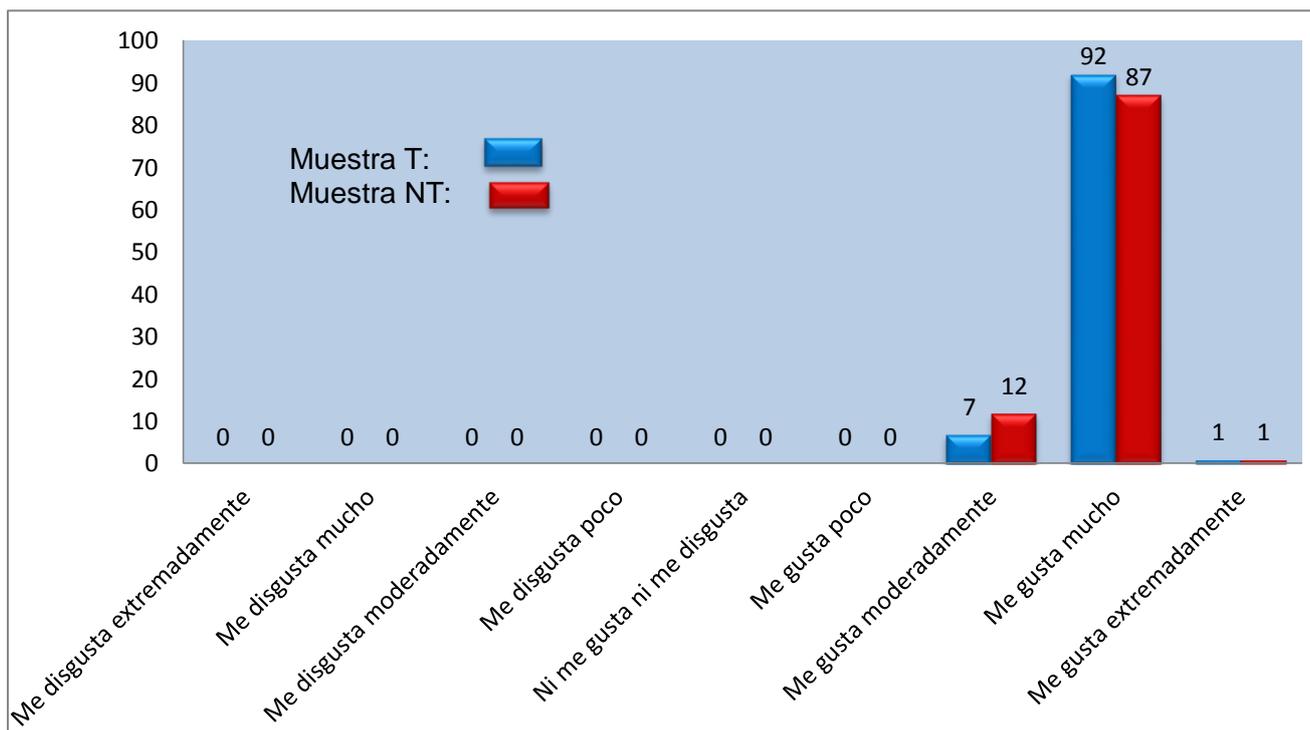
Fuente: *Elaboración propia, (2015).*

INTERPRETACIÓN 7: En las respuestas brindadas por los encuestados no existió gran diferencia, teniendo un 76% que indicaron que les gustaba mucho las jugosidad de las carnes tratadas con el extracto alcohólico de propóleo, frente un 74% que también les gustó mucho su jugosidad de la carnes no tratadas.

Cuadro XIV: Aceptación general de las carnes tratadas vs las no tratadas.

Categoría	Puntaje	Atributo: Aceptación General			
		Muestra T	%	Muestra NT	%
Me disgusta extremadamente	1		0		0
Me disgusta mucho	2		0		0
Me disgusta moderadamente	3		0		0
Me disgusta poco	4		0		0
Ni me gusta ni me disgusta	5		0		0
Me gusta poco	6		0		0
Me gusta moderadamente	7	19	7	33	12
Me gusta mucho	8	250	92	235	87
Me gusta extremadamente	9	2	1	3	1
		271 Personas		271 Personas	

Gráfico VIII: Aceptación general.



INTERPRETACIÓN 8: Mediante el Gráfico VIII podemos decir que las carnes tratadas con el extracto de propóleo tuvieron gran aceptación sensorial por parte de los encuestados reflejándose en un 92%.

Entrevista realizada a los expendedores de carnes de res molida en el mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil.

Las preguntas realizadas fueron de manera breve y específica, dirigidas a conocer la procedencia de las carnes y almacenamiento de las mismas. A los señores expendedores se les aplicó el siguiente cuestionario de preguntas, a saber:

1.- ¿Quién les distribuye la carne?

Respuesta: El camal Municipal o canchón Municipal es quien les distribuye la carne. Una vez que salen de ahí pasan a la cámara frigorífica durante 24 horas, para luego proceder los respectivos compradores en los diferentes mercados de la Ciudad de Guayaquil.

2.- ¿Dónde almacenan las carnes?

Respuesta: Las carnes las mantienen almacenadas en congeladores que se encuentran ubicados en el mismo local.

3.- ¿Controlan la temperatura del congelador?

Respuesta: En esta pregunta indicaron que el congelador pasa encendido temperaturas bajas.

4.- ¿A qué parte de la vaca corresponde la carne molida que expenden?

Respuesta: Los entrevistados respondieron que había 2 tipos de carne molida, a las cuales denominaremos A y B.

- A: Pertenece a la pulpa de la vaca (lomo, muslo etc).
- B: Pertenece una carne denominada “carne de segunda”, es decir carne dura o corriente, se las conoce como lagartillo, tablaza, gallinazo, carne perdida y grasas.

5.- ¿La carne la muelen de manera manual o mecánica?

Respuesta: Las muelen en el local de manera mecánica mediante un molino.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1. Conclusiones

En el desarrollo del presente trabajo de investigación se ha alcanzado los objetivos inicialmente planteados, concluyendo de ésta manera en lo siguiente:

- Durante la fase de experimentación y análisis, se realizaron tres diferentes concentraciones de extracto alcohólico de propóleo (0.6%, 0.8% y 1 %) determinando que la concentración del extracto alcohólico de propóleo al 1% actuó de la manera esperada disminuyendo la proliferación bacteriana.
- El extracto alcohólico de propóleo al 1% generó resultados positivos en cuanto a la evaluación antimicrobiana, evidenciándose notablemente la reducción de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en los días de estudio, se comprobó que a medida que transcurren los días su porcentaje de reducción en las carnes tratadas con el extracto es mayor.
- Las carnes tratadas con el extracto alcohólico de propóleo tuvieron gran aceptación por parte de los encuestados, cuantificando los resultados de las carnes tratadas y las no tratadas se comprobó que no existe diferencia significativa en cuanto los parámetros sensoriales por atributo (color, sabor, textura, jugosidad y aceptación general).

Se cumple así la hipótesis planteada, que el extracto alcohólico de propóleo actúa como agente conservante natural en carnes molidas.

4.2. Recomendaciones

- Realizar a futuro estudios concernientes con el extracto alcohólico de propóleo como conservante en otros productos alimenticios.
- Se recomienda realizar estudios que profundicen el tema de utilizar propóleo como una alternativa natural en las industrias.
- Difundir por los diferentes medios de comunicación acerca del uso del propóleo como inhibidor de indicador de contaminación fecal.
- Incentivar a los expendedores de carnes para que cumplan a cabalidad la reglamentación sanitaria, para que puedan dar al consumidor un producto de calidad y evitar de este modo enfermedades gastrointestinales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y tecnología. (28 de Febrero de 2012). *Propoleo, nueva alternativa natural para conservar carne*. Obtenido de <http://www.dicyt.com/noticias/propoleo-nueva-alternativa-natural-para-conservar-carne>

Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y tecnología. (28 de Febrero de 2012). *Propoleo, nueva alternativa natural para conservar carne*. Obtenido de <http://www.dicyt.com/noticias/propoleo-nueva-alternativa-natural-para-conservar-carne>

Aguirre Tobar, N. S. (Abril de 2015). *Acción antimicrobiana para inhibir el Enterococcus faecalis*. Obtenido de Analisis in vitro de dos medicamentos de uso externo, Paramonoclorofenol y Propóleo: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3755/1/T-UCE-0015-117.pdf>

Alvarado, R., Arias, Y., Blumenthal, E., Gil, M., & Perelli, A. (Diciembre de 2012). Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. *Salus*, 16(3), 24. Obtenido de <http://www.scielo.org.ve/pdf/s/v16n3/art06.pdf>

Alves Ferreira, E., Figueroa, J., Guzmán, D., Oliveira, D., & Tello, J. (2011). CARACTERIZACIÓN ANTIMICROBIANA Y FISICOQUÍMICA DE PROPÓLEOS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) DE LA REGIÓN ANDINA COLOMBIANA. *UN- Universidad Nacional de Colombia*, 16(1). Obtenido de

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/rt/printerFriendly/10346/28146>

Arroyo Llantín, N. N. (2008). *Avalúo Microbiológico de Peligros y Comparación de la Carne Molida de Venta al Detal de Procesadores Locales de Puerto Rico y los Importados de Estados Unidos*. Obtenido de <http://bovinosparacarne.uprm.edu/publication/arroyollantin%5B1%5D.pdf>

Ayala Fernández, E. S., & Macay Hernández, C. E. (Diciembre de 2010). *Efecto de extractos de propóleo y miel de abeja (Apis mellifera) en las propiedades físicas y sensoriales de una salchicha de desayuno con dos niveles de grasa*. Obtenido de Zamorano - Honduras: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/497/1/T3024.pdf>

Carrillo M., L., Cruz Sánchez, T. n., Penieres Carrillo, J. G., Londoño Orozc, A., García Tova, C. G., Quintero Mora, M. L., . . . García Vázquez, S. E. (Enero - Marzo de 2008). *Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja Apis mellifera proveniente del estado de México*. Obtenido de <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835689.pdf>

Castellanos Figueredo, C., Tan Guevara, L., Tan Castellanos, Y., & Carlisle Green, C. (Junio de 2011). *El propoleo*. Obtenido de Su aplicación en la medicina humana: <http://www.efdeportes.com/efd157/la-propolina-para-la-regulacion-del-peso-corporal.htm>

Castillo C., M., & Hualpa S., D. (10 de mayo de 2010). *ZONA ALIMENTARIA. Inocuidad de los alimentos*. Obtenido de Consumos de lácteos sin procesar. Un riesgo latente:

http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4be80e89c9036_Inocuidad%20de%20los%20alimentos.pdf

Centro de investigación en alimentación y desarrollo . (28 de Octubre de 2013).
Logra CIAD prolongar la vida de anaquel de la carne molida de res.
Obtenido de <http://www.ciad.mx/rss/946-carne-molida.html>

Centro de investigación en alimentación y desarrollo. (28 de Octubre de 2013).
Logra CIAD prolongar la vida de anaquel de la carne molida de res.
Obtenido de <http://www.ciad.mx/rss/946-carne-molida.html>

Díaz Lorenzo, T., Valdés-Dapena Vivanco, M., Caballero Torres, A., & Monterrey Gutiérrez, P. (2011). *Enfermedades transmitidas por alimentos. Causas más frecuentes en los niños.* Obtenido de <http://bvs.per.paho.org/texcom/colera/etasninos.pdf>

Farré R., Frassetto I., & Sánchez A. (2004). *El própolis y la salud.* Obtenido de <http://www.ugr.es/~ars/abstract/45-21-04.pdf>

Fatma H. Ali, Gehan, M. Kassem & Osama A. Atta-Alla. (2010). Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria italiana*, 46(2), 167-172.

Gutiérrez Cortés, C. (2012). Efecto conservante de Propóleos en chorizos. *Vitae - Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 19(1), S159. Obtenido de Efecto conservante de propoleos en chorizos: <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914044.pdf>

Gutiérrez Cortés, C., & Suarez Mahecha, H. (2012). Efecto conservante de Propóleos en chorizos. *Vitae - Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 19(1), S159. Obtenido de Efecto conservante de propoleos en chorizos: <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914044.pdf>

Jimeno Benito, M. F., & Pérez Arquillúe, C. (Julio de 1997). *HOJAS DIVULGADORAS*. Obtenido de El propóleo de las abejas: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1987_07.pdf

Leotta G.A., Chinen I., Epszteyn S., Miliwebsky E., Melamed I.C., Motter M., Ferrer M., Marey E., Rivas M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Scielo*, 37(1).

López Hernández, L. A., & Ferreyro Davis, X. V. (16 de Mayo de 2014). *Slideshare*. Obtenido de <http://es.slideshare.net/BerserkX/calidad-sanitaria-de-la-carne-molida-de-res>

López Hernández, L. H., Braña Varela, D., & Hernández Hernández, I. (Octubre de 2013). *Estimación de la vida de anaquel de la carne*. Ajuchitlán: M. en B. Luis Humberto López Hernández. Obtenido de <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/21.%20Estimaci%C3%B3n%20de%20la%20Vida%20de%20Anaquel%20de%20la%20Carne.pdf>

Luna Limaico, C. G. (2011). *“Estudio del efecto de dos promotores inmunológicos de origen natural (propóleo, polen) y su incidencia en la producción de pollos de engorde, en el sector el Tejar, provincia de*

Imbabura. Obtenido de
<http://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/161/1/T72598.pdf>

Méndez Flores, A. (2012). *Blog-Ciencias Médicas*.

Molina López, J., & Eslava Campos, C. (2015). *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*. Obtenido de Departamento de microbiología y parasitología:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>

NTE INEN 1 346. (2010). *Carne y productos cárnicos. Carne molida. Requisitos*. Obtenido de Carne y productos carnicos. Carne Molida, Requisitos:
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1346.2010.pdf>

NTE INEN 1529-2. (1999). *Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico*. Quito.

NTE INEN 776. (1985). *Carne y productos cárnicos. Muestreo*. Quito.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2005). *Sistemas Nacionales de Inocuidad de Alimentos en las Américas y el Caribe: Análisis de la Situación. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe*, (pág. 4).

Peña C., R. (2008). *Ciencia de investigación Agraria*. Obtenido de Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos:
<http://www.scielo.cl/pdf/ciagr/v35n1/art02.pdf>

Puente Calderon, A. (2010). *Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de propóleo etanólicos sobre dos bacterias periodontopatogenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal*. Obtenido de <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/ALANDANNYCALDERONPUENTEDELAVEGA.pdf>

Ramirez Navas, J. (2012). Análisis Sensorial: Pruebas Orientadas al Consumidor. *Reciteia*, 12(1), 86-87.

Restrepo Molina, D. A., Arango Mejía, C. M., & Restrepo Digiammarco, R. A. (2001). *Industria de carnes*. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://decarnes.wikispaces.com/file/view/Libro+de+carnes.pdf>

Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E. H., Contreras, C., . . . Ochoa, T. J. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* Difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Scielo Perú*, 28(1).

Rojó Cortina, M. D. (16 de Abril de 2013). Evaluación del empleo de miel artesanal en la conservación de carne picada de ternera . Cartagena, Colombia.

Sánchez-Escalante, A., Torrescano-Urrutia, G., & Vargas-Sánchez, R. D. (28 de Octubre de 2013). El Propóleo: Conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38(10), 707. Obtenido de El propóleo: Conservador potencial para la industria alimentaria: http://www.interciencia.org/v38_10/705.pdf

SENASICA. (15 de Junio de 2011). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*. Obtenido de <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=23895&IdUrl=48811>

Sisa, J. (2010). *Eco aldea*. Obtenido de <http://www.ecoaldea.com/apicultura/propolis.htm>

Stangaciu, S. (1998). *Composición y propiedades del propóleo*. Obtenido de <http://bee-winner.com/Dr.pdf>

Telmo Martínez, J. F. (2010). *Evaluación de la capacidad antimicrobiana de muestras de propoleo colombiano*. Obtenido de <http://www.apiarioloscitricos.com/pdf/ACTIVIDAD%20%20ANTIMICROBIANA%20DE%20MUESTRAS%20DE%20PROPOLEO%20COLOMBIAN1.pdf>

ANEXOS

Anexo I: Solicitud de la cepa de E. coli ATCC 25922.



Universidad de Guayaquil
Facultad de Ciencias Químicas
DECANATO
Telefax 2293680 – 2293379
E-mail: fcquimic@ug.edu.ec.

FCQ – V – 156
Mayo 22 del 2015

Ingeniero
SANTIAGO APUNTE CASTILLO
DIRECTOR EJECUTIVO
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
Ciudad.-

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo, a la vez me permito comunicar a usted, que los señores: **SRTA. ANA MACÍAS PICO** y **SR. ESAÚ YUNDA GUACHO**, estudiantes del Quinto Nivel, periodo lectivo 2014 -2015, han culminado con la Malla Curricular de la Carrera de **Química y Farmacia**, y se encuentran desarrollando el Proyecto de la Unidad de Titulación con el tema denominado: **“APLICACIÓN DE EXTRACTO DE PROPOLEO COMO AGENTE CONSERVANTE EN CARNES MOLIDAS QUE SE EXPENDEN EN EL MERCADO DE SAUCES IV DE LA CIUDAD DE GUAYAQUIL”**.

En virtud de lo que antecede, este decanato solicita muy comedidamente a usted, autorizar a quien corresponda, que se nos proporcione inóculos de cepas control de *E.coli* ATCC 25922, para la finalización de dicho proyecto y así puedan obtener el título de profesional a los mencionados estudiantes.

Para la información solicitada remitir al correo electrónico de la interesada: anitamacias26@hotmail.com

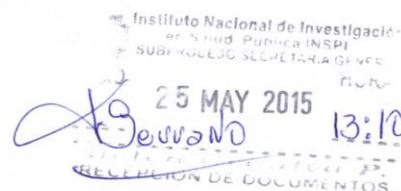
Esperando contar con su valiosa colaboración, reitero mis sentimientos de consideración y estimación.

Atentamente,


Q.F. HÉCTOR NÚÑEZ ARANDA, M.SC.
DECANO

c.c.: Lcdo. Javier Sánchez - DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

Elaborado: Tulya Verónica Chalén Rosas – Secretaria 1
Aprobado y Revisado: **Q.F. Héctor Núñez Aranda, M.Sc.** – Decano



Anexo II: Carta de entrega de la cepa de E. coli ATCC 25922.



CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

Oficio LABACT-469

Q. F. Hector Nuñez Aranda, M.SC.
Decano de la Facultad Ciencias Químicas de la Universidad

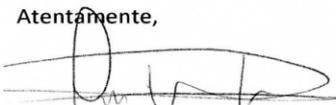
De mis consideraciones:

En respuesta al oficio FCQ-V-156 se hace entrega de cepa Bacteriana, la misma que serán utilizadas con fines de enseñanza académica universitaria, la misma que detallo a continuación:

- ***Escherichia coli* Atcc 25922**

Particular que pongo a su conocimiento para los fines pertinentes.

Atentamente,



Lcdo. Javier Sánchez
Responsable del C. R. N. Bacteriología

Anexo III: Estado higiénico de los puestos de venta de carne molida.



Carnes expuestas al medio ambiente sin control alguno.



Contacto directo de las carnes sin protección alguna por parte de los vendedores.



Mesón donde cortan las carnes en pésimo estado higiénico.



Equipo con el cual realizan el proceso de molienda de la carne.

Anexo IV: Elaboración del extracto alcohólico de propóleo.

	<p>Alcohol etílico de 96%.</p>
 	<p>Materiales e instrumentos utilizados.</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Alcohol etílico de 96%▪ Agua destilada▪ Propóleo▪ Probeta de 100 ml▪ Espátula▪ Balanza▪ Frasco ámbar de vidrio
	<p>Pesar propóleo.</p>
	<p>El propóleo pesado fue envasado en frasco ámbar de vidrio.</p>



Se midió alcohol etílico al 96% y se lo envaso en el respectivo recipiente.



El frasco con el propóleo y el alcohol listo para la maceración.

Se dejó macerar la solución durante 21 días (desde el 7 de julio hasta el 28 de julio) a 4°C en un lugar oscuro.



Filtrando la solución de propóleo.



La solución de propóleo filtrada

Anexo V: Siembra de la cepa de *E. coli* 25922.

	<p>Traslado de la cepa de <i>E. coli</i> 25922 desde el INSPI hacia la Facultad de Ciencias Químicas.</p>
	<p>Cepa de <i>E. coli</i> 25922 en medio de transporte de carbón.</p>
	<p>Materiales listos para la realización de la siembra.</p>
	<p>Sacar la cepa del envase en que fue transportado para luego realizar la respectiva siembra.</p>
	<p>Los agares en los que se sembró y la cepa de <i>E. coli</i>.</p>



Siembra de la cepa de *E. coli* en el agar TSB



Los tubos inoculados con la cepa de *E. coli*.

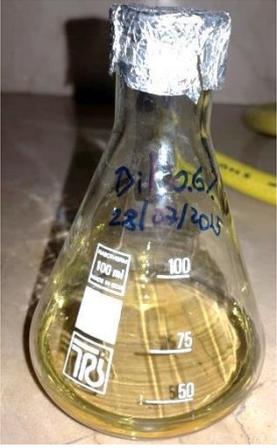


Los tubos inoculados fueron colocados en la incubadora a 35°C por 24 – 48 horas.

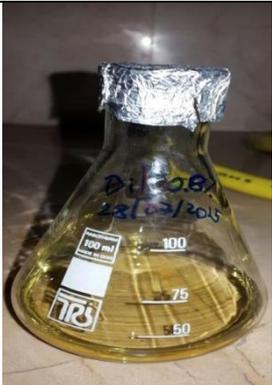


Los tubos inoculados.

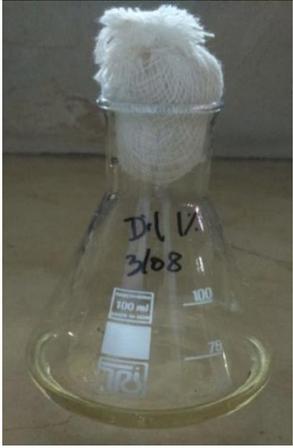
Anexo VI: Preparación de la dilución 0.6%.

	<p>Materiales usados en la preparación de la dilución.</p>
	<p>Preparación de la dilución.</p>
	<p>25 ml de la dilución 0.6% de propóleo.</p>

Anexo VII: Preparación de la dilución 0.8%.

	<p>Materiales usados en la preparación de la dilución.</p>
	<p>Preparación de la dilución.</p>
	<p>25 ml de la dilución 0.8% de propóleo.</p>

Anexo VIII: Preparación de la dilución 1.0%.

	<p>Materiales usados en la preparación de la dilución.</p>
	<p>Preparación de la dilución.</p>
	<p>25 ml de la dilución 1% de propóleo.</p>

Anexo IX: Imágenes de los materiales y equipos utilizados.

 <p>Carnes de res molida</p>	 <p>Balanza electrónica</p>
 <p>Aguas de peptona</p>	 <p>Agitador</p>
 <p>Petrifilm</p>	 <p>Pipeta automática, puntas estériles.</p>
 <p>Incubadora</p>	 <p>Dilución al 1% del extracto alcohólico de propóleo.</p>

Anexo X: Imágenes del procedimiento para los análisis de las muestras.

	<p>Muestras siendo transportadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la facultad de Ciencias Químicas.</p>
	<p>Las muestras siendo pesadas.</p>

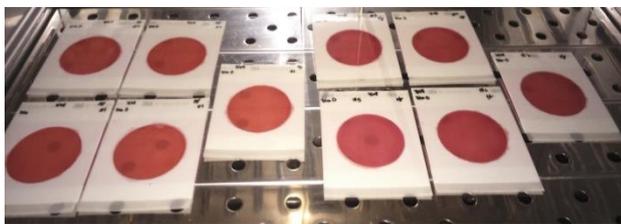
	<p>Añadiendo la dilución 1% del extracto alcohólico a las muestras.</p>
	<p>Agregando agua de peptona a las muestras que se van a analizar.</p>
	<p>Homogenizando las muestras.</p>
	<p>Codificando los Petrifilm.</p>



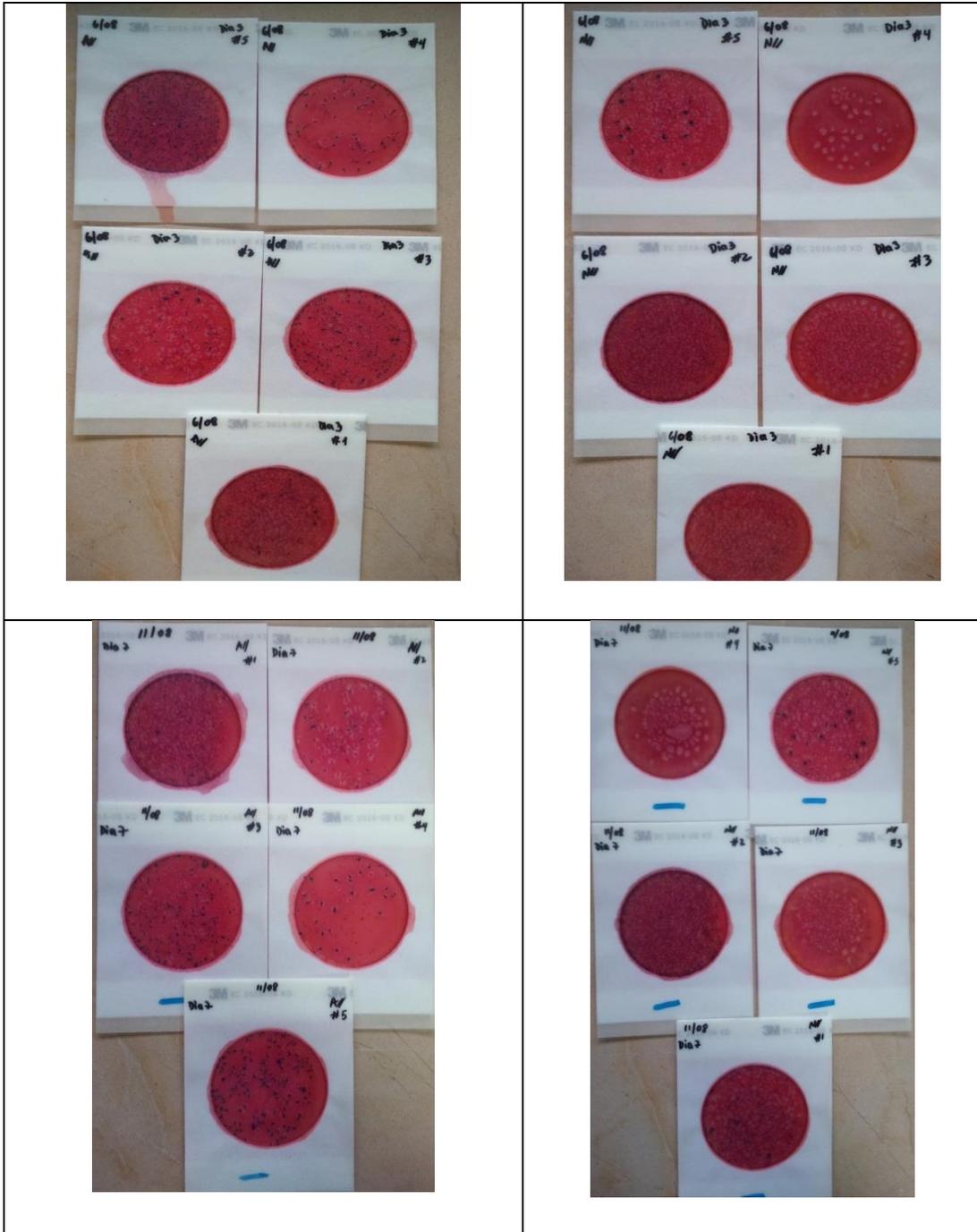
Realizando la siembra de las muestras.



Incubando las muestras



Anexo XI: Imágenes de los resultados de los Petrifilm.



Anexo XII: Hoja de Evaluación Sensorial.

Nombre: _____

Fecha: _____

Instrucciones:

- a) Se le presentarán 2 muestras codificadas de carne, una galleta de soda y un vaso con agua. Limpie su paladar con un poco de agua y galleta antes y después de cada muestra.
- b) Haga su evaluación de izquierda a derecha.
- c) Marque con una "X", según su evaluación, de las muestras de acuerdo con los atributos.

CATEGORÍA	PUNTAJE
Me disgusta extremadamente	1
Me disgusta mucho	2
Me disgusta moderadamente	3
Me disgusta poco	4
Ni me gusta ni me disgusta	5
Me gusta poco	6
Me gusta moderadamente	7
Me gusta mucho	8
Me gusta extremadamente.	9

Muestra 1: xxx	ATRIBUTOS				
	Color	Sabor	Textura	Jugosidad	Aceptación general
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

Muestra 2: xxx	ATRIBUTOS				
	Color	Sabor	Textura	Jugosidad	Aceptación general
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

Muchas gracias por su atención.

Anexo XIII: Degustación de las muestras.

