



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS**



**TEMA:**

---

**Desarrollo de una Bebida Láctea Fermentada con la incorporación de Aloe vera  
y Aceites esenciales**

---

Trabajo de Titulación, Modalidad Propuesta Tecnológica, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**AUTOR:** Rosa Gabriela Cando Quinto

**TUTOR:** Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

**AMBATO – ECUADOR**

**Abril 2016**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Ph. D. Mirari Yosune Arancibia Soria**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de éste Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Propuesta Tecnológica, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 25 de Febrero del 2016.



**Ph. D. Mirari Yosune Arancibia Soria**  
**CI. 180214246-1**  
**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Rosa Gabriela Cando Quinto, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo la obtención del título de Ingeniería en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



---

Srta. Rosa Gabriela Cando Quinto

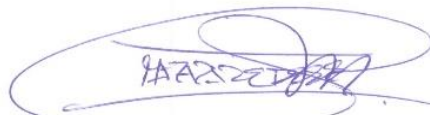
CI. 180461466-5

**AUTORA**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente trabajo de Titulación, modalidad Propuesta Tecnológica, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

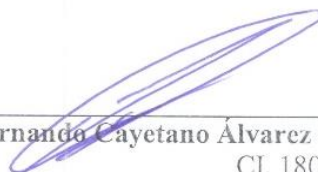
Para constancia firmar:



Dra. Ing. Mayra Liliana Paredes Escobar  
CI. 050187395-4



Mg. Ing. Silvia Janneth Sánchez Vélez  
CI. 180305801-3



Mg. Ing. Fernando Cayetano Álvarez Calvache  
CI. 180104502-0

Ambato, 25 de Febrero del 2016.

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Srta. Rosa Gabriela Cando Quinto

CI. 180461466-5

**AUTORA**

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a Dios por guiar mi camino, por su fidelidad, amor, sabiduría y misericordia.*

*A la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por brindar una educación de calidad y fomentar la preparación tanto personal como profesional.*

*A los docentes de la FCIAL, por impartir sus valiosos conocimientos y compartir cada una de sus experiencias.*

*A la Dra. Mirari Arancibia, Tutora del Trabajo de Grado, mil gracias por su valiosa asesoría, conocimientos compartidos, tiempo, dedicación, paciencia y especialmente por su confianza y amistad.*

*A toda mi familia por su amor, consejos, apoyo económico y sentimental y por brindarme un hogar único y especial.*

*A Daniel, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo, por su amor y amistad.*

*A todos mis amigos en especial a Mafer, Fernanda, Taty, Marjorie, Jesy, Fernanda, Jeka, Estefy, Marcelo por compartir grandes e inolvidables momentos.*

## DEDICATORIA

*A mamita Rosita por ser la fuerza motora de mi caminar y por ser el mejor ejemplo de sabiduría, amor, humildad y dedicación.*

*A papito Julio por enseñarme a ser fuerte y firme.*

*A cada uno de mis familiares por apoyarme en mi formación profesional y acompañarme en todos los momentos especiales y difíciles de mi vida.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA .....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN .....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA .....	1
1.1. Tema.....	1
1.2. Justificación.....	1
1.3. Objetivos .....	2
1.3.1. General .....	2
1.3.2. Específicos .....	2
CAPÍTULO II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes investigativos .....	3
2.2. Hipótesis.....	5
2.2.1. Hipótesis nula.....	5
2.2.2. Hipótesis alternativa .....	5
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis .....	5
2.3.1. Variables independientes .....	5
2.3.2. Variables dependientes.....	5
CAPÍTULO III.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS .....	6



3.1.	Materia prima .....	6
3.1.1.	Preparación del aloe vera. ....	6
3.1.1.1.	Textura.....	7
3.1.2.	Selección del aceite esencial .....	7
3.1.3.	Elaboración del yogur .....	8
3.2.	Análisis bromatológico .....	9
3.2.1.	Proteína .....	9
3.2.2.	Contenido Grasa.....	10
3.2.3.	Contenido de cenizas.....	11
3.2.4.	Contenido de agua.....	12
3.3.	Propiedades reológicas. ....	13
3.4.	Actividad antioxidante del yogur.....	13
3.5.	Vida de anaquel .....	14
3.5.1.	Determinación del pH .....	14
3.5.2.	Determinación de la acidez titulable .....	14
3.5.3.	Análisis Microbiológicos .....	14
3.5.4.	Nariz Electrónica.....	15
3.5.5.	Evaluación sensorial.....	16
3.6.	Diseño experimental.....	16
3.7.	Análisis estadístico .....	17
CAPÍTULO IV.....		18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		18
4.1.	Textura.....	18
4.2.	Elección del aceite esencial .....	20
4.3.	Análisis fisicoquímicos .....	21
4.4.	Propiedades reológicas de las muestras de yogur .....	23
4.5.	Actividad Antioxidante .....	26
4.6.	Vida útil.....	27
4.6.1.	pH y acidez.....	27
4.6.2.	Análisis Microbiológicos .....	29
4.6.3.	Evaluación Sensorial.....	31
4.6.4.	Nariz Electrónica.....	33
4.7.	Verificación de la Hipótesis .....	34
CAPÍTULO V.....		35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		35

5.1. Conclusiones .....	35
5.2. Recomendaciones.....	36
MATERIALES DE REFERENCIA .....	37
ANEXOS .....	44
ANEXO 1. Hoja de Cata.....	45
ANEXO 2 PRUEBA TRIANGULAR .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Parámetros de textura del aloe vera sin y con tratamiento térmico (STt y CTt respectivamente).....	19
<b>Tabla 2.</b>	Resultados del análisis proximal en las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial (AE), yogur con aloe vera (AV) yogur con aceite esencial y aloe vera (AVAE).....	22
<b>Tabla 3.</b>	Parámetros viscoelásticos de las muestras del yogur control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	25
<b>Tabla 4.</b>	Tiempo de fermentación (Tf), pH y acidez (Ac) de las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial (AE), yogur con aloe vera (AV), yogurt con aloe vera y aceite esencial (AVAE) a 4 °C durante 21 días.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Corte Transversal y gel de aloe vera.....	xvii
<b>Figura 2.</b>	Estructura química del limoneno, compuesto activo mayoritario del aceite esencial de naranja.....	xviii
<b>Figura 3.</b>	Proceso de tratamiento para el gel de Aloe vera.....	6
<b>Figura 4.</b>	Equipo utilizado y adaptaciones realizadas para determinar el perfil de textura del Aloe vera antes y después del tratamiento térmico.....	7
<b>Figura 5.</b>	Proceso de elaboración de yogur, yogur con aloe vera (AV) y aceite esencial de naranja (AE).....	8
<b>Figura 6.</b>	Proceso seguido en la determinación del contenido de proteína en las muestras de yogur.....	10
<b>Figura 7.</b>	Proceso de determinación del contenido de grasa en las muestras de yogur.....	11
<b>Figura 8.</b>	Proceso utilizado en la determinación del contenido de cenizas en las muestras de yogur.....	11
<b>Figura 9.</b>	Determinación del contenido de humedad en las muestras de yogur.....	12
<b>Figura 10.</b>	Determinación de las propiedades reológicas de las muestras de yogur.....	13
<b>Figura 11.</b>	Equipo de fotoquimioluminiscencia utilizado para el análisis de actividad antioxidante de las muestras de yogur.....	14
<b>Figura 12.</b>	Medios empleados para el análisis microbiológico de las muestras de yogur: a) medio VRBG Enterobacterias, b) medio PDA-Mohos y Levaduras, c) medio MRS-bacterias lácticas.....	15
<b>Figura 13.</b>	Ensayo de las muestras de yogur en nariz electrónica.....	16
<b>Figura 14.</b>	Evaluación sensorial de las muestras de yogur.....	16
<b>Figura 15.</b>	Efecto del tratamiento térmico a 80 °C, 70 °C, 60 °C durante 10 minutos en aloe vera.....	19
<b>Figura 16.</b>	Resultados del análisis sensorial de yogur con AE de lavanda, menta, jengibre, limón, hierba buena, toronja mandarina, hierba luisa, naranja y cedrón.....	20
<b>Figura 17.</b>	Resultados del análisis sensorial de una matriz láctea con tres aceites esenciales (L, limón; T, toronja; N, naranja) a tres concentraciones (10, 0,1%; 5, 0,05% y 2.5, 0,025% v/v).....	21
<b>Figura 18.</b>	Resultados del análisis proximal en las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial (AE), yogur con aloe vera (AV) y yogur con aceite esencial y aloe vera (AVAE).....	22
<b>Figura 19.</b>	Dependencia del módulo elástico ( $G'$ , Pa) con la frecuencia (rad/s) para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de	

	naranja).....	24
<b>Figura 20.</b>	Dependencia del módulo viscoso ( $G''$ , Pa), con la frecuencia (rad/s) para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	24
<b>Figura 21.</b>	Angulo de fase obtenido para las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial de naranja (AE), yogur con aloe vera (AV) y yogur con aceite esencial y aloe vera (AVAE).....	25
<b>Figura 22.</b>	Actividad antioxidante de las muestras yogur natural (control), yogur con aloe vera (AV), yogur con aceite esencial de naranja (AE), yogur con aloe vera y aceite esencial (AVAE).....	27
<b>Figura 23.</b>	Recuento de mohos y levaduras durante 21 días de almacenamiento para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	30
<b>Figura 24.</b>	Recuento de bacterias lácticas durante 21 día de almacenamiento para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	30
<b>Figura 25.</b>	Evaluación sensorial “sabor” durante el almacenamiento de 21 a 4°C de las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	31
<b>Figura 26.</b>	Evaluación sensorial “aroma” durante el almacenamiento de 21 días a 4°C de las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	32
<b>Figura 27.</b>	Evaluación sensorial “aceptabilidad” durante el almacenamiento de 21 días a 4°C de las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).....	32
<b>Figura 28.</b>	Patrón de similitud entre las muestras de yogur durante el período de conservación comparadas con las muestras a tiempo “0”.....	34

## RESUMEN

Como alternativa a las bebidas lácteas fermentadas, en el presente trabajo se desarrolló un yogur con base a leche entera, incorporado con aloe vera (AV) y aceite esencial (AE) de naranja, materiales procedentes de recursos infrautilizados y residuos. Para ello se utilizó AV tratado térmicamente a 70 °C, tras pruebas sensoriales previas en matrices lácteas con AE de naranja, limón, toronja, mandarina, cedrón, hierba buena, hierba luisa, lavanda, menta y jengibre, se seleccionó el aceite esencial de naranja. Los ingredientes de la formulación tuvieron una marcada influencia sobre la composición proximal, propiedades fisicoquímicas, actividad antioxidante, parámetros reológicos y vida útil de las muestras. La adición del AV ejerce un efecto positivo sobre el contenido de proteína del yogur, parámetros reológicos y fisicoquímicos. Por otro lado, la adición del AE de naranja produce cambios en el contenido de grasa, actividad antioxidante y parámetros microbiológicos. La interacción entre el AE y el AV provoca cambios significativos en las propiedades del yogur obteniendo un aumento en el contenido de proteína, capacidad antioxidante viscosidad y desarrollo de bacterias ácido lácticas lo que provoca la disminución del contenido de grasa. En todos los casos y tras el análisis sensorial de los productos obtenidos, estos mantienen su sabor y aroma característicos durante 21 días de almacenamiento.

**Palabras Clave:** bebida láctea, aloe vera, aceite esencial, antioxidante.

## **ABSTRACT**

As an alternative to fermented milk drinks, in the present work a yoghurt based on whole milk, incorporated with aloe vera (AV) and essential oil (AE) orange, materials from underutilized resources and waste was developed. For this AV was used heat treated at 70 ° C, after previous sensory testing in dairy matrices with AE orange, lemon, grapefruit, tangerine, lemon verbena, mint, lemon verbena, lavender, mint and ginger essential oil was selected orange. The ingredients of the formulation had a marked influence on the proximal composition, physicochemical properties, antioxidant activity, rheological parameters and service life of the samples. The addition of AV has a positive effect on the protein content of yogurt, physico-chemical and rheological parameters. Furthermore, addition of orange AE produces changes in the fat content, antioxidant activity and microbiological parameters. The interaction between the AE and the AV caused significant changes in the properties of the yogurt obtaining an increase in protein content, antioxidant capacity and viscosity development of lactic acid bacteria which causes decreased fat content. In all cases and after the sensory analysis of the products obtained, they maintain their characteristic flavor and aroma storage for 21 days.

**Keywords:** milk drink, aloe vera, essential oil antioxidant.

## INTRODUCCIÓN

Las bebidas fermentadas son fuente de proteína y calcio, esencial es en la alimentación (Espinoza & Zapata, 2010; Martínez & García, 2006). El yogur es la leche fermentada más popular y difundida a nivel mundial con alto valor nutritivo. De acuerdo con la FAO (2016), el yogur es una bebida láctea coagulada por la acción de bacterias ácido lácticas responsables de fermentar la leche pasteurizada o concentrada, con o sin aditivos lácteos. Según la noma NTE INEN 2395 (2012), al yogur se puede incorporar ingredientes como hortalizas, frutas, frutos secos, preparados a base de fruta o vegetales en trozos o enteros y no debe ser menor al 5% (p/p).

### **Yogures vegetales**

La perfecta combinación de yogur con verduras no afecta el desarrollo de bacterias ácido lácticas y contribuye con nutrientes de origen vegetal, que puede incrementar la capacidad antioxidante, antiviral, antihipertensiva, entre otras. A pesar de los beneficios que brindan los yogures vegetales, la industria restringe su elaboración por las bajas características sensoriales especialmente aquellas asociadas al sabor. Sin embargo, algunas industrias han optado por la combinación con frutas y verduras que enmascaren el sabor de ingredientes como: aloe vera, calabaza, remolacha y zanahoria con mango, naranja y mora. (Toro, 2012; Barke, 2014). La preparación de yogur con extractos de hierbas, aceites esenciales y demás derivados contribuye al desarrollo de nuevos productos con mejoradas propiedades funcionales y nutricionales. (Amirdivani & Baba, 2011; Savvaidis & Tsiraki, 2016).

Muchas investigaciones han sido realizadas para determinar la influencia de diferentes ingredientes en las propiedades del yogur. Por ejemplo, el efecto en las propiedades fisicoquímicas y de flujo de la pectina y los concentrados de frutas, materia seca, materia grasa, proteína e hidrocoloides, sales de calcio y cereales incorporados en el yogur. Sin embargo, poca o nula información ha sido documentada sobre el efecto de nuevos ingredientes como el Aloe vera y aceite esencial en las propiedades del yogur (Aportela-Palacios, Sosa- Morales & Vélez-Ruiz, 2005).



## **Aloe vera**

El Aloe vera o sábila es una planta perenne con hojas en forma de roseta, dentro de las hojas se encuentra el gel transparente, cubierto con una cutícula delgada que contiene a los conductos de aloína y en la superficie se encuentra la corteza (Row, Lovell, & Parks, 1941). Se ha descrito en la literatura científica que el gel o parénquima de las hojas posee actividad biológica como antioxidante, efecto cicatrizante, antimicrobiano, protector gástrico, activador del funcionamiento del sistema inmunológico, estimulador de macrófagos, regulador de la alcalinidad el cuerpo, así como favorece el crecimiento de bacterias lácticas y no es toxico en el organismo (Domínguez, Contreras, & Gonzáles, 2007).

En la actualidad, el uso industrial de aloe vera ha tenido un crecimiento del 12 % anual en el mercado tanto como materia prima o procesado (Eshun & He, 2004; Kim, y otros, 1998; Reynolds, 1985; Ramachandra & Srinivasa, 2008), pero siempre buscando enmascarar su sabor (Alarcon & Fernandez, 2013; Contreras, Zamudio, & Domínguez, 2003; Domínguez, y otros, 2012; Linaje, y otros, 2008; Moreno, 2012). El sabor astringente se debe a la presencia de aloína (antraquinona de color amarillento), algunos catadores testifican que el aspecto baboso del gel de la sábila no es agradable en una bebida de allí la importancia de desarrollar nuevas tecnologías que mejoren su aceptabilidad (Sierra, 2002; Gösta, 1996).

El gel de aloe vera contiene aminoácidos, vitaminas, minerales, mucopolisacaridos, ácidos, enzimas, saponinas, taninos, heteróxidos antracénicos, esteroides y glicéridos, (Reynolds, 2004); que son asimilables por el organismo (Reynold & Dweck, 1999) y se degrada fácilmente por oxidación, reacciones enzimáticas y/o presencia de microorganismos. El método tradicional de separación de la corteza el gel (Fig. 1) no permite eliminar completamente la aloína y es necesario aplicar un tratamiento que permita mantener las propiedades biológicas y eliminar el gusto amargo. Algunos investigadores describen diferentes técnicas de proceso con el objetivo de esterilizar y estabilizar el gel, a través de procesos en frío o tratamientos térmicos, sin embargo los mejores resultados se han obtenido cuando el gel es calentado a 65 °C por periodos menores a 15 minutos. Una mayor temperatura o tiempo prolongado reduce considerablemente los niveles de actividad biológica (Ramachandra & Srinivasa, 2008; Domínguez, y otros, 2012; Miranda, y otros, 2010).



**Figura 1.** Corte transversal y gel de aloe vera.

### **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son compuestos químicos orgánicos y volátiles, formados por varias sustancias como aldehídos, cetonas, entre otras. Son responsables del aroma característico de las plantas, frutos, flores, verduras, hojas que los contienen y aportan una protección contra el ataque de los insectos e infecciones. La mayoría son líquidos a temperatura ambiente y por lo general son extraídos por destilación o por arrastre con vapor de agua. En su composición están los terpenoides que son las sustancias más importantes de los AE y los responsables de las propiedades activas. Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos dependiendo de la composición, lugar de origen, medio en el que se encuentran y técnica de extracción (Guenther & Althausen, 1952; Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008; Vyas, 2013; Arancibia, y col, 2013).

Los AE más utilizados en industria de alimentos son el cilantro, la naranja y la menta, se emplean para la elaboración de productos cárnicos, bebidas alcohólicas, bebidas lácteas, jugos, refrescos y confitería. Su uso se ha extendido debido al interés del consumidor en productos naturales que sustituyan a las sustancias químicas utilizadas como saborizantes o colorantes, debido a las controversias asociadas al uso de aditivos sintéticos. Las dosis que se emplean son similares a los conservantes sintéticos, sin embargo, aún no está totalmente claro el mecanismo de acción de los AE, ni sus efectos sensoriales en alimentos (López-Malo, Palou, León-Cruz, & Alzamora, 2005; Schelz, Molnar, & Hohmann, 2006; Fisher & Philips, 2008).

## Aceite esencial de naranja

La cáscara de naranja, un residuo de la agroindustria, contiene alrededor de 1,5% (p/p) de aceite esencial y pueden ser extraídos de las hojas, tallos, flores y residuos de la fruta. El limoneno es el componente mayoritario del AE de naranja (90-95%), y presenta actividad repelente de insectos, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, entre otras (Fisher & Phillips, 2006; Stefanello, y otros, 2008; Milind & Dev, 2012; Ruiz & Flotats, 2014).



**Figura 2.** Estructura química del limoneno, compuesto activo mayoritario del aceite esencial de naranja.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **1.1. Tema**

Desarrollo de una bebida láctea fermentada con la incorporación de aloe vera y aceites esenciales

### **1.2. Justificación**

En Ecuador, el aloe vera se cultiva artesanal y comercialmente, es relativamente barato y puede ser empleado como materia prima en varios productos alimenticios. Si bien, gran parte de la producción se exporta como gel o polvo de aloe vera como materia prima para su uso en industrias como la de cosméticos, farmacéuticas y alimentarias. La industria alimentaria aprovecha el valor nutritivo y los compuestos biológicamente activos del aloe para el desarrollo de nuevos productos. Se sabe que el aloe vera presenta propiedades beneficiosas como capacidad antioxidante, antibiótica, fungicida, agente regenerativo, entre otras. En Ecuador el consumo de aloe vera, también llamado sábila, se ha limitado a incluirlo en infusiones preparadas por comerciantes minoristas y a aplicarla de forma externa a manera de tópico en productos cosméticos y de aseo. Sin embargo, una de las grandes limitaciones que presenta esta materia prima y que ha repercutido en su comercialización a gran escala, es su característico sabor astringente. El desarrollo de productos con este ingrediente, deberá tener en cuenta aspectos sensoriales y la tecnología necesaria para enmascarar o disminuir esta cualidad. En este sentido, los saborizantes naturales como los aceites esenciales (AE), pueden ser una alternativa eficaz. Los beneficios positivos de los AE han tomado gran importancia en la industria alimentaria ya que a más de ser saborizantes y aromatizantes naturales pueden ejercer una actividad antioxidante y antibiótica, dependiendo de su tipo, origen, etc. Estos ingredientes pueden ser utilizados para la elaboración de yogur. Ecuador produce diariamente alrededor de 5'300.000 litros de leche que abastecen la demanda local, con un excedente de 250.000 litros. A pesar de ello, la producción de yogur en el país es escasa.

Las leches fermentadas con adición de aloe vera en lugar de fruta; o a la vez como sustrato en el crecimiento de bacterias lácticas han tomado auge en algunos países como alimentos funcionales por el bienestar reflejado en los organismos que lo ingieren en su dieta normal. En éste sentido la presente investigación no solo permitirá desarrollar una nueva metodología para la obtención de un producto con características sensoriales aceptables por los consumidores a base de yogur, con la incorporación de aloe vera y saborizado con aceites esenciales; sino también se incentivara el consumo de alimentos más naturales en la población.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. General**

Desarrollar un prototipo de bebida láctea fermentada, yogur, con la incorporación de aloe vera y aceites esenciales.

#### **1.3.2. Específicos**

- Proponer una metodología para remover el sabor astringente y mejorar la textura del aloe vera.
- Identificar el aceite esencial ideal para ser incorporado en el yogur, considerando aspectos sensoriales.
- Establecer la concentración adecuada del aceite esencial en el yogur, considerando aspectos sensoriales.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, reológicas y sensoriales del producto terminado.
- Calcular el tiempo de vida útil de del producto terminado.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes investigativos**

En los últimos años, la preocupación del consumidor sobre los alimentos que ingiere, su calidad, su origen y los posibles efectos que podrían tener sobre la salud, ha ido en aumento. Los cambios en los hábitos alimentarios hacen que hoy en día la población busque alimentos naturales mínimamente procesados, con mayor vida útil y además que sean nutritivos o generen algún efecto benéfico para el organismo. En este contexto algunos estudios indican que el consumo de alimentos probióticos está íntimamente relacionado con beneficios a la salud, a través de mantener un correcto “balance” en la población microbiana intestinal. Los microorganismos asociados con este balance son los lactobacilos y las bifidobacterias. Las bacterias lácticas son las responsables de facilitar la digestión, desdoblarse la lactosa, mejorar la asimilación de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, además de ser ampliamente utilizadas en nuevos productos y/o como conservante de los alimentos. Una de las fuentes de estos microorganismos es el yogur, que ha sido ampliamente considerado por los consumidores como un producto “saludable”. De allí que muchas formulaciones de yogur contemplan una combinación de fuentes de nutrientes de origen animal y vegetal para incrementar el crecimiento de bacterias ácido lácticas sean o no probióticas. Sin embargo, la incorporación de nuevos ingredientes durante la elaboración de yogur implica que se mantengan o mejoren las propiedades fisicoquímicas, sensoriales, nutricionales y de flujo del yogur (Gustaw, Kordowska-Wiater, & Koziół, 2011). Un ejemplo de lo anterior fue propuesto por Sah, Vasiljevic, McKechnie, & Donkor (2016), que al elaborar un yogur en estado simbiótico con leche y polvo de la cáscara de piña aumentó significativamente la acidez y presentó menor firmeza. Ramaswamy y Basak (1992), determinaron que un yogur comercial con incorporación de concentrado de mora presenta menor estabilidad en el módulo de almacenamiento y de pérdida en relación a un yogur con pectina. Jamali, Marhamatizadeh, Yakarim, Kargar, & Rahmanian (2014) y He, (2005) afirman que el aloe vera (AV) es un buen sustrato para el crecimiento de bacterias lácticas probióticas en comparación con otros

sustratos como la soja, la malta o la miel, estudiados en otras investigaciones. Según éstos estudios la cantidad más adecuada de AV es del 15 % (p/p), con éste porcentaje se obtuvieron mejores características sensoriales, fisicoquímicas y reológicas en comparación con el yogur natural (Hernández & Romagosa, 2001; Gustaw, Kordowska-Wiater, & Koziół, 2011 y Trejo, 2014). Los yogures con AV o extractos vegetales ayudan a la asimilación de las proteínas, mejoran el proceso de digestión y no es tóxico para el organismo (Vega, 2005; Barrantes, Tamime, Muir, & Sword, 1994; Mariken, Arts, Guido, & Haenen, 2002; Papadimitriou C., y otros, 2007; Ramchandran & Shah, 2010).

A más de los ingredientes descritos anteriormente, muchos de los yogures comercializados utilizan saborizantes naturales o sintéticos, en este sentido los aceites esenciales (AE) son una alternativa natural que ha más de conferir sabor presenta actividad biológica, antioxidante, antibacteriana, antimicótica, antiviral, entre otras. Aceites esenciales como tomillo, orégano, naranja, limón, pomelo, laurel, clavo, cilantro, canela y pimienta de Jamaica son capaces de inhibir bacterias patógenas como *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* (Deans & Ritchie, 1987; Ruiz & Flotats, 2014; Shelef, 1983). Algunos estudios registran que al utilizar AE en combinación con otras sustancias, como la nisina o la lisozima han logrado la inactivación de varios patógenos que conservantes sintéticos no pueden alcanzar (Bajpai, Yoon, Bhardwaj, & Kang, 2014; Pol & Smid, 1999; Cutter & Siragusa, 1995; Karatzas, Bennik, Smid, & Kets, 2000; Blaszyk & Holley, 1998). El AE de naranja presenta actividad frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas a concentraciones de 0,5% (v/v); (Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu, 2006), el AE de naranja actúa mediante un mecanismo de hidrofobicidad, donde rompe las membranas celulares de las bacterias perturbando su estructura celular haciéndolas permeables y dañando la mitocondria (Knobloch, Weigand, Weis, Schwarm, & Vigneschow, 1986; Rivera, 2015; Sikkema, De Bont, & Poolman, 1994).

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Hipótesis nula**

Ho: El Aloe vera y el aceite esencial de naranja como ingredientes no influyen en la calidad del yogur.

### **2.2.2. Hipótesis alternativa**

H1: El Aloe vera y aceite esencial de naranja como ingredientes influyen en la calidad del yogur.

## **2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **2.3.1. Variables independientes**

Aloe vera

Aceite esencial de naranja

### **2.3.2. Variables dependientes**

Aceptabilidad

Vida de anaquel



## CAPÍTULO III

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Materia prima

Para la elaboración de la bebida láctea se trabajó con hojas de aloe vera (AV) cultivadas de manera artesanal y con leche entera de vaca, ingredientes procedentes del cantón Pelileo. El aceite esencial de naranja fue obtenida de la empresa Isabrubotanik S.A (Ambato-Ecuador).

##### 3.1.1. Preparación del aloe vera.

Inmediatamente después de la cosecha del AV se lavó la corteza con abundante agua y se empleó el método tradicional de separación de corteza, que consistió en separar las espinas y las capas de piel con un cuchillo evitando en lo posible el contacto con el gel (Fig. 4), los trozos de AV se cortaron alrededor de 5 mm<sup>3</sup> y se sumergieron en agua para evitar la oxidación; posteriormente se sometió a calentamiento a 50 °C por 10 min con agua en relación 1:2 (p/v). Trascurrido este tiempo fue lavado a temperatura ambiente y se repitió el proceso por cuadruplicado hasta eliminar aspecto “baboso”. Los trozos de AV se almacenaron a una temperatura de 5-8 °C para posteriormente ser incorporados en la leche previo un tratamiento de escaldado a 70 °C por 5 minutos (Fig. 3).



**Figura 3.** Proceso de tratamiento para el gel de Aloe vera.

### 3.1.1.1. Textura

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento térmico en la estructura y textura del gel de AV, se determinó el perfil de textura en la muestra fresca y aquella sometida a un tratamiento térmico (50 °C). Para el ensayo se utilizó un Texturómetro CT3 (Texture analyzer, Middleboro, EE.UU.), con una sonda TA.39, elemento TA-BT K1, caída de carga de 10 Kg y a una velocidad de 2 mm/s. Para mantener fija la muestra se adaptó una tuerca métrica hexagonal de 10 mm (Fig. 4). Los resultados son el promedio de tres ensayos diferentes cada uno con al menos diez determinaciones.



**Figura 4.** Equipo utilizado y adaptaciones realizadas para determinar el perfil de textura del Aloe vera antes y después del tratamiento térmico.

### 3.1.2. Selección del aceite esencial

Para seleccionar el AE más adecuado como saborizante y aromatizante del yogur se realizó una prueba sensorial con un panel de 15 catadores semi-entrenados, que probaron las muestras siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE. Los catadores fueron entrenados con AE disueltos en agua y yogur comercial durante dos sesiones para familiarizarlos con los descriptores y sus definiciones así como también con la escala a utilizar. Los AE (0,1% v/v) fueron incorporados en el yogur natural utilizando polisorbato 20 (1% v/v) (Tween 20) como agente emulsificante. Los

panelistas evaluaron el sabor, aroma y aceptabilidad del yogur con AE de naranja, limón, toronja, mandarina, cedrón, hierba buena, hierba luisa, lavanda, menta y jengibre respectivamente, de acuerdo a una escala hedónica de 0 a 5, donde 0 = no me gusta, lo peor que he probado y 5 = me gusta mucho, lo mejor que he probado.

Para determinar la concentración adecuada del AE (0,1%, 0,05% y 0,025%) en el yogur se emplearon los AE que obtuvieron la mayor calificación en sabor y aceptabilidad (toronja, naranja y limón). Las muestras, así preparadas, fueron evaluadas por los 15 catadores semientrenados según se describió anteriormente.

### 3.1.3. Elaboración del yogur

Para la elaboración del yogur se utilizó leche, azúcar al 10% p/v y gelatina 0,2% p/v. La mezcla fue sometida a pasteurización (85 °C, 15 minutos), inmediatamente se realizó un choque térmico con agua a temperatura ambiente (~20 °C) hasta que la leche alcanzó 40 °C, temperatura óptima para el desarrollo de bacterias lácticas. Rápidamente se adicionó el cultivo láctico (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. CHR Hansen YF-L811) a una concentración de 0,03% (p/v) y se incubó en una incubadora Inducel (V22 Estándar, Rusia) a 40 °C durante 4-5 horas o hasta alcanzar un pH de 4,5. Una vez transcurrido éste tiempo el yogur fue cortado y enfriado a 5-8 °C. Este yogur fue utilizado como muestra control (Fig. 5).



**Figura 5:** Proceso de elaboración de yogur, yogur con aloe vera (AV) y aceite esencial de naranja (AE).

El yogur con AV se elaboró siguiendo el procedimiento anterior pero incorporando junto con el cultivo los trozos de AV en una proporción de 15% (p/v). Asimismo, el yogur con AE de naranja fue elaborado siguiendo la metodología descrita anteriormente, a una concentración 0,025% (v/v) de AE. En todos los casos el AE fue incorporado una vez detenida la fermentación láctica (Fig.5).

### 3.2.Análisis bromatológico

#### 3.2.1. Proteína

El contenido de proteína se determinó de acuerdo a la metodología descrita en la norma AOAC (2002), para lo cual se pesaron 3 g de muestra y se añadieron 2 tabletas Kjendahl y 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La muestra se llevó a ebullición por 1 h hasta dar lugar al cambio de color de marrón a verde esmeralda. Posteriormente, la muestra se enfrió y se adicionaron 70 ml de agua destilada; una vez fría la muestra se añadieron 50 ml de NaOH 40% (p/v), el contenido se introdujo en el destilador de proteína Vapodest Gerhardt (TT625, España) junto con 30 ml de HBO<sub>3</sub> 1N contenido en un matraz para ser filtrado. El filtrado contenido se tituló con HCl 0,1001N hasta un cambio de color a rosa (Fig. 6). El contenido de proteína se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{(V_s - V_B) \times N \times 14,01}{(W \times 10)} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

14,01= es el factor de conversión de nitrógeno a proteína

V<sub>s</sub>= volumen de la muestra

V<sub>B</sub>=volumen del blanco (0,1ml)

N= normalidad del HCl

W= peso de la muestra



**Figura 6:** Proceso seguido en la determinación del contenido de proteína en las muestras de yogur.

### 3.2.2. Contenido Grasa

El contenido de grasa se determinó por duplicado según la norma AOAC (2002), para ello se homogenizó 2 a 3 g de muestra en 100 ml de HCl 3N y se calentó. Se filtró la fase orgánica exenta de grasa con ayuda de un papel filtro y el residuo se secó en una estufa por 5 minutos a 100 °C. El papel filtro junto con la muestra se insertó en los dedales del extractor de grasa Selecta (DEFGRAS; España) y se evaporó a 125°C por 40 minutos. Finalmente se lavó con hexano durante 1 hora (Fig. 7). El contenido de grasa se calculó mediante la siguiente ecuación:

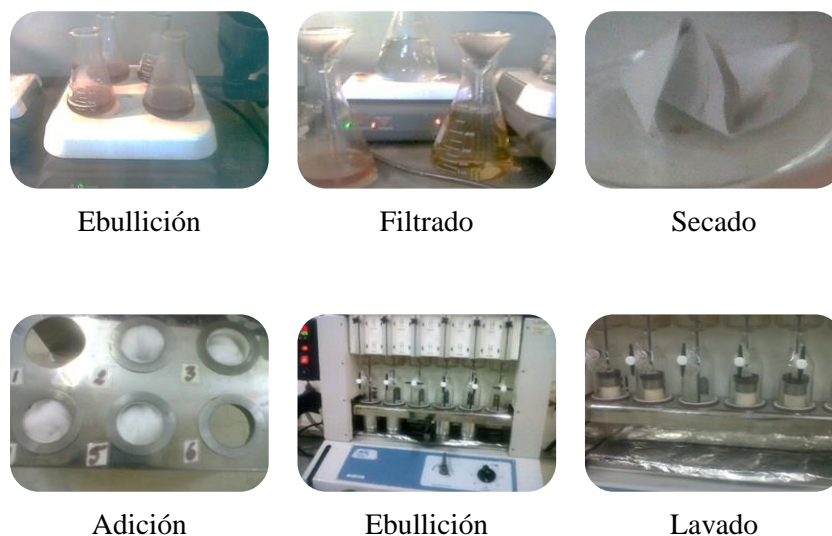
$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1)} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$W_2$ = peso muestra + vaso (g)

$W_1$ = peso de la muestra (g)

$W_0$ = peso vaso vacío (g)



**Figura 7:** Proceso de determinación del contenido de grasa en las muestras de yogur.

### 3.2.3. Contenido de cenizas

El contenido de ceniza se determinó por duplicado según la norma AOAC (2002). Para lo cual, se pesaron 5 g de muestra y se calentó a 375 °C hasta que la muestra se calcinó. Inmediatamente se llevó a una mufla (Barnstead Termolyne F6010; España) a 535 °C por 7 horas (Fig. 8). Para determinar el contenido de ceniza se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)} * 100 \quad \text{Ec.3}$$

Donde:

$W_2$ = peso muestra + vaso (g)

$W_1$ = peso de la muestra (g)

$W_0$ = peso vaso vacío (g)



**Figura 8:** Proceso utilizado en la determinación del contenido de cenizas en las muestras de yogur.

### 3.2.4. Contenido de agua

El contenido de humedad se determinó mediante la norma AOAC (2002). Para lo cual se pesaron en una cápsula con tapa, 2 g de muestra y 1 gota de agua destilada y se llevó a una estufa de vacío (Yamato ADP31; España) a  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Inmediatamente después de sacar las muestras se enfriaron en un desecador a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 hora (Fig. 9). Para determinar el contenido de humedad se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = 100 * \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

$W_2$ = peso muestra + vaso (g)

$W_1$ = peso de la muestra (g)

$W_0$ = peso vaso vacío (g)



**Figura 9:** Determinación del contenido de humedad en las muestras de yogur.

Todos los análisis bromatológicos se realizaron en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos (LACONAL), Ambato-Ecuador.

### 3.3. Propiedades reológicas.

El análisis viscoelástico se llevó a cabo a 20 °C empleando un reómetro (Anton Paar, MCR 302, Ashland-EE.UU) (Fig. 10), con una geometría de paletas (gab, 0,2 mm). Se realizó un barrido de frecuencias con una amplitud de oscilación 0,1% y un intervalo de 0,1 – 10 Hz. El módulo elástico ( $G'$ , Pa) y el módulo viscoso ( $G''$ , Pa) se trazaron en función de la frecuencia. Además se calculó el ángulo de fase ( $\delta$ ) a partir de la siguiente ecuación:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ec. 5}$$



**Figura 10.** Determinación de las propiedades reológicas de las muestras de yogur.

### 3.4. Actividad antioxidante del yogur.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó un equipo de fotoquimioluminiscencia (Photochem, Analytik-Jenna, Alemania). Las muestras fueron evaluadas en medio lipídico con Trolox (Fig. 11). La técnica combina la generación de radicales a través de la excitación fotoquímica con luminometría altamente sensible a través de la reacción del radical con luminol para hacer medible la emisión de luz. Las muestras (100 ul), se diluyeron con tampones prefabricados (kits estandarizados) y se inyectaron en el dispositivo. El relativo de capacidad antioxidante se determinó por triplicado y por comparación con un blanco estandarizado (sin antioxidantes) y un estándar proporcionado con el kit. El ensayo se llevó a cabo en los laboratorios de Petroquímica de la Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPEL, Latacunga.





**Figura 11.** Equipo de fotoquimioluminiscencia utilizado para el análisis de actividad antioxidante de las muestras de yogur.

### **3.5.Vida de anaquel**

#### **3.5.1. Determinación del pH**

El pH se determinó en 20 ml de muestra a temperatura ambiente, utilizando un pH-metro (Thermo Scientific Orion VersaStar, EE.UU). Las medidas se realizaron por triplicado.

#### **3.5.2. Determinación de la acidez titulable**

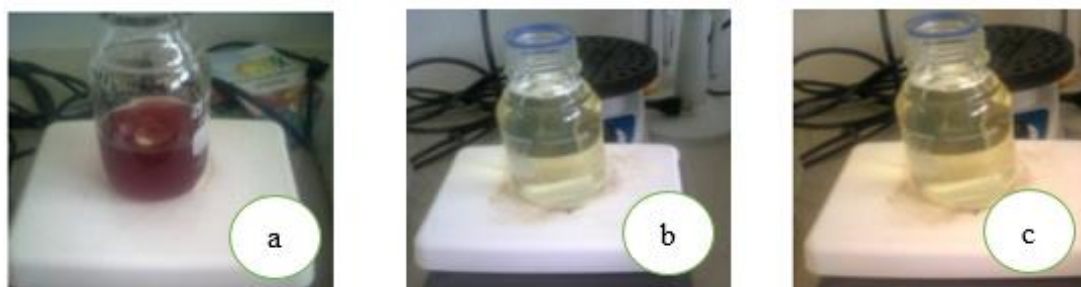
La acidez titulable se determinó mediante la técnica oficial de AOAC (1999), homogenizando 9 ml de muestra en 1 ml de agua y 3 gotas de fenolftaleína, se tituló con NaOH 0,1 N, hasta el cambio de color a rosa. La acidez se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez titulable} = \frac{\text{gasto de NaOH} * 0,1N * 90}{1000} * 100 \quad \text{Ec. 6}$$

#### **3.5.3. Análisis Microbiológicos**

Para determinar el contenido microbiano de las muestras de yogur, se pesó asepticamente 10 g de bebida láctea y se transfirió a bolsas estériles con 90 ml de agua de peptona 0,1%. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 1 minuto en un homogeneizador Stomacher (400 Circulator, Seward, Abganistan). Posteriormente se

emplearon placas de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) con la técnica de recuento en placa para bacterias ácido lácticas, que se incubaron a 37 °C durante 48 h. Para coliformes totales se empleó el medio VRBG (Violeta Rojo Bilis Glucosa) con la técnica vertido en placa, que se incubaron por 24 h a 37 °C. Con la misma técnica se usó el medio PDA (Agar Papa Dextrosa) para recuento de mohos y levaduras que se incubaron a 20 °C por 48 h. Mientras que para *Escherichia coli* se utilizaron placas petrifilm (3M® Petrifilm®, USA), incubadas por 24 h a 37 °C (Fig. 12). Los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), según lo establece la norma (NTEINEN, 2395:2012).



**Figura 12.** Medios empleados para el análisis microbiológico de las muestras de yogur: a) medio VRBG-Enterobacterias, b) medio PDA-Mohos y Levaduras, c) medio MRS-bacterias lácticas.

#### 3.5.4. Nariz Electrónica

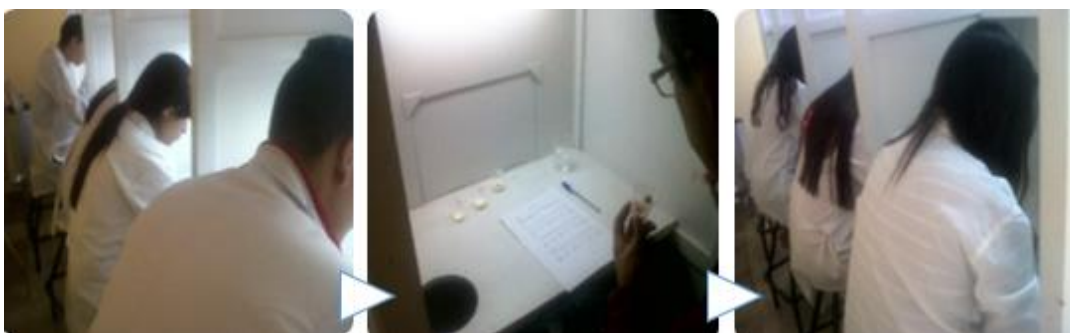
En un vial se colocaron 5 g de muestra de yogur. Posteriormente el vial fue cerrado herméticamente e incubado a 60 °C durante 3 min (Fig. 13). Una vez transcurrido este tiempo, se inyectó la muestra (fase volátil) en el detector (1 ul) del equipo de nariz electrónica (FlavourSpec®. Gaschromatograph-Ion Mobility Spectrometer, Dortmund, Alemania). EL gas portador utilizado fue nitrógeno. Los resultados fueron comparados entre muestras para identificar cambios durante el período de almacenamiento. Los ensayos se realizaron por triplicado. El ensayo se llevó a cabo en los laboratorios de Petroquímica de la Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPEL, Latacunga.



**Figura 13.** Ensayo de las muestras de yogur en nariz electrónica.

### 3.5.5. Evaluación sensorial

Para juzgar los cambios a nivel sensorial durante el período de almacenamiento, las muestras fueron evaluadas por un panel semientrenado de 10 personas. Los panelistas evaluaron el aroma, sabor y aceptabilidad de acuerdo a la escala hedónica de 0 a 5, donde 0 = no me gusta, lo peor que he probado y 5 = me gusta mucho, lo mejor que he probado (UNE87 006 92), cada 7 días, durante los 21 días de almacenamiento (Fig. 14).



**Figura 14:** Evaluación sensorial de las muestras de yogur.

### 3.6. Diseño experimental

El presente trabajo comprendió dos secciones experimentales. En la primera sección, a partir de la evaluación sensorial en sabor, aroma y aceptabilidad, se seleccionaron 3 aceites esenciales de un total de 10. Para ello se utilizó un diseño de bloques incompletos con  $t$  (tratamientos) = 10,  $K$  (tratamientos a evaluarse por catador) = 4,  $b$  (catadores) = 15,  $r$  (catadores por muestras) = 6,  $\lambda$  (repeticiones) = 2, según lo descrito por Cochran (1978). Mientras que para la segunda parte se utilizó un diseño

experimental factorial ( $3^2$ ), cuyos factores fueron: aceites esenciales (naranja, toronja, limón), previamente seleccionados, a tres diferentes concentraciones 0,1%, 0,8% y 0,6% v/v.

### **3.7. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se muestran con la media  $\pm$  desviación estándar y análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores de acuerdo a los experimentos. Cuando se detectaron diferencias significativas en los resultados se realizó un análisis de comparación múltiple mediante el test de Tuckey. Las diferencias se consideraron significativas al 95% de confianza. Para el análisis estadístico se emplearon los programas EXCEL®, SPSS® y GraphPad Prism®.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Textura

El perfil de textura no presentó diferencias significativas en las muestras del gel de AV antes y después de aplicar el tratamiento térmico ( $P > 0,05$ ) Tabla 1. Sin embargo, la fuerza aplicada durante la punción fue mayor en las muestras tratadas térmicamente que aquellas sin tratamiento térmico. Este hecho puede estar asociado con la formación de una estructura comprimida en el tejido parenquimal formado principalmente por polisacáridos localizados entre la pared celular como pectina, celulosa, hemicelulosa, que proveen rigidez a la pared celular después del tratamiento térmico (Miranda, 2010). Los autores obtuvieron valores de dureza de  $\sim 1,7$  N tras un proceso de secado  $70$  °C mientras que la muestra que no fue sometida al tratamiento presentó un valor de  $0,50$  N. Resultados similares fueron obtenidos en el presente trabajo en donde la muestra sin tratamiento térmico presentó una dureza inferior a la obtenida en el gel tratado térmicamente (Tabla 1). Ramachandra & Srinivasa (2008); Miranda, y otros (2010) y Domínguez y otros (2012) indicaron que a temperaturas bajas, menores a  $75$  °C, no existen alteraciones del AV a nivel estructural y se mantienen las propiedades bioactivas; mientras que a temperaturas altas y tiempos prolongados, la estructura se altera visiblemente. Cuando se desprende la corteza la textura de los vegetales se ve afectada y aún más cuando se aplica calor (Aguilar, Reyes, De la Garza, & Contreras, 1999). En la figura 15, se puede observar que tras pruebas previas y una vez transcurrido un tiempo mayor a los 5 minutos a  $70$  °C o una temperatura superior, la estructura del AV sufre cambios en su aspecto, se obtiene a manera de un líquido viscoso y cambia su coloración a rosa pálido. El tratamiento térmico adecuado a más de favorecer la textura del aloe vera, permite eliminar la carga microbiana (Miranda, Maureira, Rodriguez, & Vega, 2009; Ramachandra & Srinivasa, 2008).

**Tabla 1.** Parámetros de textura del aloe vera sin y con tratamiento térmico (STt y CTt respectivamente).

Parámetros	Unidad	STt	CTt
Dureza	N	1,66 ± 0,91a	2,36 ± 1,19a
Trabajo	%	2,70 ± 1,47a	3,55 ± 1,99a
Deformación	Mm	2,99 ± 0,01a	2,99 ± 0,00a
Adhesividad	mJ	1,49 ± 1,39a	1,19 ± 1,30a
Resiliencia	mJ/mm <sup>3</sup>	0,02 ± 0,01a	0,02 ± 0,02a
Firmeza	N	0,14 ± 0,12a	0,22 ± 0,15a
Masticabilidad	mJ	0,14 ± 0,19a	0,32 ± 0,22a
Elasticidad	mm	0,77 ± 0,38a	0,55 ± 0,41a

Los resultados son la media ± desviación estándar.

Diferentes letras a, b; indican diferencias significativas entre muestras.



**Figura 15.** Efecto del tratamiento térmico a 80 °C, 70 °C, 60 °C durante 10 minutos en aloe vera.

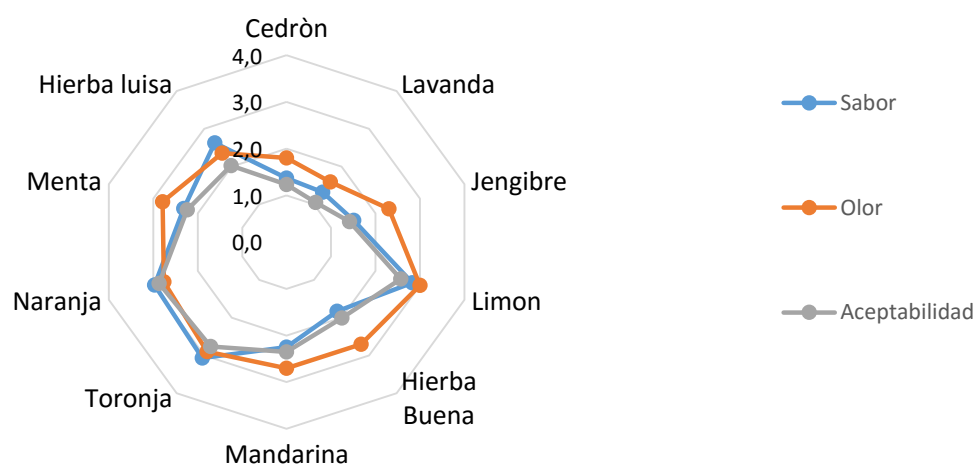
La masticabilidad aumentó ligeramente mientras que la adhesividad disminuyó (Tabla 1). Este hecho puede estar relacionado con una menor solubilización de los compuestos, obteniéndose tejidos firmes y menos adhesivos, producto del tratamiento térmico. Por otro lado, este proceso puede ser atribuido a la disminución del contenido de mucopolisacáridos, responsables de una mayor adhesividad, por el tratamiento térmico (Chang et al., 2006). La activación de la enzima pectinesterasa a temperaturas menores a 75 °C, que ocasiona una serie de cambios bioquímicos y forma estructuras moleculares insolubles de acuerdo a la solución en la que se encuentre (Reeve, 1977; Aguilar, Reyes, De la Garza, & Contreras, 1999; Espinoza, Baca, Natera, & Alonso, 2006). También puede estar atribuido a que el gel de AV tiene minerales como el calcio

que conjuntamente con los mucopolisacáridos forman sales insolubles cuando se aplica calor (Cadena, 2015).

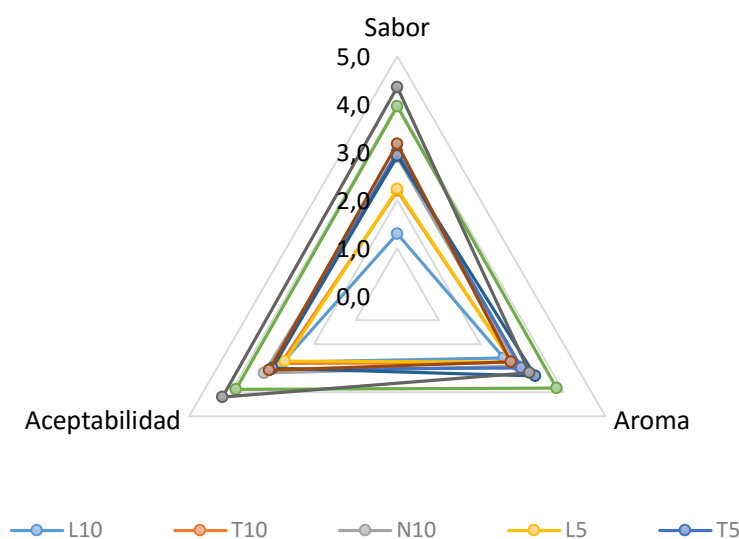
#### 4.2. Elección del aceite esencial

Los resultados de análisis sensorial indican que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los 10 aceites esenciales. Los AE cítricos presentaron mayor aceptabilidad sabor y aroma, sin embargo, las muestras que obtuvieron las mayores puntuaciones fueron aquellas que contenían aceite esencial de limón, toronja y/o naranja (Fig. 16 y 17).

A medida que disminuye la concentración del AE aumenta la puntuación en los parámetros sensoriales de sabor y aceptabilidad. El AE de naranja a una concentración de 0,025% v/v fue el preferido con un valor de 4,5 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 17). La concentración de AE empleada en el yogur fue mínima, inferior a los saborizantes y aromatizantes sintéticos utilizados (0,5 %). Ramos & Zabaleta (2013) corroboraron los resultados anteriores ya que tras incorporar 0,01% v/v de AE de Jamaica en un yogur comercial, los resultados de la evaluación sensorial fueron mayores que tras utilizar altas concentraciones. Los autores recomiendan emplear AE en bajas concentraciones para obtener mayor aceptabilidad sensorial.



**Figura 16.** Resultados del análisis sensorial de yogur con AE de lavanda, menta, jengibre, limón, hierba buena, mandarina, toronja, hierba luisa, naranja y cedrón.



**Figura 17.** Resultados del análisis sensorial de una matriz láctea con tres aceites esenciales (L, limón; T, toronja; N, naranja) a tres concentraciones (10, 0,1%; 5, 0,05% y 2.5, 0,025% v/v).

### 4.3. Análisis fisicoquímicos

La composición proximal varió de acuerdo a los ingredientes empleados. El contenido de grasa aumentó en las muestras con AE de naranja, mientras que en muestras con AV disminuyó ( $P < 0,05$ ). El análisis proximal identifica compuestos químicos con características semejantes, una de ellas es el ser solubles en el solvente utilizado (solubilidad del AE en el hexano utilizado para la determinación de grasa), y no establece si es una grasa verdadera o el tipo de lípido; esto explicaría el aumento del contenido de grasa en las muestras con AE (Tabla 2, Fig. 18). En las muestras con AV el contenido de grasa disminuye ligeramente por el porcentaje utilizado en la elaboración del yogur (15% p/v). El AV presenta péptidos, enzimas, minerales, vitaminas y mucopolisacáridos casi en su totalidad, pero no contiene materia grasa (Trejo, 2014).

El contenido de proteína y ceniza del yogur aumentó al incorporar el AV sin embargo la incorporación del AE no provocó un aumento significativo (Tabla 2, Fig. 18). Este hecho puede estar asociado a la presencia de grupos carboxilos del AV que interaccionan con los minerales de la leche, específicamente el calcio y magnesio, que forman sales insolubles (Reeve, 1977; Aguilar, Reyes, De la Garza, & Contreras, 1999; Espinoza, Baca, Natera, & Alonso, 2006; Cadena, 2015). Resultados similares fueron

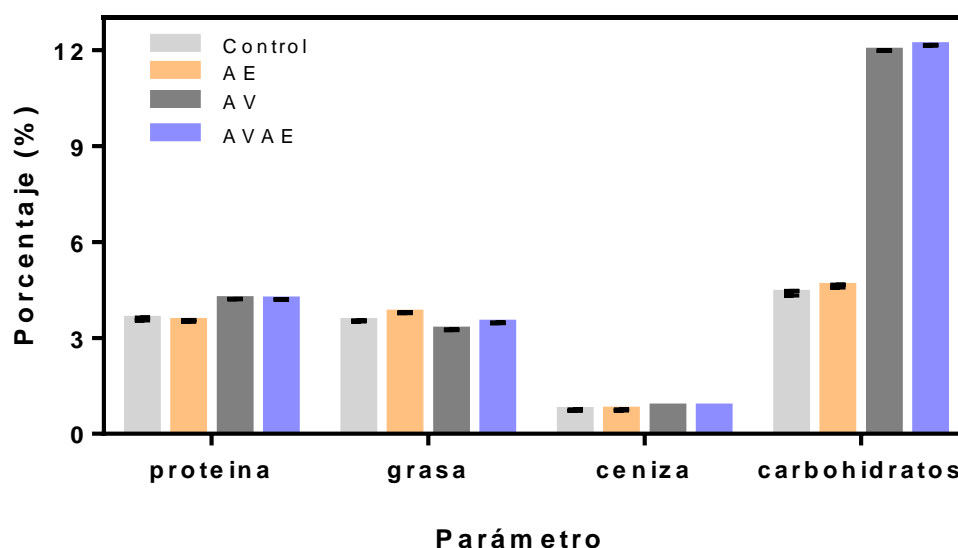


observados por Trejo (2014) y Estrada (2009) al emplear entre 10-20% (v/v) de jugo de AV en la leche después de la pasteurización. El contenido de carbohidratos aumentó tras la incorporación del 15% p/v de AV (Fig. 18). Los resultados fisicoquímicos de las muestras, están dentro de lo que establece la norma ecuatoriana (NTE-INEN, 2395:2012) y no presentan diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Resultados del análisis proximal en las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial (AE), yogur con aloe vera (AV) y yogur con aceite esencial y aloe vera (AVAE).

Parámetro (%)	Control	AE	AV	AVAE	INEN 2395
Proteína	3,59 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,7
Grasa	3,53 ± 0,12 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,06 <sup>b</sup>	3,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,43 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,5
Cenizas	0,74 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,85 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,85 ± 0,01 <sup>c</sup>	-
Humedad	87,7 ± 0,06 <sup>d</sup>	87,3 ± 0,06 <sup>d</sup>	79,7 ± 0,01 <sup>d</sup>	79,3 ± 0,08 <sup>d</sup>	-
Carbohidratos	4,40 ± 0,13 <sup>c</sup>	4,62 ± 0,13 <sup>c</sup>	11,98 ± 0,03 <sup>d</sup>	12,15 ± 0,02 <sup>d</sup>	-

Los resultados, expresados como base seca, son la media ± desviación estándar. Diferentes letras a, b, c, d indican diferencias significativas entre muestras.

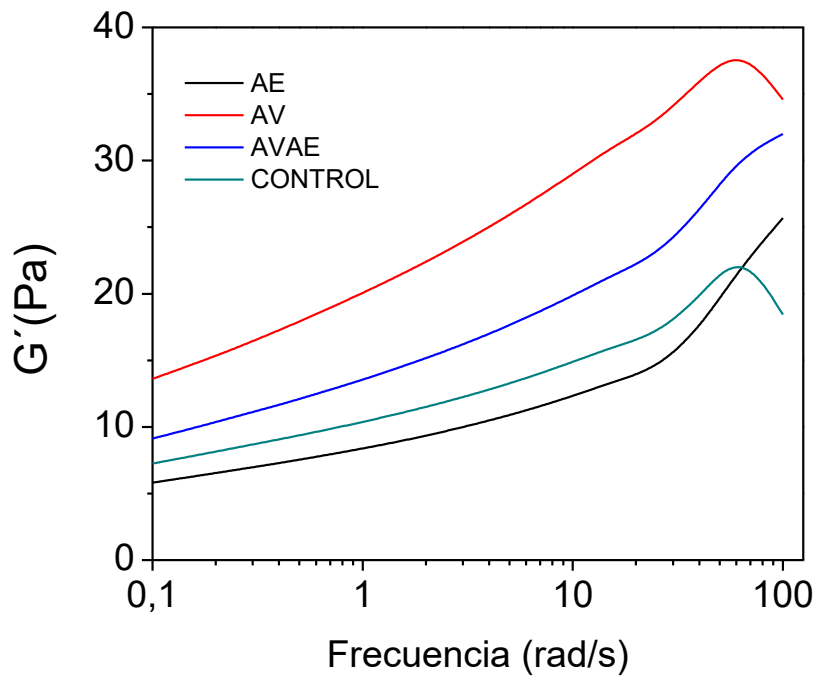


**Figura 18.** Resultados del análisis proximal en las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial (AE), yogur con aloe vera (AV) y yogur con aceite esencial y aloe vera (AVAE).

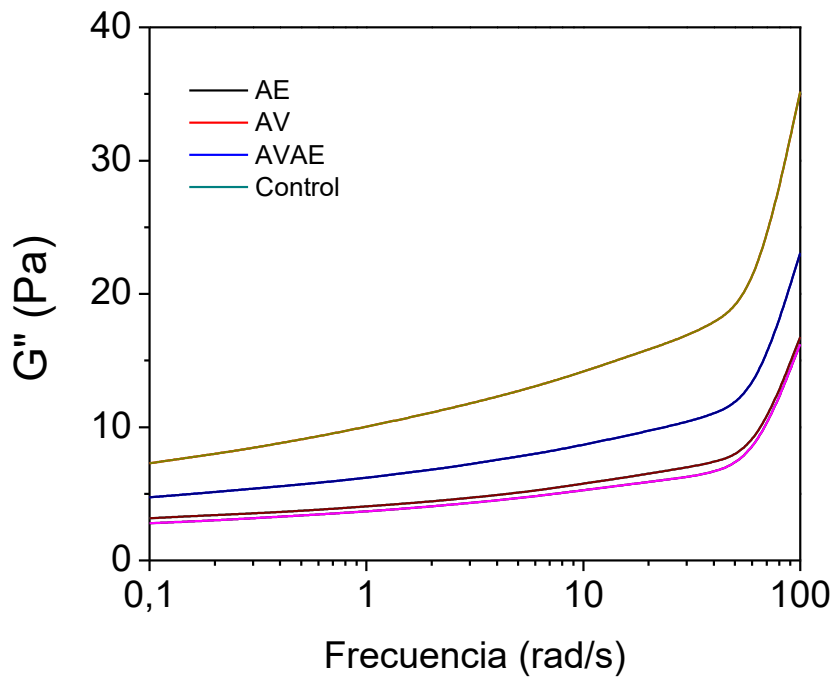
#### 4.4. Propiedades reológicas de las muestras de yogur

Todas las muestras presentaron un comportamiento típico viscoelástico donde  $G' > G''$  (Fig. 19 y 20). El yogur generalmente presenta un comportamiento viscoelástico (De Lorenzi, Pricl, & Torriano, 1995). En la Figura 19 y 20 se representan los perfiles de las muestras en términos de  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia angular (rad/s), respectivamente. En todos los casos, el módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) aumentó conforme se incrementó la frecuencia angular. El yogur con AV presentó los valores más altos en  $G'$  y  $G''$  a lo largo del intervalo de frecuencia, respecto a las otras muestras. En  $G'$  se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en todas las muestras, mientras que para  $G''$  no se encontraron diferencias significativas entre la muestra control y aquella que contiene AE ( $P > 0,05$ ). La incorporación de aloe vera incrementa la elasticidad de las muestras. Las propiedades reológicas dependen del contenido de sólidos totales, particularmente del contenido y tipo de proteína. Con el incremento en sólidos como el AV, la tendencia del yogur para aumentar en  $G'$  y  $G''$  es evidente, este hecho por ende disminuye la capacidad de deformación en el gel de yogur. La fuerza de los enlaces proteína-proteína, el número de enlaces por sección transversal de la cadena proteica y la orientación de las hebras en la matriz contribuyen a la propiedades de gel en el yogur (Zare y col., 2011). Con base a lo anterior, la incorporación de aloe vera favorece la formación de geles más fuertes. Todo lo contrario sucedió con el AE que provoca una disminución de estos parámetros en las muestras que lo contienen, probablemente asociado a una interferencia del AE con las micelas de caseína dando como resultado un coágulo menos firme (Hassan, Frank, Schmidt & Shalabi, 1996).

La Tabla 3 presenta los parámetros viscoelásticos derivados de los perfiles mecánicos calculados después de aplicar la Ley de Casson. El  $n'$  está relacionado con la estabilidad de la muestra y la estructura; cuanto mayor sea el valor de  $n'$  mayor será la inestabilidad de la muestra frente a los cambios de frecuencia y al aumento de la fase dispersa (trozos de AV). Los valores de  $n'$  también puede verse influenciados por la composición de la leche, el contenido de materia seca, cantidad de cepas usadas, temperatura, tiempo de fermentación y número de micelas de caseína (Fuentes & Yáñez, 2001).



**Figura 19.** Dependencia del módulo elástico ( $G'$ , Pa) con la frecuencia (rad/s) para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).



**Figura 20.** Dependencia del módulo viscoso ( $G''$ , Pa), con la frecuencia (rad/s) para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).

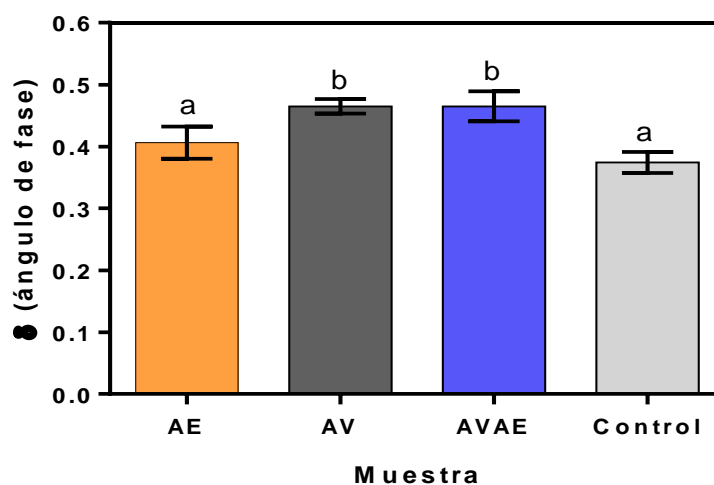
**Tabla 3.** Parámetros viscoelásticos de las muestras del yogur control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).

	n'	n''
<b>Control</b>	0,34 a	0,78 a
<b>AE</b>	0,31 a	0,69 a
<b>AV</b>	0,80 b	1,47 b
<b>AVAE</b>	0,50 c	1,06 c

Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar.

Diferentes letras a, b, c indican diferencias significativas entre muestras.

La Figura 21 muestra los valores del ángulo de fase ( $\delta$ ) para cada una de los yogures. El ángulo de fase está asociado con la viscoelasticidad de la muestra. Un valor bajo de  $\delta$  indica que el gel tiene un carácter más elástico (más del tipo sólido). Los valores obtenidos para las diferentes muestras son similares, esto indicaría que el yogur con AE tiene características viscoelásticas similares a las del control ( $P > 0,05$ ). Por otro lado, tras la incorporación de aloe vera, en el yogur AV y AVAE el valor de  $\delta$  aumenta ligeramente, si bien se mantiene el carácter elástico, los enlaces involucrados en la formación de la estructura del gel han sufrido cambios significativos respecto al control ( $P < 0,05$ ). La interacción entre el AE y el AV no tiene un efecto significativo respecto al yogur con AV. Este hecho indica que el aloe vera es responsable de la mayoría de los cambios en las propiedades reológicas.



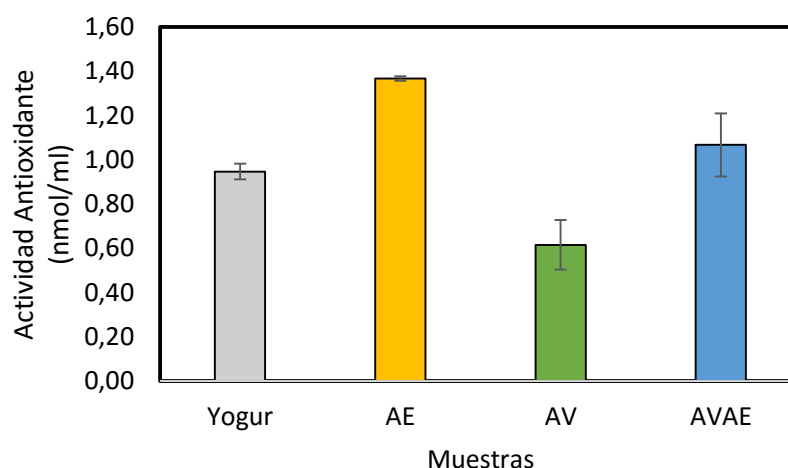
**Figura 21.** Ángulo de fase obtenido para las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial de naranja (AE), yogur con aloe vera (AV) y yogur con aceite esencial y aloe vera (AVAE).

#### **4.5. Actividad Antioxidante**

La muestra de yogur con AE presentó una actividad antioxidante de  $1,37 \pm 0,01$  nmol/ml superior a la muestra control de  $0,95 \pm 0,04$  nmol/ml; mientras que la muestra con AV tuvieron una capacidad antioxidante de  $0,62 \pm 0,11$  nmol/ml, la muestra con AVAE presentó un valor de  $1,07 \pm 0,14$  nmol/ml como capacidad antioxidante, superior a la obtenida en el control (Fig. 22).

Durante la fermentación, las bacterias lácticas pueden haber generado péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes esto explicaría la actividad antioxidante que presenta el control. Resultados similares fueron obtenidos por Sah, Vasiljevic, McKechnie, & Donkor (2014). Además, los AE como el de naranja aumentan la capacidad antioxidante gracias a la presencia de su componente mayoritario, el limoneno. Este compuesto tiene una estructura cíclica relacionada con una alta actividad antioxidante (Ismail, Marjam, & Foong, 2004; Thompson, Lopetcharat, & Drake, 2007; Kim & Thomas, 2007). Ramos & Zabaleta (2013), observaron un incremento en la actividad antioxidante de yogur cuando incorporaron aceite esencial de Jamaica a una concentración de 100 ppm.

Las muestras que contienen AV, presentaron una actividad antioxidante inferior al control, esto se puede atribuir al tratamiento térmico recibido por el gel además de interacciones entre carbohidratos y flavonoides del AV con la matriz proteica del yogur que actúan a manera de interferencia, enmascarando la concentración real de antioxidantes (Rice-Evans, Millar, & Paganga, 1996; Jacobo & Cisneros (2009). Estos resultados concuerdan con los presentados por López, Vega, & Suárez (2010) que indica que el extracto de la pulpa del aloe vera es menos activo contra el radical DPPH, es decir, presentó menos actividad antioxidante, a pesar de tener mayor rendimiento en dicha actividad.



**Figura 22.** Actividad antioxidante de las muestras yogur natural (control), yogur con aloe vera (AV), yogur con aceite esencial de naranja (AE), yogur con aloe vera y aceite esencial (AVAE).

## 4.6. Vida útil

### 4.6.1. pH y acidez

Durante el período de almacenamiento (21 días) la acidez aumentó y el pH disminuyó en todos los casos (Tabla 4). Este hecho puede estar asociado al desdoblamiento de la lactosa en ácido láctico por acción de las bacterias lácticas, o por la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, que conservan su actividad incluso a temperaturas de 0-5 °C, y como resultado de la acumulación de ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido láctico (Vedamuthu, 1982). Otro factor puede estar asociado a la presencia de enzimas residuales en el aloe vera incluso después del tratamiento térmico (Christopher, Redy, & Venkateswarlu, 2009; Kailasapathy, 2006). Las muestras con AE presentaron mayor acidez a los 7, 14 y 21 días. Estos resultados fueron similares a los observados por Amirdivani & Baba (2011), quienes al incorporar AE de menta, albaca y apio en yogur, la acidez disminuyó en comparación con el yogur natural durante el almacenamiento (28 días). Las muestras con AV presentaron mayor acidez en comparación con el control. La variación de la acidez y pH que se produjeron en las muestras presentadas se puede asociar a la diferencia en la población microbiana durante la fermentación (Eissa, Mohamed Ahmed, & Yagoub, 2010).

Los datos no presentan diferencias significativas al 95% de confianza entre muestras, pero sí entre los días de almacenamiento. Estos datos concuerdan con los de Sah,

Vasiljevic, McKechnie, & Donkor (2016), que describen que al emplear piña en cascara o en polvo tiende a disminuir el pH en comparación al yogur natural al transcurrir el tiempo de almacenamiento. En este sentido, el gel de AV es un buen sustrato para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (Parmjit, Panesar, & Chetan, 2012).

El tiempo de fermentación fue menor en las muestras con AV (4 h aproximadamente) a diferencia del yogur sin AV que requirió un tiempo de 5,5 h (Tabla 4). En éste sentido, se puede decir que la adición de AV disminuye el tiempo de incubación por presentar nutrientes vegetales que son utilizados por las bacterias ácido lácticas mejorando su crecimiento como se describió anteriormente. Otras investigaciones de nuevas bebidas lácteas con adición de jugo de AV (Hernández & Romagosa, 2001; Domínguez, Contreras, & Gonzáles, 2007; Trejo, 2014; Sierra, 2002), observaron este hecho y consideran que es beneficioso a escala industrial para disminuir costos durante la fermentación. Sin embargo, la rápida acidificación induce a la liberación de las micelas de caseína y el desarrollo rápido y débil de la red de micelas contribuyendo además con mayor sinéresis lo que repercutiría en las propiedades reológicas del yogur (Lee & Lucey, 2010; Sah B. , Vasiljevic, McKechnie, & Donkor, 2016).

**Tabla 4.** Tiempo de fermentación (Tf), pH y acidez (Ac) de las muestras de yogur (control), yogur con aceite esencial (AE) , yogur con aloe vera (AV), yogurt con aloe vera y aceite esencial (AVAE) a 4 °C durante 21 días.

		Tiempo de Almacenamiento (días)				
Muestra	Tf		0	7	14	21
Control	5,5	pH	4,50 ± 0,01 a	4,39 ± 0,00 b	4,19 ± 0,03 c	4,09 ± 0,02 d
		Ac	0,64 ± 0,11 e	0,86 ± 0,27 f	0,97 ± 0,31 g	0,92 ± 0,25 g
AE	5,5	pH	4,45 ± 0,02 a	4,34 ± 0,01 b	4,18 ± 0,03 c	4,01 ± 0,02 d
		Ac.	0,65 ± 0,09 e	0,86 ± 0,19 f	0,90 ± 0,29 g	0,94 ± 0,34 g
AV	4,06	pH	4,47 ± 0,03 a	4,37 ± 0,03 b	4,24 ± 0,02 c	3,89 ± 0,01 d
		Ac	0,64 ± 0,19 e	0,88 ± 0,23 f	1,09 ± 0,35 g	1,36 ± 0,45 h
AVAE	4,06	pH	4,45 ± 0,03 a	4,40 ± 0,02 b	4,25 ± 0,03c	3,94 ± 0,01 d
		Ac	0,65 ± 0,15 e	0,87 ± 0,21 f	1,09 ± 0,20 g	1,26 ± 0,31 h

Los resultados son la media ± desviación estándar

Diferentes letras a, b, c, d, e, f, g, h indican diferencias significativas entre muestras.

#### 4.6.2. Análisis Microbiológicos

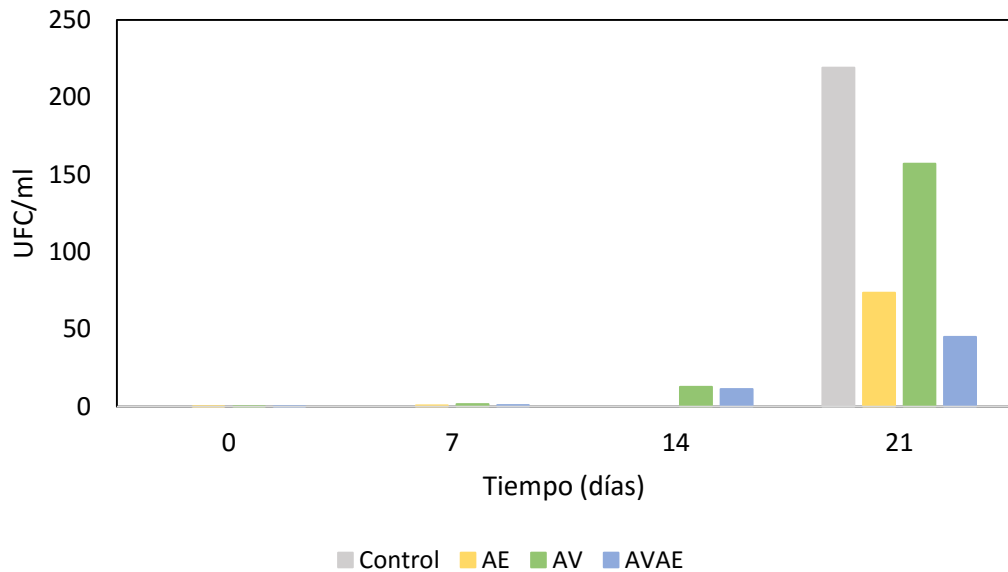
La presencia de AV en el yogur aumentó el crecimiento de bacterias lácticas, al igual que el recuento de mohos y levaduras durante el período de almacenamiento (Fig. 23 y 24). Sin embargo se mantuvo dentro de lo que establece la norma NTE-INEN 2395 (2012). Este hecho puede estar asociado al tiempo y temperatura de pasteurización del AV, que en un afán por mantener las propiedades nutritivas, no se puede aplicar un tratamiento más exhaustivo. Algunas investigaciones establecen que al adicionar sustratos de origen vegetal junto con la leche, se acelera el crecimiento de bacterias lácticas y aquellas asociadas al deterioro (Díaz-Vela, Totosaus, Cruz-Guerrero, & Pérez, 2013; Sah B. , Vasiljevic, McKechnie, & Donkor, 2016).

Con base a los resultados obtenidos, el tiempo de vida de anaquel por el método de supervivencia fue de 21 días. En dicho tiempo, microorganismos como enterobacterias o *Escherichia coli* no presentaron crecimiento (datos no mostrados), además que no sobrepasaron lo establecido en la norma citada anteriormente. Otro factor puede ser el hecho de que ciertas bacterias son antagónicas y que probablemente el AV al ser un buen sustrato para la actividad proteolítica de las bacterias ácido lácticas, favorece el desarrollo de estas (Fig. 24) y limita el crecimiento de las patógenas (Thomas & Mills, 1981; Zamudio, González, & Medina, 2001). Además es importante considerar que la presencia de compuestos vegetales aumenta la proteólisis en el yogur y puede conducir a una degradación de proteínas en aminoácidos y posiblemente a una producción de péptidos bioactivos antimicrobianos (Shahidi & Zhong, 2008).

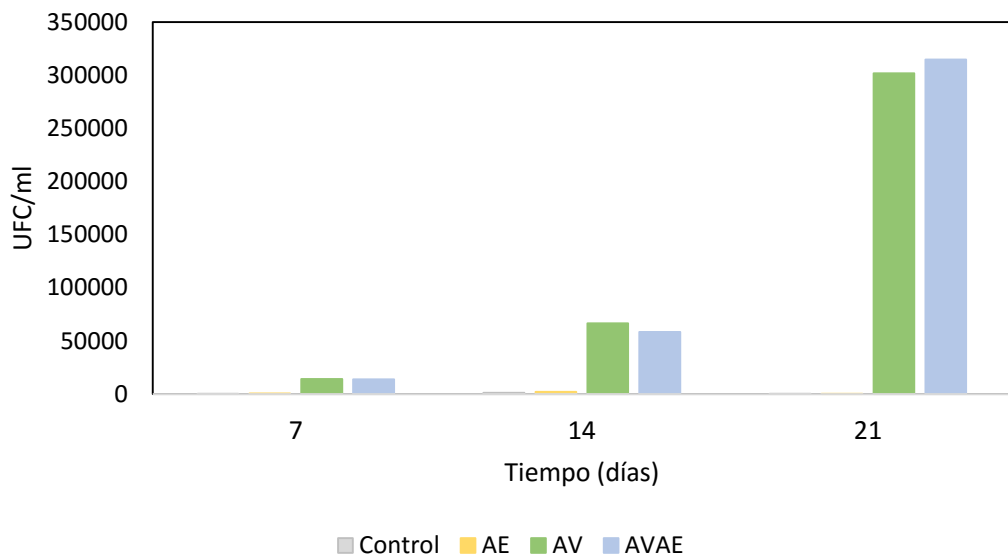
Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu (2006), indicaron que el AE de algunos cítricos actúa de mejor manera frente a bacterias Gram-negativas que en Gram-positivas. Con base a lo anterior, el AE de naranja no debería interferir en el desarrollo de las bacterias lácticas pero sí frente *E. coli*. El modo de acción del AE empleado puede ser porque éste actúa en los lípidos de la membrana celular cambiando la permeabilidad y atacando las mitocondrias de las bacterias (Sikkema, De Bont, & Poolman, 1994; Knobloch, Weigand, Weis, Schwarm, & Vigneschow, 1986). A pesar de tener efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y Enterobacterias (Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu, 2006; Shelef, 1983; Deans & Ritchie, 1987), no fue eficaz frente a mohos y levaduras a una concentración de 0,025% v/v. En este contexto, algunos autores proponen que la combinación de aceites esenciales



con otros conservantes naturales, como las bacteriocinas y ácidos grasos, promueve su eficacia contra los patógenos transmitidos por los alimentos (Yamazaki, 2004).



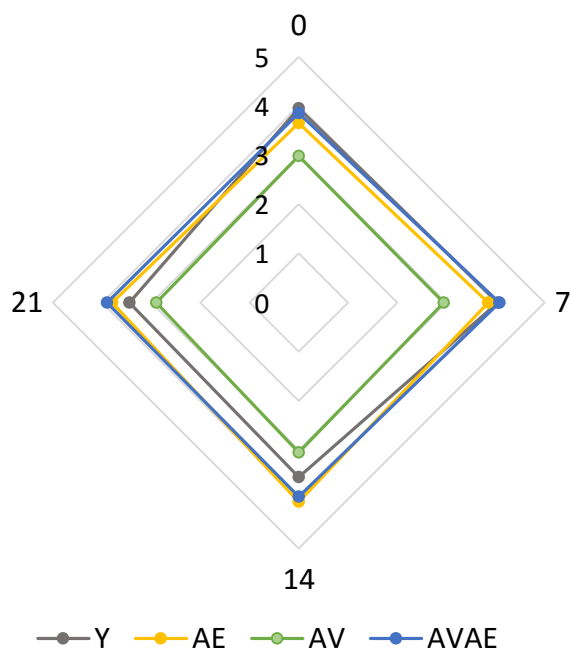
**Figura 23.** Recuento de mohos y levaduras durante 21 días de almacenamiento para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja)



**Figura 24.** Recuento de bacterias lácticas durante 21 días de almacenamiento para las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja)

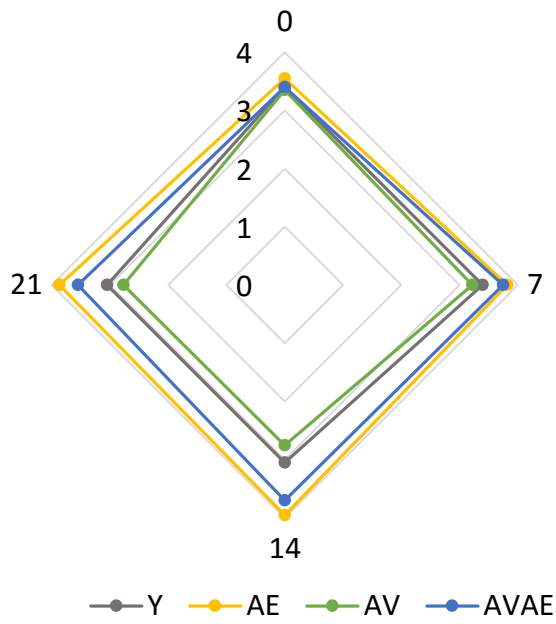
### 4.6.3. Evaluación Sensorial

La evaluación sensorial realizada con 10 panelistas semientrenados en parámetros de sabor aroma y aceptabilidad se presenta en las Figuras 25-27. En todas las muestras existieron diferencias significativas durante el período de almacenamiento ( $P < 0,05$ ). La presencia del AE favoreció las propiedades organolépticas únicas para el yogur, aumentando la calidad sensorial en aroma, sabor y aceptabilidad. El AV por otro lado, disminuye la calidad sensorial sin embargo, tras la incorporación del AE, la interacción presentó propiedades sensoriales adecuadas. Al trascurrir el tiempo de anaquel el aceite esencial de naranja favoreció las características sensoriales de la muestra AVAE. Resultados similares a los obtenidos en yogur con extractos de frutas o vegetales, en comparación con un yogur natural (Amirdivani & Baba, 2011). A partir del día 14 disminuyó la aceptabilidad y el sabor en la muestra control y en el yogur con AV, esto puede estar asociado por la baja acidez en las muestras.

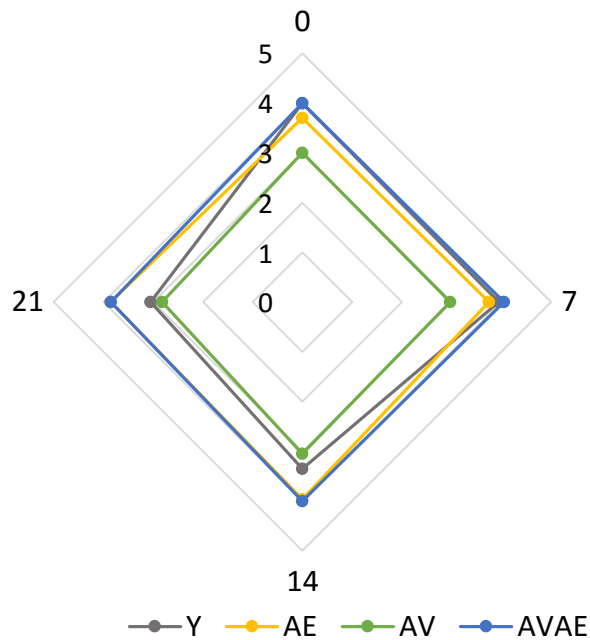


**Figura 25.** Evaluación sensorial “sabor” durante el almacenamiento de 21 a 4°C de las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).

Para complementar la evaluación sensorial, se realizó una prueba triangular con dos muestras de AVAE y una muestra de AE. Los panelistas (70% de ellos) no encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) y no pudieron diferenciar entre muestras.



**Figura 26.** Evaluación sensorial “aroma” durante el almacenamiento de 21 días a 4°C de las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).

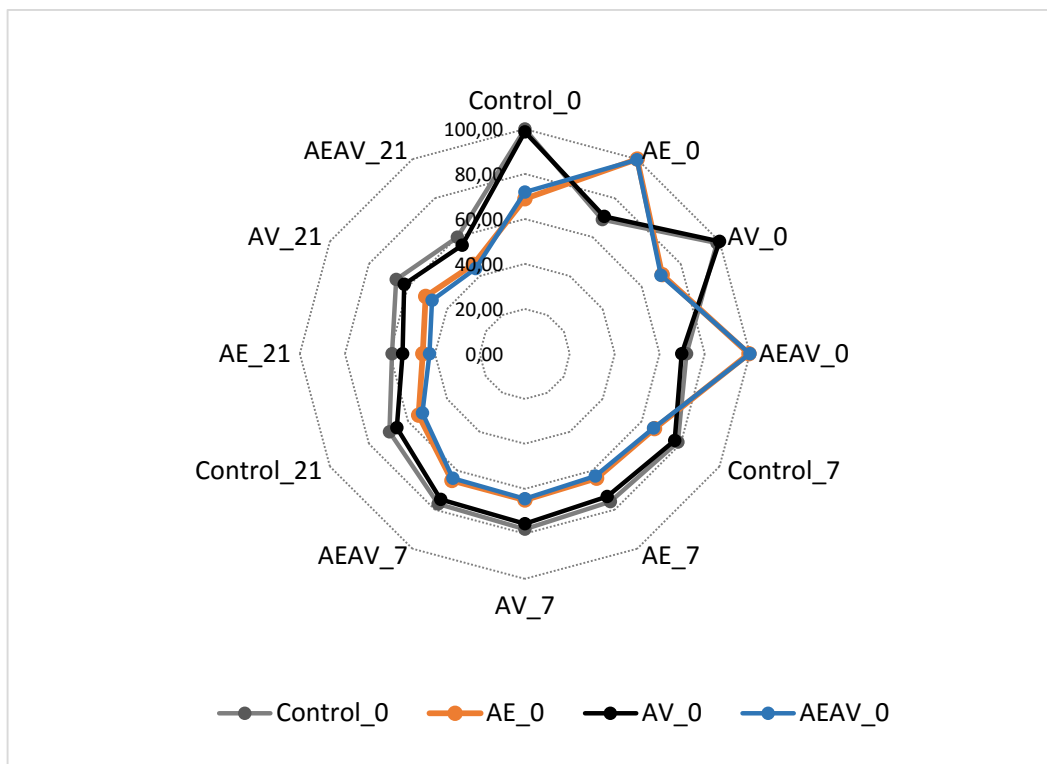


**Figura 27.** Evaluación sensorial “aceptabilidad” durante el almacenamiento de 21 días a 4°C de las muestras: control (yogur natural), AV (yogur con aloe vera), AE (yogur con aceite esencial de naranja) y AVAE (yogur con aloe vera y aceite esencial de naranja).

#### 4.6.4. Nariz Electrónica

La similitud entre los compuestos volátiles de las muestras de yogur presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). La muestra control junto con la muestra de yogur con aloe vera (AV) presentó un perfil muy similar en compuestos volátiles. Asimismo la muestra con aceite esencial de naranja (AE) y la interacción AVAE son coincidentes respecto a los compuestos volátiles. Independientemente del día de estudio de acuerdo al período de almacenamiento (0, 7 y 21 días).

Las similitudes variaron considerablemente al final del período de conservación (Fig. 28). La muestra control al día 0 del ensayo presentó un 100% de similitud respecto a la muestra Control. Al día 7 la muestra control era similar a sí misma en un 78,60% y al día 21 era similar en un 69,50%. Respecto a la incorporación del AV en el yogur, éste fue 75,5% y 61,90% similar a sí mismo durante el período de conservación (7 y 21 días respectivamente). La muestra de aceite esencial de naranja fue similar a sí misma en un 63,80% al día 7 y 45,40% al día 21 de conservación. La interacción del AVAE fue similar en 63,90% y 43,70% al día 7 y 21 respectivamente. Las mayores diferencias pueden estar asociadas a los ácidos orgánicos y ésteres que se forman durante la fermentación. En el caso de las muestras con AE de naranja, los compuestos volátiles asociados se volatilizaron o se perdieron durante la conservación. Estudios previos han puesto de manifiesto el aceite esencial de naranja está constituido mayoritariamente por limoneno (94%), éste es el compuesto volátil responsable del aroma cítrico de la naranja (Duccio y col., 1998). Mientras mayor sea la similitud los cambios que tiene lugar en cada muestra (Control y AV; AE y AVAE), son de menor importancia y no se ven afectados ya que el perfil de aroma se puede asociar con olores característicos. Además, Lee y col (2010), mostró los cambios dependientes del tiempo en las concentraciones de ácidos grasos volátiles (acetato y formiato) procedentes de la fermentación de hidratos de carbono.



**Figura 28.** Patrón de similitud entre las muestras de yogur durante el período de conservación comparadas con las muestras a tiempo “0”

#### 4.7. Verificación de la Hipótesis

Al 95% de confianza se puede atribuir que el aceite esencial de naranja actúa como un conservante, mejorador de la textura (disminuye  $G'$  y  $G''$ ), saborizante, aromatizante natural favorece la capacidad antioxidante y la acidez en la bebida láctea a una concentración de 0,025% (v/v). Además tuvo un efecto antimicrobiano frente a *E. coli* y *Enterobacterias*. El aloe vera actúa como buen sustrato para el crecimiento de bacterias lácticas, sin embargo también lo fue para mohos y levaduras. Además favorece el incremento en la acidez y en el contenido de proteínas y cenizas. Disminuye el pH y aumenta la elasticidad del yogur ( $G' > G''$ ). De lo anterior, la interacción de estos dos componentes favoreció la calidad fisicoquímica, reológica, antioxidante, microbiológica y sensoriales del yogur.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se desarrolló una bebida láctea fermentada con la incorporación del gel de aloe vera y aceite esencial de naranja como saborizante y aromatizante que presentó la mayor aceptabilidad dentro del panel semi-entrenado.
  
- La metodología empleada eliminó el aspecto viscoso conservando las propiedades estructurales propias del gel de aloe vera. A una temperatura de 55 °C durante 10 minutos se eliminó el sabor astringente característico del aloe, además de mejorar la textura y la masticabilidad del material.
  
- La incorporación de aceites esenciales en matrices lácteas es posible siempre y cuando vayan apoyadas por rigurosas evaluaciones sensoriales que permitan determinar el tipo de aceite esencial a utilizar y la dosis más adecuada. De la presente investigación se identificó que los cítricos, específicamente el aceite esencial de naranja a una concentración de 0,025%, v/v es la mejor opción para desarrollar una bebida láctea.
  
- La bebida láctea con aceite esencial de naranja y aloe vera presentó un pH de 4,45; una acidez de 0,65; un contenido de grasa de 3,43%; proteína 4,20%; cenizas 0,85% en base seca. Además de actividad antioxidante (1,07 nmol/ml). Por otro lado, la interacción de los ingredientes permite mantener el carácter elástico propio del yogur. La evaluación por nariz electrónica fue coincidente con la apreciación del panel semientrenado. Es una bebida fermentada láctea con excelentes propiedades sensoriales.
  
- El tiempo de vida útil estimado para el yogur con adición del gel de aloe vera y aceite esencial de naranja como saborizante, aromatizante y conservante fue de 21 días. Los análisis microbiológicos demostraron que al inicio y final del estudio, el

yogur favoreció el desarrollo de bacterias lácticas y mantuvo valores permisibles en mohos y levaduras, ausencia de enterobacterias y E. coli; de acuerdo a lo descrito por la norma NTE INEN 2395.

## **5.2. Recomendaciones**

- El yogur con gel de aloe vera y aceite esencial de naranja es completamente natural, no incluye conservantes sintéticos. En éste sentido se puede impulsar al desarrollo de bebidas y productos alimenticios que utilicen los beneficios de lo que se encuentra en la naturaleza
- Para obtener una mayor calidad del yogur con adición de aloe vera es recomendable identificar un proceso térmico más efectivo o a su vez incorporar un conservante.
- Al elaborar bebidas fermentadas naturales se puede emplear aceites esenciales como conservante y lo más recomendable los cítricos en concentraciones bajas.
- Al emplear trozos de gel de aloe vera en algunas bebidas o productos alimenticios como mermeladas se recomienda tener un corte inferior a  $1\text{ cm}^3$ , para que el tratamiento térmico permita eliminar el sabor característico dentro del trozo del gel de sábila.

## MATERIALES DE REFERENCIA

- Aguilar, C. N., Reyes, M., De la Garza, H., & Contreras, J. (1999). Aspectos bioquímicos de la relación entre el escaldado TB-TL y la textura de vegetales procesados. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 54-62.
- Alarcon, M., & Fernandez, R. (2013). Aplicación terapéutica del Aloe vera. *Odontología*, 42-45.
- Amirdivani, & Baba, A. (2011). Changes in yogur fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *Food Science and Technology*, 1458-1464.
- Arancibia, M., Rabossi, A., Bochicchio, P. A., Moreno, S., López-Caballero, M. E., Gómez, M., & Montero, P. (2013). Biodegradable films containing clove or citronella essential oils against the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Journal of Agriculture and Food Technology*, 3(3), 1-7.
- Bajpai, V. K., Yoon, J. I., Bhardwaj, M., & Kang, S. (2014). Anti-listerial synergism of leaf essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* with nisin in whole, low and skim milks. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(8), 602-608.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food and chemical toxicology*, 46 (2), 446-475.
- Barke, W. (2014). *Elaboración y Valoración de Yogures de Vegetales*. Valencia: Universidad Tecnológica de Valencia.
- Barrantes, E., Tamime, A., Muir, D., & Sword, A. (1994). The effect of substitution of fat by microparticulate whey protein on the quality of set-type, natural yogur. *International Journal of Dairy Technology*, 47, 61-68.
- Blaszyk, M., & Holley, R. A. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Journal Food Microbiology*, 39: 175-183.
- Cadena, W. (2015). *Determinación de los Parámetros Reológicos del yogur de sábila (Aloe vera) elaborado con diferentes formulaciones mediante el uso del Viscosímetro BROOKFIELD*. Ambato. Ecuador.: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- Christopher, M. D., Redy, V. P., & Venkateswarlu, K. (2009). Viability during storage of two *Bifidobacterium bifidum* strains in set and stirred flavoured yoghurts containing whey protein concentrates. *Nat. Prod. Rad.*, 8: 25-31.
- Contreras, M., Zamudio, M., & Domínguez, R. (2003). Growth and acid production by lactic acid bacteria grown in Aloe vera juice. *Proceedings of the AICHE*, 3.



- Cutter, C. N., & Siragusa, G. (1995). Population reduction of gram negative pathogens following treatments with nisin and chelators. *Journal Food Prot.*, 58: 977-983.
- De Lorenzi, L., Pricl, S., & Torriano, G. (1995). Rheological behavior of low-fat and full fat stirred yogur. *International Dairy Journal*, 15, 661-67.
- Deans, S., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165-180.
- Díaz-Vela, J., Totosa, A., Cruz-Guerrero, A. E., & Pérez, L. (2013). In vitro evaluation of the fermentation of added-value agroindustrial byproducts: Cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) peel and pineapple (*Ananas comosus*) peel and pineapple (*Ananas comosus*) peel as functional ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(7), 1460-1467.
- Domínguez, R. M., Contreras, M. E., & Gonzáles, A. (2007). Proceso de biotransformación láctica de jugo de Aloe vera. *Universidad Autónoma de Yucatán*, 35-42.
- Domínguez, R., Arzate, I., Chanona, J., Welti, J., Alvarado, J., Calderon, G., . . . Gutiérrez, G. (2012). El gel de Aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Ingeniería Química*, 11.
- Duccio R.L Caccioni, Monica Guizzardi, Daniela M Biondi, Agatino Renda, Giuseppe Ruberto, Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*, *International Journal of Food Microbiology*, 43(1-2): 73-79.
- Eissa, E. A., Mohamed Ahmed, I. A., & Yagoub, A. E. (2010). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of yoghurt produced from goat milk. *Livestock Research for Rural Development*, 22, 247-253.
- Eshun, K., & He, Q. (2004). Aloe vera: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 44, 91-96.
- Espinoza, A. L., Baca, P. R., Natera, S. P., & Alonso, M. E. (2006). Evaluación de textura, color y aceptación del nopalito variedad Milpa Alta escaldado, a diferentes tiempos de inmersión en solución de NaCl Y CaCl<sub>2</sub>, y empaqueo a vacío. *Agrofaz. Publicación semestral de investigación científica*, 6. 103-110.
- Espinoza, A., & Zapata, L. (2010). *Estudio de yogur. Evaluación de calidad e información nutricional*. Chile: Odecu.
- FAO. (2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura*. Obtenido de FAO: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/procesamiento-de-la-leche/conservacion-de-la-leche/es/#.Vrao9fnhDIV>

- Fisher, K., & Philips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Food Science and Technology*, 19(3): 156-164.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2006). The effect of lemon orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232-1240.
- Fuentes, C., & Yáñez, C. (2001). Estudio del comportamiento en el tiempo de las variables relacionadas con la transferencia de masa, reológicas y de color, para un yogur que contiene trozos de piña variedad Cayena Lisa (*Ananas Comosus*) deshidratados osmóticamente con previa impregnación. Bogotá-Colombia: Universidad de la Sabana. Facultad de Agroindustrial.
- Gösta, M. (1996). *Manual de Industrias Lácteas*. Suecia: Teknotext AB.
- Guenther, E., & Althausen, D. (1952). The essential oils. *Van Nostrand New York*, 6.
- Gustaw, W., Kordowska-Wiater, M., & Koziół, J. (2011). The influence of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria for bio-yoghurt production. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 10. 455-466.
- He, Q. (2005). Quality and safety assurance in the processing of Aloe vera gel juice. *Food Control*, 16, 95-104.
- Hernández, A., & Romagosa, S. (2001). *Desarrollo de una leche fermentada probiótica con jugo de Aloe vera*. Cuba: Universidad de la Habana.
- Ismail, A., Marjam, Z. M., & Foong, C. W. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87, 581-586.
- Jacobo, L., & Cisneros, A. (2009).
- Jamali, H., Marhamatizadeh, M., Yakarim, M., Kargar, J., & Rahmanian, E. (2014). Studying the influence of Aloe vera on the growth of the *Lactobacillus Acidophilus* and *Bifidobacterium Probiotic* Bacteria in Producing Probiotic Milk and Yoghurt. *Unique Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 16-20.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT Food Science and Technology*, 39: 1221-1227.
- Karatzas, A. K., Bennik, M. H., Smid, E. J., & Kets, E. P. (2000). Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal Microbiology*, 89: 296-301.
- Kim, D. S., & Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101 (1), 308-313.

- Kim, K. H., Lee, J. G., Kim, D. G., Kim, M. K., ParK, J. H., & Shin, Y. G. (1998). The development of a new method to detect the adulteration of commercial Aloe gel powders. *Archives of Pharmacal Research*, 21, 514-520.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H., & Vogenschow, H. (1986). Action of terpenoids on energy metabolism. *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils (Edited by: Brunke EJ)*, 429-445.
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogur. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136.
- Linaje, M., Alvarado, A., Arguijo, N., Elizarrarás, J., Pérez, R., Torres, E., & Ugalde, S. (2008). Yogur: Sábila y Nopal (Alimentos Probióticos). *Universidad Autónoma de Coahuila*, 3-6.
- López, A., Vega, D., & Suárez, M. (2010). Estudio de la capacidad antioxidante del Aloe vera cultivada en Canarias. *Vector Plus*, 94.
- López-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R., & Alzamora, S. (2005). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Advances in Food Mycology*, 571(4), 261-286.
- Mariken, J., Arts, J., Guido, R., & Haenen, M. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1184-1187.
- Martínez, J., & García, P. (2006). *Nutrición Humana*. Valencia. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Miranda, M., Maureira, H., Rodriguez, K., & Vega, A. (2009). Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe vera gel. *Journal of Food Engineering*, 91, 297-304.
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., García, P., Di Scala, K., Shi, J., Xue, S., & Uribe, E. (2010). -Effect of temperature on structural properties of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel and Weibull distribution for modelling drying process. *Food and Bioproducts Processing*, 88 (2), 138-144.
- Moreno, A. (2012). Aloe vera (Sábila): cultivo y utilización. *Agrogulas*.
- NTEINEN 2395. (2012). *Leches Fermentadas*. Obtenido de Requisitos: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2395.2011.pdf>
- Papadimitriou, C. G., Mastrogiannaki, A. V., Silva, A. V., Gomez, A. M., Malcata, F., & Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 105, 647-656.
- Parmjit, S., Panesar, & Chetan, S. (2012). Effect of Storage on Syneresis, pH, Lactobacillus acidophilus Count, Bifidobacterium bifidum Count of Aloe vera Fortified Probiotic Yoghurt. *Current Research in Dairy Sciences*, 4(1): 17-23.

- Pol, I. E., & Smid, E. J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Journal Microbiology*, 29: 166-170.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 39.
- Ramachandra, C., & Srinivasa, P. (2008). Processing of the Aloe vera Leaf gel: A review. *American Journal of agricultural and Biological Sciences*, 3. 502-510.
- Ramchandran, L., & Shah, N. (2010). Influence of addition of Raftiline HP on the growth, proteolytic, ACEe and a-glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria and Bifidobacterium. *LWTFoodScience and Technology*, 43,146-152.
- Ramos, K. P., & Zabaleta, K. S. (2013). *Elaboración de un Yogur estandarizado con adición de Hibiscus Sabdariffa (Flor de Jamaica), con propiedad Funcional (Antioxidante)*. Cartagena-Colombia: Universidad de Cartagena. Facultad de Ingeniería en Alimentos.
- Ramos, K., & Zabaleta, K. (2013). Elaboración de un yogur estandarizado con adición de Hibiscus Sabdariffa (Flor de Jamaica), con propiedad Funcional (Antioxidante). *Universidad de Cartagena. Facultad de Ingeniería*, 39-41.
- Reeve, R. (1977). Texture Stud. *Journal the of Mexican Chemical Society*, 8,1.
- Reynolds, T., & Dweck, A. (1999). Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal Ethnopharmacology*, 68. 3-37.
- Reynolds, T. (1985). The compounds in Aloe leaf exudates: A review. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 90, 157-177.
- Reynolds, T. (2004). *Aloes: The Genus Aloe, Medicinal And aromatic plants-industrial profiles*. Florida: CPR Press LLC.
- Rice-Evans, C. A., Millar, N. J., & Paganga, G. (1996). Free radical biology and Medicine. 20, 933-956.
- Rivera, J. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems-A review. *Food Control*, 54. 111-119.
- Row, T., Lovell, B., & Parks, L. (1941). Further observations on the use of Alos vera leaf in the tratment of third-degree X-ray reactions. *Pharm Assoc*, 266-269.
- Ruiz ,B., & Flotats, X. (2014). Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestión process. *Science Direct*, Vol. 32, Issue 11. 2063-2079.
- Sah, B. N., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogur. *Food Chemistry*, 156, 264-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>.

- Sah, B., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. (2016). Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogur fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 978-986.
- Savvaiddis, I., & Tsiraki, M. (2016). The effects of citrus extract on the naturally occurring microflora and inoculated pathogens, *Bacillus cereus* and *Salmonella enterica*, in a model food system and the tradicional Greek yogur-based salad Tzatziki. *Food Microbiology*, 53, 150-155.
- Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77:279–285.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.
- Shelef, L. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6, 29-44.
- Sierra, A. (2002). *Desarrollo de un prototipo de bebida de sábila (Aloe vera barbadensis Miller) y naranja*. Honduras: Zamorano.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal Biology Chemistry*, 269:8022–8028.
- Stefanello, M. E., Cervi, A. C., Ito, I. Y., Salvador, M. J., Wisniewski, A., & Simionatto, E. L. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 20(1), 75-78.
- Strange, R. R., Miland, S. L., Eckert, J. W., & Sims, J. J. (1993). An antifungal compound produced by grapefruit and valencia orange after wounding of the peel. *Journal of Natural Products*, 56: 1627-1629.
- Thomas, T., & Mills, O. (1981). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. “A review”. *J. Food Microbiology*, 46(3): 245-268.
- Thompson, J. L., Lopetcharat, K., & Drake, M. A. (2007). Preferences for commercial strawberry drinkable yogurs among African American, Caucasian, and Hispanic consumers in the United States. *Journal Dairy Science*, 90, 4974.
- Toro. (16 de enero de 2012). *La Razón*. Obtenido de El Financiamiento: [http://la-razon.com/index.php?\\_url=/suplementos/financiero/Indulan-produce-yogur-naturales-verduras\\_0\\_1696030502.html](http://la-razon.com/index.php?_url=/suplementos/financiero/Indulan-produce-yogur-naturales-verduras_0_1696030502.html)
- Trejo, G. (2014). *Elaboración de yogur batido adicionando cuatro concentraciones de gel de sábila (Aloe barbadensis miller) y su influencia en el crecimiento de la población microbiana*. Ibarra: Universidad Técnica del Norte.
- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics- from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714e728.
- Vedamuthu, E. R. (1982). Fermented milks. *Economic microbiology*, 199-225.

- Vega, A. (2005). El Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Rev Chil Nutr*, 32, 208-214.
- Vyas, P. (2013). Essential oils from plants: A review. *International Journal of Chemetech Applications (INTJCA)*, 2 (1).
- Yamazaki, K., Yamamoto, T., Kawai, Y., & Inoue, N. (2004). Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology*, 21(3), 283-289.
- Zare, F., Boye, J., Orsat, V., Champagne, C., Simpson, B. (2011). Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour, *Food Research International*, 44(8): 2482-2488,
- Zamudio, M., González, A., & Medina, J. A. (2001). *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Lett. Appl. Microbiology*, 32(3):181-184.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1. Hoja de Cata

Edad:

Fecha:

Evalué cada muestra que se encuentre frente a usted usando la siguiente escala. Ponga una línea paralela según su criterio.

### Sabor



### Aroma



### Aceptabilidad





## ANEXO 2 PRUEBA TRIANGULAR

Fecha:.....

Nombre:.....

INSTRUCCIONES: Probar las tres muestras tantas veces como desee, empezando por la muestra situada a su izquierda. Cuando este seguro de cuál es la muestra distinta, colocar una X en el casillero debajo del código de su muestra seleccionada.

Muestras	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Código			
Respuesta			

### COMENTARIOS:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**GRACIAS POR SU COLABORACIÓN**