



**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Extensión de la vida útil de pan mediante la adición de un extracto acuoso de *Schinus Molle L.* para controlar el desarrollo de moho durante su almacenamiento

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
Ingeniero en Alimentos**

**Autora:
JULIANA IVETTE RODRÍGUEZ BALLESTEROS**

**Director(a):
Mgst. Ing. MARÍA FERNANDA ROSALES MEDINA**

**CUENCA, ECUADOR
2025**

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a Dios, por ser el que me dio la fuerza y convicción para continuar y cumplir con una de mis metas más deseadas. .

A mis padres, que, desde la distancia siempre han estado para ayudarme y apoyarme.

A mi director y a todas las personas que me guiaron para que mi trabajo finalice con éxito.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, quien fue mi más grande motor para seguir adelante y mantener siempre mi entusiasmo y optimismo en cumplir mis metas.

Además, agradezco a mi familia y mejores amigos, ya que fueron mi impulso para que cada día, pueda cumplir con cada una de mis etapas.

De igual manera, extiendo mi agradecimiento a todos los laboratoristas y personal administrativo que conforma la Facultad de Ciencia y Tecnología, por confiar en mí y abrirme las puertas para llevar a cabo el proceso investigativo de mi tesis con éxito.

Del mismo modo, agradezco al MAAE (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica), por concederme el permiso MAAE-ARSFC-2020-0841, con el cual pude llevar a cabo la realización de proceso investigativo.

Finalmente, quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la Ing. María Fernanda Rosales, Ing Alicia Peña, Ing. Johanna Tacuri, Blgo. Danilo Minga, quienes fueron los principales colaboradores que me impartieron el conocimiento y apoyo para poder desarrollar y culminar mi tesis.

EXTENSIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE PAN MEDIANTE LA ADICIÓN DE UN EXTRACTO ACUOSO DE *SCHINUS MOLLE L.* PARA CONTROLAR EL DESARROLLO DE MOHO DURANTE SU ALMACENAMIENTO

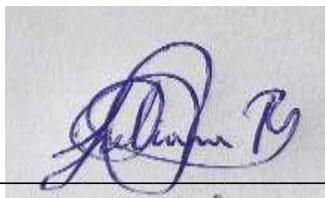
RESUMEN

El pan es un alimento cuya vida útil es relativamente corta y su deterioro se da generalmente por agentes microbiológicos. En este estudio, se fabricó pan con 1.5%, 2% y 2.5% de un extracto acuoso que se obtuvo mediante hidrodestilación y liofilización de hojas y frutos de *Schinus Molle L.* La adición de estas concentraciones provocó la disminución del desarrollo de unidades formadoras de moho (UFM). El valor idóneo de concentración de *Schinus molle L.* con actividad antifúngica fue de 2.0 mg/mL.

Palabras claves: *Schinus Molle L.*; extracto acuoso; UFM; actividad antifúngica; aceite esencial.



Ing. María Fernanda Rosales Medina, Mgst.
Director de tesis



Juliana Ivette Rodríguez Ballesteros
Autor

EXTENSION OF THE SHELF LIFE OF BREAD THROUGH THE ADDITION OF AN AQUEOUS EXTRACT OF *SCHINUS MOLLE L.* TO CONTROL MOLD DEVELOPMENT DURING STORAGE

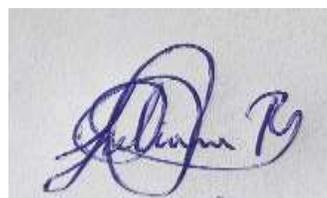
ABSTRACT

Bread is a food with a relatively short shelf life, and its deterioration is generally caused by microbiological agents. In this study, bread was made with 1.5%, 2%, and 2.5% of an aqueous extract obtained through hydrodistillation and lyophilization of leaves and fruits of *Schinus Molle L.* The addition of these concentrations led to a decrease in the development of mold-forming units (MFU). The ideal concentration of *Schinus Molle L.* with antifungal activity was 2.0 mg/mL.

Keywords: *Schinus Molle L.*; aqueous extract; MFU; antifungal activity; essential oil.



Ing. María Fernanda Rosales Medina
Thesis Director



Juliana Ivette Rodríguez Ballesteros
Author

Translated by
Juliana Ivette Rodríguez Ballesteros

Índice de contenidos

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS	IX
INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	10
CAPÍTULO I	13
1. MATERIALES Y MÉTODOS	13
1.1. <i>Materia vegetal</i>	13
1.2. <i>Extracción de compuestos bioactivos</i>	13
1.3. <i>Diseño experimental</i>	15
1.4. <i>Elaboración del pan y efecto antimoho del extracto en pan</i>	16
1.5. <i>Análisis microbiológico: determinación de mohos y levaduras</i>	17
1.6. <i>Evaluación de la actividad antimoho</i>	18
1.7. <i>Análisis estadístico</i>	18
CAPÍTULO II	19
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
2.1. <i>Extracción de compuestos bioactivos</i>	19
2.2. <i>Diseño experimental</i>	19
2.3. <i>Análisis estadístico para las unidades formadoras de moho</i>	20
2.4. <i>Evaluación de la actividad antimoho del extracto en pan</i>	23
3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
3.1. <i>Conclusiones</i>	26
3.2. <i>Recomendaciones</i>	26
4. BIBLIOGRAFÍA	27
5. ANEXOS	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles implicados en el diseño experimental unifactorial aleatorio.	15
Tabla 2. Peso de los componentes vegetales frescos y secos de la planta de <i>Schinus molle L.</i>	19
Tabla 3. Datos de las unidades formadoras de mohos (UFM) evaluados a los días 1 y 3.	20
Tabla 4. Datos de las unidades formadoras de mohos (UFM) evaluados a los días 6 y 10.	21
Tabla 5. Resumen de la prueba ANOVA para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para el día 3.	21
Tabla 6. Resumen de la prueba ANOVA para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para el día 6.	21
Tabla 7. Resumen de la prueba ANOVA para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para el día 10.	22
Tabla 8. Resumen de la prueba Tukey para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para todos los días.	22
Tabla 9. Porcentajes de inhibición de las concentraciones de extracto de <i>Schinus molle L.</i>	24

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de flujo de la extracción del aceite esencial de *Schinus molle L.* 14
- Figura 2.** Diagrama de flujo de la elaboración del pan. 17
- Figura 3.** Actividad antimoho de diferentes concentraciones de un extracto acuoso de *Schinus molle L.* aplicados en el pan durante su almacenamiento. 24

ÍNDICE DE ANEXOS

Imagen 1. Árbol de <i>Schinus molle</i> L.	30
Imagen 2. Hojas de <i>Schinus molle</i> L.	30
Imagen 3. Frutos maduros de <i>Schinus molle</i> L.	31
Imagen 4. Deshidratador de bandejas de secado con aire forzado.	31
Imagen 5. Equipo clavenger de hidrodestilación.	32
Imagen 6. Hojas y frutos maduros de <i>Schinus molle</i> L. en equipo de hidrodestilación.	32
Imagen 7. Temperatura de hidrodestilación.	33
Imagen 8. Extracto acuoso en ultracongelación.	33
Imagen 9. Liofilizador con muestras del extracto de <i>Schinus molle</i> L.	34
Imagen 10. Panes con adición de extracto en el horno.	34
Imagen 11. Acta de recepción de la especie <i>Schinus molle</i> L.	35
Imagen 12. Autorización del MAAE (página 1)	36
Imagen 13. Autorización del MAAE (página 2)	37
Imagen 14. Autorización del MAAE (página 3)	38
Imagen 15. Autorización del MAAE (página 4)	39
Imagen 16. Autorización del MAAE (página 5)	40
Imagen 17. Certificado de entrega de informe final de la investigación.	41

Juliana Ivette Rodríguez Ballesteros
Trabajo de graduación
Ing. María Fernanda Rosales
Enero, 2025

Introducción

Marco teórico

El pan es un alimento básico y a su vez fundamental en la alimentación de las personas desde años remotos. Esto se debe a la variedad de nutrientes esenciales que aporta, tales como: proteínas, vitaminas, carbohidratos y minerales. Es un alimento que se lo consume con agrado y es ideal para acompañar otro tipo de alimentos en una dieta balanceada. (Gil Hernández et al., 2010)

En la industria de panadería se procesan productos que se consideran de mayor consumo a nivel mundial, y en general, son perecederos. Los cambios organolépticos y la pérdida de frescura se deben a una serie de factores que; comúnmente, se clasifican en dos grupos: aquellos relacionados con procesos complejos que llevan al envejecimiento, y los que causan el deterioro microbiano (Pateras, 1998). La vida útil del pan es relativamente corta debido a diversas causas de deterioro como: retrogradación del almidón (cambio de textura) y la presencia de agentes microbiológicos, como: mohos, bacterias y levaduras (De Icaza Tena, 2018). Durante el horneado las altas temperaturas eliminan hongos y levaduras. Sin embargo, el punto crítico es la manipulación del producto terminado. Por ello, se recomienda un manejo bajo condiciones de higiene, ya que la contaminación cruzada por mohos se produce por el aire (Stanley et al., 2007). Generalmente; los microorganismos que causan el deterioro en el pan son los géneros: *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.*, los cuales producen esporas de coloración verdosa y negra, respectivamente (Jay, 2000).

En la actualidad se ha observado un notable avance en la tecnología de conservación en la industria alimentaria, lo que ha llevado a la necesidad de utilizar

métodos que prolonguen la vida útil del pan, manteniendo todas sus características intactas. El método tradicional más utilizado para la prevenir el crecimiento de microorganismos es la adición de antimicrobianos sintéticos en la formulación. Sin embargo, debido a la resistencia microbiana desarrollada, la industria panadera, ha optado por recurrir a métodos innovadores, que a su vez, conserven la calidad del producto durante el almacenamiento a largo plazo. Es esencial comprender, que el enmohecimiento puede deberse a varias causas, entre ellas: falta de cocción, empaquetar el pan caliente, exceso de humedad, enfriar el pan en superficies sin ventilación, baja acidez en la masa, grado de contaminación ambiental y altas temperaturas ambientales. (Tejero, 2017). Los métodos que se han comenzado a utilizar son: tecnología de barreras (control de temperatura, pH, actividad de agua y potencial redox), el uso de microorganismos competitivos, pulsos eléctricos, altas presiones, atmósferas modificadas y la utilización de aceites esenciales, entre otros. (Leistner, 2000).

Los aceites esenciales son sustancias que se presentan usualmente en plantas, su base es lipídica y su función varía según sus componentes, están dispersos en distintas partes de la planta como: raíz, tallo, hojas, flor y fruto. Su uso en la industria alimentaria es cada vez más importante, debido a su aroma y a su efectividad contra el crecimiento microbiano (Vásquez et al., 2001). Los aceites esenciales pueden ser extraídos por varios métodos, como arrastre de vapor sencillo, extracción al vacío, en seco o por aplicación de presión en frío. Estos aceites presentan características físicas específicas, tales como, densidad, actividad óptica, viscosidad e índice de refracción; siendo este último específico para cada aceite esencial (Ortuño, 2006).

El *Schinus Molle L.*, también conocida con los nombres de “aguaribay” y “anacahuita”, tiene un amplio espectro de usos en los campos de: medicina, cosmetología y alimentos. Es originaria de la zona alto andina de Sudamérica, se utiliza artesanalmente como agente insecticida para el control de plagas en la agricultura y también es utilizada para evitar el crecimiento microbiano en la

industria alimentaria. Según Wang et al., (2006) el extracto de *Schinus Molle L.* no es tóxico para el ser humano.

En efecto, es una planta introducida en Ecuador, de la cual principalmente se utilizan los extractos de las hojas y frutos. (CONABIO, 2009). En Ecuador su hábitat altitudinal varía de 1500 a 3000 metros sobre el nivel del mar. Los árboles tienen la capacidad de habitar en terrenos secos y rocosos gracias a sus raíces, que pueden llegar a medir hasta 30 metros de profundidad para buscar agua. (Muñoz, 1999). Esta especie pertenece a la familia *Anacardiaceae*, que sus tallos, hojas y frutos posee aromas intensos debido a la presencia de aceites esenciales (López et al., 2018). En estudios fitoquímicos, se ha evidenciado que *Schinus Molle L.* contiene alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas esteroidales, terpenos, esteroides y aceites esenciales. “El aceite esencial presente en las hojas contiene ácido behénico, bergamota, bicyclogermacreno, borneno, cadineno, cadinol, calacoreno, calamenediol, calamaneno, canfeno, carvacrol, ácido gálico, butirato de geraniol, limoneno, mirceno, ácido linoleico, ácido palmítico, entre otros” (Alba et al., 2009). El *Schinus Molle L.* ha demostrado grandes resultados con respecto a su actividad antifúngica, y tiene sensibilidad sobre muchas cepas fúngicas. (Dikshit A et al., 1986)

CAPÍTULO I

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Materia Vegetal

Para el presente trabajo de investigación, se recolectaron de forma manual hojas y frutos del árbol *Schinus molle* L. (Anexos, Imagen 1) en la fundación “Mensajeros de la paz”, ubicada en el cantón Santa Isabel de la provincia del Azuay, con coordenadas (3°15'58”S 79°17'22”W). Se recolectaron 10 y 7 kg, respectivamente. Para la preparación de la muestra, los frutos y hojas fueron separados de las ramas manualmente. La recolección fue autorizada por el MAAE-ARSFC-2020-0841.

Se limpió todo el material recolectado, separando las ramas gruesas del resto, luego se colocaron en bandejas separadas las hojas (Anexos, Imagen 2) y los frutos (Anexos, Imagen 3) para su posterior deshidratación. El secado se realizó en un deshidratador de bandejas con ventilación de aire forzado (Tecnopast, Trento, Italia) a 50°C durante seis horas (Anexos, Imagen 4). Finalmente, se pesaron las muestras y se obtuvo 6 kg de hojas y 4 kg de frutos maduros, los cuales fueron almacenados en fundas “ziploc” en refrigeración (4 °C) durante 24 horas para realizar posteriormente los análisis.

1.2. Extracción de compuestos bioactivos

Para la extracción de compuestos bioactivos (Figura 1), se realizó el proceso de hidrodestilación en un equipo clavenger con ciertas adaptaciones (Anexos, Imagen 5) según el método descrito por Farmacopea Europea (EDQM, 2007) (Figura 1). Se colocaron dentro del equipo las muestras de hojas y frutos maduros deshidratados, 2.3 kg y 1.5 kg, respectivamente, se añadió 4 litros de agua potable (Anexos, Imagen 6), luego se llevó a ebullición y se mantuvo a 85°C durante 3 horas para la obtención del extracto acuoso (Anexos, Imagen 7). Posteriormente se almacenó a -80°C por 48 horas para proceder a la liofilización (Anexos, Imagen 8). La concentración del extracto acuoso se realizó en un liofilizador (KD-10N Series Freeze Dryer, ZZKD, China) durante 72 horas a -80°C y < 100Pa (Anexos, Imagen 9). El liofilizado se dividió en tubos falcon de 50mL y se almacenó a -80°C hasta su

uso. A partir del diseño experimental se procedió a realizar las soluciones del extracto liofilizado de *Schinus Molle L.* a diferentes porcentajes, para ello se diluyó con 10 ml de agua desionizada.

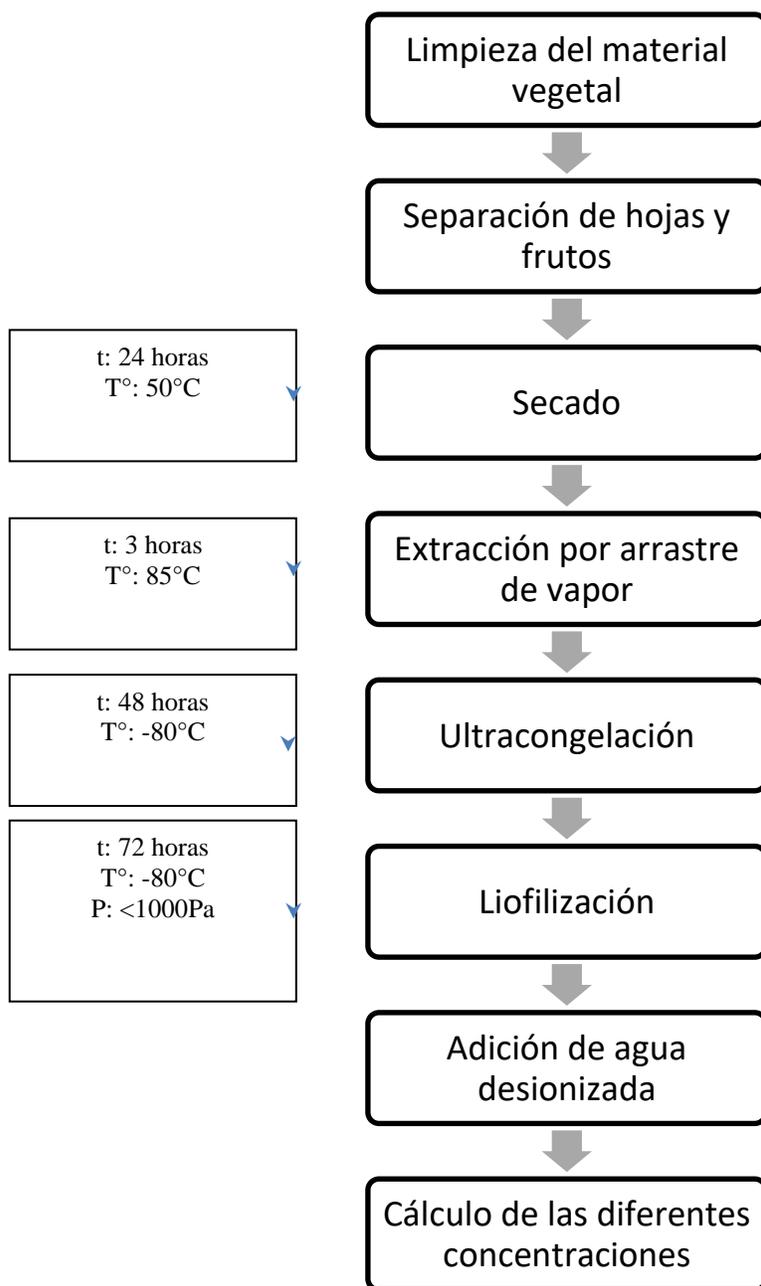


Figura 1. Diagrama de flujo de la extracción del aceite esencial de *Schinus molle L.*

El porcentaje de rendimiento del extracto se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Fórmula 1.} \quad \% \text{ Rendimiento} = \frac{P_{mv}}{P_e} * 100$$

Donde P_{mv} es el peso del material vegetal utilizado para la hidrodestilación y P_e el peso del extracto obtenido.

1.3. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental aleatorio con un solo factor, que consistió en la concentración de extracto acuoso bioactivo de *Schinus Molle L.* cuyos niveles son indicados en la Tabla 1, se incluyó un control negativo (CN) en el cual no se añadió extracto y un control positivo (CP) el cual contenía un antimoho comercial. Se definió como variable de respuesta el número de unidades formadoras de moho. Por el motivo, de que en este diseño experimental se supone que tanto las unidades experimentales, como el ambiente físico en el que se lleva a cabo el experimento son totalmente homogéneos, uniformes y sin cambio, de esta manera no se considera la variabilidad de bloque (Hidalgo et al., 2018).

Tabla 1.

Niveles implicados en el diseño experimental unifactorial aleatorio.

Niveles	Factor (Concentración $mg\ ml^{-1}$)
CN	0
CP	Anti moho comercial
C1	1.5
C2	2
C3	2.5

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza ANOVA para determinar las diferencias significativas en el número de unidades formadoras de moho en el tiempo

(1, 3, 6 y 10 días). Luego, usando los valores medios del número de unidades formadoras de moho, se observó el efecto inhibitorio resultado de las distintas concentraciones de extracto acuoso bioactivo de *Schinus Molle L.* usando las Fórmulas 2 y 3, modificadas de Tequida et al., (2002).

1.4. Elaboración del pan y efecto antimoho del extracto en pan

El proceso de elaboración del pan se detalla en la Figura 2. Se pesaron todos los ingredientes para una formulación de 100% harina de trigo, 2% de sal, 2% de azúcar, 2% de levadura seca, 4% de grasa y 68% de agua; adicional a esto, según el diseño experimental, se añadió la concentración del extracto acuoso bioactivo de *Schinus Molle L.* (1.5%, 2% y 2.5%). Se mezclaron los ingredientes secos en una microamasadora, se adicionó la grasa, la levadura activada y el agua, en el tiempo de 1 minuto y 45 segundos, se añadió 2 mL de las concentraciones del extracto acuoso en cada uno de los tratamientos, se amasó un total de 3 minutos y 45 segundos. Luego se pesó de 10 g de masa para posteriormente bolear e ingresar en la cámara de leudado durante 1 hora y 10 minutos, seguido a esto, se procedió a hornear durante 20 min a 120°C, finalmente se retiró del horno y se dejó enfriar para después empacar y realizar el recuento microbiano. (Anexos, imagen 10)

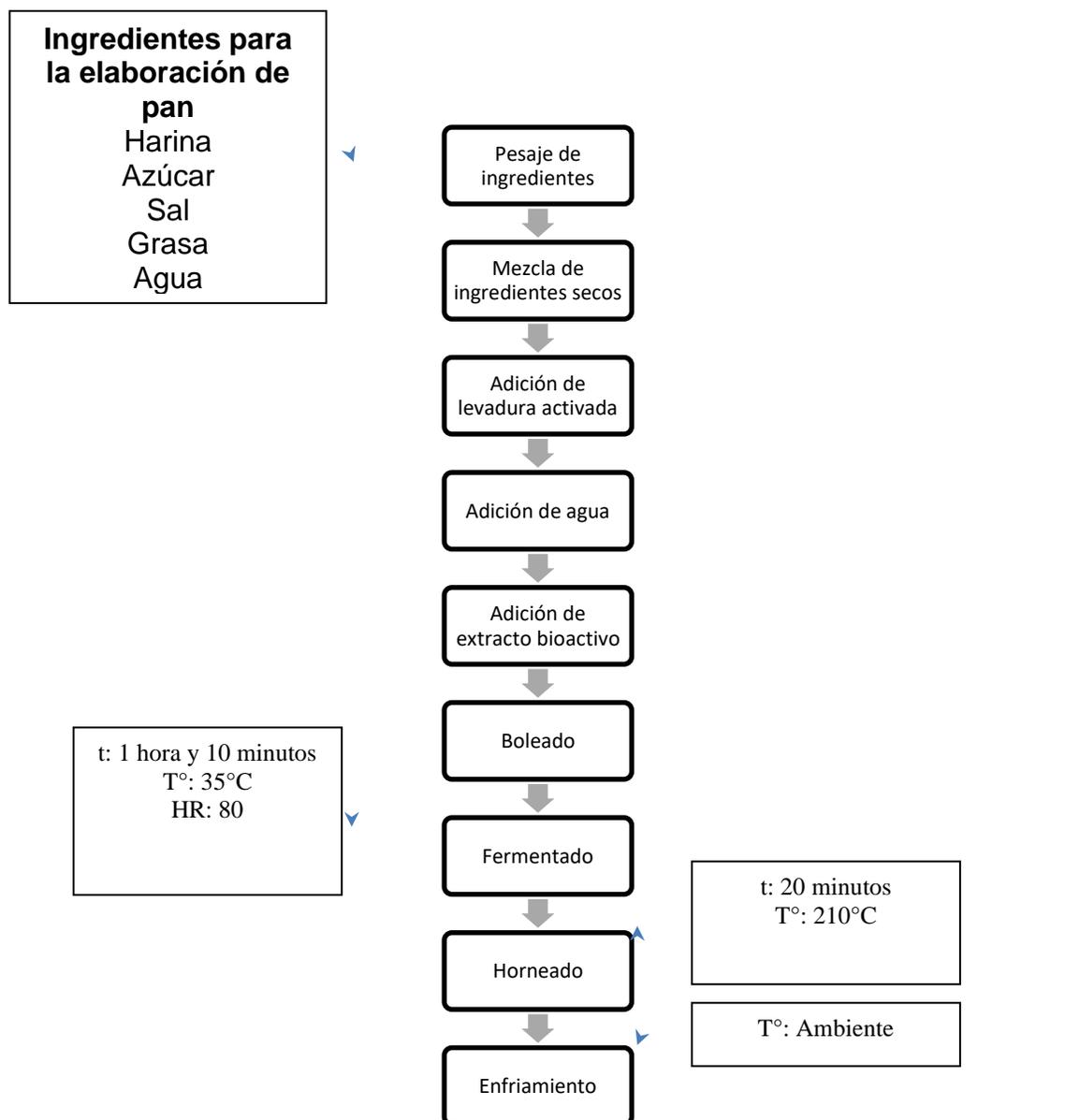


Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración del pan

1.5. Análisis microbiológico: determinación de mohos y levaduras

Se realizó un control microbiológico de mohos y levaduras en los días: 1, 3, 6 y 10; utilizando el método de plaqueado en el pan control y en los panes con adición del extracto. Se empleó peptona de la marca Merck como diluyente y para la determinación de mohos y levaduras se utilizó el agua papa dextrosa (PDA). Se prepararon los medios, luego se esterilizaron y enfriaron para posteriormente utilizarlos en la siembra, se procedió a realizar el cultivo de cada dilución por duplicado, luego se colocó en una incubadora durante 5 días a una temperatura

25°C, finalmente se realizó el recuento microbiano; todo este procedimiento se basó en el método NTE INEN 1 529-10.

1.6. Evaluación de la actividad antimoho

Luego de realizar los recuentos, el porcentaje de inhibición de crecimiento fue calculado tomando en cuenta que la inhibición es el inverso del crecimiento y los resultados fueron calculados mediante la siguiente fórmula modificada de Tequida et al., (2002):

$$\text{Fórmula 2.} \quad \% \text{ de crecimiento} = \frac{\# \text{ unidades formadoras de moho en el pan con extracto}}{\# \text{ de hongos en el control negativo}} * 100$$

$$\text{Fórmula 3.} \quad \% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

1.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza de los datos obtenidos de los recuentos de las unidades formadoras de moho, de 3 concentraciones del extracto acuoso o aceite esencial AE de *Schinus Molle L.* (1.5, 2 y 2.5 mg/ml), manteniendo un nivel de confianza 95%. El número de tratamientos fueron 5, CP y CN indican los controles positivos y negativos respectivamente véase la Tabla 1.

CAPÍTULO II

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Extracción de compuestos bioactivos

Como se indicó anteriormente, los aceites esenciales se encuentran en el tallo, hojas, flor y frutos de las plantas; en esta investigación se utilizó hojas y frutos maduros para la posterior extracción del aceite esencial; el resto de la planta fue desechado sin uso alguno. Los pesos de la planta y cada uno de sus componentes se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2.

Peso de los componentes vegetales frescos y secos de la planta de *Schinus molle L.*

Peso de hoja fresca (kg)	Peso de hoja seca (kg)	Peso de fruto fresco (Kg)	Peso de fruto seco (Kg)
10	5.57	7	4.006

Mediante el método de hidroddestilación y posterior liofilización se pudieron obtener 30 g de extracto. Según la fórmula 1, se pudo determinar que el rendimiento del aceite esencial de hojas y frutos de *Schinus molle L.* es de 0.12%. Es probable que el rendimiento se deba a las diversas condiciones de extracción del aceite esencial y además de las condiciones edafológicas.

2.2. Diseño experimental

Hafeez et al. (2016) demostraron el potencial antifúngico del extracto de *Schinus molle L.* mediante un diseño experimental aleatorio. En su estudio, evaluaron el efecto de diferentes concentraciones del extracto, en un rango de 16 a 64 mg/mL, sobre *Fusarium solani*. Como variable de respuesta, midieron el diámetro del halo inhibitorio, calculando posteriormente el porcentaje de inhibición mediante la

fórmula 100– (porcentaje de crecimiento). Este enfoque permitió evidenciar la capacidad del extracto para inhibir el crecimiento fúngico. Por este motivo, el presente estudio también evaluó la actividad antimoho de *Schinus molle L.*, distinguiéndose en el uso de concentraciones más bajas de extracto bioactivo (1.5, 2 y 2.5 mg/mL) y cuya variable de respuesta fue el número de unidades formadoras de moho (UFM). Estas diferencias metodológicas requirieron una adaptación de la fórmula para calcular el porcentaje de inhibición, la cual se describe en las fórmulas 2 y 3.

2.3. Análisis de estadístico para las unidades formadoras de moho.

El número de unidades propagadoras de moho se analizó mediante una prueba ANOVA, planteando las hipótesis para el factor (concentración) de la siguiente manera:

Ho: El número de unidades propagadoras de mohos y/o levaduras de los tratamientos CN, CP, C1, C2 y C3 son iguales.

Ha: El número de unidades propagadoras de mohos y/o levaduras de los tratamientos CN, CP, C1, C2 y C3 son diferentes.

Tabla 3.

Datos de las unidades formadoras de moho (UFM) evaluados a los días 1 y 3.

Tratamiento	Día 1						Día 3					
	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 1			Réplica 2		
CN	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota. Datos obtenidos de las unidades formadoras de moho correspondientes a 2 réplicas y tres repeticiones.

Tabla 4.

Datos de las unidades formadoras de moho (UFM) evaluados a los días 6 y 10.

Tratamiento	Día 6						Día 10					
	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 1			Réplica 2		
CN	0	19	21	7	7	2	21	12	9	18	16	12
CP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
C1	7	7	8	11	3	12	16	29	10	3	10	14
C2	0	0	1	0	1	0	0	0	3	0	3	2
C3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	3	0

Nota. Datos obtenidos de las unidades formadoras de moho correspondientes a 2 réplicas y tres repeticiones.

Tabla 5.

Resumen de la prueba ANOVA para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para el día 3.

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	4	0.2000	0.0500	0.75	0.567
Error	25	1.6667	0.0666	-	-
Total	29	1.8667			

Nota. Como los valores de p de la tabla ANOVA fueron mayores a 0,05 (Tabla 3) se aceptaron las hipótesis nulas, es decir, las unidades formadoras de moho y/o levaduras promedio fueron iguales entre sí, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 6.

Resumen de la prueba ANOVA para el análisis de las unidades formadoras de moho y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para el día 6.

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	4	519.5	129.88	7.29	0.000
Error	25	445.7	17.83	-	-
Total	29	965.2			

Nota. Como los valores de p de la tabla ANOVA fueron menores a 0,05 (Tabla 4) se rechazaron las hipótesis nulas y se aceptaron las alternativas, es decir, las unidades formadoras de moho y/o levaduras promedio fueron diferentes entre sí, con un nivel de confianza del 95%, se procedió a realizar una prueba de TUKEY.

Tabla 7.

Resumen de la prueba ANOVA para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para el día 10.

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	4	1297.8	324.45	16.23	0.000
Error	25	499.7	19.99	-	-
Total	29	1797.5			

Nota. Como los valores de p de la tabla ANOVA fueron menores a 0,05 (Tabla 5) se rechazaron las hipótesis nulas y se aceptaron las alternativas, es decir, las unidades formadoras de mohos y/o levaduras promedio fueron diferentes entre sí, con un nivel de confianza del 95%, se procedió a realizar una prueba de TUKEY.

Tabla 8.

Resumen de la prueba Tukey para el análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras con nivel de confianza del 95% para todos los días.

	Días			
	Día 1	Día 3	Día 6	Día 10
Tratamientos	Unidades formadoras de moho			

CN	0±0.000	0.167±0.408	9.330±8.820a	14.670±4.46a
C1	0±0.000	0.167±0.408	8.000±3.290a	13.670±8.73a
C2	0±0.000	0±0.000	0.500±0.548b	1.333±1.506b
C3	0±0.000	0±0.000	0.167±0.408b	0.833±1.169b
CP	0±0.000	0±0.000	0.000±0.000b	0.167±0.408b

Nota. El análisis de las unidades formadoras de mohos y/o levaduras por medio de la prueba de Tukey se muestra a continuación. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tabla 6). CN y C1 fueron similares estadísticamente. C2; C3 y CP fueron iguales. Las comparaciones se realizaron con un nivel de significancia del 95%. Indicando que no existieron diferencias significativas entre el control negativo y el tratamiento con una concentración de extracto de 1.5 mg/mL. Por otro lado, las concentraciones correspondientes a 2.5 mg/mL y el control positivo correspondiente a un antimoho no mostraron diferencias significativas, de esta manera se corrobora que la concentración mínima para provocar un efecto inhibitorio fue 2 mg/mL. Por otro lado, en los días 1 y 3 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que no existió crecimiento en ninguna placa Petri.

Según López et al., (2015) el extracto de *Schinus molle L.* en concentraciones (1, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, y 10,000 $\mu\text{L L}^{-1}$) durante tres días de incubación, no presentó diferencias significativas en respecto a los halos inhibitorios contra *A. parasiticus*. Si bien en esta investigación se estudia el número de unidades formadoras de moho, en lugar del efecto antiparasitario, se evidencia un comportamiento inhibitorio del crecimiento en los tratamientos de 2 y 2.5 mg/mL.

2.4. Evaluación de la actividad antimoho del extracto en pan.

A partir de las medias de unidades formadoras de moho determinadas en los tiempos indicados en la Tabla 6, se determinó el porcentaje inhibitorio (Tabla 9) según las Fórmulas 2 y 3. De esta manera, fue posible determinar el efecto antimoho en el tiempo como se observa en la figura 2.

Tabla 9.

Porcentajes de inhibición de las concentraciones de extracto de *Schinus molle L.*

Tratamientos	Días			
	Día 1	Día 3	Día 6	Día 10
CN	-	0	0	0
C1	-	0	14.255	6.816
C2	-	100	46.409	90.913
C3	-	100	98.21	94.321
CP	-	100	100	98.861

Nota. Durante la investigación experimental se pudo establecer que la concentración de extracto a partir de la cual se vio un porcentaje de inhibición representativo y significativamente mayor fue a 2mg/mL, 46.409% y 90.913% a los días 6 y 10 respectivamente.

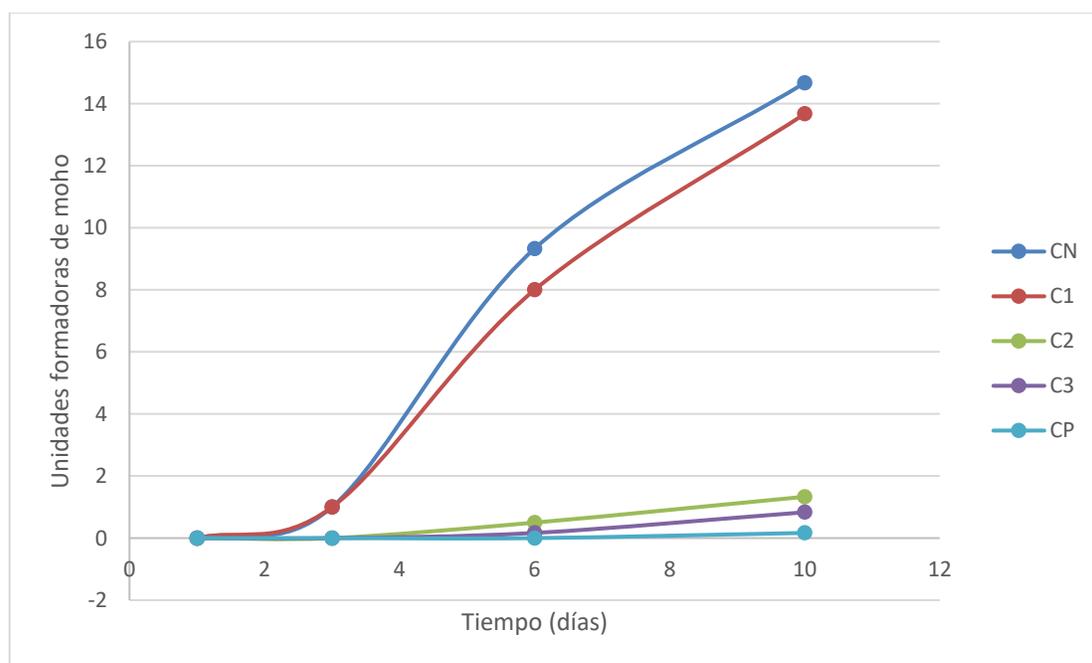


Figura 3. Actividad antimoho de diferentes concentraciones de un extracto acuoso de *Schinus molle L.* aplicados en el pan durante su almacenamiento.

En la Figura 2, se muestra el comportamiento bioactivo de *Schinus Molle* contra el moho, en el pan, señalando que en el día 1 y 3, no se muestra crecimiento, sin embargo, a partir del día 6 se refleja un incremento del número de colonias, en cada una de las diluciones, y por tanto se verificó que existe un efecto inhibidor a partir de la concentración de 2.0 mg/mL. Cabe indicar, que el antifúngico sintético demostró mayor efecto antifúngico.

Según Pereira de Menezes et al., (2020), es evidente el efecto inhibitorio del extracto de *Schinus Molle* contra agentes fúngicos como *Sclerotinia sclerotiorum*, a partir de concentraciones desde 1.56 $\mu\text{L/mL}$ hasta 100 $\mu\text{L/mL}$, con especial énfasis en la concentración final, donde se obtuvo un porcentaje de inhibición mayor al 80%. Por otro lado, en el presente estudio, se evidenció el efecto inhibitorio a partir de 1.5 mg/mL y los mayores efectos a la concentración de 2.5 mg/mL con porcentajes de inhibición mayores al 90 %. No obstante, según el test de Tukey no existió diferencias significativas entre con el tratamiento a 2 mg/mL y 2.5 mg/mL y el control positivo.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1. CONCLUSIONES

- Con métodos de Hidrodestilación y de Liofilización, se obtuvo muestras con distintas concentraciones del extracto bioactivo de *Schinus Molle L.*, estableciendo una concentración de 1.5 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL.
- Los valores óptimos de concentración de *Schinus molle L.* con actividad antifúngica fueron de 2.0 y 2.5 mg/mL .
- Durante el proceso de elaboración del pan se evidenció que, el experimento correspondiente a la concentración 2.5 % presentó un olor muy fuerte, característico del extracto de *Schinus molle L.*, lo cual podría no ser del agrado del consumidor, por ello, se determinó que la concentración de 2% sería la más idónea.

3.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir gestionando más proyectos por parte de la universidad para ampliar el estudio de la eficacia de compuestos bioactivos antifúngicos y disponer de materiales para incentivar el interés sobre el análisis de los mismos. Profundizar el estudio en los compuestos bioactivos de *Schinus Molle L.*, analizar su efectividad en otros tipos de alimentos y en microorganismos que puedan deteriorar los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alba Gonzalez, A., Bonilla Rivera, P., & Arroyo Acevedo, J. (2009). *Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de schinus molle l. "molle" en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones*. Ibarra: UNMSM.
- De Icaza Tena, G. (2018). *La Vida Útil de los Alimentos y sus Principales Reacciones: ¿Qué pasa en los alimentos con el tiempo?* (Segunda ed.). Naucalpan, México: Innovación Editorial Lagares de México.
- Dikshit A, Naqvi AA, & Husain A. (1986). Schinus molle: a new source of natural fungitoxicant. *Applied and Environmental Microbiology*, 1085-1088.
- EDQM. (2007). *European Pharmacopoeia Seventh ed. Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of th Council of Europe*. Strasbourg: EDQM.
- Gil Hernández, Á., & Serra Majem. (2010). *Libro blanco del pan*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Hafeez, E., Ibrahim, M., Mahmoud, F., & Elyousr, K. (2016). Effect of Schinus molle and Schinus terebinthifolius extracts on sweet pea damping-off. (1), 63-74.
- Hidalgo, J., Motato, J., Acevedo, D., Alvarado, J., González, J., López, J., Montero, P., Novoa, F., Novoa, F., & Vélez, F. (2018). Diseños experimentales aplicados en investigación y desarrollo de dulces de leche. En J. S. Ramírez Navas (Coord.), *Leches concentradas azucaradas: de la tradición a la ciencia* (pp. 273-292). [Editorial si está disponible]. ISBN 978-958-5522-45-9.
- Jay, J. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos. Cuarta edición*. Zaragoza: Editorial Aeribia, S.A.

- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 181-186.
- Laza. (2015). *Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del aceite esencial del Schinus molle l.* Obtenido de Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2225-87872015000200005
- López, A., Plascencia, M., Lizardi, J., Fernández, D., Rodríguez, F., Mouriño, R. (2018). Schinus molle L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and antiaflatoxigenic properties. *Food Science and Technology*, 597-603.
- López, A., Cota, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas, E. C., & Plascencia, M. (2015). Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils. *Food Science and Technology*, 35(4), 664-671. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6460>
- Moreno-Limón, S., et al. (2011). Efecto antifúngico de gobernadora sobre la inhibición in vitro de *A. flavus* y *Penicillium* sp. Agosto 2011, Núm. 32, 193-205.
- Muñoz, O. (1999). *Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología (2da. Ed)*. Santiago: Editorial Universitaria.
- Ortuño, M. (2006). Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. *Aiyana*, 23.
- Pateras IMC. (1998). *Bread spoilage and staling*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pereira de Menezes, A., de Sousa, W. & de Souza, C. (2020). Composição química dos óleos essenciais de *Schinus molle* e atividade antifúngica em *Sclerotinia sclerotiorum*. *Colloquium Agrariae*, 16(3), 115-123. <https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n3.a377>
- Stanley, P., Cauvain, S., & Young, L. (2007). Technology of breadmaking. *Springer Science Business Media*, 279-302.

- Vásquez, O., Alva, A., & Marrenos, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite de jengibre. *Revista Amazónica de Investigación*, 38-42.
- Vicenço, C. B., Feltracco, M. C., Cavião, H. C., Pansera, M. R., & Sartori, V. C. (2020). Composição química e atividade in vitro de óleos essenciais sobre a mancha púrpura da soja. *Colloquium Agrariae*, 16(3), 104-114. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200003>
- WANG, J., ZHU, F., ZHOU, X. M., NIU, C. Y., LEI, C. L. (2006). Repellent and fumigant activity of essentials oils from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.*, 42: 339-347

ANEXOS



Imagen 1. Árbol *Schinus molle* L.



Imagen 2. Hojas de *Schinus molle* L.



Imagen 3. Frutos maduros de *Schinus molle L.*



Imagen 4. Deshidratador de bandejas de secado con aire forzado.



Imagen 5. Equipo clavenger de hidrodestilación.



Imagen 6. Hojas y frutos maduros de *Schinus molle* L. en equipo de hidrodestilación.



Imagen 7. Temperatura de hidrodestilación.



Imagen 8. Extracto acuoso en ultracongelación.



Imagen 9. Liofilizador con muestras del extracto de *Schinus molle* L.



Imagen 10. Panes en el horno

Cuenca 11 de mayo de 2021.

Acta de Recepción

A los 11 días del mes de mayo de 2021, yo biólogo Danilo Minga **M.Sc.**, curador del Herbario Azuay-Universidad del Azuay, he recibido una muestra botánica, entregada por la señorita Juliana Rodríguez, del proyecto titulado "*Incorporación de extractos de plantas medicinales / alimenticias para la elaboración de productos funcionales: pan de trigo*", la muestra ha sido ingresada en la base de datos del herbario Azuay, con el respectivo procesamiento que rige las normas de la institución.

La especie receptada se adjunta a continuación:

Número	Familia	Especie	N° Azuay	N° de Voucher
1	<i>Apocynaceae</i>	<i>Schinus molle</i> L.	13826	J. Rodríguez N° 1

Atentamente



Biólogo Danilo Minga Ochoa **M.Sc.**

Curador del Herbario Azuay (HA)

Universidad del Azuay

Av. 24 de mayo 777.

Cuenca – Ecuador

Tel. 07-4091000 ext. 443

E-mail: dminga@uazuay.edu.ec

Imagen 11. Acta de recepción de la especie *Schinus molle* L.

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE E SPECIMENES DE E SPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 841

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE E SPECÍMENES DE E SPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAAE-AR.SFC-2020-0841

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA INICIO	FECHA FIN
2021-05-05	2021-09-05

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

~~Schinus~~

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES / TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

N° de C.I/Pasaporte	Nombre y Apellidos	Nacionalidad	N° REGISTRO SENESCYT	EXPERIENCIA	GRUPO BIOLÓGICO
010540592	LAZO VELLEZ MARCO ANTONIO	Ecuatoriana	SENESCYT-2015-029	Profesional	Microbiología

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE E SPECIMENES DE E SPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Actividad antimicrobiana de extractos ~~bioactivos de Schinus~~ Molle L. durante el almacenamiento de productos de panadería.

7.- SE AUTORIZA LA RECOLECCION CON EL PROPOSITO DE:

demostrar la actividad antimicrobiana del extracto de ~~Schinus~~ Molle L. en productos de panificación.

Imagen 12. Autorización del MAAE (página 1)

Determinar la citotoxicidad del extracto bosque de Giloso Mofle L.
Realizar la extracción del extracto bosque de Giloso Mofle L.
Analizar la actividad antimicrobiana del extracto bosque de Giloso Mofle L.
Determinar la factibilidad y eficacia del extracto como conservante de mínimo un producto de panadería.

8.- ÁREA GEOGRÁFICA QUE CUBRE LA RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES O ESPECÍMENES:

PROVINCIAS	SNAP	BOSQUE PROTECTOR
AZUAY	AREA PROTEGIDA COMUNITARIA MARCOS PEREZ DE CASTILLA	NA

9.- INFORMACIÓN DE LAS ESPECIES A RECOLECTAR

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE	TIPO MUESTRA	N° MUESTRA	N° LOTE
Magnoliopsida	Scrophulariales	Scrophulariaceae	Giloso	Giloso mofle	Lotex		2

10.- METODOLOGIA APLICADA EN CAMPO

FASE DE RECOLECCIÓN:	Se recolectará de forma manual 5Kg de hojas y 5 Kg de frutos de Giloso Mofle L., cultivadas en el cantón de Sta. Inabel, Azuay-Ecuador.
FASE DE PRESERVACIÓN:	Se realizará la preservación de la muestra para la identificación de la especie por el curador del Herbario de la Universidad del Azuay.

11. METODOLOGIA APLICADA EN LABORATORIO

MÉTODOS EMPLEADOS EN EL LABORATORIO:	Limpieza de objetos extraños. Deshidratación por aire forzado. Trituración de materia vegetal. Substratación , Liofilización. Obtención de concentrado. Determinación de bacterias totales, mohos y levaduras.
--------------------------------------	--

12.- SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA RECOLECCION.

Grupo Biológico a Recolectar	Descripción	Tipo de Equipamiento
desconocida	ERLEN MEYER 500 ML 1000 ML	Material en Laboratorio
desconocida	LICHELIZADOR	Equipo en

		Laboratorio
destinados	ULTRACONGELADOR	Equipo en Laboratorio
destinados	DESTILADOR DE VAPOR	Equipo en Laboratorio
destinados	SECADOR DE BANDEJAS POR AIRE FORZADO	Equipo en Laboratorio
destinados	LICUADOR	Equipo en Laboratorio
destinados	MULA	Equipo en Laboratorio
destinados	BALANZA	Material en Laboratorio
destinados	ULTRACONGELADOR	Equipo en Laboratorio
destinados	MICROSCOPIO	Equipo en Laboratorio
destinados	ERLEN MEYER 500 ML. 1000 ML.	Material en Laboratorio
destinados	TUBOS FALCON, CAJAS PETRI, VASOS DE PRECIPITACIÓN, PIPETAS, VARILLA DE VIDRIO, TAMBORES	Material en Laboratorio
destinados	SOPORTE UNIVERSAL	Material en Laboratorio
destinados	SECADOR POR AIRE FORZADO	Equipo en Laboratorio

13.- COLECCIONES NACIONALES DEPOSITARIAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Expositores	Herbario de la Universidad Azuay
destinados	Herbario de la Universidad Azuay

14.- RESULTADOS ESPERADOS

Con el siguiente proyecto se espera obtener como resultado un efecto antifúngico a base de un extracto de *Schinus Molle L.*, sobre las características organolépticas de un pan elaborado por micropanificación método directo.

15.- CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO PARA LA TOMA DE DECISIONES A LA

E STRATEGIA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD 2011-2020.

METAS	DESCRIPCIÓN
Meta04.19.01 Para el 2021, el Ecuador implementa a agenda nacional de investigaciones, con el involucramiento de la academia, sector público, privado, pueblos y nacionalidades.	Ampliar los conocimientos sobre la biodiversidad y el uso en la industria alimentaria que se pue de dar a la misma, tomando en cuenta la conservación y buen manejo como prioridad.

DE ACUERDO A LA S SIGUIENTE S E S PECIFICACIONE S

1. Solicitud de: **RODRIGUEZ BALLE STEROS JULIANA IVETTE**

2. Institución Nacional Científica : **UNIVERSIDAD DEL AZUAY**

3. Fecha de entrega del informe final o preliminar: **2021/08/21**

4. Valoración técnica del proyecto: **TELLO RAMOS FANNY ELIZABETH**

5. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS.**

6. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS**, sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

7. Los especímenes o muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPRO SPECCIÓN, NI ACCE SO AL RECURSO GENÉTICO.**

8. Los resultados que se desprendan de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

OBLIGACIONE S DEL/ LOS INVE STIGADOR/E S.

9. Ingresar al sistema electrónico de recolecta de especímenes de especies la diversidad biológica del ministerio del ambiente y agua, el o los informes parciales o finales en formato PDF, en el formato establecido.

Con los siguientes anexos:

- Escaneado de el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las Colecciones Científicas Ecuatorianas como Internacionales depositarias de material biológico.
- Escaneado de las publicaciones realizadas o elaboradas en base al material biológico

Imagen 15. Aprobación del MAAE (página 4)

recolectado.

- Escaneado de material fotográfico que considere el investigador pueda ser utilizados paradifusión.
(se mantendrá los derechos de autor).

10. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos el número de Autorización de Recolección otorgada por el Ministerio del Ambiente y Agua, con el que se recolecto el material biológico.

11. Depositar los holotipos en una institución científica depositaria de material biológico.

12. Los holotipos solo podrán salir del país en calidad de préstamo por un periodo no más de un año.

13. Las muestras biológicas a ser depositadas deberán ingresar a las colecciones respectivas siguiendo los protocolos emitidos por el Curador/a custodio de los especímenes.

14. Las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se responsabiliza a **RODRIGUEZ BALLE STEROS JULIANA IVETTE.**

DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
LAGLA CHIMBA BYRON
ADRIAN2021-06-22



Oficio Nro. MAATE-DBI-2024-0383-O

Quito, D.M., 14 de agosto de 2024

Asunto: Acuso recibo: Informe de Autorización MAAE-ARSFC-2023-3318

Juliana Ivette Rodríguez Ballesteros
En su Despacho

De mi consideración:

Con un cordial saludo me permito hacer referencia a su oficio S/N, registrado como documento Nro. MAATE-DBI-2024-0128-E, mediante el cual se remite el Informe de la Autorización de Recolección de Especímenes de Especies de la Biodiversidad Biológica Nro. **MAAE-ARSFC-2020-0841**, con sus anexos correspondientes.

Al respecto, dejo en conocimiento que esta Dirección **REGISTRA** la entrega del informe enviado para el cumplimiento de las obligaciones de la Autorización, con lo que se cumple con todo lo estipulado en las cláusulas de la Autorización de manera **SATISFACTORIA**.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Ing. Ricardo Javier Villavicencio Guibor
DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD

Referencia:
- MAATE-DBI-2024-0128-E

Copia:
Sofía Tecóniga
Janneth del Rocío Astudillo Cabezas
Secretaría de la Subsecretaría V/O Coordinación

CC:

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica
Dirección: Calle Reina Viena y Av. Bolívar
Código Postal: 170124 / Quito - Ecuador • Teléfono: (00593) 2 222 3100
www.ambiente.gob.ec



Documento firmado electrónicamente por Guibor

1/1

Imagen 17. Certificado de entrega de informe final de la investigación.