

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**



**“EVALUACIÓN DE INFUSIÓN DE CANELA (*CINNAMOMUM VERUM*) COMO
ANTIFÚNGICO NATURAL PARA LA INHIBICIÓN DE MOHOS EN PAN DULCE
ARTESANAL”.**

POR

ZAIRA MARIELOS TREJO VASQUEZ

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



**“EVALUACIÓN DE INFUSIÓN DE CANELA (*Cinnamomum verum*) COMO
ANTIFÚNGICO NATURAL PARA LA INHIBICIÓN DE MOHOS EN PAN DULCE
ARTESANAL”.**

POR

ZAIRA MARIELOS TREJO VASQUEZ

**REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

CIUDAD UNIVERSITARIA, NOVIEMBRE DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO

ING. MAECE NELSON BERNABÉ GRANADOS

SECRETARIO

ING. AGR. MSc. BALMORE MARTINEZ SIERRA

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

ING. MSc. HUMBERTO RUIZ MEJIA

DOCENTE DIRECTORES

ING. HAYDEE ESMERALDA MUNGUÍA DE PÉREZ



MSc. VILMA RUTH CALDERON DE ZACATARES

COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

ING. HAYDEE ESMERALDA MUNGUÍA DE PÉREZ

ÍNDICE

Contenido	pág.
Resumen	i
Introducción	1
1. Información de la unidad productiva	2
1.1. Datos generales	2
1.1.1. Localización.....	2
1.1.2. Antecedentes	2
1.1.3. Recursos	3
1.1.3.1. Naturales.....	3
1.1.3.2. Instalaciones y equipos	3
1.1.3.3. Humanos.....	8
1.2. Actividades actuales.....	8
1.2.1. Producción principal y otras.....	8
1.2.2. Situación técnica	9
1.2.3. Situación administrativa.....	9
1.2.4. Generales de comercialización.....	10
1.2.5. Análisis de la problemática en el sector.....	10
2. Marco Teórico.....	11
2.1 Conservación de Alimentos	11
2.2 Factores principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano	12
2.3 Deterioro microbiológico del pan	12
2.3.1 Contaminación por hongos en la industria panadera	13
2.3.2 Aspergillus.....	13
2.4 Agentes antimicrobianos naturales.....	15
2.4.1 Aceites esenciales.....	17
2.4.2 Modo de acción de los agentes antimicrobianos naturales	18
2.5 Cinemaldehído de Canela como agente antimicrobiano.....	18
2.5.1 Rendimiento de la infusión de canela de Cinemaldehído	19
2.5.2 Aplicaciones del aldehído cinámico	19
3. Metodología	21
3.1 Obtención de la infusión de canela.....	21

3.1.1 Filtración.....	22
3.2 Toma de muestras de pan dulce	22
3.3 Metodología de Análisis microbiológicos	26
3.4 Descripción de la metodología del procedimiento de análisis microbiológico de las muestras de pan.	28
4. Resultados y discusión.	30
5. Conclusiones	34
6. Recomendaciones	35
7. Bibliografía.....	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del CEICA	2
Figura 2. Organigrama del CEICA	9
Figura 3. Pesado de la canela molida	21
Figura 4. Infusión de la canela a 90° C	21
Figura 5. Filtrado del extracto con.....	22
Figura 6. Pan dulce en cámara de ambiente controlado	23
Figura 7. Aplicación de extracto de canela con cinemaldehído de canela al pan dulce....	24
Figura 8. Pan dulce en cámara de ambiente controlado	24
Figura 9. Medición de humedad de pan dulce en termo balanza	25
Figura 10. Aplicación de extracto de canela con cinemaldehído de canela al pan dulce..	25
Figura 11. Empacado de pan en bolsas de celofan con extracto de canela	26

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Equipos Laboratorio de microbiología.	4
Cuadro 2. Equipos del Laboratorio de calidad de granos y harinas.....	6
Cuadro 3. Áreas que conforman el CEICA y personal a cargo.....	8
Cuadro 4. Metodología del procedimiento de análisis microbiológicos.....	28
Cuadro 5. Resultados de 1ra. evaluación microbiológica en pan dulce tipo torta	30
Cuadro 6. Resultados de 2da. evaluación microbiológica en pan dulce tipo torta	31
Cuadro 7. Resultados de 3ra. Evaluación microbiológica en pan dulce tipo torta.....	32
Cuadro 8. Medición de humedad en pan dulce	33
Cuadro 9. Resultados del 4to. Análisis microbiológico en pan dulce	33

Resumen

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Educación e Investigación en Ciencias Aplicadas (CEICA) en donde a través de una investigación colaborativa con el CEICA, UES y la panadería “Jardín del Pan” surge la necesidad de presentar una alternativa de conservación natural para el pan dulce tipo torta que elabora la panadería “Jardín del Pan”.

En este estudio se evaluó la efectividad de una infusión de canela con cinemaldehído al 0.5%, como anti fúngico natural, aplicado a pan dulce tipo torta artesanal, de mediana humedad con la finalidad de alargar la vida en anaquel para su comercialización, evitando así, la aplicación de preservantes químicos.

Para comprobar la efectividad de la infusión de canela con cinemaldehído al 0.5% se realizaron cuatro corridas de análisis en diferentes períodos de tiempo, aplicando aproximadamente 2 ml de la solución de manera asperjada a cada pan dulce, se realizaron análisis microbiológicos en placas petrifilm 3M con medios de cultivo específico para mohos y levaduras, conocidos como métodos rápidos de análisis microbiológicos, ya que los resultados se obtienen a las 48 ± 2 horas en incubadora a una temperatura de 26°C. Se reportan solo resultados de UFC (Unidad Formadora de Colonia) de mohos.

Se obtuvieron resultados representativos en la segunda corrida de análisis donde hubo crecimiento de 10 UFC en la muestra testigo y de 1 UFC en la muestra de pan dulce asperjada analizada a los 7 días de horneado el pan dulce, comprobando así la efectividad de la infusión de canela con cinemaldehído al 0.5% en la inhibición de mohos. Dando como resultado también 7 días más de vida en anaquel ya que la Panadería “Jardín del Pan” quien proporcionó el pan de dulce manifestó que el pan dulce tipo torta les dura 5 días ya que pierde sus características sensoriales.

Introducción

Existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de alimentos saludables, motivado fundamentalmente por una creciente preocupación por una dieta más equilibrada, con mayor proporción de nutrientes y menor cantidad de preservantes aditivos y colorantes. Esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos (como son los benzoatos, nitritos y nitratos, propionatos, sorbatos, entre otros) con intoxicaciones, enfermedades como cáncer y otras degenerativas. Esto genera la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (López 2003).

La conservación de panes comerciales implica grandes pérdidas relacionados con el ataque hongos. Para evitar el deterioro fúngico, la industria alimentaria requiere del uso de aditivos de síntesis. Las preferencias actuales del mercado tienden a buscar alternativas de conservación a través de productos naturales que pueden tener además otras funciones una vez incorporados al alimento (Talavera 2015).

Es por eso que se trabajó en una investigación colaborativa con CEICA (Centro de Educación e Investigación en Ciencias Aplicadas), UES (Universidad de El Salvador) y la panadería "Jardín del Pan" para presentar una alternativa saludable de un preservante natural a partir de la canela (*Cinnamomum verum*), ya que contiene un compuesto mayoritario llamado cinemaldehído el cual es un aceite esencial y que puede funcionar como antifúngico en algunos alimentos. En este estudio se evaluó una infusión de canela con cinemaldehído al 0.5% para la inhibición de mohos en pan dulce evaluando la efectividad de este a través de análisis microbiológicos, utilizando métodos rápidos, placas petrifilm 3M las cuales contienen un medio de cultivo específico para el crecimiento del microorganismo que se desea identificar, y su lectura es en tal solo 48 ± 2 horas.

1. Información de la unidad productiva

1.1. Datos generales

1.1.1. Localización

El estudio de la efectividad de la infusión de canela con cinemaldehído en pan dulce artesanal para la inhibición de mohos y levaduras y alargar la vida en anaquel se llevará a cabo en el CEICA (Centro de Educación e Investigación en Ciencias Aplicados) se encuentra ubicado en el Km 33 ½ Carretera a Santa Ana, Ciudad Arce, La Libertad, El Salvador específicamente en 13°48'15.1"N, 89°24'00.9"O. (Ver Fig. 1).



Fuente: Google Maps

1.1.2. Antecedentes

Historia de la empresa o institución

El 11 de abril de 2013 fue inaugurado oficialmente el Parque Tecnológico en Agroindustria (PTA), en las instalaciones del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), en el kilómetro 33.5 de la carretera a Santa Ana.

Este organismo de investigación, en alianza con la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA), los ministerios de Educación y Agricultura y Ganadería, bajo la coordinación general del Viceministerio de Ciencia y Tecnología, desde su unidad especializada en Parques Tecnológicos, unieron personal, recursos, infraestructura y experiencia para hacer realidad esta iniciativa (Ibarra 2013).

Vilma de Zacatares, encargada del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Prototipos Agroindustriales del Parque Tecnológico Agroindustrial (PTA) del Viceministerio de Ciencia y Tecnología, innovó una Bebida Biofortificada con la visión de brindar al Programa de

Alimentación y Salud Escolar (PASE), un alimento nutritivo y saludable que contribuyera a mejorar el estado nutricional de los niños y niñas en edad escolar del Sistema de Educación Pública, favoreciendo así en los procesos de aprendizaje. Desde 2016 los estudiantes de parvularia reciben como parte del Programa de Alimentación y Salud Escolar (PASE) la bebida biofortificada “Biofortik”, que es un producto innovador del Parque Científico y Tecnológico en Agroindustria, conocido como PTA.

El PTA trabaja con materias primas 100% salvadoreñas para generar valor agregado al sector, cuenta con una planta de producción de bebida Biofortik, con una capacidad instalada de 12 mil quintales por año, con la cual se beneficia en la actualidad a más de 290 mil estudiantes del área de parvularia del sistema público de educación.

1.1.3. Recursos

1.1.3.1. Naturales

Para el desarrollo de las actividades diarias en el CEICA, requiere de recursos naturales que son necesarios para su funcionamiento, entre ellos se pueden destacar:

- **Agua:** Es suministrada por un pozo, y se utiliza para múltiples propósitos y actividades en las que se puede mencionar: lavado de cristalería y utensilios (cucharas medidoras, recipientes plásticos, bowls, etc.) que son utilizados para las prácticas de desarrollo y mejoramiento de productos alimenticios y análisis de laboratorio en muestras de alimentos, así como actividades de limpieza de equipo, baños, lavado de manos, etc.

Otros recursos:

- **Agua destilada:** esta se destila usando un destilador en el laboratorio de química del CEICA es utilizada para el lavado final de toda la cristalería y para los análisis microbiológicos realizados a productos alimenticios.
- **Energía Eléctrica:** Proviene de la corporación aes – CLESA, este recurso es indispensable para hacer funcionar los equipos de los laboratorios del CEICA.

1.1.3.2. Instalaciones y equipos

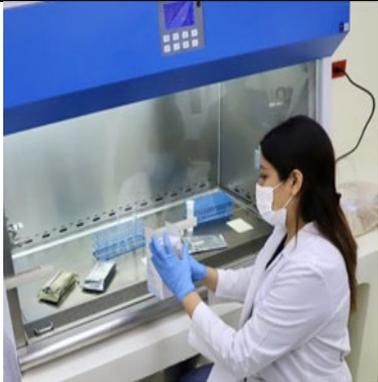
El CEICA (Complejo de Innovación Tecnológica y Productiva en Agroindustria) dispone de una infraestructura edificada en terreno propio, y dispone de diferentes áreas:

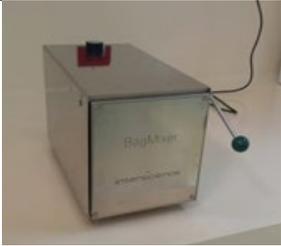
- ✓ Oficinas administrativas
- ✓ Laboratorio de microbiología

- ✓ Laboratorio de química
- ✓ Laboratorio de Alimentos I + D
- ✓ Laboratorio de calidad de granos y harinas
- ✓ Servicios Sanitarios

El CEICA cuenta con equipos modernos en todos sus laboratorios que facilitan y sirven de apoyo en los procesos de análisis que se realizan en cada uno de los laboratorios, ver Cuadro 1 y Cuadro 2.

Cuadro 1. Equipos Laboratorio de microbiología.

Laboratorio de microbiología		
Equipo	Funcionalidad	Imagen
Incubadora	Este equipo mantiene la temperatura, la humedad y otras condiciones en grado óptimo para hacer crecer cultivos microbiológicos.	
Cámara de flujo laminar	Su funcionamiento consiste en crear "barreras de aire", lo que permite que éste fluya a una velocidad constante en una única dirección proporcionando aire limpio y constante creando un ambiente estéril, libre de contaminantes.	

<p>Autoclave</p>	<p>Sirve para esterilizar material del laboratorio con vapor de agua a alta presión y temperatura y eliminar los peligros biológicos</p>	
<p>Bag mixer</p>	<p>Mezcla muestras sólidas o líquidas para garantizar una óptima extracción bacteriana de las muestras.</p>	
<p>Refrigeradora</p>	<p>Sirve para mantener, en un ambiente controlado insumos microbiológicos (placas Petri film, kit de aflatoxinas) para se conserven en buenas condiciones a una temperatura de 4 °C</p>	

Cuadro 2. Equipos del Laboratorio de calidad de granos y harinas.

Laboratorio de calidad de granos y harinas		
Equipo	Funcionalidad	Imagen
Colorímetro de mano	Sirve para la medición del color de granos, de maíz y sorgo tostados, se realiza en el espectro de color LAB.	
Higrómetro	Se utiliza para analizar la humedad, y la temperatura de los granos crudos de maíz y sorgo.	
Tamizador vibratorio digital	Sirve para determinar el tamaño de partícula de las harinas por el método de tamizaje a través de 6 tamices que van de mayor a menor metroraje.	

<p>Balanza analítica</p>	<p>Sirve para pesar o medir la masa de un cuerpo o sustancia.</p>	
--------------------------	---	--

Equipos e instrumentos del laboratorio de alimentos

- ✓ Horno
- ✓ Licuadora
- ✓ Molino de 1 hp
- ✓ Balanza de humedad
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Cámara de humedad
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Deshidratador
- ✓ Liofilizador
- ✓ Brixometro
- ✓ Mezcladora
- ✓ pH metro
- ✓ Cristalería analítica
- ✓ Selladora
- ✓ Licuadora industrial
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Freidora

Además, forman parte de estos recursos: los insumos necesarios para los análisis microbiológicos y de calidad de grano y harinas: agua destilada, cristalería analítica, placas petrifilm, alcohol, entre otros.

El CEICA también dispone de equipo de oficina, computadoras de escritorio, impresoras, cámaras de video vigilancia, etc.

1.1.3.3. Humanos

Actualmente el CEICA utiliza un conjunto de capacidades humanas, para llevar a cabo conjuntamente las diversas actividades que se realizan y servicios que ofrece el CEICA (Centro de Investigación y Educación en Ciencias Aplicadas), ver Cuadro 3.

Cuadro 3. Áreas que conforman el CEICA y personal a cargo

Áreas	N° de Colaboradores
Gerencia	1
Administración	1
Laboratorio de química	3
Laboratorio de microbiología, Laboratorio de alimentos, Laboratorio de calidad de granos.	3

1.2. Actividades actuales

1.2.1. Producción principal y otras

El CEICA (Centro de Investigación y Educación en Ciencias Aplicadas) es una Unidad del MINEDUCYT que promueve la transferencia del conocimiento entre instituciones del estado, la academia y el sector privado, incentivando la formación, la investigación, el desarrollo y la innovación en ciencias aplicadas, para favorecer el desarrollo socioeconómico de El Salvador.

El CEICA realiza los análisis de microbiología y de calidad de granos y harinas de sorgo y maíz de la planta de producción la bebida nutricional “Biofortik” para estudiantes del sistema público, para garantizar la inocuidad y calidad de la bebida “Biofortik”, la cual es administrada por el MIEDUCYT (Ministerio de Educación Ciencia y Tecnología) y el PMA (Programa Mundial de Alimentos).

Servicios que ofrece el CIECA:

- Análisis físico-químicos
- Análisis Microbiológicos
- Análisis Bromatológicos

- Desarrollo y reformulación de productos
- Elaboración de Tablas Nutricionales: RTCA y FDA
- Estudios de Vida de Anaquel y Evaluación Sensorial
- Estandarización de Fórmulas
- Capacitaciones técnicas a docentes

1.2.2. Situación técnica

Actualmente el CEICA no ha sido inaugurado oficialmente, pero se está a la espera de ese acto oficial por parte del MINEDUCYT (Ministerio de Educación Ciencia y Tecnología). Recientemente desde el año 2020 se está trabajando en los laboratorios, donde aún no se cuenta con el recurso humano necesario, sin embargo, ya se han realizado numerosos servicios de transferencia de conocimiento entre instituciones del estado, la academia y el sector privado.

1.2.3. Situación administrativa

A continuación, se presenta el organigrama del CEICA, en la Figura 2:

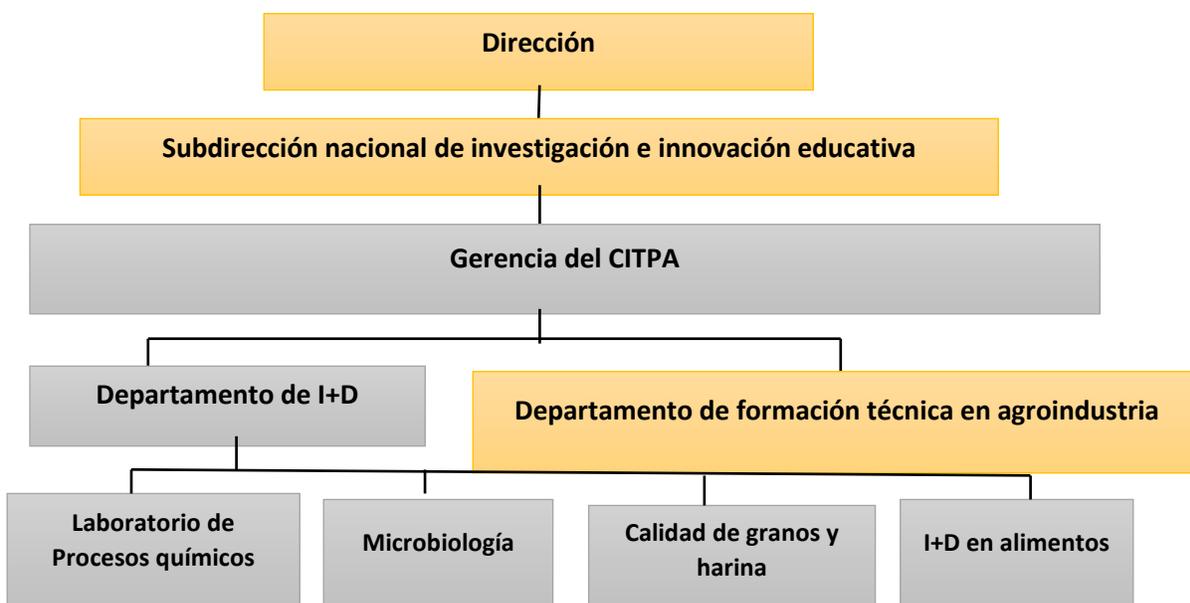


Figura 2. Organigrama del CEICA

1.2.4. Generales de comercialización

El principal eje del CEICA es la transferencia de conocimiento entre instituciones del estado y demás academias de estudios que tengan que ver con la agroindustria y las ciencias agrícolas, para fortalecer el quehacer científico tecnológico de los servicios educativos y la formación en ciencias aplicadas, impulsando la investigación y el soporte técnico al tejido productivo.

Se tiene una articulación con el sector productivo MIPYMES para brindar asesorías técnicas a emprendedores en el área de agroindustria y las ciencias agrícolas.

Las empresas privadas que contratan los servicios que ofrece el CEICA tienen que realizar un pago del 50% al inicio y 50% al final o 100% al inicio, el interesado realiza entrega al CEICA insumos y materias primas que se necesitan según la contratación del servicio y por último se realiza la transferencia tecnológica del servicio realizado y se entrega un informe final.

1.2.5. Análisis de la problemática en el sector

Uno de los ejes principales del Centro de Educación e Investigación en Ciencias Aplicadas es hacer investigación conjunta o colaborativa con entidades educativas y empresa privada.

Durante la estancia en el CEICA surge la necesidad de proponer y presentar una alternativa de solución ante una problemática presentada por la empresa “Jardín del Pan” la cual se describe a continuación:

La empresa “Jardín del Pan” se dedica al rubro de panificación, entre las variedades de pan dulce que hacen están la torta de yema redonda con pasas, la cual es muy vendida en su sala de ventas, a petición de los clientes quieren esa misma variedad de pan sin preservantes químicos como el sorbato de potasio. De ahí se propone el tema de pasantía profesional “Evaluación de cinemaldehído de canela (*cinnamomum verum*) como anti fúngico natural para la inhibición de mohos y levaduras en pan dulce artesanal”.

Después de una revisión bibliográfica se identificó que el infusión de canela tiene un componente mayoritario, el cual es el cinemaldehído y que puede funcionar como antifúngico en algunos alimentos, se propuso aplicar el infusión de canela con cinemaldehído de forma asperjada al pan dulce y evaluar la inhibición de crecimiento de mohos en el pan dulce a través de análisis microbiológicos.

2. Marco Teórico

2.1 Conservación de Alimentos

Durante los últimos años existe un interés creciente de la industria alimentaria por encontrar formas y métodos más naturales para la conservación de alimentos. En los últimos años, se han identificado numerosos compuestos bioactivos naturales con capacidad antimicrobiana como aceites esenciales, infusiones de plantas o microorganismos. Los principales problemas de estos compuestos son el coste, la baja persistencia y/o la sensibilidad a las condiciones ambientales tras su aplicación. En este sentido, la incorporación de estos compuestos junto con matrices-soporte comestibles de bajo coste, permitiría aumentar su persistencia tras la aplicación y, en consecuencia, asegurar el éxito del control, abaratando los costes de aplicación al reducir la dosis necesaria efectiva de compuesto bioactivo (Talavera 2015).

Actualmente se intenta reducir en lo posible la adición de conservantes, sustituyéndolos por el empleo de medios físicos, como la esterilización, las atmósferas controladas en embalajes adecuados, o el mantenimiento de cadenas de frío entre la producción y el consumo. Sin embargo, esto no siempre es práctico, ya que algunos alimentos no pueden calentarse lo suficiente, algunas bacterias son muy resistentes al calor, no siempre se puede garantizar la continuidad de la refrigeración, y además ésta no frena del todo el crecimiento microbiano. Otros procedimientos físicos de conservación, como la irradiación, tienen mala reputación por su relación con la industria nuclear. En algunos casos se puede recurrir al uso de conservantes ya presentes en los alimentos, pero esto no siempre es factible. El uso de ajos o de sus infusiones en la elaboración tradicional de embutidos, dificulta el deterioro por la acción de los microorganismos. Ahora bien, difícilmente se podrán utilizar en una bebida refrescante. Ciertas sustancias no autorizadas, y que por ello no se pueden considerar aditivos, se han utilizado con fines fraudulentos (Ibáñez *et al.* 2003).

Los métodos de conservación tradicionales como congelación, pasteurización, esterilización, deshidratación están basados en la manipulación de uno o dos factores de conservación. En la actualidad, se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, evitando la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa, lo que mejora la calidad sensorial y nutricional del alimento; permitiendo el procesamiento de productos semejantes

al alimento fresco, más sanos, con menos aditivos y listos para preparar y servir (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

2.2 Factores principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano

La calidad de los alimentos se encuentra afectada por factores físicos, químicos, bioquímicos, y microbiológicos, el control de dichos factores y en especial el microbiológico es esencial para la preservación de los alimentos. Los factores principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano se pueden clasificar de la siguiente forma:

Factores implícitos y microbianos (microorganismos presentes, velocidades y fases de crecimiento, efectos sinérgicos, etc.).

Factores intrínsecos, aquellos factores químicos y físicos que actúan dentro del alimento (nutrientes, pH, actividad de agua, presencia de conservadores y otras sustancias antimicrobianas, microestructura, etc.).

Factores extrínsecos (temperatura, humedad relativa, presión parcial de oxígeno, etc.) (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos. Por otra parte, los alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

2.3 Deterioro microbiológico del pan

Productos secos como el pan y las galletas no contienen suficiente humedad para permitir el crecimiento de las bacterias. El deterioro de estos productos es usualmente causado por mohos que son hongos que se encuentran tanto al aire libre como en lugares húmedos y de poca luminosidad. El moho es el principal factor limitante de la vida útil de aquellos productos que tienen una humedad alta o media y es, por tanto, la principal causa de pérdida económica en la industria productora de pan.

Debido a que en el proceso de horneado la masa panadera se somete a altas temperaturas (por encima de 180 °C), se provoca la destrucción de esporas y bacterias que pudiesen estar presentes, por lo que la presencia de microorganismos en el producto final se debe a la posterior manipulación, almacenamiento en una atmosfera húmeda, envoltura (sobre todo si el pan está caliente) y exposición del pan a aire cargado de esporas (Jaramillo 2020).

Los hongos (principalmente levaduras y mohos) son responsables de la formación de sabores desagradables y la producción de micotoxinas y compuestos alergénicos, que

pueden formarse incluso antes de que el crecimiento sea visible. En el pan de trigo, dominan los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Jaramillo 2020).

2.3.1 Contaminación por hongos en la industria panadera

Los productos industrializados de la panificación son perecibles por naturaleza y requieren protección de los contaminantes durante su preparación, almacenamiento y distribución. Conservar el pan luego de horneado es una preocupación constante del panadero, porque éste se convierte en un cultivo de los hongos, por ser aerobios y necesitar de oxígeno para desarrollarse y reproducirse en la corteza del pan. Entre los mohos más frecuentes del pan de molde podemos citar al *Rhizopus nigricans*, *Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* y *Neurospora sitophila* (Pilco 2009).

Las condiciones que favorecen la acción de los hongos en este tipo de productos están asociadas, en primer lugar, a la presencia de oxígeno. La textura porosa de los panes y/o los envases en los que habitualmente se conservan no permiten la completa eliminación del oxígeno, por lo que con el tiempo son capaces de acumular un nivel de oxígeno suficientemente elevado para el desarrollo de los hongos. En segundo lugar, los niveles de aw habituales de panes (en torno a 0.80) son suficientes para el crecimiento de los hongos y, aunque el horneado es capaz de destruir la mayor parte de los hongos o esporas, los productos de panadería son muy susceptibles a sufrir contaminaciones secundarias durante el envasado o almacenamiento. El punto más sensible para el inicio del deterioro fúngico es la superficie de estos alimentos, ya que además de ser muy rica en nutrientes como azúcares, se dan otras condiciones ambientales beneficiosas para el crecimiento de los hongos (Talavera 2015).

2.3.2 Aspergillus

El *Aspergillus* es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón, lana y plumas. Su medio ideal son los ambientes oscuros, húmedos y cerrados. Podemos encontrar esporas de *Aspergillus* en los depósitos de trigo, en los edificios en construcción, en los aparatos de aire acondicionado y en los alimentos enmohecidos. El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, ubicuo y cosmopolita que se encuentra en la naturaleza y en las viviendas. Se puede aislar de la tierra, de los sistemas de ventilación, del agua. Los aspergilos se reproducen con facilidad a temperaturas altas y se encuentran con frecuencia en cereales, forrajes, algodón y algunas aves como las palomas; abundan en materiales orgánicos en

descomposición. Las esporas se diseminan por el aire (conidios) y son inhaladas (Vásquez 2008).

Más de 200 especies de *Aspergillus* se encuentran en la naturaleza, de las cuales solo unas 20 especies pueden causar enfermedades humanas. De estos 20, los tres agentes patógenos más comunes en alrededor del 95 por ciento de los casos son *Aspergillus flavus*, una de las que más perjudica los alimentos *A. fumigatus* y *Aspergillus niger* (Vásquez 2008).

La composición básica del pan lo hace un producto apropiado para el crecimiento de microorganismos, los cuales, invariablemente necesitan de tres condiciones para su desarrollo: alimento, calor y humedad. Los principales factores que afectan el crecimiento de microorganismos son: disponibilidad de nutrientes, temperaturas de almacenamiento, acidez, actividad de agua y las buenas prácticas de manufactura. El pan recién salido del horno se encuentra libre de microorganismos y esporas; sin embargo, durante el enfriamiento, manipulación y almacenamiento es posible que se contamine y en los días posteriores presente daños por causa de microorganismos, los principales problemas asociados a microorganismos que presentan el pan son dos: enmohecimiento e “hilado” o “pan filamentoso”. De acuerdo a Frazier & Westhoff (2003), en los productos de panificación los mohos son los principales responsables del daño causado por la acción de los microorganismos, siendo los de mayor interés *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Monilia sitophila* y *Mucor*. El pan después del horneado es estéril, y durante el enfriamiento, la manipulación y almacenamiento se vuelve un medio apropiado para el crecimiento de microorganismos a los pocos días de su elaboración (González L. *et al.* 2019).

2.3.3 *Rhizopus stolonifer*: Denominado moho del pan, interviene en la alteración de frutas, hortalizas y pan. Requiere una fuente accesible de carbono, como el azúcar o el almidón. Los esporangios se producen y se transportan sobre hifas altas, no ramificadas (González L. *et al.* 2019).

2.3.4 *Penicillium* spp. en alimentos

En muchas ocasiones los alimentos destinados al consumo humano o animal son el hábitat de *Penicillium* spp. Algunas especies son consideradas patógenas de frutas y algunas verduras frescas (sobre todo especies de los subgéneros *Penicillium* y *Biverticillium*) y cereales (algunas especies del subgénero *Penicillium*). Así, algunas *Penicillium* spp. tienen asociaciones específicas con alimentos, lo que permite identificaciones presuntivas, como

algunas de las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* en los cereales, o como otras que presentan un mayor grado de especialización: los patógenos de frutas *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos y *P. expansum* en manzana, pera, cereza y otras frutas. Desde el punto de vista económico, las especies de este género causan importantes pérdidas al deteriorar cereales, frutas y otros alimentos durante su almacenamiento. Muchas especies del género son psicrótrofas y pueden producir el deterioro de diferentes alimentos a bajas temperaturas, suponiendo un posible problema para alimentos que se conservan en refrigeración. Uno de los mayores problemas que generan las *Penicillium* spp. Para el hombre y los animales radica en la posible producción de micotoxinas, con diferentes efectos tóxicos, en alimentos (Martínez Sf.).

El mayor riesgo de la contaminación alimentaria por hongos miceliares es la posible formación de micotoxinas ya que pueden ser introducidas en el organismo por una ruta natural, fundamentalmente la vía oral a través de los alimentos. El género *Penicillium* contiene un gran número de especies toxígenas y la capacidad que tienen las *Penicillium* spp. de producir diferentes micotoxinas es superior a la existente en cualquier otro género fúngico (Martínez Sf.).

2.4 Agentes antimicrobianos naturales

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma, apariencia y mayor comodidad. Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos.

El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación procesamiento o comercialización. Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

- a) Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán.

- b) Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.
- c) Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus infusiones o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

Los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados como son las frutas frescas y ensaladas frescas cortadas envasadas bajo diferentes atmósferas y refrigeradas, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos (sistemas de conservación que impiden el desarrollo de gérmenes) o fungistáticos, en lugar de bactericidas (sistemas de conservación que destruyen los gérmenes) o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada.

Muchas especias y hierbas exhiben actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran por ejemplo el apio, cilantro, laurel, canela etc. Los compuestos presentes en especias y hierbas que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente. La función conservadora se debe a los aceites esenciales que poseen, en cuya composición poseen compuestos tipo eugenol o aldehído cinámico con poder antimicrobiano. También presentan actividad antimicrobiana las oleorresinas de estas especias (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

El cinamaldehído es un aldehído aromático que confiere el sabor y olor característico de la canela. Como componente principal de la corteza de canela, el cinamaldehído ha sido

ingerido por las personas durante siglos y comúnmente se calienta a altas temperaturas para cocinar y hornear (Behar *et al.* 2018).

La mayor parte de lo que nos venden hoy día como alimento, es artificial, sintético, lleno de preservativos, aditivos, colorantes y sabores artificiales, hormonas y antibióticos. Mas todo lo natural es procesado, refinado e industrializado (Ibáñez *et al.* 2003).

2.4.1 Aceites esenciales

Las plantas sintetizan los aceites esenciales en su superficie para protegerse de enfermedades e infecciones que les afectan, ahuyentar a los insectos depredadores y atraer a los beneficiosos (polinizadores). Estos aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad en numerosas aplicaciones: perfumes, ambientadores, cosméticos, fármaco, etc. A pesar de que la industria alimentaria ha utilizado los AE como saborizantes, en la actualidad su capacidad antimicrobiana ha centrado el interés por su alto potencial.

Numerosas investigaciones han demostrado que los componentes de estos aceites esenciales son capaces de ejercer una acción bactericida o bacteriostática a partir de diferentes concentraciones, y en algunos casos también antifúngica, también se ha encontrado una buena efectividad antimicrobiana cuando estos aceites se incorporan junto a matrices poliméricas formadoras de film en aplicaciones a diferentes alimentos (Talavera 2015).

A pesar de los numerosos estudios sobre AE, su mecanismo de acción todavía no está claro. Todo indica que la clave de su actividad es su hidrofobicidad ya que los terpenos, componentes mayoritarios de los AE, tienen la habilidad de insertarse entre los lípidos que constituyen la membrana bacteriana provocando la desnaturalización de las proteínas y, consecuentemente, destruyendo la membrana celular. En general los AE parecen ser más efectivos frente a Bacterias Gram + que frente a Gram -, ya que su membrana celular es más sencilla.

Por otro lado, en el caso de las células eucariotas como es el caso de los hongos, el daño se produce a nivel de la membrana mitocondrial. Los AE provocan su despolarización disminuyendo el potencial transmembrana y aumentando la permeabilidad de la membrana a través de los canales iónicos y de la bomba de protones. Cabe mencionar que la actividad antimicrobiana de los AE no se puede atribuir a un único componente mayoritario, sino que se al tratarse de mezclas muy complejas, su actividad antimicrobiana es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes. Numerosos estudios corroboran que los AE son

significativamente más efectivos que sus componentes principales aislados (Talavera 2015).

2.4.2 Modo de acción de los agentes antimicrobianos naturales

El modo de acción de estos compuestos fenólicos no ha sido determinado, éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

El mecanismo de ataque de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes para la sobrevivencia de la célula. Puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética y en la síntesis de su genética. Esto puede causar daños irreparables a una célula. De varios de los antimicrobianos no se conoce aún su modo de acción, pero al actuar de forma diferente, las combinaciones de estos pueden llevar a mejores resultados (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especias y sus aceites esenciales. Sin embargo, se supone que dada la estructura fenólica de muchos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las especias y sus aceites esenciales, el modo de acción debe ser similar al de otros compuestos fenólicos.

En muchos casos los antimicrobianos pueden no tener ningún efecto hasta que se rebasa una concentración crítica (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

2.5 Cinemaldehído de Canela como agente antimicrobiano

El aldehído cinámico es un compuesto fenólico de algunas especies arbóreas, es generalmente admitido como seguro para su uso en alimentos y es usado en muchos alimentos como saborizante. El aldehído cinámico (3- fenil-2 propenal) constituye aproximadamente el 80% del aceite esencial de la canela, posee actividad antimicrobiana no solo exhibe actividad antibacteriana sino que también inhibe el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

El aceite esencial obtenido de la corteza del arbusto de la canela tiene una mayor importancia respecto al obtenido en otras partes de la planta de la canela debido a su mayor concentración de cinamaldehído, cuya acción antimicrobiana ha sido demostrada en diversos estudios contra: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis*; y acción antifúngica contra *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* (Talavera 2015).

La canela tiene un fuerte efecto inhibitorio en mohos, incluyendo *Aspergillus parasiticus*, se reporta que de 1 a 2% de concentración de canela puede permitir algún crecimiento de *Aspergillus parasiticus*, pero también puede disminuir la producción de aflatoxinas en un 99% (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

2.5.1 Rendimiento de la infusión de canela con Cinamaldehído

El departamento de farmacia de la Universidad de Pakuan, Indonesia realizó una investigación en 2017 para estudiar los efectos del método de extracción de cinamaldehído de canela por infusión destacando que el cinamaldehído tiene actividad antibacteriana.

La preparación de la infusión de canela fue que de cada 100 g de corteza remacerada para infusión utilizando aquadest (agua destilada) 2500 mL a 90°C en 15 min.

El rendimiento de la infusión en la investigación fue de 14.945 ± 1.034 y de contenido de cinamaldehído por el mismo método de infusión fue de $59,285 \pm 4,22$ mg/g infusión seco (Wardatun 2017).

2.5.2 Aplicaciones del aldehído cinámico

Los japoneses reportaron el uso de aldehído cinámico como un agente antimicrobiano en pasta de pescado y en pan leudado. Estudios hechos por Lock y Borrada, en la universidad de Bath en el Reino Unido sobre las propiedades antimicrobianas del ácido cinámico en el laboratorio, han demostrado que el aldehído cinámico es particularmente efectivo contra mohos y levaduras a pH ácidos. Los investigadores de Bath encontraron que el aldehído cinámico usado para sumergir o rociar, extiende la vida de anaquel de pan leudado, hasta en 5 días más, después de su elaboración, sin presentar hongos y mohos (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

El aldehído cinámico fue muy efectivo para prolongar la vida de anaquel de algunos productos de frutos importantes. Por ejemplo, la vida de anaquel de rebanadas de tomate

fresco almacenado a 4°C fue extendida de 42 a 70 días mientras que las rebanadas almacenadas a 25 °C tuvieron el doble de vida de anaquel de 21 a 42 días.

Se ha observado que las concentraciones en que se requieren los antimicrobianos naturales son más altas en alimentos que en medios de cultivo, dañando significativamente el sabor de los alimentos, por lo que su efectividad puede reforzarse por el uso de aditivos o combinaciones sinérgicas con otros compuestos, reduciendo así las concentraciones necesarias para lograr la eficacia deseada (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011).

Desde hace mucho tiempo la canela ha sido utilizada para preservar los alimentos, debido a su acción antibacteriana. Ésta fue estudiada por Gende en 2008 sobre *Paenibacillus larvae*, bacteria responsable de una de las enfermedades más importantes en apicultura: la “loque americana”, que causa la muerte de las larvas de abeja (especialmente a las larvas de abeja reina). Así, mediante una bioautografía (técnica analítica en la que los compuestos orgánicos son separados por cromatografía e identificados por su efecto en microorganismos), se demostró el efecto bactericida del cinemaldehído. También se calcularon distintos parámetros del aceite esencial de canela, relacionados con su actividad bactericida: su concentración mínima inhibitoria (CMI), de unos 50 mg/L, y su concentración mínima bactericida (CMB), la cual se sitúa alrededor de unos 150 mg/L (Gende 2018).

3. Metodología

Para ejecutar el tema de pasantía, se realizaron las siguientes actividades:

- Obtención de la infusión de canela
- Toma de muestras de pan dulce
- Aplicación de la infusión de canela con cinemaldehído y monitoreo de vida en anaquel
- Análisis microbiológicos

3.1 Obtención de la infusión de canela

La metodología de extracción utilizada es accesible para poder ser reproducida por las panaderías y así evitar cualquier inconveniente tecnológico.

Basándose en bibliografía consultada en línea de un artículo publicado por la universidad de Pakuan, Indonesia (2017). El procedimiento de extracción de canela se realizó por infusión se pesó y se molió 8.48 gramos de canela (ver Fig. 3), y se llevó a 90°C con agitación constante durante 15 min en 250 ml de agua purificada (ver Fig. 4) de esta manera la concentración de cinemaldehído de canela es del 0.5%.



Figura 3. Pesado de la canela molida



Figura 4. Infusión de la canela a 90° C

3.1.1 Filtración

Con una manta de colar, se filtró la infusión de canela con cinemaldehído de canela al 0.5% en un balón volumétrico de 250 ml (ver Fig. 5), se dejó enfriar y se almaceno en un frasco plástico de 250 ml con boquilla de spray para su fácil aplicación en el pan de dulce tipo torta y se mantuvo en refrigeración hasta su utilización.



Figura 5. Filtrado del extracto con cinemaldehído de canela

3.2 Toma de muestras de pan dulce

Se realizaron cuatro tomas de muestras del pan dulce en estudio, en la panadería “Jardín del Pan” ubicada en Antigua Cuscatlán.

El pan dulce que se utilizo fue de mediana humedad tipo “torta” sin relleno, y recién horneado, sin antifúngicos ni preservantes químicos.

1ra. Toma de muestras

La panadería “Jardín del Pan” proporciono 5 muestras de pan tipo torta.

Se esperó en el local de la panadería aproximadamente 30 minutos después de que salieran del horno a que se enfriarán para poder asperjar la infusión de canela con cinemaldehído. Se asperjaron 4 muestras de pan dulce dejando 1 muestra de pan dulce como testigo, luego fueron llevadas al laboratorio de alimentos del CEICA y se inició su evaluación de vida en anaquel en cámara de ambiente controlado a una temperatura de 32°C con humedad relativa de 65%, (ver Fig. 6).

Los panes asperjados con infusión de canela se identificaron como Mx1, Mx2, Mx3, Mx4 y el pan sin infusión de canela se tomó como muestra testigo (T).



Figura 6. Pan dulce en cámara de ambiente controlado

2da. Toma de muestras

La panadería “Jardín del Pan” proporciono 6 muestras de pan tipo torta.

Esta vez se llevaron las muestras de pan dulce tipo torta al laboratorio de alimentos del CEICA y ahí se asperjaron con la infusión de canela con cinemaldehído (ver Fig. 7). Se asperjaron 3 muestras de pan y 3 se dejaron como testigo y se inició su evaluación de vida en anaquel en cámara de ambiente controlado a una temperatura de 32°C con humedad relativa de 65%, (ver Fig. 8). Además, se colocaron todas las muestras de pan dentro de una caja plástica para simular el mismo ambiente que se crea en la vitrina de la panadería.

Los 3 panes asperjados con infusión de canela se identificaron como Mx y los panes sin infusión de canela se identificaron como muestra testigo (T). Al momento de tomar las muestras para análisis microbiológico se tomaron al azar tanto las muestras identificadas como Mx y las muestras testigos (T).



Figura 7. Aplicación de extracto de canela con cinemaldehído de canela al pan dulce



Figura 8. Pan dulce en cámara de ambiente controlado

3ra. Toma de muestras

La panadería “Jardín del Pan” proporciono 6 muestras de pan tipo torta.

En esta tercera toma de muestras se llevaron las muestras de pan dulce tipo torta al laboratorio de alimentos del CEICA y se midió la humedad inicial en termo balanza (ver Fig. 9) desde su primer día de anaquel, y cada vez que se realizaron los análisis microbiológicos, (ver Cuadro 4).



Figura 9. Medición de humedad de pan dulce en termo balanza

Se asperjaron 3 muestras de pan con la infusión de canela con cinemaldehído (ver Fig. 10). y 3 se dejaron como testigo y se inició su evaluación de vida en anaquel en cámara de ambiente controlado a una temperatura de 32°C con humedad relativa de 65%, colocando todas las muestras de pan dentro de una caja plástica.

Los 3 panes asperjados con infusión de canela se identificaron como Mx y los panes sin infusión de canela se identificaron como muestra testigo (T). Al momento de tomar las muestras para análisis microbiológico se tomaron al azar tanto las muestras identificadas como Mx y las muestras testigos (T).



Figura 10. Aplicación de extracto de canela con cinemaldehído de canela al pan dulce

4ta. Toma de muestras

Se realizó una última toma de muestras para evaluar el efecto inhibitorio de la infusión de canela con cinemaldehído sobre el crecimiento de mohos en el pan dulce tipo torta.

Esta vez se cambió la metodología ya que se empacaron las 6 muestras de pan, en bolsas de celofán transparente luego de asperjar 3 muestras con la infusión de canela con cinemaldehído para evaluar su vida en anaquel, sin someterlas a un ambiente controlado en cámara (ver Fig. 11).



Figura 11. Empacado de pan en bolsas de celofan con extracto de canela

3.3 Metodología de Análisis microbiológicos

Primer muestreo:

Al día 4 después de haber llevado las cinco muestras de pan al laboratorio, se sacaron de la cámara de ambiente controlado para su respectivo análisis microbiológico y se tomó muestra (10 gr) de toda la superficie de los panes tanto de las muestras con infusión de canela como de la muestra testigo, y se siguió la metodología descrita en el cuadro 4, esta fue la primera siembra microbiológica. Se guardaron todas las muestras de pan nuevamente en la cámara de ambiente controlado, en las mismas condiciones ambientales (32° C y 65% de humedad relativa).

La segunda siembra se realizó el día 7, nuevamente se sacaron las cinco muestras de pan de la cámara de ambiente controlado para su respectivo análisis microbiológico, repitiendo el mismo procedimiento, tal y como se menciona en el párrafo anterior.

Segundo muestreo:

En esta evaluación microbiológica se cambió la metodología con respecto al primer muestreo con el fin de obtener mejores resultados. En esta evaluación para no afectar la humedad del pan dulce y propiciar el crecimiento de moho, no se aplicó la infusión de canela al pan dulce recién horneado como en la primera evaluación, esta vez se aplicó un día después de horneado el pan, en el laboratorio de alimentos del CEICA, y se colocaron las muestras de pan en la cámara de ambiente controlado bajo los mismos parámetros (32° C y 65% de humedad relativa).

En esta segunda evaluación microbiológica ya no se utilizó solamente un pan dulce como testigo, sino que 3, y 3 se asperjaron con la infusión de canela se realizaron 3 siembras en un periodo de 11 días.

Al día 4 se realizó la primera siembra, se sacaron dos muestras de pan de la cámara una muestra sin infusión de canela (muestra testigo) y una muestra con infusión de canela y se tomaron 10 gr de toda la superficie de los panes y se siguió la metodología descrita en el cuadro 4. Las muestras de pan fueron desechadas, para tomar muestras de pan enteras en la siguiente siembra.

La segunda siembra se realizó el día 7 y una tercera al día 11, siguiendo la misma metodología del párrafo anterior.

Tercer muestreo:

En esta tercera evaluación microbiológica, se siguieron los mismos pasos que en la segunda evaluación microbiológica, realizando 3 siembras la primera al día 4, la segunda al día 7, y una tercera al día 11.

Cuarto muestreo:

El estudio de la infusión de canela con cinemaldehído como agente inhibitorio de mohos en pan dulce solo pretendía realizar 3 evaluaciones microbiológicas sin embargo se realizó una cuarta.

En esta cuarta evaluación microbiológica, se empacaron las 6 muestras de pan dulce en bolsas de celofán y se dejaron fuera de la cámara de ambiente controlado para descartar que hubiera una contaminación cruzada entre las muestras en la cámara de ambiente controlado. Se realizaron 2 siembras la primera el día 4 y la segunda el día 7. Se tomaron

2 muestras una con infusión de canela y una sin infusión de canela tomando de cada muestra 10 gr y siguiendo la metodología descrita en el cuadro 4.

Los 3 panes asperjados con infusión de canela se identificaron como Mx y los panes sin infusión de canela se identificaron como muestra testigo (T). Al momento de tomar las muestras para análisis microbiológico se tomaron al azar tanto las muestras identificadas como Mx y las muestras testigos (T).

3.4 Descripción de la metodología del procedimiento de análisis microbiológico de las muestras de pan.

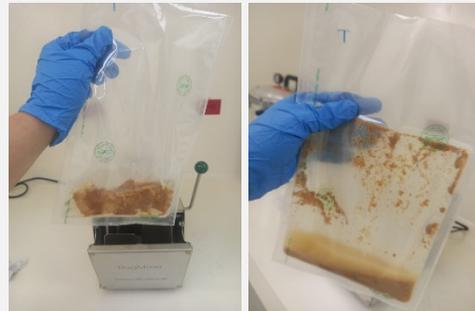
Para la realización de todos los análisis microbiológicos que se realizaron durante la pasantía profesional se llevó a cabo la siguiente metodología (ver Cuadro 4):

Cuadro 4. Metodología del procedimiento de análisis microbiológicos.

ACTIVIDAD	FOTOGRAFÍA
<p>Esterilización de materiales a utilizar y de cámara de flujo laminar con luz ultravioleta: se esterilizan antes los materiales para realizar los análisis microbiológicos, los materiales son: 1 beaker de 500 ml, 1 probeta de 100 ml, pipetas de 1 ml desechables y un dispersor para placa petrifilm. La cámara de flujo laminar cuenta con una lámpara de luz ultravioleta para esterilizar, se enciende por 30 minutos para poder trabajar en un ambiente estéril.</p>	
<p>Preparación de las muestras: se tomaron pequeñas muestras de toda la superficie de cada pan, tanto inferior como superior y a los lados, hasta completar aprox. 10 gramos, de cada pan y se depositaron en diferentes bolsas estériles con filtro, y se añadió 90 ml de agua destilada a cada bolsa, identificada como Mx₁ y T (testigo).</p>	

Homogeneización de las muestras en el equipo BagMixer:

Se colocaron las bolsas una por una en el equipo BagMixer por 1 minuto, el bagmixer tiene la función de mezclar muestras sólidas o líquidas para garantizar una óptima extracción bacteriana de las muestras.



Inoculación de la muestra en placa petrifilm de recuento rápido de mohos y levaduras: luego de obtener las muestras bien homogeneizadas en el BagMixer se toma 1 ml de muestra (inóculo) con una pipeta desechable que previamente fue esterilizada, se siembra ese ml en el centro de la placa petrifilm específica para mohos y levaduras hasta cubrir toda el área donde se encuentra el medio de cultivo para el crecimiento de mohos y levaduras.

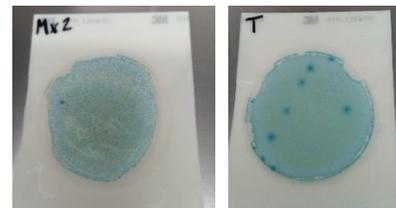


Incubación de placas petrifilm sembradas: luego de haber echo la siembra se colocan las placas petrifilm en una incubadora a una temperatura de entre 25–28°C durante 48±2 horas para el crecimiento de mohos y levaduras, durante 48 horas.



Lectura de análisis microbiológico en placa petrifilm:

A las 48±2 horas, se realiza la lectura de UFC (Unidad Formadora de Colonia) de mohos en las placas petrifilm de recuento rápido, el recuento se hace de manera visual con mucha iluminación para poder identificar las UFC.



Adaptado de la Guía de Interpretación Placas Petrifilm™ para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras 2017.

4. Resultados y discusión.

A continuación, se presentan los resultados del crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos, de los 4 análisis microbiológicos realizados durante la pasantía profesional.

1ra. evaluación microbiológica

En el primer análisis microbiológico realizado al pan dulce, algunos de los resultados del conteo de UFC de las muestras de pan fueron MNPC (ver cuadro 5.), es decir que no fue posible identificar y contar las UFC de moho en las placas petrifilm ya que el gel, medio de cultivo de las placas petrifilm se tornó de una coloración azul verdoso con abundantes puntos con bordes difusos uno sobre otro.

Cuadro 5. **Resultados de 1ra. evaluación microbiológica en pan dulce tipo torta**

	T	Mx1	Mx2	Mx3	Mx4
Siembra 1 (día 4)	0 UFC	1 UFC	MNPC	3 UFC	MNPC
Siembra 2 (día 7)	0 UFC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

Mx: muestra con infusión de canela

T: muestra testigo sin infusión de canela

El resultado de MNPC se puede deber a que se aplicó la infusión de canela al pan dulce recién horneado, es decir que estaba caliente y con una humedad alta, esto hizo que el pan dulce se humedeciera aún más creando un ambiente propicio para el crecimiento de moho en el pan. Por lo tanto, no se pudo realizar una tercera siembra ya que los resultados en la segunda siembra fueron MNPC, sin embargo, esto sirvió para mejorar la metodología en el segundo análisis microbiológico.

2da. evaluación microbiológica

Para esta evaluación microbiológica no se utilizó solamente un pan dulce como testigo como en la primera evaluación microbiológica, de 6 muestras de pan dulce se tomaron 3 como testigos, y se realizaron 3 siembras, llegando hasta el día 11 con la tercera siembra, hasta ese día el pan dulce aun mantenía buenas sus características organolépticas es decir su olor, sabor, y textura. La panadería “Jardín del Pan” expreso que el pan dulce sin preservantes solo duraba 5 días con sus características organolépticas aceptables, es decir que la aplicación de infusión de canela con cinemaldehído había incidido en la vida de anaquel del pan dulce en estudio.

En esta evaluación para no afectar la humedad del pan dulce y propiciar el crecimiento de moho, no se aplicó la infusión de canela con cinemaldehído al pan dulce recién horneado como en la primera evaluación, esta vez se aplicó un día después de horneado el pan, en el laboratorio de alimentos del CEICA. Los resultados se presentan a continuación en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados de 2da. evaluación microbiológica en pan dulce tipo torta

	T	Mx
	Mohos	Mohos
Siembra 1 (día 4)	0	0
Siembra 2 (día 7)	10	1
Siembra 3 (día 11)	MNPC	MNPC

MNPC: Muy Numeroso Para Contar
Mx: muestra con infusión de canela
T: muestra testigo sin infusión de canela

Los resultados del segundo análisis microbiológico fueron los más representativos de todos los análisis realizados, ya que en esta evaluación se comprobó que si hay inhibición en el crecimiento de UFC de mohos en el pan dulce con la aplicación del infusión de canela, fue en la siembra 2, día 7, donde los resultados de los análisis microbiológicos fueron de 10 UFC para la muestra testigo y de 1 UFC para la muestra con infusión de canela, demostrando que si hubo inhibición en el crecimiento de UFC de moho en el pan dulce, ver Gráfico 1.

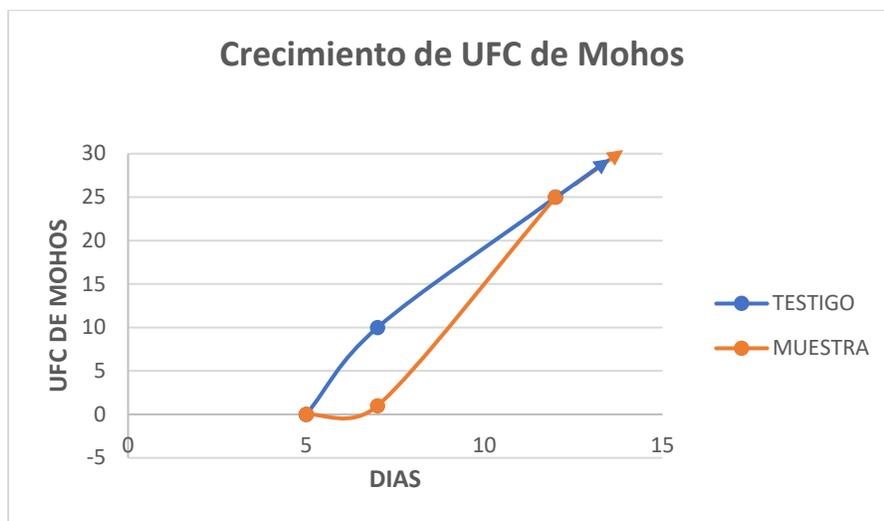


Gráfico 1. Crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias de mohos en 11 días

Los resultados obtenidos comprueban lo citado en la literatura (Rodríguez, S., Nereyda, E. 2011), que indica que el componente mayoritario presente en la canela el cinemaldehído inhibe el crecimiento de mohos.

3ra. Evaluación microbiológica

En el tercer análisis microbiológico los resultados que se presentan en el cuadro 7, se puede observar que en la primera siembra hubo inhibición de mohos en comparación con la muestra testigo donde las UFC fueron incontables (MNPC) y la muestra de pan con infusión de canela presento 3 UFC, sin embargo, en la siembra 2 y 3 no se pudo determinar el número de unidades formadoras de colonias de mohos ya que se determinó que era MNPC (ver Cuadro 7). Un posible factor del resultado MNPC fue que hubo una contaminación cruzada entre los panes, ya que podían haberse contaminado con esporas de moho en la panadería esto llevo a la formación de muchas UFC lo cual no permitió que se realizara un conteo de UFC.

Cuadro 7. Resultados de 3ra. Evaluación microbiológica en pan dulce tipo torta

	T	Mx
	UFC de mohos	UFC de mohos
Siembra 1 (día 4)	MNPC	3
Siembra 2 (día 7)	MNPC	MNPC
Siembra 3 (día 11)	MNPC	MNPC

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

Mx: muestra con infusión de canela

T: muestra testigo sin infusión de canela

En el cuadro 8 se muestran los resultados de la medición de humedad al pan dulce en termo balanza, el cual muestra una disminución de humedad en todas las muestras pan dulce conforme fueron pasando los días en anaquel, y esto es normal debido a que los productos de panadería después de su cocción comienzan a perder humedad si están fuera de un empaque adecuado, está pérdida de humedad afecto las características sensoriales del pan dulce.

Las muestras de pan dulce asperjadas con infusión de canela (Mx) presentaron un mayor porcentaje de humedad en comparación con las muestras testigos, debido a que la infusión de canela aumento la humedad de los panes.

Cuadro 8. **Medición de humedad en pan dulce**

FECHA	MEDICION DE HUMEDADES EN PAN DULCE (%)		
		Mx	T
31/08	Humedad inicial	-	13.68
04/09	1ra. Medición	12.98	11.34
07/09	2da. Medición	11.67	10.03
11/09	3ra. Medición	11.06	10.14

Mx: muestra con infusión de canela

T: muestra testigo sin infusión de canela

4to. Análisis microbiológico

En la cuarta evaluación los análisis microbiológicos se realizaron solo 2 veces debido a que los resultados de UFC en las muestras de pan con infusión de canela fueron MNPC (Ver Cuadro 9), esto se debió a que se cambió la metodología, esta vez empacando el pan dulce en bolsas de celofán de mediana densidad luego de haber asperjado el pan dulce con el infusión de canela con cinemaldehído, esto provoco que se creara un ambiente de alta humedad en la bolsa provocando el aparecimiento de moho en el pan, tanto que el moho ya era visible en el pan dulce.

Cuadro 9. **Resultados del 4to. Análisis microbiológico en pan dulce**

	T	Mx
	UFC de Mohos	UFC de Mohos
Siembra 1	0	MNPC
Siembra 2	0	MNPC

MNPC: Muy Numeroso Para Contar

Mx: muestra con infusión de canela

T: muestra testigo sin infusión de canela

5. Conclusiones

- Se estableció un método de fácil adopción y aplicación, para la obtención de una solución de canela con cinemaldehído al 0.5% a través de una infusión de canela molida a 90°C por 15 minutos.
- Se comprobó la acción antifúngica la infusión de canela con cinemaldehído al 0.5%, aplicada en pan dulce tipo torta de mediana humedad mediante análisis microbiológicos, en segunda y tercera corrida de análisis.
- El pan dulce tipo torta con aplicación de infusión de canela con cinemaldehído tuvo 6 días más de vida en anaquel en comparación con la muestra testigo, que solo dura 5 días con sus características organolépticas aceptables.
- El factor humedad afectó los resultados de UFC del primer y cuarto análisis microbiológico ya que esta aumentó al agregarle la solución de infusión de canela a las muestras de pan.

6. Recomendaciones

- Controlar la cantidad de la infusión de canela que se aplica al pan dulce y el tiempo de espera del secado del pan, ya que eso incrementa la humedad e induce al apareamiento de mohos en el pan dulce.
- Usar otras metodologías como alternativas para la extracción del compuesto cinemaldehído de canela de las variedades Cinnamomun cassia y verum, para evaluar su concentración y eficiencia en la inhibición de mohos en pan dulce.
- Evaluar la infusión de canela con cinemaldehído para estudios de inhibición de mohos en otros tipos de productos alimenticios, evaluando la concentración adecuada según la naturaleza del producto.
- Realizar la identificación de mohos que atacan al pan dulce, para conocer su especie.
- El método establecido puede ser usado por el rubro de panificadores y con fines didácticos en la academia.
- Transferir esta tecnología al sector panificador a través de las instancias competentes.

7. Bibliografía

- Behar R, Luo W, McWhirter K, Pankow J, Talbot P. 2018. Analytical and toxicological evaluation of flavor chemicals in electronic cigarette refill fluids. Consultado el 16 de marzo de 2023. Disponible en <https://www.nature.com/articles/s41598-018-25575-6>
- Gende L, Floris I, Fritz R, Eguaras M, 2018. "Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus* larvae from Argentina", Bulletin of Insectology. Consultado el 17 de marzo de 2023. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/228712418_Antimicrobial_activity_of_cinnamonCinnamomum_zeylanicum_essential_oil_and_its_main_components_against_Paenibacillus_larvae_from_Argentina
- González L., Altamirano R., Campos J. 2019. Calidad microbiológica del pan de caja adicionadas con harinas no convencionales (jamaica y nopal). Universidad de la Cañada. Oaxaca, México. Consultado el 27 de feb de 2023. Disponible en <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/8/104.pdf>
- Guía de Interpretación Placas Petrifilm™ para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras. 2017. México D.F. Consultado el 02 de feb de 2023. Disponible en <https://multimedia.3m.com/mws/media/1624089O/3m-petrefilm-placas-hongos-y-levaduras-ym-guia-de-interpretacion.pdf>
- Ibáñez F, Torre P, Irigoyen A, 2003. ADITIVOS ALIMENTARIOS. Consultado el 15 de febrero de 2023 (en línea). Área de Nutrición y Bromatología Universidad Pública de Navarra. Disponible en https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34481720/aditivos_1-libre.pdf?1408438698=&response-content-disposition
- Jaramillo J. 2020. Protocolo Para La Vida Útil Del Pan Sin Relleno. Universidad de Antioquia. Colombia. Consultado el 11 de marzo de 2023. Disponible en

https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/18769/1/JaramilloJuliana_2020_ProtocoloVida%C3%9Atil.pdf

- López A. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Balcarce, Argentina. Consultado el 27 de feb de 2023. Disponible en <https://www.fao.org/3/y4893s/y4893s.pdf>.
- Martínez E. Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum*. Universidad Autónoma de Barcelona. Consultado el 20 de marzo de 2023. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5598/emb1de1.pdf?sequence=1>
- Pilco S, Quito M, Quispe S. 2009. Conservación de Pan Artesanal Ezequiel y Pan Superbueno Usando Aceite Esencial de Clavo de Olor (*Eugenia caryophyllus*). Universidad Peruana Unión. Consultado el 11 de feb de 2023. Disponible en <https://revistas.upeu.edu.pe/index.php/riu/article/view/683>
- Rodríguez S., Nereyda E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Revista Ra Ximhai. Universidad Autónoma Indígena de México, México. Consultado 03 marzo 2023. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>
- Vásquez A. 2008. Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud. El Salvador. Consultado el 12 de marzo de 2023. Disponible en <https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/download/12/16/76>
- Wardatun S, Rustiani E, Alfiani N, Rissani D. 2017. Study Effect Type of Extraction Method And Type of Solvent To Cinnamaldehyde and TransCinnamic Acid Dry Extract Cinnamon (*Cinnamomum burmanii*). J Young Pharm. University of Pakuan, Bogor. INDONESIA. (en línea). Consultado el 01 de feb de 2023. Disponible en <https://www.jyoungpharm.org/sites/default/files/10.5530jyp.2017.1s.13.pdf>