

Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerrectorado de  
**INVESTIGACIÓN**

ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

“CARACTERIZACIÓN DE LOS PROPÓLEOS DEL DISTRITO DE HUARAZ Y SU  
EFECTO CONSERVANTE EN YOGURT FRUTADO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:  
DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

AUTOR

INTI BARRETO JULIO CONSTANTINO

ASESOR:

LÓPEZ RÁEZ LUZ EUFENIA

JURADO:

DRA. NAUPAY VEGA MARLITT FLORINDA

DRA. ESENARRO VARGAS DORIS

DR. ZAMORA TALAVERANO NOE SABINO

LIMA - PERÚ

2019

## DEDICATORIA

A mi señora madre María Barreto, que fue una madre ejemplar y que solo repartió amor y comprensión en sus días de vida.

A ella... más allá de toda palabra, mi eterna gratitud.

A mí tía Victoria Barreto, por apoyo y cariño de su persona.

A mi hijo; Anthony, mi más preciado regalo de vida e inspiración

## AGRADECIMIENTO

A los apicultores del distrito de Huaraz, que han colaborado de manera desinteresada en la recolección de propóleo de sus apiarios para el estudio.

A la Dra. Luz Eufenia López Ráez, por su valioso tiempo que ha invertido en la asesoría, confianza y dominio durante el desarrollo de esta tesis.

A todos los estudiantes de la Escuela de Ingeniería de Industrias Alimentarias y amigos participaron de manera directa en la evaluación de sensorial del producto.

A todos mis profesores del doctorado que impartieron sus conocimientos y experiencias en el desarrollo de clases, las cuales han hecho posible que hoy culmine una etapa de mi vida, un sueño más.

**INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN..</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT..</b> .....	<b>xv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Planteamiento de problema.....</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 Descripción del problema .....</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 Formulación del problema .....</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.1 Problema general.....</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.2 Problema específico .....</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4 Antecedentes.....</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Justificación de la investigación.....</b> .....	<b>24</b>
<b>1.6 Limitaciones de la investigación.....</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7 Objetivos.....</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7.1 Obetivo general.....</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7.2 Objetivos específicos.....</b> .....	<b>28</b>
<b>1.8 Hipótesis.....</b> .....	<b>28</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Marco conceptual .....</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.1 Propóleos.....</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.2 Utilización del propóleos en las colmenas .....</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2.3 Composición de propóleos.....</b> .....	<b>31</b>

2.2.4	Compuestos fenólicos.....	32
2.2.5	Flavonoides.....	33
2.2.6	Propiedad antimicrobiana de flavonoides en extractos de propóleos.....	34
2.2.7	Actividad antibacteriana y antifúngica.....	34
2.2.8	Usos de propóleos .....	35
2.2.9	Extracto etanólico de propóleos o tintura de propóleos .....	36
2.2.10	Yogurt .....	37
2.2.11	Vida útil .....	38
2.2.12	Evaluación sensorial .....	38
III.	MÉTODOS .....	40
3.1	Tipos de investigación.....	40
3.2	Población y muestra .....	40
3.3	Operacionalización de variables.....	41
3.4	Instrumentos.....	42
3.4.1	Instrumentos de recolección de datos .....	42
3.4.2	Materiales y equipos .....	43
3.4.3	Métodos de análisis .....	44
3.4.3.1	Caracterización físico-química de propóleos.....	44
3.4.3.2	Análisis microbiológico.....	46
3.4.3.3	Análisis sensorial de un yogurt batido frutado con propóleos.....	47
3.4.4	Métodos de investigación.....	47
3.5	Procedimiento .....	47

<b>3.5.1</b>	<b>Diseño de investigación.....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Obtención de extracto etanólico de propóleos .....</b>	<b>51</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Evaluación del efecto conservante del extracto etanólico de propóleos en un yogurt batido frutado .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6</b>	<b>Análisis de datos .....</b>	<b>56</b>
<b>3.7</b>	<b>Consideraciones éticas.....</b>	<b>56</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Contrastación de hipótesis.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Caracterización físico-química de propóleos.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Evaluación del efecto conservante del extracto etanólico de propóleos en un yogurt batido frutado .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Análisis sensorial de un yogurt batido frutado con propóleos .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>Análisis e interpretación .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Características físico-químicas de propóleos recolectados.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Vida útil microbiológico del yogurt frutado con extracto etanólico de propóleo .....</b>	<b>72</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Características sensoriales del yogurt frutado .....</b>	<b>81</b>
<b>4.2.3.1</b>	<b>Atributo color .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2.3.2</b>	<b>Atributo olor .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.3.3</b>	<b>Atributo sabor. ....</b>	<b>90</b>
<b>4.3.3.4</b>	<b>Atributo aceptabilidad .....</b>	<b>93</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS. ....</b>	<b>98</b>

<b>5.1</b>	<b>Características físico-químicas de propóleos recolectados.....</b>	<b>98</b>
<b>5.2</b>	<b>Vida útil microbiológico del yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos .....</b>	<b>100</b>
<b>5.3</b>	<b>Características sensoriales del yogurt frutado .....</b>	<b>106</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>120</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Variables, dimensiones e indicadores .....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 2. Promedio de los análisis físico-químicos de las muestras de propóleos .....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 3. Fenoles totales de propóleos del distrito de Huaraz .....</b>	<b>65</b>
<b>Tabla 4. Análisis de varianza (AVONA) de fenoles totales de las tres muestras .....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 5. Medias de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 6. Comparaciones en parejas de Tukey de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de 95%. .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 7. Flavonoides totales de propóleos del distrito de Huaraz.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 8. Análisis de varianza (AVONA) de flavonoides totales de las tres muestras .....</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 9. Medias de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 10. Comparaciones en parejas de Tukey de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de 95%. .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 11. Análisis microbiológico de muestras almacenadas en refrigeración inicio .</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 12. Análisis microbiológico de muestras almacenadas en refrigeración días .....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 13. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración días .....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 14. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración días .....</b>	<b>76</b>

<b>Tabla 15. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 28 días .....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 16. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 35 días .....</b>	<b>79</b>
<b>Tabla 17. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 42 días .....</b>	<b>80</b>
<b>Tabla 18. Control de pH en diferentes muestras con adición de extracto etanólico de propóleo .....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 19. Análisis de varianza (AVONA) del atributo color de los cinco tratamientos .....</b>	<b>85</b>
<b>Tabla 20. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de atributo color .....</b>	<b>86</b>
<b>Tabla 21. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95% - atributo color. ....</b>	<b>87</b>
<b>Tabla 22. Análisis de varianza (AVONA) del atributo olor de los cinco tratamientos</b>	<b>89</b>
<b>Tabla 23. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4.....</b>	<b>90</b>
<b>Tabla 24. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95%.....</b>	<b>90</b>
<b>Tabla 25. Análisis de varianza (AVONA) del atributo sabor de los cinco tratamientos .....</b>	<b>92</b>
<b>Tabla 26. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4.....</b>	<b>93</b>
<b>Tabla 27. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95%.....</b>	<b>94</b>

<b>Tabla 28. Análisis de varianza (AVONA) del atributo aceptabilidad de los cinco muestras .....</b>	<b>96</b>
<b>Tabla 29. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4.....</b>	<b>97</b>
<b>Tabla 30. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95%.....</b>	<b>97</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Obtención de los diferentes tratamientos - propóleos.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 2. Obtención de los diferentes tratamientos-vida útil.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 3. Obtención de los diferentes tratamientos-sensorial.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 4. Diagrama de flujo para elaboración de aguaymanto .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 5. Diagrama de flujo para obtención de yogurt frutado.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 6. Fenoles totales de muestras de propóleos.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 7. Gráfica de distribución de fenoles totales entre muestras .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 8. Valores individuales de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de fenoles totales .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 9. Gráfica de intervalos de Muestra 1, Muestra 2 y muestra 3 de fenoles totales .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 10. Flavonoides totales de muestras de propóleos.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 11. Gráfica de distribución de Flavonoides totales entre muestras.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 12. Valores individuales de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de fenoles totales .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 13. Intervalos de muestra 1, muestra 2 y muestra 3.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 14. Crecimiento de la levadura en las cinco muestras .....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 15. Crecimiento de la levadura en la muestra testigo T0.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 16. Crecimiento de la levadura en el tratamiento T4 .....</b>	<b>82</b>

<b>Figura 17. Evaluación sensorial del atributo color de los cinco tratamientos .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 18. Diferencias de medias ICs simultáneos de 95% de tukey atributo color. ..</b>	<b>87</b>
<b>Figura 19. Valores individuales de los cinco tratamientos - atributo color .....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 20. Evaluación sensorial del atributo olor de los cinco tratamientos .....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 21. Diferencia de las medias ICs simultáneos de 95% de Tukey - atributo olor .....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 22. Valores individuales de los cinco tratamientos de atributo olor.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 23. Evaluación sensorial del atributo sabor de los cinco tratamientos .....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 24. Diferencia de las medias de ICs simultáneos de 95% de tukey de atributo sabor.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 25. Valores individuales de los cinco tratamientos de atributo sabor .....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 26. Evaluación sensorial del atributo aceptabilidad de los cinco tratamientos .....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 27. Diferencia de las medias ICs simultáneos de 95% de tukey-Atributo aceptabilidad.....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 28. Valores individuales de los cinco tratamientos- aceptabilidad.....</b>	<b>98</b>

**INDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo 1. Imagen de las tres muestras .....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo 2. Imagen de 200g de cada una de las muestras para el análisis físico-químico .....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo 3. Resultado de los análisis físico-químico de los propóleos .....</b>	<b>124</b>
<b>Anexo 4. Imagen de las muestras de yogurt frutado .....</b>	<b>128</b>
<b>Anexo 5. Imagen de las muestras de yogurt frutado sin y con extracto etanólico de propóleos .....</b>	<b>128</b>
<b>Anexo 6. Análisis microbiológico de las muestras de yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos .....</b>	<b>129</b>
<b>Anexo 7. Procedimiento para el análisis microbiológico de las muestras de yogurt frutado .....</b>	<b>131</b>
<b>Anexo 8. Ficha de evaluación sensorial .....</b>	<b>134</b>
<b>Anexo 9. Resultado de la evaluación sensorial por atributo (1) .....</b>	<b>135</b>
<b>Anexo 10. Resultado de la evaluación sensorial por atributo (2) .....</b>	<b>136</b>
<b>Anexo 11. Promedio de evaluación sensorial de los tratamientos por atributo .....</b>	<b>137</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se planteó como objetivo investigar las características físico-químicas de propóleos recolectados de los centros apícolas del distrito de Huaraz para seleccionar el mejor tratamiento, luego evaluar su efecto conservante de propóleos en la prolongación de la vida útil y sensorial en un yogurt frutado. Se recolectó muestras de propóleos de 40 y 70 colmenas de los centros apícolas de Huypishca, Ichoca y Quenuayoc; luego se realizó el análisis físico-químico con espectrofotómetro UV para determinar fenoles, flavonoides, ceras, resinas, impurezas mecánicas, análisis de humedad y cenizas. Se empleó el alcohol etílico de 95° para la obtención de extracto etanólico de propóleos del mejor tratamiento y se utilizó dicho extracto la evaluar la vida útil del yogurt frutado. El físico-químico de nuestra M1 seleccionada del Centro apícola de Huypishca es: 7,31g de ácido gálico/100g muestra de fenoles totales y 10,16g de quercetina/100g muestra de flavonoides totales, humedad 3,56%, cenizas 3,1%, ceras 34%, resinas 57%, impurezas mecánicas 18,8%. La vida útil del yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos tratamiento T4 es 14 días, conservando a temperatura de refrigeración de 4 - 5°C similar al yogurt frutado comercial de los pequeños fabricantes de la ciudad de Huaraz. Estadísticamente se ha demostrado en los atributos color, olor, sabor y aceptabilidad a un nivel de confianza de 95% de Tukey existe una diferencia estadísticamente significativa entre la muestra T0 yogurt frutado sin EEP y los tratamientos T1 yogurt frutado con 0,4% EEP, T2 yogurt frutado con 0,8% EEP, T3 yogurt frutado con 1,2% EEP y T4 yogurt frutado con 1,6% EEP.

Palabra clave: caracterización, propóleos, fenoles, antimicrobiano, vida útil, yogurt frutado.

## ABSTRACT

In the present work the objective was to investigate the physico-chemical characteristics of propolis collected from the beekeeping centers of the Huaraz district to select the best treatment, then to evaluate its preservative effect of propolis in the prolongation of the useful life and sensory in a yogurt fruity. Samples of propolis from 40 and 70 beehives were collected from the apiculture centers of Huypishca, Ichoca and Quenuayoc; then the physical-chemical analysis was performed with a UV spectrophotometer to determine phenols, flavonoids, waxes, resins, mechanical impurities, moisture and ash analysis. The 95° ethyl alcohol was used to obtain the ethanol extract of propolis for the best treatment and this extract was used to evaluate the shelf life of fruity yogurt. The physicist-chemist of our M1 selected from the Beekeeping Center of Huypishca is: 7,31g of gallic acid/100g sample of total phenols and 10,16g of quercetin/100g sample of total flavonoids, moisture 3,56%, ashes 3,1 %, waxes 34%, resins 57%, mechanical impurities 18,8%. The shelf life of fruity yogurt with 1,6% ethanol extract of propolis treatment T4 is 14 days, keeping at a refrigeration temperature of 4-5°C similar to the commercial fruity yogurt of the small manufacturers of the city of Huaraz. Statistically it has been demonstrated in the attributes color, smell, taste and acceptability at a level of confidence of 95% of Tukey there is a statistically significant difference between the sample T0 fruity yogurt without EEP and the treatments T1 fruity yogurt with 0,4% EEP, T2 fruity yogurt with 0,8% EEP, T3 fruity yogurt with 1,2% EEP and T4 fruity yogurt with 1,6% EEP.

Keyword: characterization, propolis, phenols, antimicrobial, shelf life, fruity yogurt.

## I. INTRODUCCIÓN

El propóleo es un material pegajoso, gomoso, resinoso, de color variable marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, amarillo verdoso, castaño, rojizo e incluso negro que depende de su origen; tiene aroma a yemas de especies arbóreas como, miel, ceras y vainilla, igualmente puede tener sabor amargo (Vázquez, 2010)

En el distrito de Huaraz existen plantas silvestres y árboles de eucalipto (*Eucalyptus* spp), pino (*Pinus* sp.), molle (*Lithaea molleoides*) y otros, estas vegetaciones son diferentes en los lugares donde existen centros apícolas. Sin embargo, la composición química del propóleos es altamente variable y depende exclusivamente de la flora local del sitio de recolección, tanto en los brotes, ramas, cortezas y flores (Kumazawa *et al.*, 2004; Papotti *et al.*, 2012). Las más importantes fuentes botánicas del propóleos en regiones templadas son el álamo (*Populus* spp.), abedul (*Betula alba*), sauce (*Salix* spp.), pino (*Pinus* spp.), encino (*Quercus* spp.), fresno (*Fraxinus* s pp.), entre otros árboles (Farré *et al.*, 2004; citados por Vargas, Torrescano y Sánchez, 2013).

Los propóleos tienen un efecto importante sobre una gran variedad de microorganismos tales como bacterias, hongos, virus y levaduras; que ha sido ampliamente comprobado y demostrado que el efecto dependiendo de la composición química que posee (Kumar *et al.*, 2008; Viuda-Martos *et al.*, 2008; citados por Vargas, Torrescano y Sánchez, 2013).

La recolección del propóleos viene a ser una actividad de las abejas pecoreadoras, que extraen las sustancias de las yemas de las plantas con sus mandíbulas y con el apoyo del primer par de patas, con la secreción de glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) permite el ablandamiento para tritararlo y transportarlo a las

cestillas, después que ingresan a la colmena, se dirigen a sitios donde se requiere de este producto y permanecen quietas mientras las abejas propolizadoras toman partículas de la sustancia para comprimirlas y agregarles cera procediendo al propolizado (Bedascarrasbure et al., 2000a; citado por Yoong , 2004).

Aguilar *et al.* (2011), los autores en su investigación reportan que la aplicación del tratamiento térmico (T1) y la adición de propóleos (T2, T3, T4), nisina (T5, T6 y T7) y aceites esenciales (T8, T9 y T10) permitieron controlar la contaminación microbiológica y prolongar la vida útil del jugo de sábila hasta 90 días tanto a 10 como a 25°C.

En algunos estudios se han demostrado el efecto de los extractos de propóleos sobre ciertas bacterias y hongos, así como patógenos de interés alimentario, por su capacidad que tienen para prevenir o retardar reacciones de oxidación; lo cual los convierte en productos naturales potencialmente atractivos para ser utilizados como conservadores alimentarios en sustitución de los aditivos sintéticos (Vargas, Torrescano y Sánchez, 2013).

La actividad antibacteriana del propóleo ha sido confirmada por numerosos estudios científicos, contra las gram positivas (*Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*), gram negativas (*Salmonella typhi*, y *Pseudomonas aeruginosa*); sean aeróbicas o anaeróbicas; pero la composición de los propóleos puede variar considerablemente de su origen botánico.

Los yogures son productos que se obtienen por las fermentaciones ácido-lácteas de leche pasteurizada descremada, con la acción de los microorganismos *Lactobacilus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, con o sin agregados

opcionales de leche entera o descremada en polvo, suero en polvo, etc (OMS y FAO, 2011).

El propósito de la presente investigación está referido a la caracterización de los propóleos de los tres centros apícolas del distrito de Huaraz, luego conocer efecto conservante del extracto etanólico del propóleos en la vida útil y la aceptación del yogurt frutado por los panelistas semientrenados. Además, se realizará análisis microbiológico con el propósito de determinar los hongos, levaduras y coliformes totales en el yogurt frutado con la adición de 0,4%, 0,8%, 1,2% y 1,6% de extracto etanólico de propóleos.

### **1.1 Planteamiento del problema**

El propóleos recolectado por las abejas melíferas es una sustancia resinosa y altamente adhesiva; esta sustancia colectada es transformada y usada por las abejas para lacrar los agujeros, fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores y proteger la entrada contra los roedores (Burdock, 1998; citado por Palomino, 2009).

En la actualidad, la tintura de propóleos se ofrece como producto natural a un costo menor que los productos farmacéuticos que se encuentran en el mercado; pero este tema ha sido abordado por otros autores y han reportado que la actividad antimicrobiana del propóleos depende de sus componentes fenólicos, los cuales varían en su composición físico-química, según la ubicación geográfica y la estación de recolección que se realiza. Una de las propiedades más importante del propóleos es su actividad antimicrobiana, la cual se atribuye fundamentalmente a los flavonoides.

En la ciudad de Huaraz se consumen tintura de propoleo (extracto etanólico de propoleo) como antibiótico para resfríos, pero su actividad antimicrobiana no ha sido

científicamente evaluada; por lo que es necesario obtener y realizar la caracterización físico-química de los propóleos procedentes de los centros apícolas y luego comprobar su efecto conservante en un alimento perecible como yogurt frutado.

La tintura o extracto etanólico de propóleos que se consume como antibactericida no está incluido en la Norma Técnicas Peruana.

El consumo de yogurt aumenta cada día más regional, nacional y mundial, debido a sus propiedades nutricionales como proteínas, calcio y bacterias benéficas; pero este producto tiene corta vida útil a temperatura de refrigeración.

No se ha realizado ningún estudio en los centros apícolas del distrito de Huaraz, respecto a la caracterización físico-químico como la evaluación de su efecto antimicrobiano de acuerdo al contenido de flavonoides.

## **1.2 Descripción del problema**

El propóleos es un material pegajoso, gomoso, resinoso, de color variable marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, amarillo verdoso, castaño, rojizo e incluso negro dependiendo de su origen; su aroma a yemas de especies arbóreas como, miel, ceras y vainilla, también puede tener sabor amargo (Vázquez, 2010). La recolección es de las exudaciones o secreciones de origen vegetal (yemas, corteza, ramas, frutos jóvenes, etc.) realizada por la abeja (*Apis mellifera*) y son mezcladas las exudaciones con otros agentes como polen y enzimas se tiene lugar una modificación física y química (Bankova et al., 1999; Bedascarrasbure et al., 2006; Dausch Andreas et al., 2007; Gustafson et al., 1992; Hegazi, 2000; Normas IRAM 2002; Salamanca Grosso et al, 2000; Salgado Laurenti et al., 2003; Von Frisch, 1999; Whiterell, 1975, citado por Vázquez, 2010).

Otros autores citan como menos frecuentes a *Eucalyptus* spp., Castaño Silvestre (*Aesculus hippocastanum*), Abedul (*Betula* spp.), Aliso (*Alnus* spp.), Olmo (*Ulmus* spp.), Acacia (*Robinia pseudoacacia*), Alerce (*Picea* sp.), Pino (*Pinus* sp.), Fresno (*Fraxinus* sp.), Cerezo (*Prunus avium*), Ciruelo (*Prunus domestica*), Abeto (*Abies* sp.), Sauce (*Salix* spp.), Roble (*Quercus* spp.), Acacia (*Gleditsia triacanthos*) (Bonvehi *et al.*, 1994, Koenig; citado por Vázquez, 2010). Se sabe también que las colmenas ubicadas en bosques cuentan con mayor cantidad de propóleos que las que se encuentran en otros lugares (Hegazi, 2000; citado por Vázquez, 2010).

En el distrito de Huaraz existen plantas silvestres y árboles de eucalipto (*Eucalyptus* spp), pino (*Pinus* sp.), molle (*Lithaea molleoides*) y otros, estas vegetaciones son diferentes en los lugares donde existen centros apícolas. Sin embargo, la composición química de este producto apícola es altamente variable y depende de la flora local del sitio de recolección, tanto en brotes como en ramas, cortezas y flores (Kumazawa *et al.*, 2004; Papotti *et al.*, 2012). Las más importantes fuentes botánicas del propóleos en regiones templadas son el álamo (*Populus* spp.), abedul (*Betula alba*), sauce (*Salix* spp.), pino (*Pinus* spp.), encino (*Quercus* spp.), fresno (*Fraxinus* spp.), entre otros árboles (Farré *et al.*, 2004; citados por Vargas, Torrescano y Sánchez, 2013).

El efecto de los propóleos sobre una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos, virus y levaduras) ha sido ampliamente comprobado y se ha demostrado que el efecto depende de la composición química (Kumar *et al.*, 2008; Viuda-Martos *et al.*, 2008; citados por Vargas, Torrescano y Sánchez, 2013).

Maidana, (2000); Markham *et al.*, (1995); citado por Vázquez, (2010), indica que es escasa la información que obtuvo acerca de la cuantificación y utilización de los componentes individuales del propóleos.

### 1.3 Formulación del problema

#### Problema general

¿Cuáles serán las características físico-químicas de propóleos recolectados de cada centro apícola del distrito de Huaraz y cuál es su efecto conservante en la vida útil en un yogurt frutado?

#### Problemas específicos

1. ¿Cuáles son las características físico-químicas de propóleos recolectados de los centros apícolas del distrito de Huaraz?
2. ¿Cuál es el efecto conservante del extracto etanólico de propóleos en la vida útil de un yogurt frutado?
3. ¿Cuáles son las características sensoriales de un yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos?

### 1.4 Antecedentes

#### Antecedentes Internacionales

Gutiérrez (2012), Evaluación del efecto de propóleos como bio-preservante en chorizo. El autor dice que los propóleos presentan actividad similar a los nitritos, controlando el desarrollo de microorganismos dentro de la matriz cárnica, muestran capacidad antioxidante y control de producción de bases volátiles nitrogenadas (BVT-N), finalmente la aceptación del producto por los panelistas sugiere que es posible su aplicación en productos comerciales.

Ayala y Macay (2010), Efecto de extractos de propóleos y miel de abeja (*Apis mellifera*) en las propiedades físicas y sensoriales de una salchicha de desayuno con

dos niveles de grasa. Los autores reportan que no existieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos en las mediciones de: nivel de purga, pH, rendimiento de cocción y aerobios mesófilos totales; también presentaron un efecto en la aceptación general siendo el tratamiento 5 % miel y 22 % de grasa el preferido por los panelistas en comparación con el tratamiento control y 30 % de grasa.

Gerónimo (2009), Comparación del efecto antimicrobiano de propóleos y el benzoato de sodio en mermelada de mango de la Escuela Agrícola Panamericana. El autor reporta que los panelistas prefirieron el tratamiento con benzoato de sodio y con 11% de propóleos en evaluaciones sensoriales, en el análisis microbiológico encontró que no existe diferencia significativa estadísticamente entre los cuatro tratamientos para el crecimiento de mohos y levaduras.

Gómez *et al* (2014), Evaluación por dos métodos *in vitro* de actividad antimicrobiana de propóleos frente a algunos microorganismos de interés alimentario. Los autores indican que el extracto etanólico de propóleos (EEP) presentó un efecto antibacterial con mayor eficacia contra las bacterias gram positivas utilizadas, determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) del 20% y la técnica de dilución en tubos demostró que los propóleos presentan mayor efecto en líquidos lo que puede tener una aplicación importante en alimentos.

Martínez, Fajardo y Pérez (2005), Obtención de tintura de propóleos en las plantas de productos naturales. Los autores manifiestan que la extracción fue realizada con mezcla hidroalcohólica en un proceso de extracción sólido-líquido, se ensayaron dos concentraciones de la mezcla y tres tiempos de extracción; los mejores resultados se obtuvieron a 56 h, con la mezcla hidroalcohólica 85°GL y a una temperatura entre 45-50 °C, no fue necesario realizar ninguna modificación del equipamiento existente en estas plantas para la obtención de estos resultados.

Carrillo, Castillo y Mauricio (2011), Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). Los autores mencionan que usaron cepas de microorganismos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*; y microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*.; la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleos fue de 0,93 mg mL<sup>-1</sup> para las Gram positivas y 7,5 mg mL<sup>-1</sup> para las Gram negativas, en el extracto acuoso fue 20 mg mL<sup>-1</sup> para Gram positivas y 30 mg mL<sup>-1</sup> para Gram negativas; por tanto los extractos etanólicos de propóleos tienen una actividad antibacteriana significativamente mayor que los extractos acuosos, y esta actividad depende de su procedencia y de la especie bacteriana evaluada.

Aguilar *et al.* (2011), Vida útil del jugo de sábila (Aloe vera MILL), en presencia de propoleo, citracidin y nisina, Los autores indican que la aplicación del tratamiento térmico (T1) y la adición de propóleos (T2, T3, T4), nisina (T5, T6 y T7) y aceites esenciales (T8, T9 y T10) permitieron controlar la contaminación microbiológica y prolongar la vida útil del jugo de sábila hasta 90 días tanto a 10 como a 25°C; el uso de las diferentes concentraciones de propóleos, Nisina y aceites esenciales en el jugo de sábila no causó cambios significativos en las características de acidez titulable, pH, °Brix, azúcares totales, densidad óptica y en el perfil cromatográfico de azúcares.

#### **Antecedentes Nacionales.**

Vásquez *et al.* (2014), Aceptabilidad de una bebida de maíz morado variedad canteño (*Zea Mays* L.) endulzada con Stevia (*Stevia rebaudiana* B.) y propóleos como potencial conservante. Los autores demostraron que de acuerdo a la metodología de diseño de mezclas simplex con Centroides Ampliado, los rangos

óptimos para una buena aceptabilidad de una bebida de maíz morado fueron los valores de concentraciones 0.3 a 0.67 g/1000mL de propóleos, de 3,6 a 4,1 g/1000mL de Stevia y de 1, 92 a 2,33 g/1000mL de Ácido cítrico.

Rengifo (2013), Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. El autor demostró que el extracto etanólico de propóleos contiene en su composición flavonoides al presentar respuestas positivas en todas las pruebas realizadas y el porcentaje obtenido de flavonoides totales expresados en quercetina fue 8,71 g/100g de extracto seco.

Soto (2015), Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. El autor reporta que los fenoles y flavonoides totales cuantificó con el método de Folin-Ciocalteu y el de formación de complejos con  $AlCl_3$  al 2 %, respectivamente y encontró una alta diversidad de metabolitos secundarios como catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos en los extractos etanólicos de propóleos de Piura, Ayacucho y Pucallpa; además de encontró alcaloides (Piura), saponinas (Pucallpa) y quinonas (Piura y Ayacucho), el contenido de fenoles y flavonoides totales osciló entre los valores de  $60.5 \pm 0.10$  hasta  $78.6 \pm 0.20$  mg de GAE/g de EEP y  $28.5 \pm 0.10$  hasta  $42.5 \pm 0.10$  mg QE/g EEP respectivamente; y el extracto etanólico del propóleos proveniente de Ayacucho presentó mayor contenido de fenoles y flavonoides totales.

## **1.5 Justificación de la investigación**

### **Justificación**

El propóleo por ser un producto natural recibe la denominación GRAS (generalmente reconocido como seguro). En algunos estudios se han demostrado el efecto de los extractos de propóleos sobre ciertas bacterias y hongos, así como

patógenos de interés alimentario, por su capacidad que tienen para prevenir o retardar reacciones de oxidación; lo cual los convierte en productos naturales potencialmente atractivos para ser utilizados como conservadores alimentarios en sustitución de los aditivos sintéticos.

La actividad antibacteriana del propóleo ha sido confirmada por numerosos estudios científicos, contra las gram positivas (*Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*), gram negativas (*Salmonella typhi*, y *Pseudomonas aeruginosa*); sean aeróbicas o anaeróbicas, aunque la composición de los propóleos puede variar considerablemente de acuerdo a su origen botánico.

Por otra parte, la Apicultura en el distrito de Huaraz y del país es una de las actividades económicas más importantes, la alternativa de conocer las propiedades del propóleo de esta región para impulsar su aprovechamiento es un aspecto de gran interés para la industria alimentaria.

Es factible la caracterización físico-química del propóleo, puesto que se está incrementando la producción de propóleos en los centros apícolas del distrito de Huaraz. Además, se ha desarrollado una tecnología adecuada para la extracción de extracto etanólico de propóleos y con ello obtendrá productos de calidad e higiene; que puede ser utilizado como conservante natural para bebidas perecibles como yogurt frutado.

### **Importancia**

En la actualidad, es importante la búsqueda de nuevas fuentes antibacteriano para la prevención del crecimiento de los microorganismos que afectan la calidad de los productos lácteos como el yogurt y no tóxicas para los consumidores.

Los propóleos se han utilizado en muchas oportunidades como bactericida debido a su amplio halo de inhibición y que funciona como un buen conservante de bebidas no alcohólicas y no fermentadas; pero no existe en el mercado nacional algunas bebidas alimenticias que contengan conservante natural.

El interés de la presente investigación radica en el análisis físico-química de propóleos de los centros apícolas del distrito de Huaraz, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la composición y posible uso como conservante antibacteriano en una bebida no fermentada como yogurt. Además, con este estudio se conocerá la calidad de los propóleos y su valor potencial como conservante natural, para ser utilizado como aditivo en la industria alimentaria en reemplazo de conservante químico.

La actividad antimicrobiana usada para alimentos no ha sido científicamente evaluada; por lo que es necesario obtener y realizar la caracterización físico-química de los propóleos procedentes de los centros apícolas y luego comprobar su efecto conservante en un alimento perecible como yogurt frutado.

El resultado en esta investigación radica en generar interés de los apicultores de la región Ancash, para que los subproductos como el propóleos de las colmenas de abejas tengan mejor uso como aditivo natural en la industria alimentaria.

Asimismo, la investigación pretende demostrar que el extracto de propóleos utilizado como conservante natural, incrementa la vida útil del yogurt frutado que elaboran los pequeños productores locales y regionales del país. Además, con este aditivo se evitará el deterioro de los yogures que no tienen conservante químico y se ofrecerá productos de calidad para la salud humana.

## **1.6 Limitaciones de la investigación**

Durante el desarrollo de la investigación se presentaron algunas limitaciones:

- La disponibilidad de propóleos en las colmenas de abejas es en junio y julio, después es escasa su recolección. Además, los apicultores tienen desconfianza y son reacios en facilitar la recolección de muestras para su caracterización.
- En la mayoría de los centros apícolas la recolección de propóleos bruto, se realiza por el método de raspado que es de menor calidad por la presencia de impurezas; porque en el lugar de estudio no existe la producción de propóleos por método de mallas que es de mejor calidad.
- Existen pocos laboratorios en las universidades nacionales que cuentan con los reactivos y equipos necesarios para efectuar los análisis físico-químicos de propóleos en bruto, que dificultó la ejecución de la investigación.
- En la Norma Técnica Peruana, no se tiene incluido el protocolo de análisis de físico-químico de propóleos, pero en otros países limítrofes si existen.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo General**

Investigar las características físico-químicas de propóleos recolectados de los centros apícolas del distrito de Huaraz para seleccionar el mejor tratamiento, luego evaluar su efecto conservante de propóleos en la prolongación de la vida útil y sensorial en un yogurt frutado.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- Determinar las características físico-químicas de propóleos recolectadas de cada centro apícola del distrito de Huaraz y seleccionar el propoleo con mayor contenido de flavonoides.
- Evaluar el efecto conservante del extracto etanólico de propóleos con mayor contenido flavonoides totales en la vida útil de un yogurt frutado.
- Efectuar la evaluación sensorial de un yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de flavonoides totales

## **1.8 Hipótesis**

### **Hipótesis general**

Las características físico-químicas del propóleos del distrito de Huaraz y su extracto etanólico tienen efecto conservante en la prolongación de la vida útil y sensorial en un yogurt frutado.

### **Hipótesis específico**

1. Los contenidos de fenoles y flavonoides de las tres muestras recolectadas de los centros apícolas del distrito de Huaraz mediante el análisis físico-químico son iguales.
2. El extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales tienen efecto conservante en la vida útil de un yogurt frutado.
3. El extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales tienen efecto en las características sensoriales de un yogurt frutado.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Marco conceptual

#### 2.1.1 Propóleos

El propóleo es un producto elaborado por las abejas que “son mezclas complejas de resinas, ceras, aceites esenciales, polen y microelementos, de consistencia viscosa y de color verde, pardo, castaño, rojizo e incluso puede ser casi negro, dependiendo de su origen botánico” (Fernández, 2001).

Al considerar factores de seguridad “se ha reportado que varios compuestos de los propóleos están presentes en aditivos nutricionales y/o alimentos y son considerados” GRAS (generalmente reconocidos como seguros) (Bankova, 2000; citado por Suarez, Jiménez y Díaz, 2013). Estas características hacen de los propóleos “sean atractivos para la conservación natural en aplicaciones alimenticias nuevas y para poder satisfacer la demanda de antioxidantes y antimicrobianos, que nace de una conciencia creciente de consumidores de alimentos naturales y la omisión de procesamientos y conservantes químicos” (Tosi, Ortega y Cazzoli, 2007, Kalogeropoulos *et al.*, 2009; citado Suarez, Jiménez y Díaz, 2013).

El propóleo “es una resina oscura y pegajosa, sustancia recolectada por las abejas pecoreadoras en sus patas traseras de las yemas de las hojas, ramitas, lesiones de tronco y árboles; son llevados a su colonia, donde se combina con cera y es utilizado por obreras ‘colmenas’ para sellar y esterilizar la cámara de cría de la colonia” (Sorkun, Süer y Salih, 2001; citado por Tamiz *et al.*, 2013). El propóleo “contiene una variedad de compuestos químicos como los polifenoles (flavonoides, agliconas, ácidos fenólicos y sus ésteres, fenólicos, aldehídos y alcoholes), terpenoides,

esteroides, amino ácidos, y compuestos inorgánicos” (Kartal, Yıldız, Kaya *et al.*, 2003; citado por Tamiz *et al.*, 2013).

Havsteen (2002) planteó que “existe aproximadamente 18 componentes y se señaló entre los principales compuestos del tipo flavonoide tales como las flavonas, flavones y las flavononas, propiedades muy importantes del propóleo fue su actividad antimicrobiana, la cual fue atribuida fundamentalmente a los flavonoides”.

La Universidad Nacional de Tokio de Japón fue uno de los pioneros en la investigación de las propiedades del propóleo, allí “se analizó muestras de propóleos del mundo; en industria alimentaria está legalizado como Suplemento Dietario como conservante, pero en medicina continúan los estudios de investigación” (Yanucci, 2013; citado por Saltos, 2015).

El propóleo de acuerdo a la información publicada por la FAO (2003) indica:

El producto es originado de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, colectadas por abejas melíferas, de brotes y exudaciones de corteza, hojas y otras partes de las plantas, a las cuales las abejas agregan secreciones salivales y cera para la elaboración final del propóleo. Está compuesto de cera de abejas melíferas, resinas, productos balsámicos, aceites esenciales, polen y micro elementos.

Bedascarrasbure *et al.* (2000a); citado por Yoong (2004) define que “el propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica colectada por las abejas melíferas a partir de brotes de corteza, hojas y otras partes de arbustos silvestres, árboles”

En un estudio publicado por Bedascarrasbure *et al.* (2000a); citado por Yoong (2004) afirma:

La recolección del propóleo es una actividad de las pecoreadoras, que extraen con sus mandíbulas sustancias de las yemas y con ayuda del primer par de patas,

la secreción de glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) que permite el ablandamiento para tritarlo y transportarlo a las cestillas, después que ingresan a la colmena, se dirigen a sitios donde se requiere de este producto y permanecen quietas mientras las abejas propolizadoras toman partículas de la sustancia para comprimirlas y agregarles cera procediendo al propolizado.

### **2.1.2 Utilización del propóleo en las colmenas**

Las abejas utilizan los propóleos como recurso importante dentro con la finalidad de las colmenas.

Recubren las paredes de la colmena, reparan los panales, cierran rendijas, agrietamientos, y las fracturas que puedan existir, además, cubren los bordes de las entradas para proporcionar un sello hermético, que permita al mismo tiempo la defensa de la entrada. Se supone que, al cubrir las paredes y grietas de la colmena con propóleos, las abejas buscan mantener un ambiente hermético que conserve la humedad del interior, además, establecen un control de las bacterias, mohos y otros organismos como insectos pequeños y ácaros, que afectan el desarrollo de las crías y los individuos que habitan la colmena (Funari y Ferro, 2006).

### **2.1.3 Composición del propóleo**

Las composiciones químicas de los propóleos son muy complejas y esto depende de las vegetaciones. Bedascarrasbure, 2005; citado por Gerónimo, 2009) indica:

Que es bastante compleja y depende básicamente de las fuentes vegetales y de la función específica dentro de la colonia; se compone de un 50-55% de resinas y bálsamos, 30- 40% de cera de abeja, 5-10% de aceites esenciales volátiles, 5% de polen y 5% de materiales diversos (orgánicos y minerales), sus principales

constituyentes son los compuestos fenólicos, que se caracterizan por la presencia de al menos un grupo oxhidrilo unido directamente a un anillo aromático.

La vegetación es una materia prima utilizado por las abejas pecoreadoras para recolectar propóleos bruto. Yoong (2004), hace referencia:

Los apiarios de Zamorano están rodeados de alta vegetación circundante, cerca de plantaciones frutales, pastos y otros cultivos extensivos; pero las especies predominantes es el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), es reconocida por sus numerosos usos en fisioterapia por su alto contenido en resinas y bálsamos, también contienen taninos, pigmentos flavónicos (heterosidos del queracetol), caliptosidos, ácidos fenólicos (gálico y cafeíco), poseen propiedades semejantes a las del propóleos y son mejoradas por el proceso que realizan las abejas como resina original.

De acuerdo a Bedascarrasbure et al., (2000b); citado por Yoong (2004), la “composición del propóleos es compleja y difícil de caracterizar o comparar mediante una norma generalizada debido a su alta variación (por cambios en vegetación, clima, manejo, ubicación); por esto existen rangos generales que sirven para conocer la composición, las fuentes de origen de cada componente y sus usos”.

#### **2.1.4 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos tienen una actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral.

Están formados por un anillo aromático unido por lo menos aun grupo oxhidril: la estructura más sencilla es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales y en el propóleo; esta les provee propiedades

bactericidas, fungicidas y antivirales (Tabera, Hegazi y Hegazi; citado por Bedascarrasbure et al. 2004).

“La amplitud de compuestos fenólicos en la naturaleza da como resultado propóleos con características físico-químicas y propiedades variables. Son elementos de interés biológico que se valoran en el propóleo, donde la mayoría de las propiedades son atribuidas a los flavonoides y ácidos fenólicos” (Yoong, 2004).

El propóleo en definitiva debe estar “libre de contaminantes tóxicos (metales pesados), contener bajos niveles de cera, impurezas mecánicas y cenizas; asimismo es recomendado determinar la fuente vegetal circundante de la colmena para conocer los componentes activos presentes en sus resinas y estimar la proporción de éstos compuestos activos en el propóleo” (Bankova, 2000; citado por Suarez, Jiménez y Díaz, 2013).

### **2.1.5 Flavonoides**

Los flavonoides tienen actividades biológicas durante el desarrollo de las plantas debido a formación de pigmentos.

Los flavonoides forman parte de un largo subgrupo de metabolitos secundarios clasificados como compuestos fenólicos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se encuentran en las vacuolas celulares; estos flavonoides desempeñan una variedad de actividades biológicas en las plantas como la formación de pigmentos, actúan como filtro frente a la radiación ultravioleta, protegen a las plantas de diferentes factores bióticos y abióticos generadores de estrés (Villar, 1999, p. 210).

### **2.1.6 Propiedad antimicrobiana de flavonoides en extractos de propóleos.**

Popova *et al.* (2004); citado por Martínez (2009); afirma que en los “estudios microbiológicos *in vitro* e *in vivo* concluyen que la presencia de flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos es determinante en la actividad antibacteriana de los propóleos”.

En el análisis microbiológico realizado en Brasil, han determinado respecto a la actividad antimicrobiana del propóleos. Mendes *et al.* (2006) afirmaron:

Se relacionó la actividad de extractos etanólicos frente a cepas *Staphylococcus aureus* (determinando su Concentración Inhibitoria Mínima) y el contenido de flavonoides, determinó una relación media positiva entre estos parámetros, esto indica que los flavonoides cumplen un rol importante en la determinación de la actividad antibacteriana en propóleos brasileños.

### **2.1.7 Actividad antibacteriana y antifúngica**

Los extractos etanólicos de propóleos están preparados con alcohol rectificado de 96 grados alcohólicos. Kalogeropoulos *et al.*, (2009); citado por Martínez (2009) reportaron:

El efecto de varios extractos etanólicos de propóleos frente a varias bacterias tales como: *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, y *emodina*, y *crisofanol*; con esta base los resultados obtenidos los autores recomiendan el uso de estos propóleos como aditivos de origen natural para *Listeria monocytogenes*, la actividad fue asociada a la presencia de compuestos del tipo terpénico, flavonoides y antraquinonas, principalmente conservación en alimentos.

Castelo (2002); citado por Yoong (2004) afirma:

Los flavonoides son pigmentos y compuestos aromáticos presentes en la constitución de las plantas superiores, se encuentran en las partes verdes y coloreadas, pero también en la savia y resinas, lo cual constituye un mecanismo de defensa vegetal contra parásitos, bacterias, virus y hongos. La coloración del propóleo depende en gran parte de la cantidad de flavonoides del mismo, aunque la cera influye y disminuye la calidad de este producto.

El mecanismo de acción del propóleo como agente antibacteriano “es por los flavonoides y los compuestos cinámicos, que actúan como alteradores de membrana de las bacterias, disipando para que pierda la capacidad de sintetizar ATP la bacteria, inhibiendo su motilidad e impidiendo el desarrollo de infección por los microorganismos” (Mirzoeva, Grishanin y Calder, 1997; citado por Muñoz, Linares y Narváez, 2011). “Los flavonoides del propóleo hacen interferencia en el metabolismo bacteriano ligando metaloenzimas, como las fosfatasa e inhibiendo algunas de las enzimas que pueden hidrolizar la red de proteoglicanos” (Havsteen, 2002).

### **2.1.8 Usos de propóleos**

Figuroa *et al.* (2011) reportan “como producto de la colmena que tiene una gran variedad de usos industriales, desde la industria alimentaria, la cosmética, hasta la farmacéutica o química. Existen antecedentes del uso del propóleo en suplementos dietarios y en diferentes tipos de alimentos”.

Bedascarrasbure (2005); citado por Gerónimo (2009), indica que en “múltiples estudios bacteriológicos *in vivo* e *in vitro* confirmaron su acción bacteriostática y

bactericida; los principales responsables de esta propiedad son los flavonoides galangina, pinocembrina y derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y cafeico”

Figuroa *et al.* (2011) afirman “que el uso de propóleos es una alternativa como recubrimiento comestible que permite prolongar la vida útil, mejorar la calidad y generar valor agregado a frutas y hortalizas, frescas o mínimamente procesadas”.

En este acápite se menciona que el propóleo contiene una fuente natural de antioxidante.

Estos componentes protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación; sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad anti radical particularmente, frente a radicales alcoxi y en menor grado, a superóxido y al efecto inhibitor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Salamanca et al., 2007; citado por Gerónimo, 2009).

### **2.1.9 Extracto etanólico propóleos (EEP) o tintura de propóleos**

El extracto de etanólico de propóleo se conoce también como tintura de propóleo. Luna (2011) dice:

Es un preparado apícola (hidro-alcohólico) que contiene antibióticos naturales y sustancias biológicamente activas provenientes de propóleo, que le confieren alto poder cicatrizante e inmunoestimulante; por tanto, la tintura de propóleo se obtiene mezclando propóleos con alcohol etílico de 70 a 95°, con una maceración de 7 días como mínimo, agitación frecuente, posterior filtrado y envasado en frascos oscuros.

Tylkowski *et al.* (2010); citado por Gutiérrez (2012), reporta que “extracción con etanol se remueve la cera y los desechos orgánicos, se obtiene el extracto

etanólico de propóleos con todos los constituyentes bioactivos; fueron observados más de 300 componentes diferentes entre los que se encuentran: terpenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, etc”

### 2.1.10 Yogurt

El yogurt es una leche fermentada con la adición de cultivos que contienen microorganismos necesarios para su coagulación. OMS y FAO (2011) afirman:

Es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones, por medio de la acción de microorganismos adecuados (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subesp. Bulgaricus*) y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoelectrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. (2011, p.6)

Se tipifican como:

**Yogurt batido:** Yogurt cuya fermentación se realiza en tanques de incubación produciéndose en ellos la coagulación, siendo luego sometido a un tratamiento mecánico de batido, según NTP.202.092 (INDECOPI, 2008).

**Yogurt frutado:** Yogurt al que se le ha agregado fruta procesado en trozos, jugo y/o pulpa de frutas y aditivos, según se indica en el apartado 6.4 de la NTP.202.092 (INDECOPI, 2008).

### **2.1.11 Vida útil**

“La vida útil” de un producto depende de factores ambientales, de la humedad, de la temperatura de exposición, del proceso térmico al que se somete y de la calidad de las materias primas, entre otros; “su efecto se manifiesta como el cambio en las cualidades del alimento que evitan su venta: cambios de sabor, color, textura o pérdida de nutrientes” (Potter, 1978). “El final de la vida útil de un producto se alcanza cuando ya no mantiene las cualidades requeridas para que el consumidor final lo utilice” (Kuntz, 1991; citado por García y Molina, 2008).

Casp y Abril (1999); citado por Rondon, Pacheco y Ortega (2004) indica:

Para determinar la vida útil de un alimento o producto, primero deben identificarse las reacciones químicas o biológicas que influyen en la calidad y seguridad del mismo, considerando la composición del alimento y el proceso a que es sometido y se procede a establecer las reacciones más críticas en la calidad.

### **2.1.12 Evaluación sensorial**

La evaluación sensorial de alimentos se realiza con la finalidad el control de calidad. Torricella, Zamora y Pulido (2007) hacen referencia:

Es frecuente que se rechacen producciones por problemas de control de calidad con reclamación contra los productores; por este motivo se requiere que las pruebas se realicen con una fundamentación científica, lo cual requiere del constante desarrollo de los procedimientos de evaluación y su correcta planificación, diseño y obtención de la calidad sensorial adecuada.

Ureña, D'Arrigo y Girón (1999), define como “disciplina científica es usado para medir, analizar e interpretar las sensaciones producidas por las propiedades

sensoriales de los alimentos y otros materiales, y que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído”.

Está constituida por dos procesos definidos según su función: el análisis sensorial y el análisis estadístico.

El análisis sensorial es un método experimental mediante el cual los jueces perciben y califican, caracterizando y/o mensurando, las propiedades sensoriales de muestras adecuadamente presentadas, bajo condiciones ambientales preestablecidas y bajo un patrón de evaluación acorde al posterior análisis estadístico. En cambio, el análisis estadístico está dado por la formulación de supuestos teóricos (hipótesis), con los que se podrá hacer inferencias o conclusiones sobre un población de alimentos o personas, y que están comprobados a partir de los resultados del tratamiento estadístico de los datos obtenidos del análisis sensorial de la muestra que la represente; tratamiento aplicado en base a un adecuado diseño experimental que asegure la confiabilidad de los datos y sus resultados (Ureña, D'Arrigo y Girón ,1999).

## III. MÉTODO

### 3.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación que se ha utilizado es de carácter experimental porque se ha buscado resultados específicos mediante técnicas para la obtención de resultados satisfactorios.

Es aplicada y tecnológica; porque se orienta obtener un conservante natural a base de propóleos para uso alimentario.

El nivel de estudio es descriptiva, explicativa y predictivo, ya que, a partir de las características de la problemática en estudio, se busca responder las preguntas de investigación relacionadas a la conservación, pretendiendo evaluar la dependencia y posible interacción entre las variables estudiadas.

### 3.2 Población y muestra

#### **Población**

En la presente investigación se ha aplicado el muestreo no probabilístico de tipo intencional en diferentes colmenas hasta obtener una muestra representativa de propóleos. La población de propóleos procedentes son los tres centros apícolas del distrito de Huaraz estuvo conformada por más de 30 colmenas cada uno.

#### **Muestra**

Para la toma de muestras de propóleos en bruto se realizó en los tres centros apícolas del distrito de Huaraz que contaban entre 40 y 70 colmenas de abejas.

Las muestras para análisis físico-químico y obtención del extracto etanólico de propóleos fueron de tres centros apícolas, fue de 400 g de propóleo bruto de cada uno

de los centros apícolas respectivamente y siendo un total de 1200 g para los análisis por duplicado.

### 3.3 Operacionalización de variables

En la investigación se tomó en cuenta dos variables de estudio:

- Variable Independiente: X

X<sub>1</sub>: Características físico-químicas del propóleo

- Variable Dependientes: Y

Y<sub>1</sub>: Vida útil del yogurt batido frutado

En la tabla 1, se indica la operacionalización de variables.

**Tabla 1. Variables, dimensiones e indicadores**

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES
Variable independiente:	Análisis físico-químico.	% humedad
Características físico-químicas del propóleo		% cenizas
		% ceras
		% resinas
		% impurezas mecánicas.
		g compuestos fenólicos/100 g de propóleo.
		g Flavonoides/100 g propóleo.
Variable dependiente:	Análisis microbiológico	ufc/g coliformes totales
Vida útil de un yogurt batido frutado		ufc/g hongos y levaduras.
	Análisis sensorial	Color
		Olor
		Sabor
		Aceptabilidad

### **3.4 Instrumentos**

#### **3.4.1 Instrumentos de recolección de datos**

La recolección de datos en este trabajo de investigación se realizó de la siguiente manera:

##### **Fuente primaria**

La información se ha recolectado de manera continua durante la etapa experimental a través de un seguimiento en las características físico-químicas de propóleos analizados en bruto de cada muestra, y el contenido de los compuestos fenoles y flavonoides en el extracto etanólico de propóleos.

Los parámetros de control que se consideró en la recolección de datos son:

- 1) Análisis físico-químicos: humedad, cenizas, ceras, resinas e impurezas mecánicas, compuestos fenólicos y flavonoides.
- 2) Para comprobar el efecto conservante del extracto etanólico de propóleo que contiene flavonoides, se utilizó como medio el yogurt frutado por ser un producto perecible. Se adicionó 0%, 0.4%, 0.8%, 1.2% y 1.6% de extracto etanólico de propóleos a un medio como yogurt frutado previamente preparada. Luego se evaluó la vida útil del yogurt frutado conservada durante 42 días a 5°C temperatura de refrigeración. La determinación de presencia de los microorganismos, tales como: coliformes totales, hongos y levaduras, se realizó utilizando medios de cultivo en placas Petri que fueron incubadas en una incubadora del laboratorio.
- 3) Para el análisis sensorial se adicionó 0%, 0.4%, 0.8%, 1.2% y 1.6% de extracto etanólico de propóleo a un medio como yogurt frutado previamente preparada.

La evaluación sensorial se realizó mediante de degustaciones ejecutadas por 30 panelistas no entrenados, con el propósito de seleccionar el mejor tratamiento.

### **Fuente secundaria**

Las fuentes bibliográficas que se utilizó fueron los libros, revistas científicas, proyectos similares, trabajos publicados en internet, etc.

En la recolección de datos se aplicó el diseño experimental, basado en la manipulación de las variables independientes y analizando los efectos sobre la variable dependiente. La estrategia que se empleó fue el trabajo de campo y de laboratorio, que consistió en la recolección de muestras de los tres centros apícolas y trabajo de laboratorio experimental tecnológico.

### **3.4.2 Materiales y equipos**

#### **Muestra**

- Propóleos en bruto 1200 g
- Alcohol etílico grado alimenticio (96%).
- Yogurt frutado.

#### **Materiales**

Cartuchos de celulosa; Agua destilada; Papel absorbente; Papel aluminio; Frascos de plástico estériles con tapa; Espátulas; Cuchillos; Varilla de agitación; Pizetas; Gradillas; Vasos de precipitación de 50, 100, 150, 250 y 500 mL; Cronómetro; Morteros con pistilo; Placas Petri (100x15mm); Probetas de 10, 50 y 100 mL; Pipetas graduadas de 1, 5, 10 y 25 mL; Pera de succión; Buretas de 25 y 50 mL; Placas Petri pirex; Cápsula; Crisol de porcelana; Termómetro de rango -10 a 150°C, Frascos de vidrio ámbar de 500 mL; Soporte universal; Pinzas para bureta; Pinzas

universales; Goteros; Matraz Erlenmeyer de 50, 100, 250 y 500 ml; Trípode; Tubos de ensayo; Gradilla para tubo de ensayo; Pipetas bacteriológicas de 1, 5 y 10 mL; Embudo de vidrio y Vidrio Reloj.

### **Equipos**

Balanza analítica, Equipo de soxhlet, Plancha calefactora, Estufa, Incubadora, Autoclave, Desecador, Espectrofotómetro de absorbancia de 425 y 765 nm, Baño maría, Agitador magnético, Centrifuga, Cámara fotográfica, Bomba de vacío, Licuadora y Refrigeradora

### **Reactivos**

1-Hexano, Etanol, Solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%, Solución de referencia de ácido gálico de 0,5 mg/mL, Reactivo de Folin-Ciocalteu, Solución de carbonato de sodio, Etanol al 10%, Solución patrón de quercetina de 100  $\mu\text{g/mL}$ , Solución de tricloruro de aluminio al 5%, Metanol.

### **Medio de cultivo**

Solución buffer fosfato pH 7.0, Agar violeta rojo bilis (VRBA), Agar oxitetraciclina glucosa (OGA).

## **3.4.3 Métodos de análisis**

### **3.4.3.1 Caracterización físico-química de propóleos**

- **Determinación de humedad**

Se utilizó un método gravimétrico en el que se secan las muestras en un horno siguiendo el método de la AOAC (1990).

- **Determinación de cenizas**

La determinación de cenizas se realizar por calcinación y por diferencia de peso. Se pesa 1g de muestra a temperatura ambiente en un crisol previamente tarado y se coloca en una mufla a 550°C. Posteriormente se deja el conjunto en el desecador hasta obtener un peso constante (A.O.A.C., 1990)

- **Determinación de ceras**

Se realizó mediante el método de Soxhlet según Norma IRAM 15.935-1: 2008; citado por Vásquez (2010).

- **Determinación de resinas**

Se realizó mediante el método de Soxhlet según Norma IRAM 15.935-1: 2008; citado por Vásquez (2010).

- **Impurezas mecánicas**

Se realizó mediante el método gravimétrico según Norma IRAM 15.935-1: 2008; citado por Vásquez (2010).

- **Compuestos fenólicos totales**

Se realizó mediante el método espectrofotométrico UV visible según Norma IRAM 15.935-1: 2008; citado por Vásquez (2010). El resultado obtenido debe indicar el contenido de compuestos fenólicos totales, en g/100 g de propóleos, expresado como su equivalente en ácido gálico.

- **Determinación de flavonoides totales.**

Se realizó mediante el método espectrofotométrico UV visible según Norma IRAM 15.935-1: 2008; citado por Vásquez (2010). El resultado obtenido indica el

contenido de flavonoides totales, en g/100 g de propóleos, expresado como su equivalente en quercetina.

#### **3.4.3.2 Análisis microbiológico.**

El análisis microbiológico de las muestras almacenadas se realizó a cada 7 días hasta completar el total de días programados. Los análisis se realizaron teniendo en cuenta lo recomendado por ICMSF (2000), DIGESA (2008) y Alina, Vega y Garrido (1983):

##### **Mohos y levadura.**

Método de ensayo: método recuento de levadura y mohos por siembra en placa en todo el medio (ICMSF, 2000 y DIGESA, 2008 y 2017).

Medio de cultivo: Agar oxitetraciclina glucosa (OGA).

##### **Coliformes totales**

Método de ensayo: técnica del número más probable (NMP) Medio de cultivo: Agar violeta rojo bilis (VRBA) (ICMSF, 2000 y DIGESA, 2008 y 2017).

##### **Recuento de microorganismos**

De cada frasco inoculada y almacenada a la temperatura correspondiente, se tomaron como experiencia desde el inicio (día 0) y cada 7 días para recuento 10 gr de la muestra de yogurt, por duplicado. Se agregó 90 ml de solución buffer Fostato en matraz de erlenmeyer y se homogeneizaron aproximadamente por 2 minutos para homogeneizar la mezcla. A partir de dichas mezclas homogeneizadas se calcularon las diluciones correspondientes como para lograr un recuento de no más de 100 colonias por placa y minimizar el error de conteo. Se inocularon las placas de Petri, por duplicado realizando la metodología de recuento combinado. Para la metodología del recuento combinado se tomó 1 ml de homogeneizado del matraz de Erlenmeyer, se

distribuyó homogéneamente en 3 placas de Petri a aproximadamente 0,33 ml en cada placa, luego se extendió con una espátula hasta absorción total, se puso a incubar en una incubadora a 37°C y finalmente se realizó el recuento informando UFC/mL (Alina, Vega y Garrido, 1983).

#### **3.4.3.3 Análisis sensorial de un yogurt batido frutado con propóleos**

Se realizó la evolución sensorial con dos repeticiones, del yogurt frutado con la adición de extracto etanólico de propóleos. En dicha evaluación participaron 30 panelistas no entrenados seleccionados al azar, para identificar el mejor tratamiento. Se evaluó con una hoja de respuesta los siguientes atributos: olor, color y sabor y aceptabilidad. Para la calificación de cada atributo de calidad se utilizó una escala hedónica de 7 puntos siendo, donde 1 = disgusta muchísimo y 7 = gusta muchísimo (Anexo 8).

#### **3.4.4 Método de investigación**

El método científico que se aplicó es experimental e hipotético deductivo, por su carácter cuantitativo y analítico. Cuantitativo, porque se ha determinado el contenido de los compuestos de fenólicos y flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Las observaciones cuantificadas fueron para realizar el análisis estadístico.

### **3.5 Procedimientos**

#### **3.5.1 Diseño de investigación**

##### **Diseño Experimental (Fase 1):**

El diseño experimental fue de un solo factor. Se utilizó un diseño completo al azar (DCA) donde se ha evaluado tres niveles de tratamientos. Se ha realizado cada análisis por triplicado para determinar la caracterización de propóleos de cada apiario. Se comprobó que el análisis de varianza de las características físico-químicas

entre las tres muestras a través de un análisis estadístico tiene un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

### **Factor A: Propóleos**

a1 = Análisis físico-química de M1

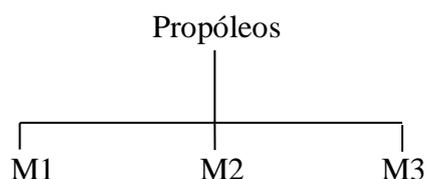
a2 = Análisis físico-química de M2

a3 = Análisis físico-química de M3

M: muestra de propóleos

### **Tratamientos del estudio**

Se han analizado tres tratamientos con tres repeticiones, como se muestra en la siguiente figura:



**Figura 1. Obtención de los diferentes tratamientos - propóleos**

### **Diseño Experimental (Fase 2):**

Para evaluar el efecto conservante del extracto etanólico de propóleos (EEP) en la vida útil del yogurt frutado, se utilizó un diseño experimental completamente a azar, de un solo factor (EEP) con cuatro niveles de concentración de %EEP y una muestra testigo con dos repeticiones; siendo un total de 10 unidades experimentales.

Dichas unidades experimentales se realizaron con la finalidad de evaluar el efecto conservante natural del extracto etanólico de propóleos (EEP) en la vida útil del yogurt frutado, mediante el análisis microbiológico de cada una de las muestras. Los análisis microbiológicos se realizaron cada 7 días desde el día 0 de almacenamiento

hasta 42 días; conservándolas en sistema de refrigeración 5°C de temperatura y luego se determinó un modelo matemático

**Factor A:** Extracto etanólico de propóleos (EEP) al 20%

a0 = 0% de EEP y 200 mL de yogurt frutado (testigo).

a1 = 0.4% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

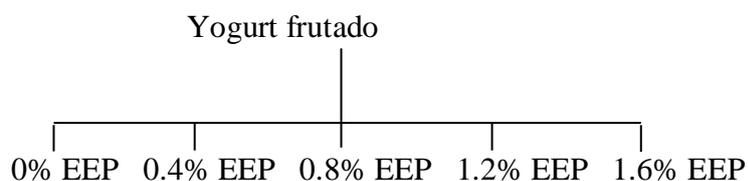
a2 = 0.8% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

a3 = 1.2% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

a4 = 1.6% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

### Tratamientos del estudio

Se han analizado cuatro tratamientos y muestra testigo con dos repeticiones, como se muestra en la siguiente figura:



**Figura 2. Obtención de los diferentes tratamientos – vida útil**

### Diseño Experimental (Fase 3)

El diseño experimental que se ha empleado en este trabajo es de un solo factor y con dos repeticiones. Para la evaluación sensorial se han utilizado cuatro niveles de tratamientos y muestra testigo, teniendo un total de cinco unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de tukey con 95% de nivel de confianza.

Factor A: Extracto etanólico de propóleos (EEP) al 20%.

a0 = 0% de EEP y 200 mL de yogurt frutado (testigo).

a1 = 0.4% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

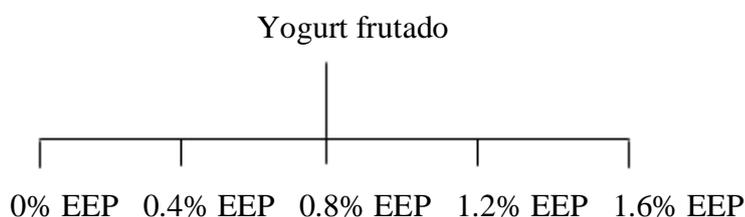
a2 = 0.8% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

a3 = 1.2% de EEP y 200 mL de yogurt frutado.

a4 = 1.6% de EEP y 200 mL de yogurt frutado

### Tratamientos del estudio

Se analizó cuatro tratamientos y una muestra testigo como se indica en la siguiente figura:



**Figura 3. Obtención de los diferentes tratamientos-sensorial**

### Estrategia de prueba de hipótesis

Se realizó cada análisis por triplicado para determinar si la caracterización físico-química del propóleo de cada apiario es igual estadísticamente ( $H_0=M_1=M_2=M_3$ ).

En el segundo ensayo se ha utilizado un diseño completamente al azar (DCA), con medidas repetidas en el tiempo, presentando cinco niveles de tratamiento: 0%, 0.4%, 0.8%, 1.2% y 1.6% de extracto etanólico de propóleos, porcentajes seleccionados por los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides en la muestra de propóleo seleccionado.

La prueba para la hipótesis en un diseño completamente al azar se ajusta al siguiente modelo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

Donde,

$Y_{ij}$  = Respuesta observado en la  $k$ -ésima muestra, por el  $j$ -ésimo panelista, a la cual se le ha sometido el  $i$ -ésimo tratamiento

$\mu$  : media global

$T_i$  : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento (extracto etanólico de propóleos)

$B_j$  : Efecto del  $j$ -ésimo Bloque (característica evaluado por el panelista).

$E_{ij}$  : Error experimental

### **3.5.2 Obtención de extracto etanólico de propóleos**

La muestra de propóleo se recolectó en la época de floración y cosecha de miel, por método de raspada del interior de las colmenas. Luego se almacenó el propóleo a 0°C durante por 24 horas facilitar la trituración de la muestra.

Se preparó un extracto etanólico de propóleos para solubilizar la fracción resinosa y sus compuestos fenólicos. Se empleó etanol al 96% y propóleo mecánicamente limpio en una solución 80/20 (80% solvente y 20% de propóleos) o sea 800 mL de alcohol etílico de consumo humano y 200 g de propóleo bruto, la dejó por 20 horas aproximadamente en un agitador (sin luz), luego se filtró y conservó en un ambiente adecuado (Yoong, 2004).

### **3.5.3 Evaluación del efecto conservante del extracto etanólico de propóleo en un yogurt batido frutado.**

#### **a) Elaboración de pulpa de aguaymanto**

Para la elaboración de la pulpa de aguaymanto se consideró las siguientes operaciones (Carbajal, 2013):

- 1) **Pesado:** se pesó la fruta inmediatamente después de la recepción.
- 2) **Selección:** se apartó la fruta deteriorada.
- 3) **Desbraqueado:** se retiró la cobertura que envuelve a la fruta.
- 4) **Lavado:** se eliminó las partículas extrañas, suciedad y restos de tierra adheridas a la fruta.
- 5) **Desinfección:** se desinfectó con solución de hipoclorito de sodio (lejía) en una concentración 75 ppm. El tiempo de inmersión en estas soluciones desinfectantes
- 6) **Escaldado:** esta operación se realizó para inactivar las enzimas de la fruta, después realizó para ablandó la fruta a 80°C por 4 minutos para aumentar el rendimiento de la pulpa.
- 7) **Enfriado:** se realizó enfriamiento rápido a una temperatura de 5°C.
- 8) **Refinado:** se realizó con una licuadora y un colador para la separación de pulpa o jugo, libres de cáscaras y pepas.
- 9) **Concentrado:** se realizó a una temperatura de 85°C por 45 minutos, se adicionó el 20 % azúcar a un 80% pulpa refinada. Se homogeneizó continuamente hasta llegar a 45 °Brix y pH de 3,6
- 10) **Envasado:** la pulpa concentrada se envasó en frasco de vidrio a una temperatura de 60 °C.
- 11) **Almacenado:** se almacenó en una refrigeradora a 5 °C

El diagrama de flujo considerado para la elaboración de pulpa de aguaymanto se muestra en la figura 4.

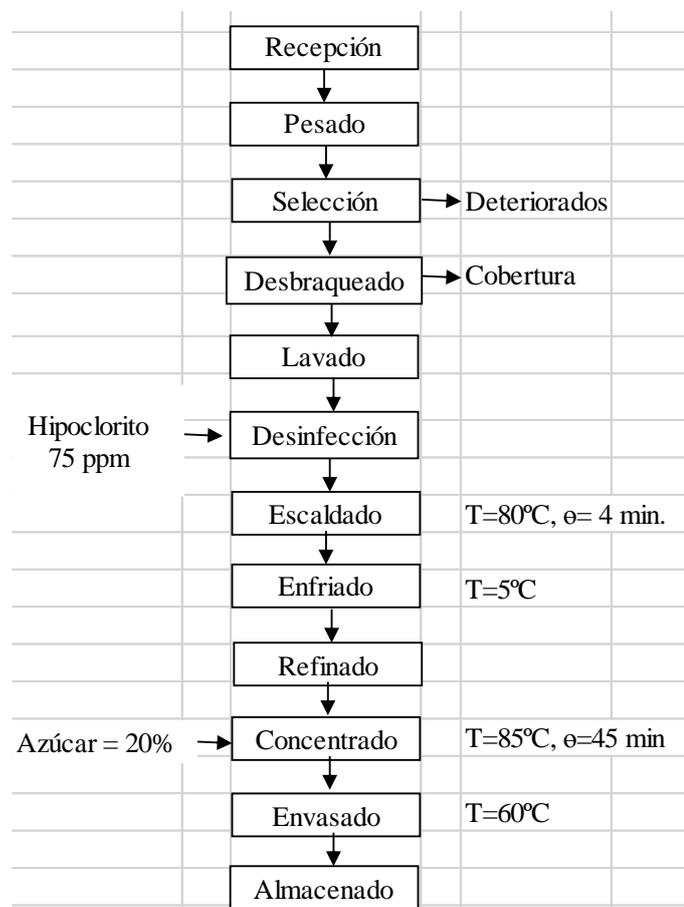


Figura 4. Diagrama de flujo para elaboración de aguaymanto

Fuente: Carbajal (2013)

## b) Elaboración de yogurt frutado

Para la elaboración de la pulpa de aguaymanto se consideró las siguientes operaciones (Carbajal, 2013):

- 1) **Materia prima:** se recibió la leche fresca del Centro Experimental Tingua de la UNASAM en un balde desinfectado de 10 L. de capacidad, bajo las siguientes condiciones: la temperatura de recepción fue 6°C, periodo de traslado al laboratorio 8 minutos a 17°C temperatura ambiente.

- 2) **Colado:** se filtró con un paño de tocuyo limpio y desinfectado, para eliminar partículas extrañas procedentes del ordeño.
- 3) **Pre calentamiento:** se calentó la leche hasta alcanzar una temperatura de 65 – 70°C.
- 4) **Estandarizado:** se adicionó a la leche fresca el estabilizante en la proporción de 4 gramos por litro de leche, en esta operación también se agregó azúcar en la proporción de 70 gramos por litro.
- 5) **Pasteurizado:** se pasteurizó a 80°C por 15 minutos en una olla de acero inoxidable.
- 6) **Enfriado:** cumplido el tiempo de pasteurizado, se enfrió inmediatamente hasta 45°C temperatura adecuada para el desarrollo de los microorganismos del cultivo.
- 7) **Inoculado del cultivo:** se inoculó 50 ml de Vivolac previamente preparado en 5 de litro de leche a temperatura de 45°C y mezcló por un minuto para la distribución uniforme de los microorganismos del cultivo en toda la masa de la leche.
- 8) **Incubado:** se incubó a una temperatura 45°C durante 6 horas aproximadamente hasta la coagulación del producto a un pH de 4,6
- 9) **Enfriado:** se enfrió en un refrigerador doméstico hasta una temperatura de 10°C, aproximadamente para detener la actividad de las bacterias.
- 10) **Batido:** se realizó el batido lentamente con un batidor eléctrico a baja velocidad y luego se adicionó la pulpa refinada de aguaymanto.
- 11) **Envasado:** se envasó inmediatamente en recipientes plásticos desinfectados.
- 12) **Almacenado:** se guardó en la refrigeradora doméstica a una temperatura de refrigeración a 5 °C.

El diagrama de flujo considerado para la obtención de yogurt se muestra en la figura 5.

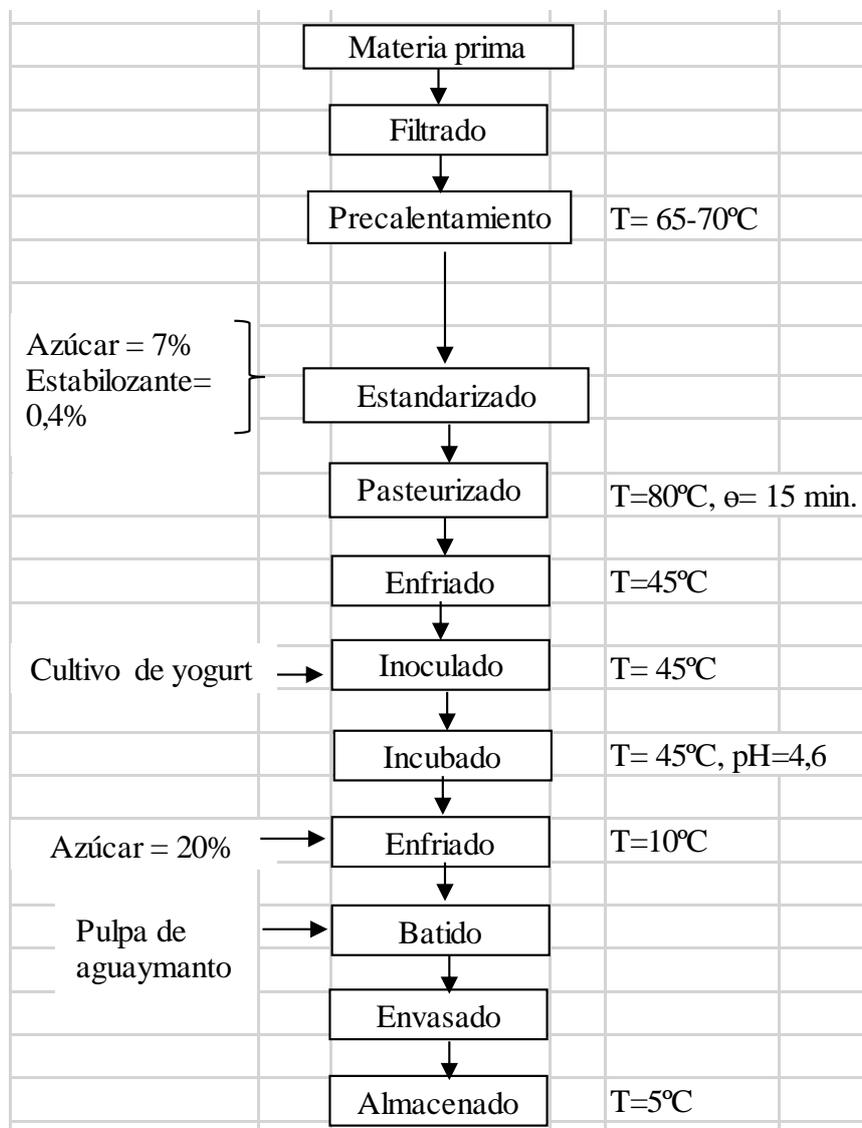


Figura 5. Diagrama de flujo para obtención de yogurt frutado

Fuente: Carbajal (2013)

### c) Efecto conservante del extracto etanólico de propóleo.

Para evaluar el efecto conservante del extracto etanólico de propóleo se realizó el estudio de vida útil del yogurt frutado. Para el análisis microbiológico, se analizaron coliformes totales, hongos y levaduras. La frecuencia de análisis se efectuó cada 48

horas por tiempo de incubación. La determinación de la vida útil del yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos fue por 42 días a 5°C de temperatura de refrigeración, realizándose los análisis microbiológicos cada 7 días.

### **3.6 Análisis de datos**

Se emplearon los programas estadísticos Excel 2016, Minitab 20017, hallándose como respuesta experimental el porcentaje de humedad, cenizas, ceras, resinas, impurezas mecánicas, fenólicos totales y flavonoides en los propóleos de las abejas.

Obtenidos los datos de los análisis físico-químicos, microbiológico y sensorial se tabuló la información con Excel.

Las tablas de análisis de varianza se trabajaron en Minitab 2017, en caso de significancia estadística para la selección del mejor tratamiento, se utilizó la prueba de Tukey con el software Minitab17 y Excel. Así se determinó la interacción de los atributos de calidad físico-química, sensorial y microbiológica de las muestras experimentales.

Para las pruebas sensoriales se utilizó un diseño completamente al azar, con 30 panelistas que dieron respuesta utilizando una tabla de escala hedónica de 7 puntos.

### **3.7 Consideraciones éticas**

La presente cumple con los principios ética en trabajos de investigación a nivel experimental:

Autonomía: se solicitó al decano de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional “Santiago Antunez de Mayolo” la autorización del laboratorio de biología, para realizar el análisis microbiológico de las muestras de yogurt con extracto etanólico de propóleos. De la misma manera se realizó los análisis físico-químico en

la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el laboratorio del Centro de Control Analítico.

No maleficencia: el producto seleccionará en la presente investigación, no ocasiona daños a los consumidores de yogurt frutado natural con propóleos y se podrá conservar por más días con la adición del extracto etanólico del propóleos.

Justicia: El extracto etanólico de propóleos será usado por las pequeñas empresas que comercializan el yogurt frutado natural sin conservante químico.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Contratación de Hipótesis

Para la prueba de hipótesis se utilizó el análisis de varianza (AVONA) con la finalidad de comparar la variabilidad de las medias que existe entre las muestras o tratamiento experimentales.

En los casos en que las diferencias estadísticas significativas se han utilizado comparaciones en parejas del test de Tukey, la prueba simultánea de Tukey para diferencias de las medias entre las muestras con un nivel de confianza individual de 95%.

El análisis de Varianza (ANOVA) se aplicó para comparar los diversos valores medios de las muestras experimentales y luego se determinó si alguno de ellos difiere significativamente del resto (Minitab 2017).

#### 4.1.1 Caracterización físico-química de propóleos

##### **Hipótesis específica:**

Los contenidos de fenoles y flavonoides totales de las tres muestras recolectadas de los centros apícolas del distrito de Huaraz mediante el análisis físico-químico son iguales.

##### **Formulación de las hipótesis estadísticas:**

Ho: Los contenidos de fenoles y flavonoides totales de las tres muestras recolectadas de los centros apícolas del distrito de Huaraz mediante el análisis físico-químico son iguales (Ho:  $M1 = M2 = M3$ ).

H1: Los contenidos de fenoles y flavonoides totales de las tres muestras recolectadas de los centros apícolas del distrito de Huaraz mediante el análisis físico-químico no son iguales ( $H_0: M1 \neq M2 \neq M3$ ).

Para el análisis estadístico se considerará un nivel de significancia ( $\alpha= 0.05$ ) del 5%; por lo tanto el nivel de confianza ( $1 - \alpha= 0.95$ ) será del 95%.

Criterios de decisión:

Si  $p < 0,05$  Se rechaza  $H_0$ .

Si  $p > 0,05$  Se acepta  $H_0$ .

Como el valor de significancia  $0,000 < 0,05$  se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se acepta la hipótesis alterna ( $H_1$ ), es decir los contenidos de fenoles y flavonoides totales de las tres muestras recolectadas de los centros apícolas del distrito de Huaraz mediante el análisis físico-químico no son iguales; por tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre las características físico-químicas de los propóleos recolectados de tres centros apícolas del distrito de Huaraz.

De acuerdo a las muestras analizadas físico-químicamente y estadísticamente, se determina que la muestra 1 del Centro apícola de Huypishca ubicado en el distrito de Huaraz es la tiene mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, seguido de la muestra 2 del Centro apícola de Ichoca y muestra 3 de Centro apícola de Quenuayoc.

#### **4.1.2 Evaluación del efecto conservante del extracto etanólico de propóleos en un yogurt batido frutado**

**Hipótesis específica:**

El extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales tienen efecto conservante en la vida útil de un yogurt frutado.

La variable se tomó para la investigación de la vida útil del yogurt fue las condiciones de almacenamiento como la temperatura, porque esto influye positivamente en la conservación a un rango de temperatura de 4 a 5°C. Además, para prolongar la vida útil del yogurt se utilizó como conservante natural el extracto etanólico de propóleos. Las cantidades adicionadas a las cuatro muestras de yogurt fue de 0.4%, 0.8%, 1.2% y 1.6% de extracto etanólico de propóleos.

En el recuento microbiológico de hongos, levaduras y coliformes totales se ha demostrado que se puede prolongar conservación del yogurt frutado por 14 días, adicionando como conservante natural 1.6% de extracto etanólico de propóleos. Los yogures comerciales de los pequeños productores tienen una duración de 10 días desde la fecha de elaboración. Por lo tanto, el extracto etanólico de propóleos tiene efecto como conservante natural en la conservación del yogurt frutado a 5°C de temperatura de refrigeración.

#### **4.1.3 Análisis sensorial de un yogurt batido frutado con propóleos**

##### **Hipótesis específica:**

El extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales tienen efecto en las características sensoriales de un yogurt frutado.

##### **Formulación de las hipótesis estadísticas:**

Ho: El extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales no tienen efecto en las características sensoriales de un yogurt frutado (Ho:  $T_0 = T_1 = T_2 = T_3 = T_4$ ).

H1: El extracto etanólico de propóleos con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales tienen efecto en las características sensoriales de un yogurt frutado (Ho:  $T_0 \neq T_1 \neq T_2 \neq T_3 \neq T_4$ ).

Nivel de significación  $\alpha = 0,05$

Criterios de decisión:

Si  $p < 0,05$  Se rechaza  $H_0$ .

Si  $p > 0,05$  Se acepta  $H_0$ .

Como el valor de significancia  $0,000 < 0,05$  se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se acepta la hipótesis alterna ( $H_1$ ), es decir el extracto etanólico de propóleos (EEP) con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales tienen efecto en las características sensoriales de un yogurt frutado. Esto significa que los cuatro tratamientos T1, T2, T3 y T4 y la muestra testigo T0 tienen efecto en los atributos de color, olor, sabor y aceptabilidad que fueron evaluados sensorialmente por los panelistas.

## 4.2 Análisis e interpretación

### 4.2.1 Características físico-químicas de propóleos recolectados.

Los resultados de los análisis físico-químicos como humedad, cenizas, ceras, resinas e impurezas mecánicas, compuestos fenólicos y flavonoides; se han obtenido de las muestras de propóleos recolectadas de los tres centros apícolas del distrito de Huaraz (tabla 2 e imagen de las tres muestras de propóleos bruto en el anexo 1).

**Tabla 2. Promedio de los análisis físico-químicos de las muestras de propóleos**

Muestras	Humedad (%)	Cenizas (%)	Ceras (%)	Resinas (%)	Impurezas mecánicas (%)	Fenoles totales g/100g (a)	Flavonoides totales g/100g (b)
M1	3,56	3,1	34	57	18,8	7,31	10,16
M2	3,44	4,8	45	50	10,6	6,05	8,37
M3	3,64	3,8	37	53	14,5	5,14	4,75

(a) g de ácido gálico/100g de muestra,

(b) g de quercetina/100g de muestra

M1: Centro apícola de Huypishca ,

M2: Centro apícola de Ichoca

M3: Centro apícola de Quenuayoc.

En los análisis de la composición fisicoquímicas de los propóleos de tres centros apícolas del distrito de Huaraz (anexo 2 y anexo 3) recolectados por método raspado, se observa que existe diferencias en la composición porcentual de los componentes como humedad, cenizas, ceras, resinas, impurezas mecánicas, fenoles totales y flavonoides totales (Tabla 2).

En el contenido de humedad se presentan diferencias entre las muestras recolectadas de los centros apícolas, hallándose valores entre 3,44 – 4,64%

En el contenido de cenizas hay diferencias entre los centros apícolas en el distrito de Huaraz, se encuentran entre 3,1 – 4,8 %.

En el contenido de ceras existen diferencias entre las muestras de los centros apícolas en el distrito de Huaraz, estos se encuentran entre 34 - 45%.

En cuanto al contenido de resinas de las tres muestras es de 50 - 57% e impurezas mecánicas visibles presentes en el propóleo (tierra, partes de abeja, etc.), principalmente recolectado por método de raspado se obtuvo resultados entre 10.6 - 18.8%.

En la tabla 3, se indica los resultados de análisis de varianza de los fenoles totales de las 3 muestras recolectadas.

**Tabla 3. Fenoles totales de propóleos del distrito de Huaraz**

<b>Lugares</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Fenoles totales g/100g (a) medio <math>\pm</math> desviación estándar</b>	<b>Valor F</b>	<b>Sig</b>
<b>Muestra 1</b>	3	7,310 $\pm$ 0,020	16957,47	0,000*
<b>Muestra 2</b>	3	6,030 $\pm$ 0,010		
<b>Muestra 3</b>	3	5,137 $\pm$ 0,012		

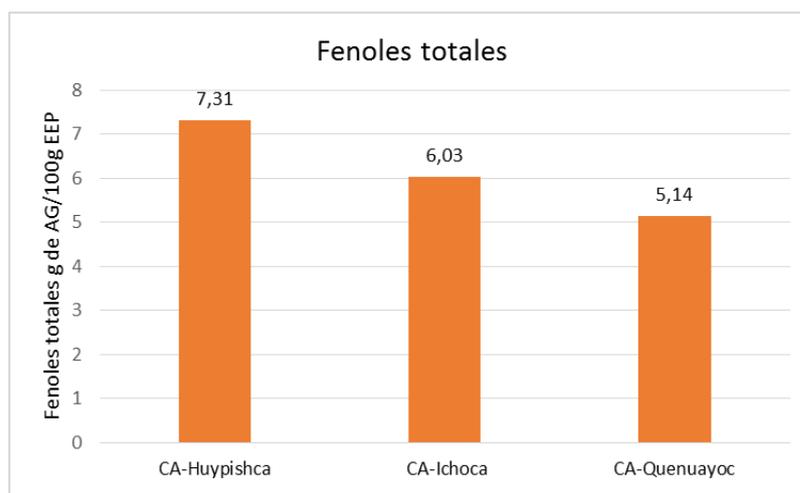
(a)g de ácido gálico/100g de muestra

Muestra 1: CA-Huypishca, Muestra 2: CA-Ichoca, Muestra 3: CA-Quenuayoc

\* ANOVA de un solo factor/HSD de tukey ( $p < 0,05$ ), existe diferencia significativa estadísticamente.

Aplicando el análisis de varianza (ANOVA) se determinó que la desviación estándar de la muestra 1 del Centro Apícola de Huypishca es mayor a la muestra 2 del Centro Apícola de Ichoca y muestra 3 del Centro Apícola de Quenuayoc. Como el valor de significancia  $0,000 < 0,05$ ; por tanto, existe diferencia significativa entre muestra 1, muestra 2 y la muestra 3 en los fenoles totales.

La muestra 1 (Centro apícola de Huypishca), muestra 2 (Centro apícola de Ichoca) y muestra 3 (Centro apícola de Quenuayoc) analizadas, se encuentran directamente relacionado con la calidad de los propóleos que contienen fenoles totales. Con esto se demuestra a que la fracción soluble en etanol agrupa la mayoría de los compuestos biológicamente activos (Figura 6).



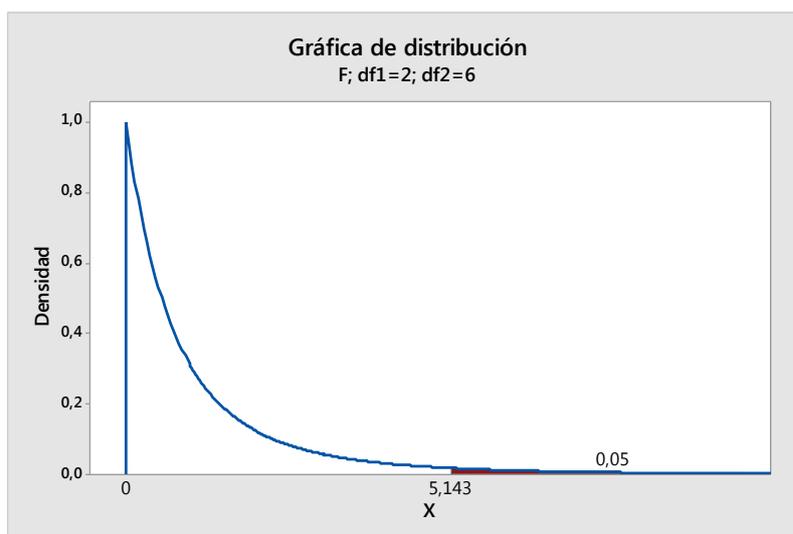
**Figura 6. Fenoles totales de muestras de propóleos**

En el análisis de varianza (ANOVA) de fenoles totales de la muestra 1 (Centro apícola de Huypishca), muestra 2 (Centro apícola de Ichoca) y muestra 3 (Centro apícola de Quenuayoc) se reportan en la tabla 4, el valor crítico de F en la Figura 7, media en la tabla 5 y la prueba de tukey en la Tabla 6, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

**Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de fenoles totales de las tres muestras**

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	P-valor	Valor crítico de F
<b>Factor</b>	2	7,159822	3,579911	16957,47	0,000	5,143
<b>Error</b>	6	0,001267	0,000211			
<b>Total</b>	8	7,161089				

Se observa los resultados de la tabla 4, donde el valor  $F=16957,47$  es mayor que valor crítico  $F=5,143$ , esto significa que existe diferencia estadística significativa de los fenoles totales entre las muestras.



**Figura 7. Gráfica de distribución de fenoles totales entre muestras**

Interpretando la Figura 7, con valor crítico de  $F = 5,143$  se puede afirmar con certeza que, si existe diferencia estadística significativa en la zona de rechazo entre la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 que contienen fenoles.

**Tabla 5. Medias de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3.**

Factor	N	Media	Desviación Estándar	IC de 95%
<b>Muestra 1</b>	3	7,3100	0,0200	(7,2895; 7,3305)
<b>Muestra 2</b>	3	6,03000	0,01000	(6,00947; 6,05053)
<b>Muestra 3</b>	3	5,13667	0,01155	(5,11614; 5,15719)

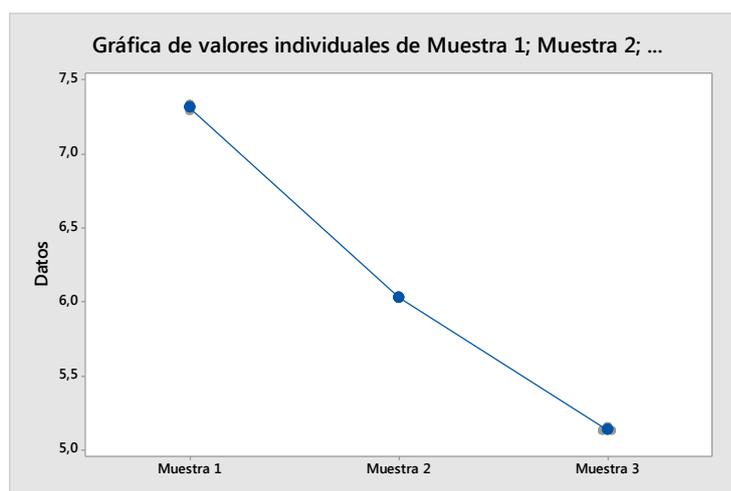
De la tabla 5 concluye que la desviación estándar agrupada es igual a 0,0145297, en consecuencia, la muestra 1 (Centro apícola de Huypishca) es más significativo que la muestra 2 (Centro apícola de Ichoca) y muestra 3 (Centro apícola de Quenuayoc).

**Tabla 6. Comparaciones en parejas de Tukey de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de 95%.**

Lugares	Repeticiones	Media	Agrupación
Muestra 1	3	7,310	A
Muestra 2	3	6,030	B
Muestra 3	3	5,137	C

De la tabla 6, las comparaciones en parejas de Tukey del 95% se deduce que las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre muestras. Esto significa que la muestra 1 del Centro apícola de Huypishca la media es 7,310, la muestra 2 del Centro apícola de Ichoca la media es 6,030 y muestra 3 del Centro apícola de Quenuayoc la media es 5,137.

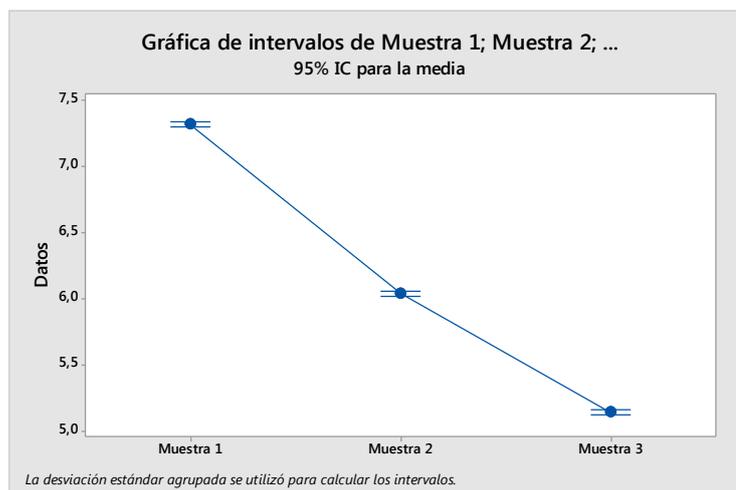
En la Figura 8, se muestra los valores individuales de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 para fenoles totales con intervalos de confianzas simultáneos de 95% de Tukey.



**Figura 8. Valores individuales de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de fenoles totales**

De la Figura 8 se deduce que muestra 1 del Centro Apícola de Huypishca tiene mayor puntuación que las encima de las muestras 2 y 3.

En la Figura 9, se muestra que los intervalos de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 para fenoles totales es 95% de IC para la media.



**Figura 9. Gráfica de intervalos de Muestra 1, Muestra 2 y muestra 3 de fenoles totales.**

La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 con 95% de intervalo de confianza (IC) entre las medias (figura 9).

En la tabla 7, se indica los resultados de análisis de varianza de los flavonoides totales de las 3 muestras recolectadas.

**Tabla 7. Flavonoides totales de propóleos del distrito de Huaraz**

Lugares	Repeticiones	Fenoles totales g/100g (b) medio $\pm$ desviación estándar	Valor F	Sig
<b>Muestra 1</b>	3	10,160 $\pm$ 0,010	227883,00	0,000**
<b>Muestra 2</b>	3	8,370 $\pm$ 0,010		
<b>Muestra 3</b>	3	4,750 $\pm$ 0,010		

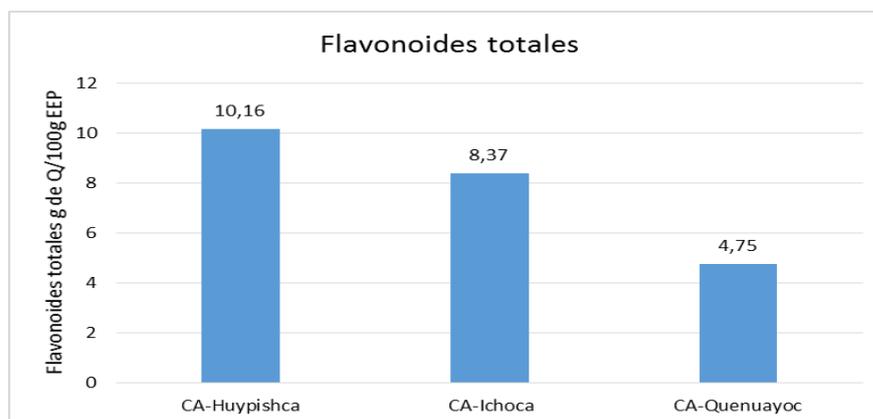
(b) g de quercetina/100g de muestra

\* \*ANOVA de un solo factor/HSD de tukey ( $p < 0.05$ ), existe diferencia significativa estadísticamente.

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA)  $p < 0,05$ ; por tanto existe diferencia significativa entre muestra 1 (Centro apícola de Huypishca), muestra 2 (Centro apícola de Ichoca) y la muestra 3 (Centro apícola de Quenuayoc) en los flavonoides totales.

Las muestras analizadas se encuentran directamente relacionado con la calidad de los propóleos que contienen flavonoides totales. Esto indica a que la fracción soluble en etanol agrupa la mayoría de los compuestos biológicamente activos (Figura 10).

Por tanto, la calidad de los propóleos está relacionado directamente de propóleos dependen de la vegetación que tienen en el Huypishca como Eucalipto, Molle, Chilca, Sauce, Melocotón y otros. Con esto se demuestra a que la fracción soluble en etanol agrupa la mayoría de los compuestos biológicamente activos son los flavonoides totales.



**Figura 10. Flavonoides totales de muestras de propóleos**

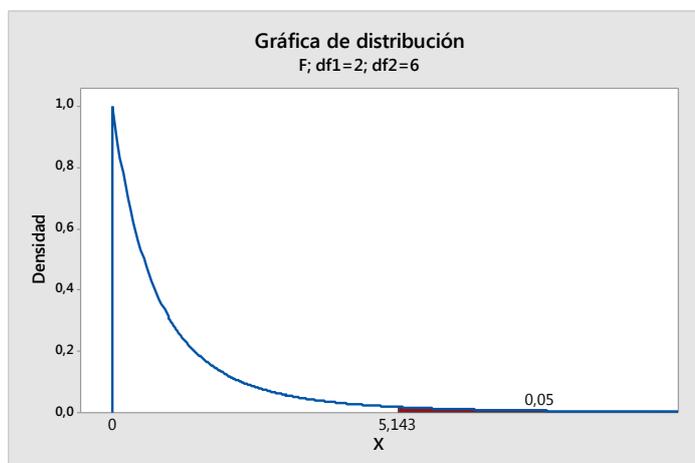
En el análisis de varianza (ANOVA) de flavonoides totales de la muestra 1 (Centro apícola - Huypishca), muestra 2 (Centro apícola - Ichoca) y muestra 3 (Centro apícola - Quenuayoc) se reporta en la tabla 8, el valor crítico de F en la

Figura 11, la media en la tabla 9 y la prueba de tukey en la Tabla 10, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

**Tabla 8. Análisis de varianza (AVONA) de flavonoides totales de las tres muestras**

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados ajustado	Cuadrado medio ajustado	Valor F	P-valor	Valor crítico de F
<b>Factor</b>	2	45,5766	22,7883	227883,00	0,000	5,143
<b>Error</b>	6	0,0006	0,0001			
<b>Total</b>	8	45,5772				

Se observa los resultados de la tabla 4, donde el valor  $F=227883,00$  es mayor que valor crítico  $F=5,143$ , esto significa que existe diferencia estadística significativa de los fenoles totales entre las muestras.



**Figura 11. Gráfica de distribución de Flavonoides totales entre muestras**

Interpretando la Figura 7, con valor crítico de  $F = 5,143$  se puede afirmar con certeza que si existe diferencia estadística significativa en la zona de rechazo entre la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 que contienen flavonoides.

**Tabla 9. Medias de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3**

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>Muestra 1</b>	3	10,1600	0,0100	(10,1459; 10,1741)
<b>Muestra 2</b>	3	8,37000	0,01000	(8,35587; 8,38413)
<b>Muestra 3</b>	3	4,75000	0,01000	(4,73587; 4,76413)

Por tanto, la desviación estándar agrupada es igual a 0,0100, en consecuencia, la muestra 1 (Centro apícola - Huypishca) es más significativo que la muestra 2 (Centro apícola – Ichoca) y muestra 3 (Centro apícola –Quenuayoc).

La agrupación de la información utilizando el método de Tukey y con un nivel de confianza de 95% (tabla 10).

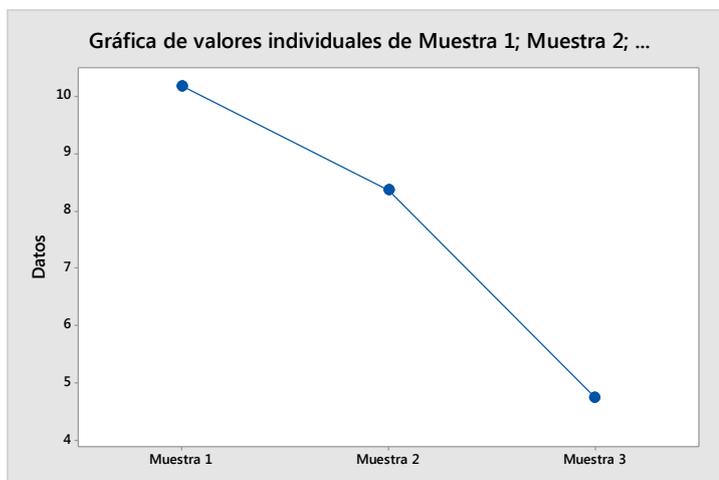
**Tabla 10. Comparaciones en parejas de Tukey de la muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de 95%.**

	<b>Repeticiones</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>Muestra 1</b>	3	10,1600	A
<b>Muestra 2</b>	3	8,37000	B
<b>Muestra 3</b>	3	4,75000	C

Las medias reportadas en la tabla 10, que no comparten una letra son significativamente diferentes, entonces la muestra 1 (Centro apícola - Huypishca) tiene una media de 10,1600, la muestra 2 (Centro apícola – Ichoca) tiene una media de 8,37000 y la muestra 3 (Centro apícola –Quenuayoc) tiene una media de 4,75000.

En la Figura 12, se reporta los valores individuales de muestra 1 (Centro apícola - Huypishca), muestra 2 (Centro apícola – Ichoca) y muestra 3 (Centro apícola –

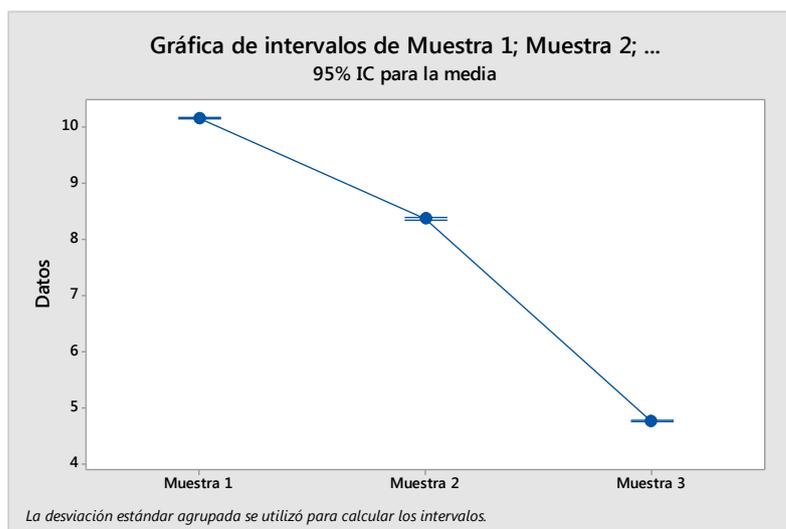
Quenuayoc) para flavonoides totales con intervalos de confianzas simultáneos de 95% de Tukey.



**Figura 12. Valores individuales de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 de fenoles totales**

De la Figura 12, se deduce que muestra 1 del Centro Apícola de Huypishca tiene mayor puntuación que las encima de las muestras 2 y 3

En la Figura 13, se indica que los intervalos de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 para flavonoides totales es 95% de IC para la media.



**Figura 13. Intervalos de muestra 1, muestra 2 y muestra 3**

La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos de muestra 1, muestra 2 y muestra 3 con 95% de intervalo de confianza (IC) entre las medias.

#### 4.2.2 Vida útil microbiológico del yogurt frutado con extracto etanólico de propóleo.

En las tablas 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17, se reporta los resultados del análisis microbiológico de las 5 muestras: T0= Yogurt frutado, T1= yogurt frutado con 0,4% EEP, T2= yogurt frutado con 0,8% EEP, T3= yogurt frutado con 1,2% EEP, T4= yogurt frutado con 1,6% EEP (anexo 4 y anexo 5). Estas muestras se almacenaron en refrigeración a una temperatura 5°C. Se realizó el análisis microbiológico desde el inicio y a cada 7 días por 42 días (anexo 6). La cantidad de cada muestra para el análisis microbiológico fue un frasco de 200 g por cada tratamiento. El incubado de las muestras previamente preparadas por dilución se realizó a un rango de temperaturas de 35 -37°C por 24 horas para numeración de bacterias coliformes totales por método de recuento en placas, numeración de hongos y levaduras a un rango de temperaturas de 20 – 24°C por 3 días. El recuento de hongos, levaduras y coliformes totales realizado en el laboratorio de biología de la UNASAM (anexo 7).

**Tabla 11. Análisis microbiológico de muestras almacenadas en refrigeración inicio**

Muestra de yogurt frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	Ausente	40 ufc/mL	Ausente
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	Ausente	33 ufc/mL	Ausente
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	Ausente	29 ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	Ausente	24 ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	18 ufc/mL	Ausente

**Tabla 12. Análisis microbiológico de muestras almacenadas en refrigeración 7 días**

Muestra de yogurt frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	Ausente	9x10 ufc/mL	Ausente
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	Ausente	8x10 ufc/mL	Ausente
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	Ausente	7x10 ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	Ausente	5x10 ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	4x10 ufc/mL	Ausente

De acuerdo a la tabla 11, en el tratamiento T0 muestra testigo al inicio (día 0) se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente y en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 son similares a la muestra testigo. En el recuento de las levaduras en tratamiento T0 muestra testigo igual a 40 ufc/mL, tratamiento T1 con 0,4% de EEP es 33 ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 29 ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 24 ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 18 ufc/mL; estos crecimientos no son significativos. En recuentos de coliformes totales ausentes en tratamiento T0 muestra testigo y en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 con extracto etanólico de propóleos; estos resultados no son significativos.

En la tabla 12, en tratamiento T0 muestra testigo a los 7 días, se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente y los tratamientos T1, T2, T3 y T4 de la misma manera; por tanto, no son significativos.

En el recuento de las levaduras en T0 muestra testigo igual a 90 ufc/mL, tratamiento T1 con 0,4% de EEP es 80 ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 70 ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 50 ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 40 ufc/mL, este crecimiento no es significativo.

En el recuento coliformes totales en la muestra T0 (testigo) y en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 ausente; por tanto, no son significativos.

**Tabla 13. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 14 días**

Muestra de yogurt frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	Ausente	98x10 ufc/mL	Ausente
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	Ausente	92x10 ufc/mL	Ausente
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	Ausente	48x10 ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	Ausente	34x10 ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	9.6x10 ufc/mL	Ausente

En la tabla 13, en el tratamiento T0 muestra testigo, tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento 3, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 14 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente.

En el recuento de las levaduras de 98x10 ufc/mL en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP es 92x10 ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 48x10 ufc/mL y tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 34x10 ufc/mL, estos crecimientos son significativos por superar el límite mínimo y máximo permitido de 10 - 10<sup>2</sup> ufc/mL, en cambio el tratamiento T4 con 1,6% EEP es 96 ufc/mL; no es significativo el crecimiento.

En el recuento coliformes totales en la muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0.8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP ausente; por tanto, no es significativo.

**Tabla 14. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 21 días**

Muestra de yogurt  frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	Ausente	24x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	Ausente	17x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	Ausente	28x10 <sup>4</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	Ausente	15x10 <sup>4</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	32 x10 <sup>2</sup> ufc/mL	Ausente

En la tabla 14, en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento 3, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 21 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; por lo tanto, no es significativo el crecimiento.

En el recuento de las levaduras de 24x10<sup>5</sup> ufc/mL en muestra T0 (testigo), T1 con 0,4% de EEP es 17x10<sup>5</sup> ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 28x10<sup>4</sup> ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 15x10<sup>4</sup> ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 32 x10<sup>2</sup> ufc/mL, el crecimiento es significativo por superar el límite mínimo y máximo permitido de 10 - 10<sup>2</sup> ufc/mL.

En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6%; el crecimiento no es significativo.

**Tabla 15. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 28 días**

Muestra de yogurt frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	Ausente	20x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	Ausente	24x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	Ausente	34 x10 <sup>4</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	Ausente	52x10 <sup>3</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	33x10 <sup>3</sup> ufc/mL	Ausente

En la tabla 15, en la muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento 3, tratamiento T3 yogurt con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 28 días se determinó de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; el crecimiento no es significativo.

En el recuento de las levaduras de 20x10<sup>5</sup> ufc/mL en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP es 24x10<sup>5</sup> ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 34 x10<sup>4</sup> ufc/mL y tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 52x10<sup>3</sup> ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 33x10<sup>3</sup> ufc/mL; el crecimiento es significativo por superan el límite mínimo y máximo permitido de 10 - 10<sup>2</sup> ufc/m.

En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 1,2% de EEP y tratamiento T4 con 1,6% de EEP; este crecimiento no es significativo.

**Tabla 16. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 35 días**

Muestra de yogurt frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	Ausente	27x10 <sup>6</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	Ausente	11x10 <sup>6</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	Ausente	13x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	Ausente	92x10 <sup>4</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	60x10 <sup>4</sup> ufc/mL	Ausente

En la tabla 16, en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento 3, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 35 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; no es significativo el crecimiento.

En el recuento de las levaduras de 27x10<sup>6</sup> ufc/mL en muestra T0 (testigo), T1 con 0,4% de EEP es 11x10<sup>6</sup> ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 48x10 ufc/mL y tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 13x10<sup>5</sup> ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 60x10<sup>4</sup> ufc/mL, el crecimiento es significativo porque superan el límite mínimo y máximo permitido de 10 - 10<sup>2</sup> ufc/mL.

En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP; el crecimiento no es significativo.

**Tabla 17. Análisis microbiológico de yogurt con EEP almacenadas en refrigeración 42 días**

Muestra de yogurt frutado	Recuento		
	Mohos	Levaduras	Coliformes totales
	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL	Limite 10 - 10 <sup>2</sup> ufc/mL
<b>T0= Testigo</b>	No realizado	No realizado	No realizado
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	No realizado	No realizado	No realizado
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	60x10 <sup>3</sup> ufc/mL	10x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	20x10 <sup>3</sup> ufc/mL	11x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	Ausente	21x10 <sup>5</sup> ufc/mL	Ausente

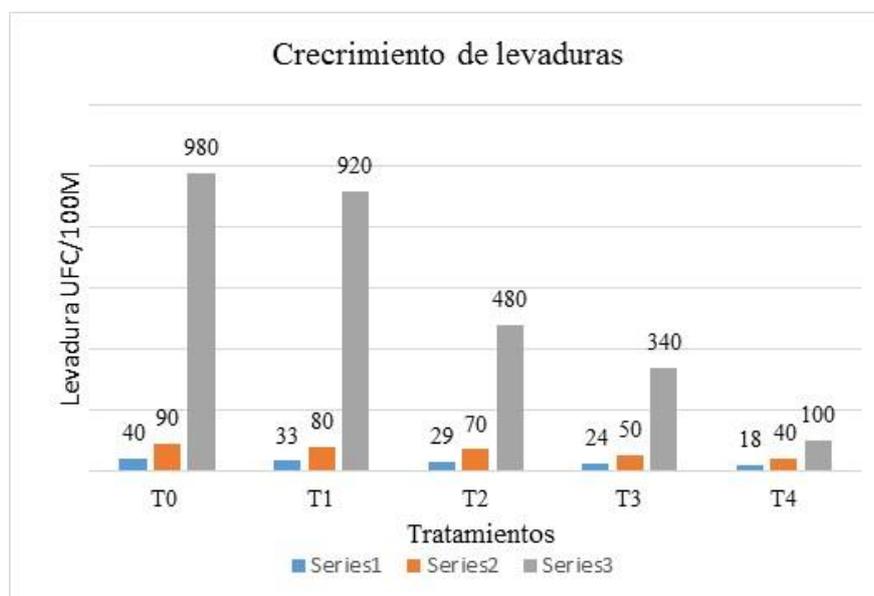
En la tabla 17, a los 45 días los tratamientos T0 (testigo) y T1 con 0,4% EEP, no se realizó el recuento en placas por derrame de la muestra a causa de producción de gas por fermentación de la muestra. Se realizó el inoculado en placas los tratamientos T2 con 0,8% de EEP, tratamientos T3 con 1,2% EEP y T4 con 1,6% EEP, después de 48 horas de incubado en el recuento de hongos se halló 60x10<sup>3</sup> ufc/mL en tratamiento T2 con 0,8% de EEP, 20x10<sup>3</sup> ufc/mL en el tratamiento T3 con 1,2% de EEP; el crecimiento es significativo por superar el límite mínimo y máximo permitido de 10 - 10<sup>2</sup> ufc/mL. El tratamiento T4 con 1,6% EEP en el recuento de hongos ausente; no es significativo el crecimiento.

En el recuento de levadura en el tratamiento T2 con 0,8% EEP es 10x10<sup>5</sup> ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% EEP es 11x10<sup>5</sup> ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 21x10<sup>5</sup> ufc/mL; el crecimiento es significativo porque se encuentran muy superior límite mínimo y máximo permitido de 10 - 10<sup>2</sup> ufc/m).

En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0.8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP; el crecimiento no es significativo.

El extracto etanólico de propóleos usados en 0,8%, 1,2% y 1,6% tienen efectos significativos frente a hongos y coliformes totales a excepción de la levadura. En consecuencia, la vida útil del yogurt frutado con 1,6% extracto etanólico de propóleos T4 se incrementa por 14 días aproximadamente conservándolo a una temperatura de refrigeración de 5°C, siendo apto para los consumidores.

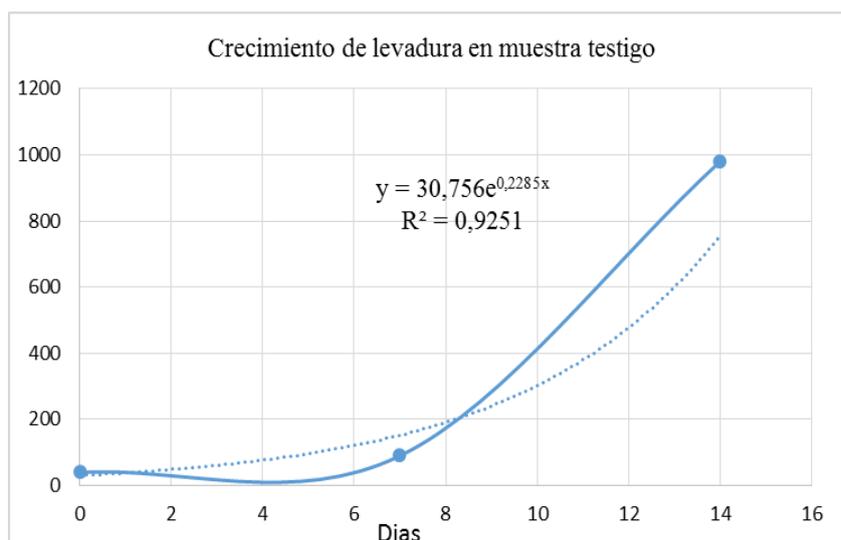
En la figura 14, se indica el crecimiento de la levadura en los tratamientos T1, T2, T3 y T4; y en la muestra testigo (T0) desde el inicio hasta los 14 días. La evaluación microbiológica de cada una de las muestras se realizó cada 7 días.



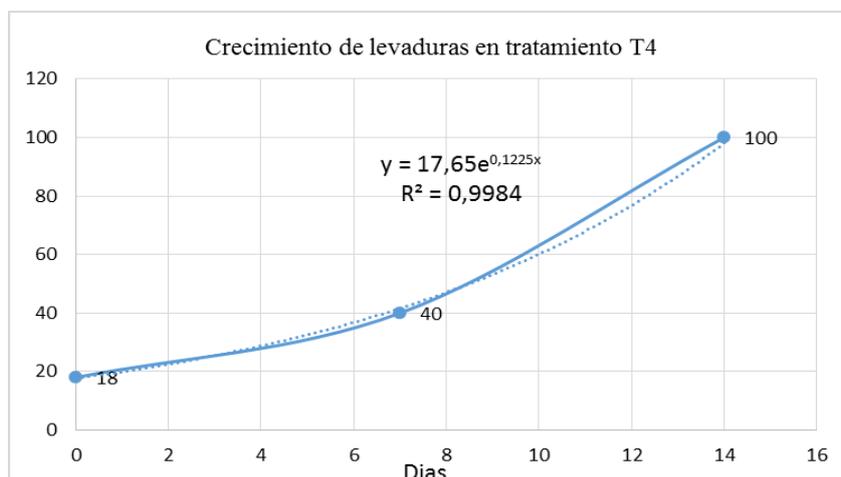
**Figura 14. Crecimiento de la levadura en las cinco muestras**

De acuerdo a la figura 14, se deduce que a mayor porcentaje de extracto de propóleos (1.6%) adicionado como conservante natural en un yogurt frutado se conserva por más días como en el tratamiento T4.

En las figuras 15 y 16, se muestran el crecimiento de la levadura en el tratamiento T4 y en la muestra testigo T0.



**Figura 15. Crecimiento de la levadura en la muestra testigo T0**



**Figura 16. Crecimiento de la levadura en el tratamiento T4**

El crecimiento de la levadura en las muestras es exponencial: muestra testigo T0,  $y = 30,756e^{0,2285x}$ , con  $R^2 = 0,9251$  y tratamiento T4  $y = 17,65e^{0,1225x}$ , con  $R^2 = 0,9984$ . Por tanto, el modelo matemático predictivo para determinar el tiempo de vida útil es:

$$t = \ln y / 0,2285 - (\ln 30,756) / 0,2285 \text{ para muestra testigo T0 (a)}$$

$$t = \ln y / 0,1225 - (\ln 17,65) / 0,1225 \text{ para tratamiento T4 (b)}$$

#### 4.2.2.1 Control de pH de los tratamientos.

En la tabla 18, se tiene la lectura de pH de cada uno de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4, desde el día 0 (inicio) hasta los 42 días.

**Tabla 18. Control de pH en diferentes muestras con adición de extracto etanólico de propóleo**

Control de pH por días							
Días	0	7	14	21	28	35	42
Muestra de yogurt frutado	pH						
<b>T0 = Testigo</b>	4,43	4,37	4,26	4,15	3,82	3,77	3,75
<b>T1= con 0,4% EEP</b>	4,43	4,39	4,31	4,26	3,91	3,78	3,78
<b>T2= con 0,8% EEP</b>	4,43	4,40	4,36	4,29	4,17	3,85	3,80
<b>T3= con 1,2% EEP</b>	4,43	4,42	4,37	4,31	4,23	3,92	3,85
<b>T4= con 1,6% EEP</b>	4,43	4,43	4,37	4,34	4,25	4,00	3,90

En los tratamientos T0 (testigo) y T1 de yogurt frutado con 0,4% extracto etanólico de propóleos a los 35 y 42 días conservados en refrigeración a temperatura de 5°C, se observó la presencia de gas debido a la fermentación del yogurt frutado por la multiplicación de las levaduras.

En la tabla 18 se observa que los tratamientos tienen un comportamiento descendente del pH y ascendente de la acidez de las muestras de yogurt frutado durante la conservación a temperatura de 5°C en refrigeración; en consecuencia, es evidente que influye que el tiempo de vida útil de cada tratamiento con la adición de extracto etanólico de propóleos.

#### 4.2.3 Características sensoriales del yogurt frutado

La evaluación sensorial se realizó con la participación de 30 panelistas semi-entrenados. Para ésta evaluación se consideró a los alumnos del VIII, IX y X ciclo de

industrias alimentarias quienes son consumidores frecuentes de yogurt frutado comercial o yogurt natural. Los resultados de la evaluación individual por atributos y tratamientos de acuerdo a la escala hedónica (anexos 9, 10 y 11).

La evaluación sensorial del yogurt frutado sin extracto etanólico de propóleos de la muestra testigo T0 (yogurt frutado sin EEP) y yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos con 0,4%, 0,8%, 1,2% y 1,6% en los tratamientos T1, T2, T3, T4; se aplicó al panel de degustación para que realicen la evaluación del color, olor, sabor y aceptabilidad.

En el anexo 11, se presentan los resultados del atributo color donde se observa que la muestra testigo T0 (yogurt frutado sin EEP) tuvo mejor aceptación con 164,5 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de extracto etanólico de propóleos 158 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de extracto etanólico de propóleos 148 puntos, T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 143 puntos y T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de extracto etanólico de propóleos 140 puntos.

En el mismo anexo 11, se presentan los resultados del atributo olor donde se observa que la muestra testigo T0 (yogurt frutado sin EEP) tuvo mejor aceptación con 165,5 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de extracto etanólico de propóleos 144,5 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de extracto etanólico de propóleos 121 puntos, T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de extracto etanólico de propóleos 114.5 puntos y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 108.5 puntos.

En cuanto al atributo sabor (anexo 11), se observa que la muestra testigo T0 (yogurt frutado sin EEP) tuvo mejor aceptación con 178 puntos, seguido de los

tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de EEP 136 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de EEP 104 puntos, T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de EEP 89,5 puntos y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP 79,5 puntos.

Respecto al atributo aceptación, se observa que la muestra testigo T0 (yogurt frutado sin EEP) tuvo mejor aceptación con 174,1 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0.4% de EEP 149,5 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de EEP 111 puntos, T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de EEP 96,5 puntos y T3 muestra de yogurt frutado con 1,6% de EEP 93 puntos.

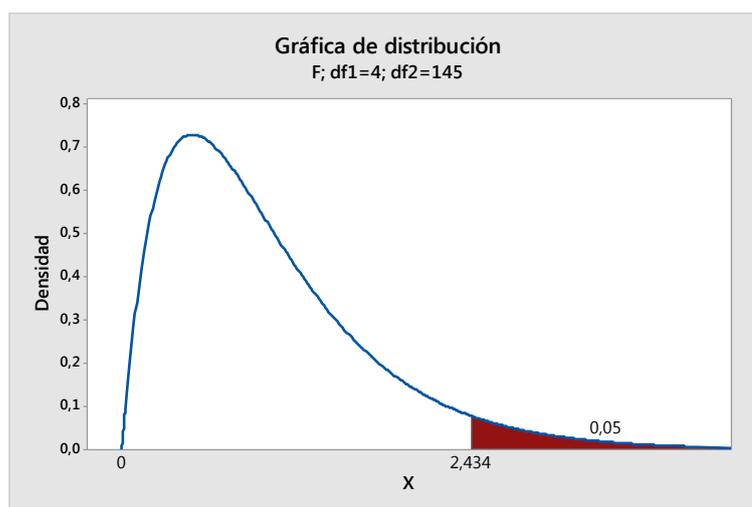
#### 4.2.3.1 Atributo color

Para diferenciar estadísticamente los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 relacionado al atributo color se realizó con el software Minitab17 y se reporta en las tablas 19, 20 y 21; y en las Figuras 17, 18 y 19.

**Tabla 19. Análisis de varianza (ANOVA) del atributo color de los cinco tratamientos.**

<b>Fuente</b>	<b>Grado de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados ajustado</b>	<b>Cuadrado medio ajustado</b>	<b>Valor F</b>	<b>P-valor</b>	<b>Valor crítico de F</b>
<b>Tratamientos</b>	4	14,16	3,5400	5,40	0,000	2,434
<b>Error</b>	145	95,01	0,6552			
<b>Total</b>	149	109,17				

De la tabla 19, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) el p valor (0,000) es menor que 0,05; de esto se deduce que existe diferencia estadísticamente significativa entre la muestra testigo T0 y los tratamientos T1, T2, T3 y T4 en atributo color.



**Figura 17. Evaluación sensorial del atributo color de los cinco tratamientos.**

Interpretando la Figura 17, con valor crítico de  $F = 2,434$  se puede afirmar que, si existe diferencia estadística significativa en la zona de rechazo, dado que  $F$  calculado 5.40 es mayor al valor crítico de  $F$ .

**Tabla 20. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de atributo color**

Factor	N	Media	Desviación Estándar	IC de 95%
<b>T0</b>	30	5,483	0,623	(5,191; 5,775)
<b>T1</b>	30	5,267	0,751	(4,975; 5,559)
<b>T2</b>	30	4,933	0,878	(4,641; 5,225)
<b>T3</b>	30	4,667	0,941	(4,375; 4,959)
<b>T4</b>	30	4,767	0,817	(4,475; 5,059)

La desviación estándar agrupada = 0,809463

De la tabla 20 se deduce que la desviación estándar agrupadas es igual a 0,809463; por tanto, el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin tienen extracto etanólico de propóleos respecto al atributo color es más significativo. Los tratamientos T1, T2, T3 y T4 que tienen extracto etanólico de propóleos con 0,4%, 0,8%, 1,2% y 1,6% se aproximan al tratamiento T0.

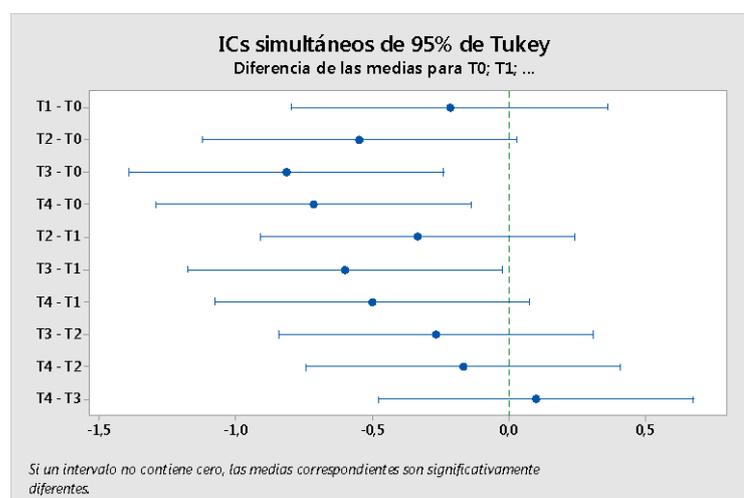
En las comparaciones en parejas, utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza de 95% se muestra en la tabla 21.

**Tabla 21. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95% - atributo color**

Factor	N	Media	Agrupación
T0	30	5,483	A
T1	30	5,267	A B
T2	30	4,933	A B C
T3	30	4,767	B C
T4	30	4,667	C

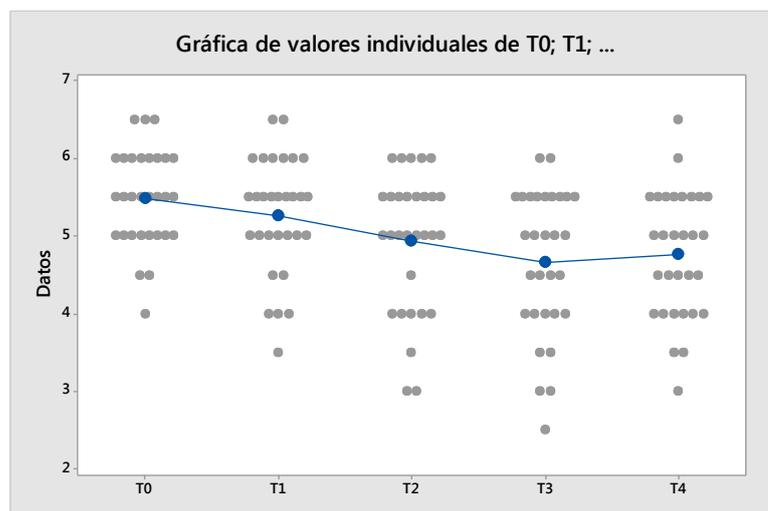
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos como los tratamientos T0 muestra testigo y T4 yogurt frutado con 1,6% de EEP; pero los tratamientos T1 yogurt frutado con 0,4% de EEP, T2 yogurt frutado con 0,8% de EEP y T3 yogurt frutado con 1,2% de EEP no son significativamente diferentes porque comparten una letra.

En la figura 18, se reporta las diferencias de las medias ICs simultáneos de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4.



**Figura 18. Diferencias de medias ICs simultáneos de 95% de tukey atributo color**

Los intervalos no contienen cero como se observa en la Figura 18, por tanto, las medias correspondientes son significativas en intervalos simultáneos de 95% de Tukey.



**Figura 19. Valores individuales de los cinco tratamientos - atributo color**

Como se observa en la Figura 19, los valores individuales de los tratamientos se encuentran ubicados en puntos diferentes, por tanto, existe diferencia significativa entre los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4.

El tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin EEP les gustó el color a los panelistas seguido del tratamiento T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de EEP y T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de EEP, pero los tratamientos T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de EEP y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP le gustó el color debido a la reacción propia del propóleo en medio viscoso.

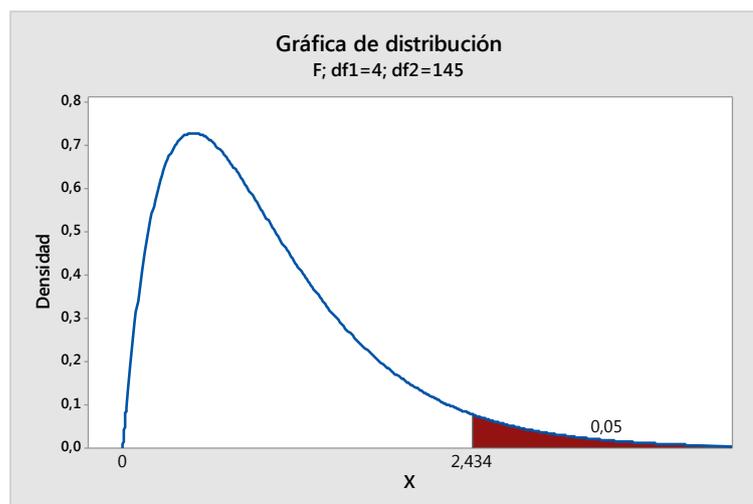
#### 4.2.3.2 Atributo olor

Para diferenciar estadísticamente los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 relacionado al atributo olor se realizó con el software Minitab17 y se reporta en las tablas 22, 23 y 24; y en las Figuras 20, 21 y 22.

**Tabla 22. Análisis de varianza (AVONA) del atributo olor de los cinco tratamientos**

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados ajustado	Cuadrado medio ajustado	Valor F	P-valor	Valor crítico de F
Tratamientos	4	75,03	18,7567	26,40	0,000	2,434
Error	145	103,03	0,7106			
Total	149	178,06				

De la tabla 22, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) el p valor (0,000) es menor que 0,05; se deduce que existe diferencia estadísticamente significativa entre la muestra testigo T0 y los tratamientos T1, T2, T3 y T4 en atributo olor.



**Figura 20. Evaluación sensorial del atributo olor de los cinco tratamientos.**

Interpretando la Figura 20, con valor crítico de  $F = 2,434$  se puede afirmar que, si existe diferencia estadística significativa en la zona de rechazo, dado que  $F$  calculado 26,40 es mayor al valor crítico de  $F$ .

**Tabla 23. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4**

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>T0</b>	30	5,517	0,713	(5,212; 5,821)
<b>T1</b>	30	4,817	0,760	(4,512; 5,121)
<b>T2</b>	30	4,033	0,870	(3,729; 4,338)
<b>T3</b>	30	3,817	0,846	(3,512; 4,121)
<b>T4</b>	30	3,617	0,997	(3,312; 3,921)

La desviación estándar agrupada = 0,842956

De la tabla 23 se deduce que la desviación estándar agrupadas es igual a 0,842956; entonces el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado respecto a atributo olor es más significativo. Los tratamientos T1, T2, T3 y T4 que tienen extracto etanólico de propóleos con 0,4%, 0,8%, 1,2% y 1,6% existe diferencia significativa con respecto al tratamiento T0.

Las comparaciones en parejas utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza de 95% se reporta en la tabla 24.

**Tabla 24. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95%.**

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>T0</b>	30	5,517	A
<b>T1</b>	30	4,817	B
<b>T2</b>	30	4,033	C
<b>T3</b>	30	3,817	C
<b>T4</b>	30	3,617	C

Los tratamientos T0 muestra testigo y T1 yogurt frutado con 0,4% de EEP son significativamente diferentes entre sí las medias porque no comparten una letra, pero los tratamientos T2 yogurt frutado con 0,8% de EEP, T3 yogurt frutado con 1,2% de



El tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin EEP les gustó el olor a los panelistas seguido del tratamiento T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de EEP y T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de EEP, pero los tratamientos T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de EEP y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP les gustó menos por el olor característico del propóleo.

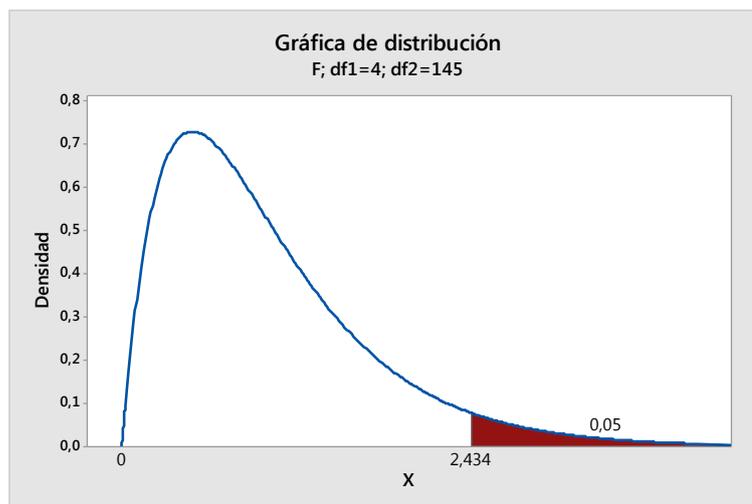
#### 4.2.3.3 Atributo sabor

Para diferenciar estadísticamente los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 relacionado al atributo sabor se realizó con el software Minitab17 y se reporta en las tablas 25, 26 y 27; y en las Figuras 23, 24 y 25.

**Tabla 25. Análisis de varianza (AVONA) del atributo sabor de los cinco tratamientos**

<b>Fuente</b>	<b>Grado de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados ajustado</b>	<b>Cuadrado medio ajustado</b>	<b>Valor F</b>	<b>P-valor</b>	<b>Valor crítico de F</b>
<b>Tratamientos</b>	4	213,76	53,4392	86,46	0,000	2,434
<b>Error</b>	145	89,62	0,6180			
<b>Total</b>	149	303,37				

De la tabla 25, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) el p valor (0,000) es menor que 0,05; en consecuencia, existe diferencia estadísticamente significativa entre la muestra testigo T0 y los tratamientos T1, T2, T3 y T4 en atributo color.



**Figura 23. Evaluación sensorial del atributo sabor de los cinco tratamientos.**

Interpretando la Figura 23, con valor crítico de  $F = 2,434$  se puede afirmar que, si existe diferencia estadística significativa en la zona de rechazo, dado que  $F$  calculado 86,46 es mayor al valor crítico de  $F$ .

**Tabla 26. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4**

Factor	N	Media	Desviación Estándar	IC de 95%
<b>T0</b>	30	5,933	0,553	(5,650; 6,217)
<b>T1</b>	30	4,533	0,840	(4,250; 4,817)
<b>T2</b>	30	3,467	0,850	(3,183; 3,750)
<b>T3</b>	30	2,983	0,846	(2,700; 3,267)
<b>T4</b>	30	2,650	0,800	(2,366; 2,934)

Desviación estándar agrupadas = 0.786159

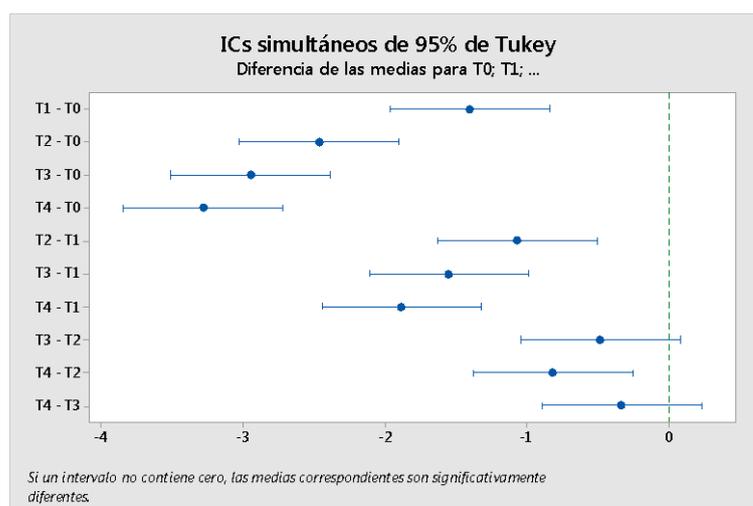
De la tabla 26 se deduce que la desviación estándar agrupadas es igual a 0,786159, es decir el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado respecto a atributo sabor es más significativo que los tratamientos T1 yogurt frutado con 0,4% EEP, T2 yogurt frutado con 0,8% EEP, T3 yogurt frutado con 1,2% EEP y T4 yogurt frutado con 1,6% EEP.

Las comparaciones en parejas utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza de 95% se reporta en la tabla 27.

**Tabla 27. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95%.**

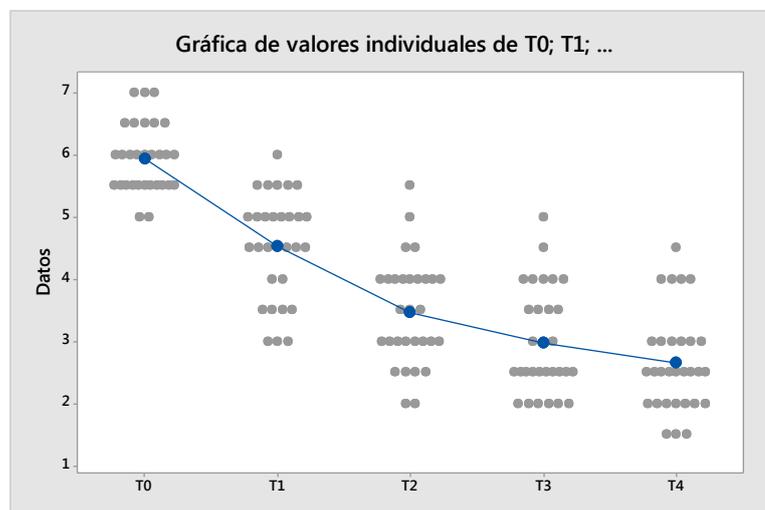
Factor	N	Media	Agrupación
T0	30	5,933	A
T1	30	4,533	B
T2	30	3,467	C
T3	30	2,983	C D
T4	30	2,650	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes son los tratamientos T0 muestra testigo, T1 yogurt frutado con 0,4% EEP y T2 yogurt frutado con 0,8 % EEP; en cambio los tratamientos T3 yogurt frutado con 1,2% EEP y T4 yogurt frutado con 1,6% EEP no son significativamente diferentes porque comparten una letra.



**Figura 24. Diferencia de las medias de ICs simultáneos de 95% de tukey de atributo sabor**

De la Figura 22, se deduce que si un intervalo no contiene cero entonces las medias correspondientes son significativas.



**Figura 25. Valores individuales de los cinco tratamientos de atributo sabor**

Como se observa en la Figura 23, los valores individuales de los tratamientos se encuentran ubicados en puntos diferentes; por tanto, existe diferencia significativa entre tratamientos.

El tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin EEP les agradó el sabor a los panelistas seguido del tratamiento T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de EEP; pero los tratamientos T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de EEP, T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de EEP y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP les gustó menos por el sabor típico del propóleo.

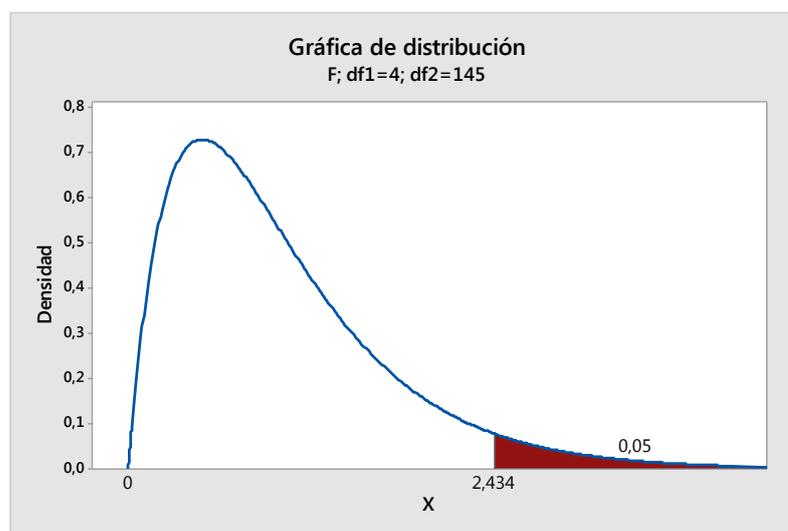
#### **4.2.3.4 Atributo aceptabilidad**

Para diferenciar estadísticamente los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 relacionado al atributo aceptabilidad se realizó con el software Minitab17 y los resultados se reportan en las tablas 28, 29 y 30; y en las Figuras 26, 27 y 28.

**Tabla 28. Análisis de varianza (AVONA) del atributo aceptabilidad de los cinco muestras**

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados ajustado	Cuadrado medio ajustado	Valor F	P-valor	Valor crítico de F
Tratamientos	4	168,10	42,0262	82,31	0,000	2,434
Error	145	74,03	0,5106			
Total	149	242,14				

De la tabla 28, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) el p valor (0,000) es menor que 0,05; en consecuencia, existe diferencia estadísticamente significativa entre la muestra testigo T0 y los tratamientos T1, T2, T3 y T4 en atributo aceptabilidad.



**Figura 26. Evaluación sensorial del atributo aceptabilidad de los cinco tratamientos.**

Interpretando la Figura 24, con valor crítico de  $F = 2,434$  se puede afirmar que, si existe diferencia estadística significativa en la zona de rechazo, dado que  $F$  calculado 82,31 es mayor al valor crítico de  $F$ .

**Tabla 29. Medias de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4**

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>IC de 95%</b>
<b>T0</b>	30	5,933	0,571	(5,545; 6,061)
<b>T1</b>	30	4,533	0,713	(4,725; 5,241)
<b>T2</b>	30	3,467	0,783	(3,442; 3,217)
<b>T3</b>	30	2,983	0,806	(2,959; 3,475)
<b>T4</b>	30	2,650	0,675	(2,842; 3,358)

Desviación estándar agrupadas = 0,714544

De la tabla 29 se deduce que la desviación estándar agrupadas es igual a 0.714544, en consecuencia, el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado respecto a atributo aceptabilidad es más significativo que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 tienen extracto etanólico de propóleos con 0,4%, 0,8%, 1,2% y 1,6%.

Las comparaciones en parejas utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza de 95% (tabla 31).

**Tabla 30. Comparaciones en parejas de Tukey de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4 de 95%.**

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
<b>T0</b>	30	5,803	A
<b>T1</b>	30	4,983	B
<b>T2</b>	30	3,700	C
<b>T3</b>	30	3,217	C D
<b>T4</b>	30	3,100	D

De la tabla 30 se deduce que las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes son los tratamientos T0 muestra testigo, T1 yogurt frutado con 0,4% EEP y T2 yogurt frutado con 0,8 % EEP; en cambio los



Como se observa en la Figura 26, los valores individuales de los tratamientos se encuentran ubicados en puntos diferentes, por tanto, existe diferencia significativa entre tratamientos.

El tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin EEP tuvo mejor aceptación en los cuatro atributos seguido del tratamiento T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de EEP, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de EEP. Los tratamientos T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de EEP y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de EEP tuvieron menor puntuación debido al olor y sabor característico del propóleo por contenido flavonoides totales.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 Características físico-químicas de propóleos recolectados.

De la tabla 2, se deduce que el contenido de humedad se presentan diferencias entre las muestras recolectadas de los centros apícolas, hallándose valores entre 3,44 - 4,64%, esto concuerda con lo reportado por Sosa et al., (2000b); citado por Martínez, (2009), al encontrarse los propóleos argentinos porcentajes de humedad entre un 2 - 7%. Estos valores indican que las tres muestras analizadas cumplen con la normativa vigente del Ministerio de Agricultura del Brasil (2001), citado por Martínez, (2009), que dice que la humedad no debe superar el 8 %.

En el contenido de cenizas hay diferencias entre los centros apícolas en el distrito de Huaraz, se encuentran entre 3,1 – 4,8 %. Todos los valores son inferiores al 5%, que es el máximo permitido por la normativa internacional (Ministerio agricultura de Brazil, 2001; citado por Martínez, 2009), estos propóleos de los centros apícolas cumplen satisfactoriamente con esta reglamentación internacional.

En el contenido de ceras existen diferencias entre las muestras de los centros apícolas en el distrito de Huaraz, estos se encuentran entre 34 - 45%; en el contenido de ceras se observó un menor porcentaje en las muestras colectadas por el método de raspado en comparación con las obtenidas es mayor por el método de malla (Martínez, 2009). Con respecto a la calidad (rendimiento de compuestos bioactivos) un alto contenido de ceras no es favorable porque estas no presentan actividad biológica. En términos generales, ninguna de las muestras recolectadas de los centros apícolas en el distrito de Huaraz cumple con la normativa Brasileña que solo permite un máximo del 25% (Ministerio de Agricultura de Brazil, 2001; citado por Martínez,

2009). Es probable que el alto contenido de ceras obtenidas en los análisis de las tres muestras recolectadas sea un reflejo de la mala manipulación de muestras o que las abejas mezclaron mayor cantidad de ceras con las resinas colectadas, para poder tapar los orificios de las entretapas o fijar los bastidores.

En cuanto al contenido de resinas de las tres muestras es de 50 - 57%, pero según Burdock (1998) citado por Palomino (2009), reporta que la composición general aproximada de los propóleos es: 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias que incluyen escombros orgánicos. Sin embargo, este resultado de composición, puede variar significativamente con diferentes factores, tales como la floración del entorno a las colmenas que difiere de una zona a otra y la temporada de acopio del material.

Las impurezas mecánicas visibles presentes en el propóleo (tierra, partes de abeja, etc.), principalmente recolectado por método de raspado se obtuvo resultados entre 10,6 – 18,8%; pero según la Norma Rusa (1997) citado por Álvarez (2012) deberían estar por debajo del 20%, por tanto, el método de recolección por raspado del propóleos influye en la calidad del mismo.

En cuanto al contenido de fenoles y flavonoides totales caracterizados mediante el análisis físico-químico que reporta en la tabla 2; se deduce que la muestra M1 del Centro apícola de Huypishca es mayor que la muestra M2 del Centro apícola de Ichoca seguido de la muestra M3 del Centro apícola de Quenuayoc del distrito de Huaraz, se encuentran directamente relacionado con la calidad de los propóleos. Con esto se demuestra a que la fracción soluble en etanol agrupa la mayoría de los compuestos biológicamente activos son los flavonoides totales.

## 5.2 Vida útil microbiológico del yogurt frutado con extracto etanólico de propóleos.

De acuerdo a la tabla 11, en el tratamiento T0 muestra testigo al inicio (día 0) se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente y en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 similar a la muestra testigo. En el recuento de las levaduras en tratamiento T0 muestra testigo igual a 40 ufc/mL, tratamiento T1 con 0,4% de EEP es 33 ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 29 ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 24 ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es 18 ufc/mL; estos crecimientos no son significativos. En recuentos de coliformes totales ausentes en tratamiento T0 muestra testigo y en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 con extracto etanólico de propóleos; estos resultados no son significativos por encontrarse dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

En la tabla 12, en tratamiento T0 muestra testigo a los 7 días, se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente y los tratamientos T1, T2, T3 y T4 de la misma manera; por tanto, no es significativo. En el recuento de las levaduras en T0 muestra testigo igual a 90 ufc/mL, tratamiento T1 con 0,4% de EEP es 80 ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es 70 ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% de EEP es 50 ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% de EEP es 40 ufc/mL, este crecimiento no es significativo. En el recuento coliformes totales ausente en la muestra T0 (testigo) y en los tratamientos T1, T2, T3 y T4; por tanto, no son significativos el crecimiento porque se encuentran dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

En la tabla 13, en el tratamiento T0 muestra testigo, tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 yogurt frutado con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1.2% de

EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 14 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; no es significativo el crecimiento. En el recuento de las levaduras de  $98 \times 10^4$  ufc/mL en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP es  $92 \times 10^4$  ufc/mL, tratamiento T2 con 0,8% de EEP es  $48 \times 10^4$  ufc/mL y tratamiento T3 con 1,2% de EEP es  $34 \times 10^4$  ufc/mL, estos crecimientos son significativos por superar el límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017), en cambio el tratamiento T4 con 1,6% EEP es 96 ufc/mL, no es significativo el crecimiento por encontrarse dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento coliformes totales en la muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 yogurt frutado con 0,8% de EEP, tratamiento 3, tratamiento T3 yogurt con 1.2% de EEP y T4 yogurt frutado con 1.6% de EEP ausente; por tanto, no es significativo el crecimiento por encontrarse en los límites mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

En la tabla 14, en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 21 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; por tanto, no es significativo el crecimiento por encontrarse dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento de las levaduras de  $24 \times 10^5$  ufc/mL en muestra T0 (testigo), T1 con 0,4% de EEP es  $17 \times 10^5$  ufc/mL, tratamiento T2 con 0.8% de EEP es  $28 \times 10^4$  ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% de EEP es  $15 \times 10^4$  ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es  $32 \times 10^2$  ufc/mL; el crecimiento es significativo por superar el límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a

DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento 3, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6%; el crecimiento no es significativo porque se encuentran dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

En la tabla 15, en la muestra T0 (testigo), tratamiento con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 28 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; no es significativo estos valores están dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento de las levaduras de  $20 \times 10^5$  ufc/mL en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0.4% de EEP es  $24 \times 10^5$  ufc/mL, tratamiento T2 con 0.8% de EEP es  $34 \times 10^4$  ufc/mL y tratamiento T3 con 1.2% de EEP es  $52 \times 10^3$  ufc/mL y tratamiento T4 con 1.6% EEP es  $33 \times 10^3$  ufc/mL; el crecimiento es significativo por superan el límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 de yogurt frutado con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y tratamiento T4 con 1,6% de EEP; este crecimiento no es significativo porque se encuentran dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

En la tabla 16, en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP a los 35 días se determinó después de 48 horas de incubado, en el recuento de hongos ausente; no es significativo porque están dentro del límite mínimo y máximo

permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento de las levaduras de  $27 \times 10^6$  ufc/mL en muestra T0 (testigo), T1 con 0,4% de EEP es  $11 \times 10^6$  ufc/mL, tratamiento T2 con 0.8% de EEP es  $48 \times 10^4$  ufc/mL y tratamiento T3 con 1,2% de EEP es  $13 \times 10^5$  ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es  $60 \times 10^4$  ufc/mL, el crecimiento es significativo porque superan el límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP; el crecimiento no es significativo por encontrarse dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

En la tabla 17, a los 45 días los tratamientos T0 (testigo) y T1 con 0,4% extracto etanólico de propóleos, no se realizó el recuento en placas por el abombamiento de las muestras síntoma corriente de la actividad de las levaduras causantes de producción de gas por fermentación (Céspedes, 2016). Se realizó el inoculado en placas los tratamientos T2 con 0,8% de EEP, tratamientos T3 con 1,2% EEP y T4 con 1.6% EEP, después de 48 horas de incubado en el recuento de hongos se halló  $60 \times 10^3$  ufc/mL en tratamiento T2 con 0,8% de EEP,  $20 \times 10^3$  ufc/mL en el tratamiento T3 con 1,2% de EEP; el crecimiento es significativo por superar el límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). El tratamiento T4 con 1.6% EEP en el recuento de hongos ausente; no es significativo el crecimiento por encontrarse dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento de levadura en el tratamiento T2 con 0,8% EEP es  $10 \times 10^5$  ufc/mL, tratamiento T3 con 1,2% EEP es  $11 \times 10^5$  ufc/mL y tratamiento T4 con 1,6% EEP es

$21 \times 10^5$  ufc/mL; el crecimiento es significativo porque se encuentran muy superior límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017). En el recuento coliformes totales ausente en muestra T0 (testigo), tratamiento T1 con 0,4% de EEP, tratamiento T2 con 0,8% de EEP, tratamiento T3 con 1,2% de EEP y T4 con 1,6% de EEP; el crecimiento no es significativo porque estos valores se encuentran dentro del límite mínimo y máximo permitido de  $10 - 10^2$  ufc/mL de acuerdo a DIGESA (2008) y DIGESA (2017).

De acuerdo a Céspedes (2016) se demuestra que las levaduras y mohos en particular son poco afectadas por el pH y cuando disponen como fuente de energía de sacarosa y lactosa dan lugar a la alteración rápidamente; esto puede ser por la presencia de **Kluyveromyces fragilis** levaduras lactosa fermentativa que se desarrolla en la superficie del producto y el crecimiento de mohos en el yogurt puede ser por la presencia **Mucor** o **Rhizopus**; la causa puede ser por el mal cerrado de la tapa de las muestras, el primer caso las levaduras descomponen el azúcar en alcohol y agua en ausencia de oxígeno, mientras que en presencia del oxígeno descomponen el azúcar en anhídrido carbónico y agua, y en el segundo caso los mohos se desarrollan en presencia de oxígeno condiciones aeróbicas.

La presencia de levaduras en los yogures es un problema muy importante y para evitar la fermentación del producto (abombamiento de las tapas de los envases) Danis, Ashton y McCaskill (19971) citado por Céspedes (2016) han propuesto que el yogurt, en la fase de comercialización, debe contener menos de 100 levaduras por mL y superior a lo indicado suponen un importante riesgo alteración. El resultado obtenido en la investigación respecto a la vida útil del yogurt frutado con 1,6% EEP del tratamiento T4 se encuentra dentro del límite máximo de 100 UFC/mL; por tanto, se puede incrementar la conservación de yogurt comercial de los pequeños

fabricantes de 10 días a 14 días aproximadamente conservándolo a una temperatura de refrigeración de 5°C, siendo apto para los consumidores. Se puede incrementar el tiempo de vida útil del yogurt corrigiendo la calidad de la leche y la higiene durante la elaboración.

Mediante las pruebas microbiológicas, los flavonoides totales que contiene el extracto etanólico de propóleos (EEP), tiene efectividad como conservante natural en el yogurt frutado.

### **Control de pH de los tratamientos.**

En la tabla 18, se tiene la lectura de pH de cada uno de los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4, desde el día 0 (inicio) hasta los 42 días.

En los tratamientos T0 (testigo) y T1 de yogurt frutado con 0.4% extracto etanólico de propóleos a los 35 y 42 días conservados en refrigeración a temperatura de 5°C, se observó la presencia de gas debido a la fermentación del yogurt por la multiplicación excesiva de las levaduras. Adams y Moss (1995), Silliker et al. (1980) y Desrosier (1987) citado por Echevarría (2006), corrobora que la vida útil varía generalmente alrededor de 14 a 28 días en refrigeración a 5°C, esto dependerá de la sanidad de la planta procesadora, la técnica de procesamiento, el tipo de empaque, la temperatura de distribución y el uso de preservantes. Durante este período continúa desarrollándose la acidez, aunque muy lentamente, hasta que finalmente el pH se reduce a un valor menor o igual a 4. Esto se puede contrastar con Kuntz (1991) citado García y Molina (2008), que el final de la vida útil de un producto se alcanza cuando ya no mantiene las cualidades requeridas para que el consumidor final lo utilice.

El extracto etanólico de propóleos (EEP) usados en 0,8%, 1,2% y 1,6% tienen efectos positivos frente a hongos y coliformes totales, pero tiene un efecto no significativo a la multiplicación de las levaduras. En consecuencia, la vida útil del yogurt frutado con 1,6% extracto etanólico de propóleos T4 se incrementa por 14 días aproximadamente conservándolo a una temperatura de refrigeración de 5°C, siendo apto para los consumidores; esto reafirma los reportes de investigaciones de Popova et al. (2004); citado por Martínez (2009) y Mendes *et al.* (2006) que la presencia de flavonoides y fenoles totales en el extracto etanólico de propóleos tiene efecto antibacteriano.

### **5.3 Características sensoriales del yogurt frutado**

En el anexo 11, se presentan los resultados del atributo color donde se observa en el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin extracto etanólico de propóleos tuvieron mejor aceptación con 164,5 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de extracto etanólico de propóleos 158 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de extracto etanólico de propóleos 148 puntos, T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 143 puntos y T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de extracto etanólico de propóleos 140 puntos. Con la adición de extracto etanólico de propóleos en el yogurt frutado se observa una ligera variación de color, esto se debe a la reacción propia de los flavonoides totales.

En el mismo anexo 11, se presentan los resultados del atributo olor donde se observa que el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin extracto etanólico de propóleos tuvieron mejor aceptación con 165,5 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de extracto etanólico de propóleos 144,5 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de extracto etanólico de propóleos

121 puntos, T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de extracto etanólico de propóleos 114,5 puntos y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 108,5 puntos. El olor del extracto etanólico de propóleo modifica ligeramente el olor característico del yogurt de acuerdo a la cantidad en cada tratamiento; por tanto, los panelistas prefieren el olor típico del yogurt como se observa en las puntuaciones.

En cuanto al atributo sabor (anexo 11), se observa que el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin extracto etanólico de propóleo tuvieron mejor aceptación con 178 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de extracto etanólico de propóleo 136 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de extracto etanólico de propóleos 104 puntos, T3 muestra de yogurt frutado con 1,2% de extracto etanólico de propóleo 89,5 puntos y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 79,5 puntos. El sabor amargo es característico de los fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico propóleo; por tanto, el sabor típico del yogurt se modifica gradualmente de acuerdo a la cantidad adicionada en cada tratamiento. Los panelistas detectaron sabor residual en los tratamientos, debido a la cantidad de resinas presente en extracto etanólico propóleo, esto es corroborado por Gerónimo (2009).

Respecto al atributo aceptación, se observa que el tratamiento T0 muestra de yogurt frutado sin extracto etanólico de propóleo tuvieron mejor aceptación con 174,1 puntos, seguido de los tratamientos T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% de extracto etanólico de propóleos 149,5 puntos, T2 muestra de yogurt frutado con 0,8% de extracto etanólico de propóleos 111 puntos, T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 96,5 puntos y T3 muestra de yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleos 93 puntos. Se puede mejorar la

aceptación del yogurt frutado con extracto etanólico de propóleo a los consumidores, explicando que este producto les provee propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales según el reporte de Tabera, Hegazi y Hegazi; citado por Bedascarrasbure et al. (2004). Además, Japón ha sido uno de los pioneros en investigar las propiedades que posee el propóleo, en la Universidad Nacional de Tokio es donde se han analizado muestras de propóleos de todo el mundo; dentro de la industria alimentaria está legalizado como Suplemento Dietario (Yanucci, 2013; citado por Saltos, 2015).

Con estos resultados obtenidos en la investigación, se concluye que el tratamiento T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% EEP, tratamiento T2 muestra yogurt frutado con 0,8% EEP, tratamiento T3 muestra yogurt frutado con 1,2% EEP y tratamiento T4 muestra yogurt frutado con 1,6% EEP fueron aceptados por los panelistas en un 18% en promedio frente a la muestra testigo sin EEP con un 28%.

Estadísticamente se demuestran en los atributos color, olor, sabor y aceptabilidad a un nivel de confianza de 95% de Tukey una mínima diferencia significativa entre tratamientos, tales como la muestra testigo T0 sin EEP, tratamiento T1 muestra yogurt frutado con 0,4% EEP, tratamiento T2 muestra yogurt frutado con 0.8% EEP, tratamiento T3 muestra yogurt frutado con 1,2% EEP y tratamiento T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP.

## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden de la presente investigación pueden resumirse en los siguientes puntos:

- La caracterización físico-químico de las tres muestras de propóleos bruto, fue con la finalidad de seleccionar una muestra que tenga en su composición mayor de flavonoides totales.
- En el contenido de fenoles totales es 7,31 g de ácido gálico/100g de muestra y flavonoides totales 10,16 g de quercetina/100g de muestra M1 del Centro apícola de Huypishca; 6,05 g de ácido gálico/100g de muestra de fenoles totales y 8,37 g de quercetina/100g de muestra de flavonoides totales en muestra M2 del Centro apícola de Ichoca y 5,24 g de ácido gálico/100g de muestra de fenoles totales y 4,75 g de quercetina/100g de muestra de flavonoides totales, por tanto la muestra M1 del Centro apícola de Huypishca existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestra M2 del Centro apícola de Ichoca y la muestra M3 del Centro apícola de Quenuayoc. La calidad de los propóleos está relacionada directamente de propóleos dependen de la vegetación que tienen en el Huypishca como Eucalipto, Molle, Chilca, Sauce, Melocotón y otros. Con esto se demuestra a que la fracción soluble en etanol agrupa la mayoría de los compuestos biológicamente activos son los flavonoides totales. En cuanto a humedad, cenizas, ceras, resinas e impurezas mecánicas se encuentran dentro del rango máximo permitido por la normativa internacional de Ministerio agricultura de Brazil.
- La vida útil del tratamiento T4 yogurt frutado con 1,6% de extracto etanólico de propóleo se encuentra dentro del límite máximo de 100 UFC/mL y se puede incrementar la conservación de yogurt frutado comercial de los pequeños fabricantes de la ciudad de Huaraz por 14 días, conservándolos a una temperatura

de refrigeración de 4 - 5°C de acuerdo a la NTP.202.092, siendo apto para los consumidores. Se puede incrementar el tiempo de vida útil del yogurt frutado corrigiendo la calidad de la leche de los ganaderos y la higiene durante la elaboración. En las pruebas microbiológicas realizadas, los flavonoides totales que contiene el extracto etanólico de propóleos (EEP), son muy significativos descriptivamente como conservante natural en el yogurt frutado. El modelo matemático predictivo es:  $t = (\ln y) / 0,1225 - (\ln 17,65) / 0,1225$ .

- El tratamiento T1 muestra de yogurt frutado con 0,4% EEP, tratamiento T2 muestra yogurt frutado con 0,8% EEP, tratamiento T3 muestra yogurt frutado con 1,2% EEP y tratamiento T4 muestra yogurt frutado con 1,6% EEP fueron aceptados por los panelistas en un 18% en promedio frente a la muestra T0 testigo sin EEP con un 28%. Estadísticamente se ha demostrado en los atributos color, olor, sabor y aceptabilidad a un nivel de confianza de 95% de Tukey existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos T0 muestra testigo sin EEP, tratamientos T1 muestra yogurt frutado con 0,4% EEP, tratamiento T2 muestra yogurt frutado con 0,8% EEP, tratamiento T3 muestra yogurt frutado con 1,2% EEP y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP. En cuanto al sabor los tratamientos T3 muestra yogurt frutado con 1,2% EEP y T4 muestra de yogurt frutado con 1,6% EEP presentaron un sabor típico a la resina del propóleo.

## VII. RECOMENDACIONES

- Incrementar el tiempo de vida útil del yogurt frutado corrigiendo la calidad de la leche adquirida de los ganaderos durante el ordeño y la higiene durante la elaboración.
- Realizar trabajo de investigación utilizando otras variedades de frutas como guanábana, piña, durazno y otros con la finalidad de enmascarar el olor y sabor característico del propóleo.
- Promover la elaboración y consumo de yogurt frutado con adición de un conservante natural de extracto etanólico de propóleo, que poseen propiedades antibacterianas por la acción de los flavonoides totales.
- Desarrollar un sistema informático ayudaría a la determinación de la vida útil del yogurt frutado a temperatura variable.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeurni, A. A. y Ogunjinmi, A. A. (2011). The healing potential of honey and propolis lotion on septic wounds. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S55-S57. Recuperado de <http://apjtb.com/zz/2011S1/13.pdf>
- Aguilar, D. C., Moo, V. Cob, N., River, G., Vargas y Vargas, L., Tamayo, E., Tamayo, J. (2011). Vida útil del jugo de sábila (*Aloe vera* MILL), en presencia de propóleo, citracidin y nisina. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1), 94-100. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808015>.
- Alina, R., M., Vega, Cl., Garrido T. (1983). *Control microbiológico de leche y productos lácteos. Métodos recomendados* (pp. 61-71, 91y 127). Lima-Perú: CLEIBA-UNMSM.
- Álvarez, S. (2012). Caracterización organoléptica y físico-química de propóleos del Departamento de La Libertad. *The Biologist*, 10 (1), 34-40, ISSN-e 1816-0719. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima (Perú). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4015074>.
- Ayala Fernández, E. y Macay Hernández, C. (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*. (Proyecto Especial, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Recuperado de <http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/497>
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A. y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo Argentino. *Acta Farm. Bonaerense*. 23 (3), 369-72.

[http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP\\_23\\_3\\_2\\_2\\_5OA9K8V7K9.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_2_2_5OA9K8V7K9.pdf)

Bilisik, A., Cakmak, I., Bicakci, A. y Malyer, H. (2008). Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees (*Apis mellifera L. anatoliaca*). *Grana*. 47 (1), 70-77. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00173130801923976?needAccess=true>

Carrillo, M. L, Castillo, L. N y Mauricio, R. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*, 22(5), 21-28. Recuperado de [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642011000500004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642011000500004&script=sci_arttext)

Casp, A. y April, J. (2003). *Procesos de conservación de alimentos* (2ª edición). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Castelo, N. (2002). Cuando las alianzas dan sus frutos. Recuperado de [www.sada.org.ar/Articulos/Actualidad/alianzas.htm](http://www.sada.org.ar/Articulos/Actualidad/alianzas.htm)

Céspedes Huttemann, A. (2016). *Determinación de mohos y levaduras en yogur comercializado en despensas de las ciudades de Fernando de la Mora, Lambaré, Luque, Mariano Roque Alonso y San Lorenzo del Departamento Central* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción). Recuperado de <http://www.vet.una.py/biblioteca/index.php/tesis/439-adriana-carolina-cespedes-huttemann>

- DIGESA. (2008). Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima-Perú: MINSA.
- DIGESA. (2017). Reglamento de la leche y productos lácteos. MINAGRI. [http://www.digesa.minsa.gob.pe/orientacion/DS\\_7\\_2017\\_MINAGRI.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/orientacion/DS_7_2017_MINAGRI.pdf)
- Echevarría Pérez, M. (2006). *Evaluación y mejoramiento de la calidad microbiológica de yogur artesanal comercializado* (Tesis pre-grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia). Recuperado de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2421.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2421.pdf).
- Fernández, R. (2001). El propóleo un valioso producto de la colmena. Recuperado de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10\\_1227.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1227.pdf).
- Figuroa, J., Salcedo, J., Aguas, Y., Olivero, R., Narváez, G. (2011). Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y perspectiva, al uso del propóleo en su formulación. *Revista Colombiana ciencia Animal*, 3(2). Recuperado de <https://revistas.unisucree.edu.co/index.php/recia/article/view/414>
- García, C. y Molina, M. (2008). Estimación de la vida útil de una mayonesa mediante pruebas aceleradas. *Ingeniería* 18 (1, 2), 57-64. Recuperado de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/7Vidadeanaquel\\_14223.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/7Vidadeanaquel_14223.pdf)
- Gerónimo Maríñez, A. (2009). *Comparación del efecto antimicrobiano del propóleo y el benzoato de sodio en mermelada de mango de la Escuela Agrícola Panamericana*. (Proyecto Especial, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Recuperado de <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/275/1/T2765.pdf>

- Gómez, J.; Peña, N., Pérez, C.; Gutiérrez-Cortés, C. y Suarez Mahecha, H. (2014). Evaluación por dos métodos in vitro de actividad antimicrobiana de propóleos frente a algunos microorganismos de interés alimentario. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 67(2). Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/264348316\\_Evaluacin\\_por\\_dos\\_mtodos\\_in\\_vitro\\_de\\_actividad\\_antimicrobiana\\_de\\_propleos\\_frente\\_a\\_algunos\\_microorganismos\\_de\\_inters\\_alimentario](http://www.researchgate.net/publication/264348316_Evaluacin_por_dos_mtodos_in_vitro_de_actividad_antimicrobiana_de_propleos_frente_a_algunos_microorganismos_de_inters_alimentario).
- Gutiérrez Cortés, C. (2012). *Evaluación del Efecto de Propóleos como Biopreservante en Chorizo*. (Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/8695/1/carolinagutierrezcortes.2012.pdf>
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology y Therapeutics*, 96, 67-202. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/1338/1a690ae70c1760d58decce449c2a50991533.pdf>
- INDECOPI. (2008). *Leche y Productos Lácteos. Yogurt. Requisitos NTP.202.092.2008*. Cuarta Edición. Lima-Perú: ITINTEC.
- 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 del Tejar, provincia de Imbabura*. (Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Sede Ibarra). Recuperado de <http://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/161/1/T72598.pdf>
- Martínez Galán, J. (2009). *Caracterización físico-química y evaluación de la Actividad antifúngica de propóleos Recolectados en el suroeste antioqueño*.

(Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1918/1/74185664.2009.pdf>

Martínez Rojas, J. M., Fajardo Cárdenas, M. y Pérez Morales, J. C. (2005).

Obtención *de* tintura de propóleos en las plantas de productos naturales. *En Revista CENIC Ciencias Químicas*, 36, No. Especial. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181620511011.pdf>.

Mendes, J., Souza, M., Matta, S., Andrade, M. y Vidal, F. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 99, 431-435. Recuperado de <https://eurekamag.com/pdf/004/004510364.pdf>.

Muñoz, L., Linares S., y Narváez W. Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*, 10 (2), 101-111. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1657-95502011000200010&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1657-95502011000200010&script=sci_abstract)

Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2003). Definición propóleo. Norma Salvadoreña NSO 65.19.02:03. Recuperado de <http://faolex.fao.org/docs/pdf/els49789.pdf>

Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (OMS y FAO). (2011). *Leche y Productos Lácteos*. Codex Alimentarius. Roma: Norma de Codex, Segunda edición. <http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>

Palomino García, L. (2009). *Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad Antioxidante de propóleos de Antioquia*. (Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias-Escuela de Química

Medellín). Recuperado

de [http://www.bdigital.unal.edu.co/670/1/34317446\\_2009.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/670/1/34317446_2009.pdf)

Potter, N. (1978). *La ciencia de los alimentos* (2a ed.). México D. F: Edutex, S. A.

Rengifo, R. A. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Revista Farmaciencia*, 1(2), 1-6. Recuperado <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/462>

Rondon, E., Pacheco, E. y Ortega, F. (2004). Estimación de la vida útil de un análogo comercial de mayonesa utilizando el factor de aceleración Q10. *Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela*, 4(21), 68-83.

Salatino, A., Teixeira, E., Negri, G. y Message, D. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 33-38.

Saltos Jaramillo, Y. (2015). *Análisis de la conservación de papa fresca (solanum phureja) como producto de iv gama usando extracto acuoso de propóleo*. (Tesis de grado, Escuela superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia). Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3948/1/56T00520%20UDCTFC.pdf>

Soto Vásquez, M. (2015). Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. *In Crescendo. Institucional*, 6(2): 22-32. Recuperado de <https://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo/article/viewFile/1051/841>

Suarez H., Jiménez, A. y Díaz, C. (2014). Determinación de parámetros microbiológico y sensorial de filetes de pescado preservados con propóleos bajo refrigeración. *MVZ Córdoba* 9(3), 4214-4225. Recuperado de

<https://es.scribd.com/document/369727157/Determinacion-de-parametros-microbiologico-y-sensorial-de-filetes-de-pescado-pdf>.

- Tamiz, A., Şener, A., Özkök Tüylü A., Sorkun, K., y Salih, B. (2013). Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes. *Turk J Biol* 38 (3), 135-142. Recuperado de <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/78991>
- Torricella, R., Zamora, E. y Pulido, H. (2007). *Evaluación Sensorial. Aplicada a la investigación, desarrollo y control de la calidad en la Industria Alimentaria*. Ministerio de Educación Superior. 2da edición. El Vedado, Ciudad de la Habana: Editorial Universitaria.
- Ureña, M., D'Arrigo, M. y Girón, O. (1999). *Evaluación sensorial de los alimentos. Aplicación didáctica*. Lima: Editorial Agraria.
- Vargas, R., Torrescano, G, y Sánchez, A. (2013). El propóleos: Conservador potencial para industria Alimentaria. *Interciencia*, 38 (10), 705-710. Recuperado de [www.interciencia.org/v38\\_10/705.pdf](http://www.interciencia.org/v38_10/705.pdf)
- Vázquez, J. C. (2010). *Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola I - Cuenca del Salado, PCIA. De Buenos Aires*. (Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia Departamento de Ciencia Animal). Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12264/tesisUPV3345.pdf?sequence=1>
- Vásquez, V., Cruz-Tirado, J., Huaccha, K., Ávila, M., Chávez, V., Barbarán, J., Zamudio, J., Hoyos, C., Fernández G. y Valle, H. (2014). Aceptabilidad de una bebida de maíz morado variedad canteño (*Zea Mays* L.) endulzada con Stevia

(*Stevia rebaudiana* B.) y propóleos como potencial conservante. *Agroindustrial Science*, 4 (2). Recuperado de

<http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindsience/article/view/789/713>

Villar, A. (1999). *Farmacognosia general*. Vallehermoso, Madrid: Editorial Síntesis S.A., capítulo 14, 209-218.

Yoong Kuffó, A. M. (2004). *Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya*. (Proyecto Especial, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Recuperado de <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1949/1/T1893.pdf>.

**IX. ANEXOS**

**X. Anexo 1.****Imagen de las tres muestras de propóleos**

Centro Apícoa-Huypishca



Centro Apícoa-Ichoca



Centro Apícoa-Quenuayoc

**Anexo 2.****Imagen de 200 g de cada una de las tres muestras para el análisis físico-química.**

### Anexo 3.

#### Resultado de análisis físico-químico de los propóleos

Muestras	Humedad (%)	Cenizas (%)	Ceras (%)	Resinas (%)	Impurezas mecánicas (%)	Fenoles totales g/100g*	Flavonoides g/100g**
M1	3,57	3,13	34,02	56,31	18,79	7,31	10,15
	3,54	3,16	34,04	56,30	18,82	7,29	10,17
	3,58	3,14	34,03	56,29	18,80	7,33	10,16
Promedio	3,56	3,14	34,03	56,30	18,80	7,31	10,16
M2	3,44	4,80	45,04	50,01	10,61	6,03	8,36
	3,43	4,81	45,05	50,03	10,59	6,02	8,37
	3,45	4,78	45,03	50,02	10,60	6,04	8,38
Promedio	3,44	4,80	45,04	50,02	10,60	6,03	8,37
M3	3,65	3,80	37,01	50,01	14,51	5,13	4,76
	3,65	3,81	37,03	50,02	14,50	5,15	4,75
	3,63	3,79	37,02	50,01	14,49	5,13	4,74
Promedio	3,64	3,80	37,02	50,01	14,50	5,14	4,75

M1: CA-Huypishca; M2: CA-Ichoca ; M3: CA-Quenuayoc

## Anexo 3a.

## Resultado promedio de muestra 01 de propóleos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00384-CPF-2018**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004909/2018  
SOLICITADO POR : JULIO CONSTANTINO INTI BARRETO  
MUESTRA : PROPÓLEO DE ABEJA (MUESTRA 01)  
NÚMERO DE LOTE : ---  
CANTIDAD : 01 bolsa x 40 g  
FECHA DE RECEPCIÓN : 21 de Mayo del 2018  
FECHA DE FABRICACIÓN : ---  
FECHA DE VENCIMIENTO : ---

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
CENIZAS	---	AOAC	3,1%
CERAS	---	---	34%
RESINAS	---	---	57%
IMPUREZAS MECÁNICAS	---	---	18,8%
FENOLES TOTALES	---	UV - Visible	7,31g/100g *1
FLAVONOIDES TOTALES	---	UV - Visible	10,16g/100g *2

(\*1) g de ácido gálico/100g muestra problema  
(\*2) g de quercetina/100g de muestra problema

Lima, 20 de Agosto del 2018

  
Q.F. Gustavo Guerra Brizuela  
Director del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001  
BUREAU VERITAS  
Certification



## Anexo 3b.

## Resultado promedio de muestra 02 de propóleos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA

**PROCOLO DE ANÁLISIS N.º00385-CPF-2018**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004910/2018  
SOLICITADO POR : JULIO CONSTANTINO INTI BARRETO  
MUESTRA : PROPÓLEO DE ABEJA (MUESTRA 02)  
NÚMERO DE LOTE : ---  
CANTIDAD : 01 bolsa x 40 g  
FECHA DE RECEPCIÓN : 21 de Mayo del 2018  
FECHA DE FABRICACIÓN : ---  
FECHA DE VENCIMIENTO : ---

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
CENIZAS	---	AOAC	4,8%
CERAS	---	---	45%
RESINAS	---	---	50%
IMPUREZAS MECÁNICAS	---	---	10%
FENOLES TOTALES	---	UV - Visible	6,05g/100g *1
FLAVONOIDES TOTALES	---	UV - Visible	8,37g/100g *2

(\*1) g de ácido gálico/100g muestra problema

(\*2) g de quercetina/100g de muestra problema

Lima, 20 de Agosto del 2018

  
Q.F. Gustavo Guerra Brizuela  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR233265



## Anexo 3c.

## Resultado promedio de muestra 03 de propóleos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA  
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA

**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00386-CPF-2018**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004911/2018  
SOLICITADO POR : JULIO CONSTANTINO INTI BARRETO  
MUESTRA : PROPÓLEO DE ABEJA (MUESTRA 03)  
NÚMERO DE LOTE : ---  
CANTIDAD : 01 bolsa x 40 g  
FECHA DE RECEPCIÓN : 21 de Mayo del 2018  
FECHA DE FABRICACIÓN : ---  
FECHA DE VENCIMIENTO : ---

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
CENIZAS	---	AOAC	3,8%
CERAS	---	---	37%
RESINAS	---	---	53%
IMPUREZAS MECÁNICAS	---	---	14,5%
FENOLES TOTALES	---	UV - Visible	5,14g/100g *1
FLAVONOIDES TOTALES	---	UV - Visible	4,75g/100g *2

(\*1) g de ácido gálico/100g muestra problema

(\*2) g de quercetina/100g de muestra problema

Lima, 20 de Agosto del 2018

  
Q.F. Gustavo Guerra Brizuela  
Director del Centro de Control Analítico



*"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"*

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



**Anexo 4.****Imagen de muestras de yogurt frutado****Anexo 5.****Imagen de muestras de yogurt frutado sin y con extracto de etanólico de propóleos**

## Anexo 6.

## Análisis microbiológico de las muestras de yogurt frutado con EEP

<b>Recuento</b>	<b>Muestra A (testigo)</b>	<b>Muestra B (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E (1.6% EEP)</b>
<b>19-09-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>
Coliformes totales	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	40 ufc/g	33 ufc/g	29 ufc/g	24 ufc/g	18 ufc/g
<b>Recuento</b>	<b>Muestra A1 (testigo)</b>	<b>Muestra B1 (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C1 (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D1 (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E1 (1.6% EEP)</b>
<b>26-09-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>
Coliformes totales	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	9 x10 ufc/g	8 x10 ufc/g	7 x10 ufc/g	5 x10 ufc/g	4 x10 ufc/g
<b>Recuento</b>	<b>Muestra A2 (testigo)</b>	<b>Muestra B2 (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C2 (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D2 (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E2 (1.6% EEP)</b>
<b>03-10-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>
Coliformes totales	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	98 x10 ufc/g	92 x10 ufc/g	48 x10 ufc/g	34 x10 ufc/g	10 x10 ufc/g
<b>Recuento</b>	<b>Muestra A3 (testigo)</b>	<b>Muestra B3 (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C3 (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D3 (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E3 (1.6% EEP)</b>
<b>10-10-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>
Coliformes totales	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	24 x10 <sup>4</sup> ufc/g	17 x10 <sup>5</sup> ufc/g	28 x10 <sup>4</sup> ufc/g	15 x10 <sup>4</sup> ufc/g	32 x10 <sup>2</sup> ufc/g
<b>Recuento</b>	<b>Muestra A4 (testigo)</b>	<b>Muestra B4 (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C4 (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D4 (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E4 (1.6% EEP)</b>
<b>17-10-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>

Coliformes totales	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	20 x10 <sup>5</sup> ufc/g	24 x10 <sup>5</sup> ufc/g	34 x10 <sup>4</sup> ufc/g	52x10 <sup>3</sup> ufc/g	33x10 <sup>3</sup> ufc/g
<b>Recuento</b>	<b>Muestra A5 (testigo)</b>	<b>Muestra B5 (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C5 (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D5 (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E5 (1.6% EEP)</b>
<b>24-10-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>
Coliformes totales	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	27x10 <sup>6</sup> ufc/g	11x10 <sup>6</sup> ufc/g	13x10 <sup>5</sup> ufc/g	92x10 <sup>4</sup> ufc/g	60x10 <sup>4</sup> ufc/g
<b>Recuento</b>	<b>Muestra A6 (testigo)</b>	<b>Muestra B6 (0.4% EEP)</b>	<b>Muestra C6 (0.8% EEP)</b>	<b>Muestra D6 (1.2% EEP)</b>	<b>Muestra E6 (1.6% EEP)</b>
<b>31-10-2018</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>	<b>Recuento</b>
Coliformes totales	No realizado	No realizado	Ausente	Ausente	Ausente
Mohos	No realizado	No realizado	Ausente	Ausente	Ausente
Levaduras	No realizado	No realizado	10x10 <sup>5</sup> ufc/g	11x10 <sup>5</sup> ufc/g	21x10 <sup>4</sup> ufc/g

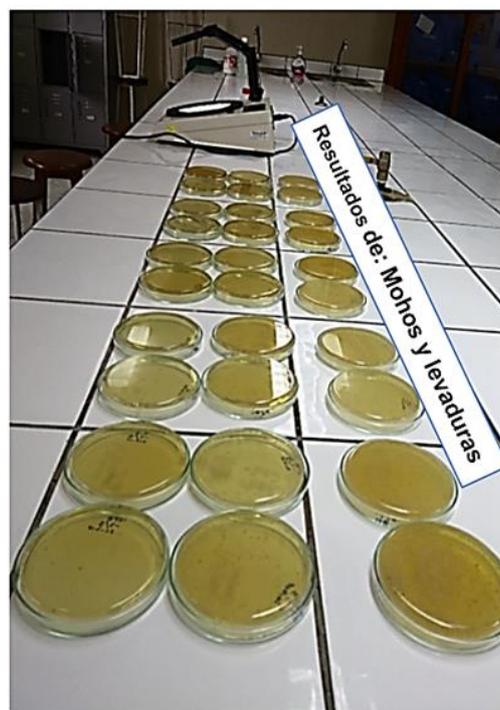
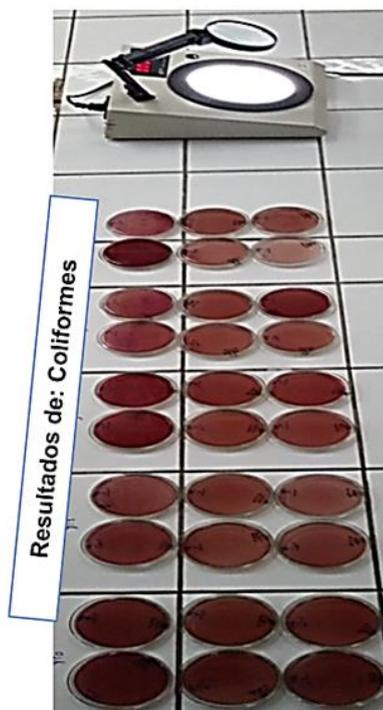
## Anexo 7.

## Procedimiento para el análisis microbiológico de las muestras de yogurt

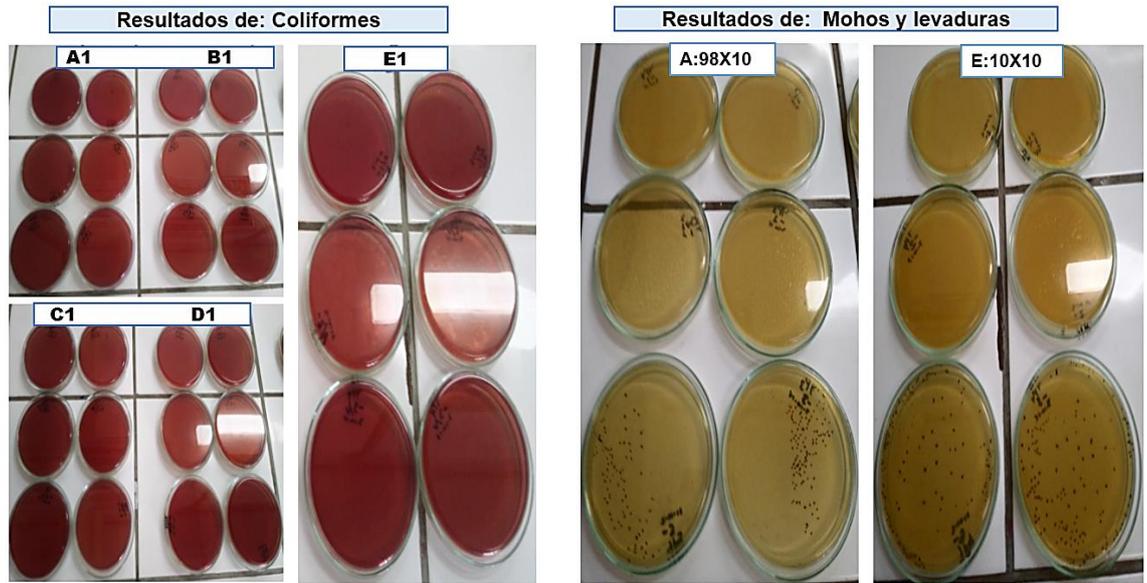
## PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL YOGUR



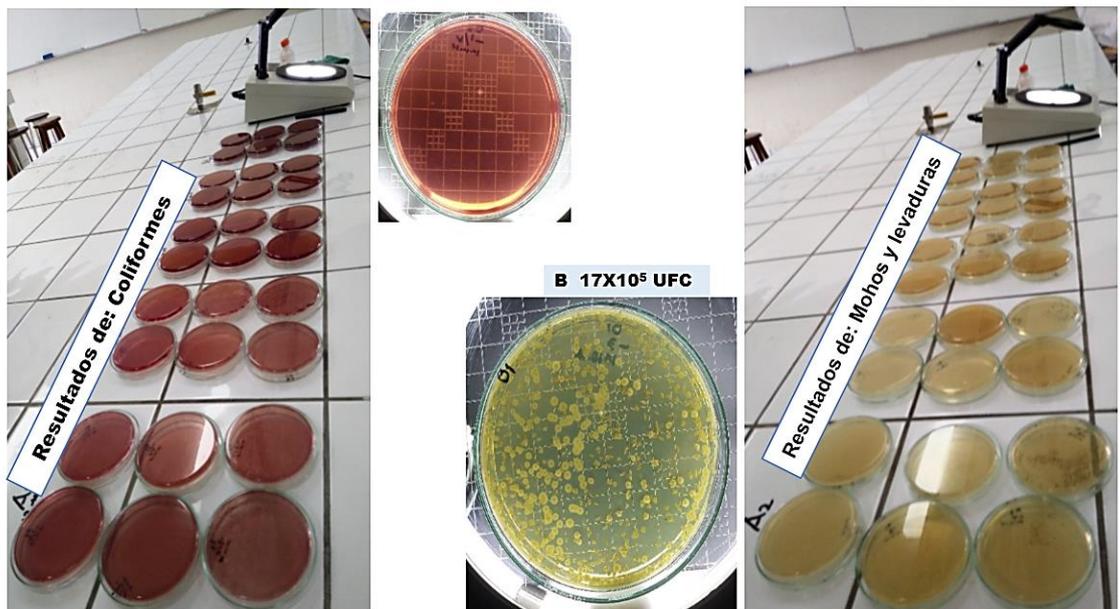
## 1. Análisis microbiológico del yogurt: 25 de setiembre del 2018



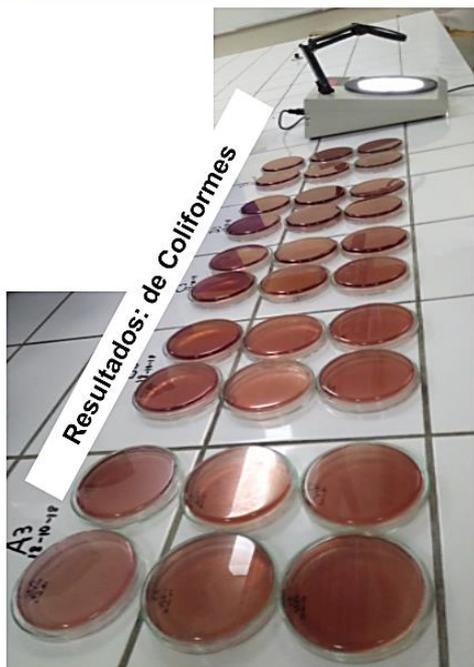
**2. Análisis microbiológico del yogur: 03 de octubre del 2018**



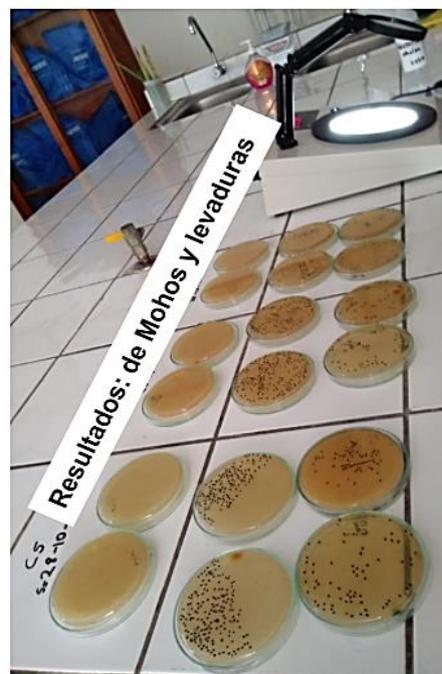
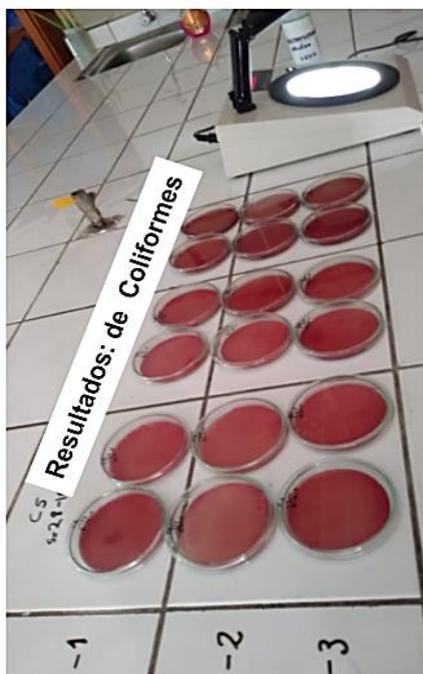
**3. Análisis microbiológico del yogur: 10 de octubre del 2018**



4. Análisis microbiológico del yogur: 17 de octubre del 2018



5. Análisis microbiológico del yogur: 26 de octubre del 2018



**Anexo 8.****Ficha de evaluación sensorial: Fichas técnicas de los instrumentos a utilizar**

Edad..... Sexo..... Fecha.....

Hora.....

**INSTRUCCIONES.** Se le presenta a Ud. un yogurt frutado, pruebe cada una de las muestras e indique el grado en que le gusta o le disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje, escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.

<b>Categoría</b>	<b>Puntaje</b>	<b>Categoría</b>	<b>Puntaje</b>
Disgusta muchísimo	1	Gusta moderadamente	5
Disgusta mucho	2	Gusta mucho	6
Disgusta moderadamente	3	Gusta muchísimo	7
No gusta, ni disgusta	4		

<b>CÓDIGO</b>	<b>Calificación para cada Atributo</b>			
	<b>COLOR</b>	<b>OLOR</b>	<b>SABOR</b>	<b>ACEPTABILIDAD</b>
<b>M1</b>				
<b>M2</b>				
<b>M3</b>				
<b>M4</b>				
<b>M5</b>				

Comentarios:.....

.....

.....

.....

## Anexo 9.

## Resultado de evaluación sensorial de los tratamientos por atributo (1)

Atributos	Color					olor					Sabor					Aceptabilidad				
	Tratamientos					Tratamientos					Tratamientos					Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
1	4	5	4	4	4	5	5	4	4	4	5	4	4	3	3	5	4	3	3	3
2	6	3	3	2	5	5	3	3	2	3	6	5	3	2	2	6	5	5	2	3
3	5	6	6	5	5	7	5	6	5	4	7	6	4	3	2	7	6	5	4	4
4	5	5	5	5	5	5	5	4	4	3	6	5	5	4	4	6	5	5	4	4
5	5	5	5	5	5	5	6	4	4	3	6	4	4	3	3	5	5	4	3	3
6	4	5	5	5	5	6	5	6	5	4	7	6	4	3	3	7	6	4	3	2
7	4	6	7	6	6	5	4	6	4	5	5	4	5	6	6	4	5	6	5	4
8	6	6	5	5	5	6	5	4	4	3	6	5	3	2	2	5	4	3	4	4
9	6	7	3	3	3	7	5	4	3	2	7	6	5	5	2	7	6	4	4	2
10	5	5	3	3	3	6	5	3	5	4	7	5	4	3	3	6	5	3	3	3
11	5	6	4	4	4	5	3	3	4	4	6	6	4	4	3	5	6	3	3	3
12	6	6	4	5	5	6	5	5	3	4	5	4	4	3	3	6	6	4	4	3
13	6	5	4	3	4	6	4	4	3	3	6	5	4	2	2	6	4	3	2	3
14	6	6	6	6	6	5	6	3	3	4	5	4	3	3	3	5	6	4	4	3
15	5	5	5	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	5
16	6	6	6	6	6	6	5	5	5	3	6	6	6	5	3	6	6	5	5	3
17	6	7	6	6	5	4	7	4	4	6	5	6	4	3	2	5	6	4	3	3
18	5	5	5	4	5	5	5	4	4	4	6	6	4	3	3	5	5	4	4	4
19	5	5	6	6	6	4	5	3	4	3	5	4	4	3	2	5	4	3	3	3
20	6	4	4	3	3	6	3	2	2	1	6	4	3	2	2	6	7	3	3	2
21	5	6	5	3	4	7	5	4	3	3	7	5	3	2	2	7	7	4	3	3
22	6	5	5	5	4	6	6	5	5	5	6	5	4	4	3	6	6	4	4	3
23	6	6	6	6	6	6	5	4	3	4	6	5	4	4	3	6	5	4	3	3
24	6	5	5	5	5	6	4	3	3	3	6	5	3	3	2	6	5	4	3	3
25	5	5	5	5	5	4	5	3	3	2	5	4	3	3	2	6	5	3	3	3
26	5	5	6	6	6	6	5	5	4	4	6	4	5	5	4	6	6	4	4	3
27	5	5	5	5	5	5	4	4	4	3	6	5	3	2	2	6	5	4	3	3
28	6	5	6	5	6	5	5	5	5	5	6	5	3	3	4	6	5	4	4	5
29	5	6	5	5	4	4	5	4	5	5	7	5	4	4	3	6	5	3	3	3
30	5	4	4	4	4	6	5	4	4	3	5	4	3	3	2	6	6	4	3	3
	160	160	148	140	144	165	145	123	116	109	178	147	117	100	85	174	161	118	104	96

## Anexo 10.

## Resultado de evaluación sensorial de los tratamientos por atributo (2)

Atributos	Color					olor					Sabor					Aceptabilidad				
	Tratamientos					Tratamientos					Tratamientos					Tratamientos				
Panelista	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4
1	4	3	4	4	4	5	5	4	4	4	5	3	3	3	3	5	4	3	3	3
2	7	6	6	5	5	7	5	6	5	4	7	6	4	2	1	7	6	5	4	4
3	5	5	4	3	2	4	5	3	3	2	4	5	2	2	2	4	5	3	2	2
4	5	5	5	5	5	5	6	4	4	3	6	3	1	1	1	5	4	2	1	1
5	4	5	7	6	4	7	2	6	3	4	7	5	4	2	1	7	2	4	3	1
6	5	6	7	6	6	5	4	6	4	5	5	4	5	6	6	4	5	6	5	4
7	6	6	5	5	5	6	5	4	4	3	6	5	3	2	2	5	4	3	4	4
8	6	7	3	3	3	7	5	4	3	2	7	6	5	5	3	7	6	4	4	3
9	7	5	3	3	3	6	5	3	5	4	7	3	4	3	3	7	4	3	3	3
10	5	3	3	4	4	5	3	3	4	4	6	2	1	1	3	5	3	2	1	3
11	6	5	4	5	5	6	5	5	3	4	5	4	4	3	3	6	5	4	3	5
12	6	4	4	3	4	6	4	4	3	3	6	4	4	2	2	6	4	3	2	3
13	6	6	6	6	6	5	6	3	3	4	5	4	3	3	3	5	5	3	3	4
14	5	5	5	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	5
15	6	6	6	6	6	6	5	5	5	3	6	6	6	5	3	6	6	5	5	3
16	6	7	6	6	5	4	7	4	4	6	5	6	4	3	2	5	6	4	3	3
17	5	5	5	4	5	5	5	4	4	4	6	4	4	3	3	5	5	4	4	4
18	5	5	5	5	5	4	5	3	4	3	5	4	2	2	2	5	4	3	3	3
19	6	4	4	3	3	6	3	2	2	1	6	3	1	1	2	6	4	2	2	2
20	6	3	3	2	5	5	3	3	2	3	6	5	3	2	2	6	5	5	2	3
21	7	6	5	3	4	7	5	4	3	3	7	5	3	2	2	7	5	4	3	3
22	7	6	6	6	5	7	7	6	6	6	7	6	4	3	3	7	6	4	4	4
23	6	6	6	6	6	6	5	4	3	4	6	2	2	2	2	6	5	4	3	3
24	6	5	5	5	5	6	3	2	2	2	6	3	2	2	2	6	4	2	2	2
25	6	6	6	6	6	4	5	3	3	2	5	2	1	2	1	5	3	3	2	2
26	5	5	5	5	5	5	4	3	4	3	6	5	1	2	2	6	5	3	2	2
27	6	5	6	5	6	5	5	5	5	5	6	5	3	3	4	6	5	4	4	5
28	5	6	5	6	7	6	6	5	6	6	6	5	5	5	4	6	6	5	5	4
29	5	6	5	5	4	4	5	4	5	5	7	5	1	1	1	7	5	1	1	1
30	5	4	4	4	4	6	5	2	2	1	6	2	1	1	1	6	2	1	1	1
	169	156	148	140	142	166	143	119	113	108	178	127	91	79	74	174	138	104	89	90

## Anexo 11.

## Promedio de evaluación sensorial de los tratamientos por atributo

Atributos	Color					olor					Sabor					Aceptabilidad				
	Tratamientos					Tratamientos					Tratamientos					Tratamientos				
	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4
1	4	4	4	4	4	5	5	4	4	4	5	3,5	3,5	3	3	5	4	3	3	3
2	6,5	4,5	4,5	3,5	5	6	4	4,5	3,5	3,5	6,5	5,5	3,5	2	1,5	6,5	5,5	5	3	3,5
3	5	5,5	5	4	3,5	5,5	5	4,5	4	3	5,5	5,5	3	2,5	2	5,5	5,5	4	3	3
4	5	5	5	5	5	5	5,5	4	4	3	6	3	3	2,5	2,5	5,5	4,5	3,5	2,5	2,5
5	4,5	5	6	5,5	4,5	6	4	5	3,5	3,5	6,5	4,5	4	2,5	2	6	3,5	4	3	2
6	4,5	5,5	6	5,5	5,5	5,5	4,5	6	4,5	4,5	6	5	4,5	4,5	4,5	5,5	5,5	5	4	3
7	5	6	6	5,5	5,5	5,5	4,5	5	4	4	5,5	4,5	4	4	4	4,5	4,5	4,5	4,5	4
8	6	6,5	4	4	4	6,5	5	4	3,5	2,5	6,5	5,5	4	3,5	2,5	6	5	3,5	4	3,5
9	6,5	6	3	3	3	6,5	5	3,5	4	3	7	4,5	4,5	4	2,5	7	5	3,5	3,5	2,5
10	5	4	3	3,5	3,5	5,5	4	3	4,5	4	6,5	3,5	2,5	2	3	5,5	4	2,5	2	3
11	5,5	5,5	4	4,5	4,5	5,5	4	4	3,5	4	5,5	5	4	3,5	3	5,5	5,5	3,5	3	4
12	6	5	4	4	4,5	6	4,5	4,5	3	3,5	5,5	4	4	2,5	2,5	6	5	3,5	3	3
13	6	5,5	5	4,5	5	5,5	5	3,5	3	3,5	5,5	4,5	3,5	2,5	2,5	5,5	4,5	3	2,5	3,5
14	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	4	4	4,5	5,5	4,5	4	4	4	5,5	5,5	4,5	4,5	4
15	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	6	5,5	5	5	4	6	5,5	5,5	5	4	6	5,5	5	5	4
16	6	6,5	6	6	5,5	5	6	4,5	4,5	4,5	5,5	6	5	4	2,5	5,5	6	4,5	4	3
17	5,5	6	5,5	5	5	4,5	6	4	4	5	5,5	5	4	3	2,5	5	5,5	4	3,5	3,5
18	5	5	5	4,5	5	4,5	5	3,5	4	3,5	5,5	5	3	2,5	2,5	5	4,5	3,5	3,5	3,5
19	5,5	4,5	5	4,5	4,5	5	4	2,5	3	2	5,5	3,5	2,5	2	2	5,5	4	2,5	2,5	2,5
20	6	3,5	3,5	2,5	4	5,5	3	2,5	2	2	6	4,5	3	2	2	6	6	4	2,5	2,5
21	6	6	5	3	4	7	5	4	3	3	7	5	3	2	2	7	6	4	3	3
22	6,5	5,5	5,5	5,5	4,5	6,5	6,5	5,5	5,5	5,5	6,5	5,5	4	3,5	3	6,6	6	4	4	3,5
23	6	6	6	6	6	6	5	4	3	4	6	3,5	3	3	2,5	6	5	4	3	3
24	6	5	5	5	5	6	3,5	2,5	2,5	2,5	6	4	2,5	2,5	2	6	4,5	3	2,5	2,5
25	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	4	5	3	3	2	5	3	2	2,5	1,5	5,5	4	3	2,5	2,5
26	5	5	5,5	5,5	5,5	5,5	4,5	4	4	3,5	6	4,5	3	3,5	3	6	5,5	3,5	3	2,5
27	5,5	5	5,5	5	5,5	5	4,5	4,5	4,5	4	6	5	3	2,5	3	6	5	4	3,5	4
28	5,5	5,5	5,5	5,5	6,5	5,5	5,5	5	5,5	5,5	6	5	4	4	4	6	5,5	4,5	4,5	4,5
29	5	6	5	5	4	4	5	4	5	5	7	5	2,5	2,5	2	6,5	5	2	2	2
30	5	4	4	4	4	6	5	3	3	2	5,5	3	2	2	1,5	6	4	2,5	2	2
	164,5	158	148	140	143	165,5	144,5	121	114,5	108,5	178	136	104	89,5	79,5	174,1	149,5	111	96,5	93