

Propolis como conservante natural en leche chocolatada

Xavier Andres Cedeño Carpio¹; Alex Alberto Dueñas Rivadeneira²; Luis Humberto Vásquez Cortez^{3,4}

Resumen

El propóleo, una sustancia elaborada por las abejas para proteger su colmena, se investigó como un potencial conservante natural para la leche chocolatada. Se evaluaron diferentes concentraciones de un extracto etanólico de propóleo (0,5 ml.L-1, 1 ml.L-1, 1,5 ml.L-1) a lo largo de cinco semanas, comparándolas con un control sin conservantes y con sorbato de potasio. Se analizaron parámetros como pH, propiedades fisicoquímicas, acidez titulable y la presencia de bacterias como aerobias mesófilas, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Se realizó también una evaluación sensorial. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de propóleo, especialmente a una concentración de 0,5 ml.L-1, inhibió el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas y coliformes totales durante el período de estudio. No hubo cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas de la leche chocolatada. En cuanto a la aceptación sensorial, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, pero se detectó una tendencia hacia una mejor aceptación organoléptica en las muestras con 1 ml.L-1 de extracto etanólico de propóleo. Estos hallazgos sugieren que el extracto etanólico de propóleo podría ser efectivo como conservante natural para la leche chocolatada, ya que inhibe el crecimiento bacteriano sin comprometer su calidad. Sin embargo, se señala la necesidad de investigaciones adicionales para determinar las concentraciones óptimas y los métodos de aplicación para su potencial uso industrial.

Palabras claves: Inhibición bacteriana, concentraciones de extracto, eficacia del conservante, evaluación sensorial.

Propolis as a natural preservative in chocolate milk

Abstract

Propolis, a substance produced by bees to protect their hive, was investigated as a potential natural preservative for chocolate milk. Different concentrations of an ethanolic extract of propolis (0.5 ml.L-1, 1 ml.L-1, 1.5 ml.L-1) were evaluated over five weeks, comparing them with a control without preservatives and with potassium sorbate. Parameters such as pH, physicochemical properties, titratable acidity, and the presence of bacteria such as mesophilic aerobes, total coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* were analyzed. Sensory evaluation was also conducted. The results showed that the ethanolic extract of propolis, especially at a concentration of 0.5 ml. L-1, inhibited the growth of mesophilic aerobes and total coliforms during the study period. There were no significant changes in the physicochemical properties of the chocolate milk. Regarding sensory acceptance, no significant differences were found between the different treatments, but there was a trend towards better organoleptic acceptance in samples with 1 ml.L-1 of ethanolic extract of propolis. These findings suggest that the ethanolic extract of propolis could be effective as a natural preservative for chocolate milk, as it inhibits bacterial growth without compromising its quality. However, further research is needed to determine the optimal concentrations and application methods for its potential industrial use.

Keyword: Bacterial inhibition, extract concentrations, preservative efficacy, sensory evaluation.

Recibido: 02 de febrero de 2025

Aceptado: 22 de abril de 2025

¹ Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, ICAI-CONICET, xaviercedenocarpio@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9240-7630>

² Facultad de Agrociencia, Universidad Técnica de Manabí, Chone, Ecuador, alex.duenas@utm.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0002-8603-0694>.

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera en Agroindustria, Universidad Técnica de Babahoyo, Los Ríos, Ecuador; lvazquezc@utb.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0003-1850-0217>

⁴ Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, ICAI-CONICET.

I. INTRODUCCIÓN

La ciencia y tecnología de los alimentos comprende desde la salud hasta el vínculo del bienestar en el consumo de los alimentos. El desarrollo en formas considerables permite cumplir grandes objetivos en la industria alimenticia con parámetros diversos como la higiene, seguridad y producción. Al conocer que la leche y los productos lácteos al ser transformados necesitan de técnicas y envases adecuados que prolonguen la duración del producto, es necesario agregar conservantes de origen químicos y/o naturales, donde el propóleo puede ser empleado como un conservante de origen natural. La leche con sabores es una bebida láctea que se elabora con saborizantes y azúcar, normalmente es enriquecida con vitaminas y calcio; tradicionalmente su consumo se direcciona hacia la población infantil (Vásquez et al., 2024).

La innovación del consumo es baja en comparación con otros productos como las bebidas gaseosas sin alcohol, para los consumidores que no desean desistir del sabor, la salud o la practicidad, la leche chocolatada está demostrando ser una alternativa popular, recientemente se ha centrado en sabores para los adultos, el deleite irresistible y la regeneración del envasado hace ampliar las expectativas de los consumidores. “La leche chocolatada es un alimento de sabor dulce que se consume en estado de refrigeración, se prepara y constituye exclusivamente por leche entera o semidescremada, y con la adición de sustancias aromatizadas naturales” (Villamil et al., 2020).

La leche modificada se puede elaborar a partir de la leche entera, parcialmente descremada o descremada, pasteurizada o sometida a tratamiento UHT, o a esterilización comercial (Álvarez et al., 2022). Muchas veces se puede agregar en la formulación suero de leche en polvo que va a depender de los niveles de grasas iniciales a estos se le ha adicionado saborizantes, aromatizantes, estabilizantes y conservantes autorizados, con el objetivo de lograr un producto con características organolépticas diferentes a la leche natural. Los aditivos alimentarios son agregados de forma deliberada a los alimentos en pequeñas cantidades, con el fin de modificar sus características organolépticas, sus técnicas de elaboración y preservación, o para mejorar la adaptación del uso al que son destinados.

Cualquier sustancia que no se consuma normalmente, ni tampoco se utilice como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutricional, y cuya

adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento; resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) para sí, o para sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características (Cuadros et al., 2017).

Los aditivos tienen un papel fundamental a la hora de mejorar las propiedades físicas de los alimentos, su objetivo es aportar aroma, color, sabor, y a su vez, vida útil al producto para alargar la conservación, esto hace que los alimentos continúen siendo seguros, nutritivos y apetecibles hasta su consumo (Velázquez et al., 2019). Los conservantes tienen un rol dentro de la preservación de las leches saborizadas, son la parte funcional para ampliar la variedad de los compuestos que ayudan a retrasar o prevenir la proliferación bacteriana y proteger los productos del deterioro. “El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores” (Villamil et al., 2020).

En el Ecuador los principales consumidores de bebidas lácteas y saborizadas, son los habitantes con edades que oscilan entre los 3 y 12 años, ellos representan el 10% del consumo en el Ecuador. “El consumidor ecuatoriano antes de comprar un producto lácteo, se preocupa por factores como la salud y la economía, porque se siente atraído por un sabor diferente ante la leche común” (Contero et al., 2021).

Los conservantes que se emplean en el Ecuador son en su mayoría sustancias naturales y artificiales, éstas se utilizan en la preservación de los alimentos ante la eminente acción de los microorganismos, para reducir el deterioro por un lapso de tiempo determinado, bajo las condiciones de almacenamiento adecuadas; esto depende del tipo de sustancia, el tiempo de exposición y la cantidad que se adicionará, de lo cual podría resultar carcinogénico (nitrocompuestos), mutagénicos (nitrosaminas), o producir disturbios metabólicos (anhídrido sulfuroso, ácido benzoico y otros).

El propóleo es un conservante natural que posee una condición semejante a los conservantes químicos, los cuales son utilizados actualmente en la industria alimentaria; las biomoléculas del propóleo se presentan como una técnica que permite reemplazar

dichos conservantes tradicionales. “El propóleo hasta el momento no presenta efectos indeseables o perjudiciales para la salud del consumidor” (Rodríguez, 2011). Utilizar estos efectos positivos del propóleo en productos lácteos saborizados permitirá la generación de una producción con mayores índices de durabilidad. El enfoque de la investigación fue la obtención de una alternativa bioconservadora con el extracto etanólico de propóleo (EEP), siendo éste adicionado a varias muestras, con la finalidad de reducir el crecimiento de microorganismos, así se extenderá la vida útil de la leche chocolatada, cumpliendo con los objetivos del buen vivir de los ecuatorianos. Con la implementación del extracto etanólico de propóleo como bioconservador será factible mejorar la calidad de la leche chocolatada, y que conserven las características organolépticas deseables al consumidor.

El Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), el 18% del ganado vacuno del país está en Manabí. Según cifras del 2012, de las 5,2 millones de reses que se contabilizaron en el país, 977.000 son de la provincia antes mencionada, por esta razón Manabí es considerada la provincia con mayor producción nacional (Taipe et al., 2022).

Considerando el principio de conservación de los alimentos, se considera que para prolongar su vida útil se debe emplear tratamientos térmicos, envases adecuados y/o conservantes; los mismos que en las líneas de producción de mercadeo garantizarán la salida de alimentos seguros, inocuos e higienizados. El cumplimiento de los parámetros referidos, permitirá hacer frente a las eminentes amenazas procedentes del deterioro o hasta de la toxicidad del alimento; y de la acción desfavorable de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos. La eficacia y eficiencia de los procedimientos se demuestra mediante los análisis físicos, químicos y microbiológicos que aseguran la calidad del producto, el objetivo principal de la investigación fue evaluar el propóleo como conservante natural en leche chocolatada y su incidencia en las características organolépticas, con tres objetivos específicos; Estandarizar el proceso de la leche con extracto etanólico de propóleo, Evaluar diferentes porcentajes de propóleo como conservante de leche chocolatada, Determinar la aceptación de los tratamientos mediante un panel sensorial.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se detallan los aspectos que engloban los materiales utilizados durante la investigación: ubicación geográfica; equipos, materiales de laboratorio, implementos y herramientas; estandarización del proceso; y proceso de obtención del extracto etanólico de propóleo y la leche chocolatada.

Localización

El propóleo utilizado para la ejecución del trabajo investigativo procede de la finca Delfin Carlozama de la provincia de Imbabura, Ecuador; con este los estudios se realizaron en el laboratorio de lácteos de la Facultad de Ciencias Zootécnicas de la Universidad Técnica de Manabí, ubicado en la vía Boyacá kilómetro 1.5 del cantón Chone, provincia de Manabí; y los análisis microbiológicos se ejecutaron en la Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, de la misma institución.

Estandarización del proceso

Se realizaron seis pruebas preliminares para estandarización de la leche chocolatada con el extracto etanólico de propóleo:

Tabla 1. Resultados de las muestras preliminares de estandarización de proceso

Fórmula	Descripción
Muestra 1: Cacao puro 76,1 g Leche entera 500 ml Azúcar 50 g Goma xantán 0,09g	La leche inicialmente tenía 10°Brix (Bx) al momento de terminar el producto constó con 19°Bx. Para este caso se efectuaron 5 muestras de 100 ml. Se usó goma xantán lo cual permitió una corta estabilidad dentro del producto.
Muestra 2: Leche entera 650 ml Azúcar 25g Cacao sin grasa 25g Goma xantán 0.11g	Se tomó a la leche los sólidos solubles los cuales estaban en 10°Brix y al término de la elaboración de la leche chocolatada se volvió tomar la lectura siendo de 18°Bx. Se elaboraron 5 unidades por 130 ml de producto y se sometió a mínima cantidad de goma xantán.
Muestra 3: Leche entera 950 ml Azúcar 35g Cacao sin grasa 35g Goma xantán 0.13 g Carboximetilcelulosa (CMC) 0,19 g	Se tomó la referencia de los sólidos solubles de la leche entera de 10°Bx y al finalizar el producto obtuvo 20°Bx. Esta proporción de leche era para 7 unidades con un contenido de 130 ml. La adición del componente estabilizante permitirá la persistencia del producto.

Muestra 4:
Leche entera 950 ml
Azúcar 20 g
Cacao sin grasa 25 g
Goma xantán 0.28 g
Carragenina 0.13 g

Muestra 5:
Leche entera 950 ml
Azúcar 20 g
Cacao sin grasa 12 g
CMC 0.19 g
Carragenina 0.13 g

Muestra 6:
Leche entera 950 ml
Azúcar 20g
Cacao sin grasa 7.7
Goma xantán 0.28 g
CMC 0.19 g
Carragenina 0.13 g

Muestra 7:
Leche entera 1000 ml
Azúcar 25 g
Cacao sin grasa 10 g
Goma xantán 0.15 g
CMC 0.20 g
Carragenina 0.30
Extracto etanólico de propóleo con 0,5 ml.L⁻¹, 1 ml.L⁻¹, 1,5 ml.L⁻¹

Se realizó la toman de sólidos solubles que fue de 10°Bx y al término de la elaboración del producto la cifra fue de 19°Bx. Con una proporción de 130ml de leche chocolatada para 7 unidades envasadas y con estabilizante de Carragenina.

Se inició con la toma de sólidos solubles en 10°Bx de la leche entera, y al finalizar la elaboración se obtuvo 19°Bx. Con una proporción de 130 ml de leche chocolatada en 7 envases con la adición de CMC y Carragenina.

En el primero la toma de los grados Brix en la leche fue de 10°Bx, y finalizando el proceso fue de 19°Bx. Esta formulación permitió elaborar 7 unidades de chocolatada con 130 ml en cada envase, la adición fue de tres estabilizantes.

Al tener la referencia de que los estabilizantes funcionaron en la muestra #6, se la escogió para ser usada con la interacción de los extractos etanólicos de propóleo en diferentes concentraciones al 0,5 ml.L⁻¹, 1 ml.L⁻¹, 1,5 ml.L⁻¹ el que anteriormente fue rotaevaporado para la eliminación del solvente.

Obtención del extracto etanólico del propóleo (EEP)

Recepción de la materia prima: En esta primera fase se procedió a la limpieza del propóleo con la eliminación de impurezas adheridas en el momento de la recolección y en este caso fue fundamental observar ciertas características organolépticas de la materia prima.

Congelación: El propóleo fue llevado al congelador a una temperatura de < 5°C por 6 horas, para que los cristales de hielo atravesaran el mismo y fuera más fácil trocearlo.

Troceado: Se dividió el propóleo en partes diminutas con el objetivo de que pueda diluirse en alcohol en menor tiempo.

Disolución del alcohol: Se calculó la cantidad de agua destilada en un alcohol etílico de 96° para que este contenga 70° GL.

Preparación del propóleo y el alcohol: Se pesaron 100 gramos de propóleo en 200 cc de alcohol etílico de 70° GL.

Maceración: Se realizaron constantes movimientos diarios para disolver las partículas de propóleo en el alcohol, al cabo de 30 días se obtuvo el

Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).

Filtrado: Se empleó papel whatman#41 con un estimado de 3 horas para la decantación del extracto y la eliminación de impurezas.

Rotavaporador V 700: El uso del equipo permitió la extracción del solvente del compuesto logrando concentrar el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), mediante la bomba de vacío, se redujo la presión sin que sea necesario aplicar tanto calor al sistema, ni tampoco la reducción de la cantidad de alcohol etílico presente en el mismo, el proceso tuvo una duración de 4 horas.

Envasado: Se envasó en frasco oscuro para evitar que la luz ingrese al frasco y deteriore el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), a través de reacciones fotoquímicas, de esta manera se preservó el producto.

Almacenado: Una vez envasado, no fue necesario introducir el producto en medios fríos, y por el contenido en alcohol etílico pudo mantenerse a temperatura ambiente.



Figura 1. Flujograma de obtención del extracto etanólico de propóleo

Elaboración de la leche chocolatada con extracto etanólico de propóleo (EEP)

Recepción de materia prima: En esta primera fase se verificó las características organolépticas, el estado sanitario, y la composición física química (pH, densidad, acidez) de la leche entera recién ordeñada.

Filtrado y enfriamiento: Se elaboraron registros de hallazgos de residuos físicos (impurezas, piedras, etc.) en la leche, al finalizar este procedimiento se sometió a enfriamiento <7°C.

Estandarización: El contenido de materia grasa fue de 3,8 % para la leche entera.

Dosificación: Se adicionó los siguientes aditivos: azúcar, estabilizantes y Extracto Etanólico de Propóleo

(EEP) en diferentes concentraciones con el fin de obtener un producto homogéneo.

Pasteurización: Se procedió a calentar la leche chocolatada a una temperatura de 60°C por 30 minutos.

Homogenización: Se redujo de tamaños de los glóbulos grasos y otras partículas de los aditivos con el fin de mejorar las características organolépticas de la leche chocolatada.

Envasado: Se utilizó envases de plástico (polietileno), apropiado para resistir altas temperaturas, en presentaciones de 300 ml.

Almacenamiento: Una vez terminado el producto fue almacenado en un cuarto frío manteniendo una temperatura de 4°C; ya que así se logró evitar la proliferación de agentes patógenos

Diseño experimental

Para las tres concentraciones de extracto etanólico de propóleo de 0,5 mL.L-1, 1,1 mL.L-1, 1,5 mL.L-1, la muestra testigo sin conservante y el control químico sorbato de potasio, se evaluaron las características físico químicas (pH y acidez titulable). Las evaluaciones

fueron cada siete días durante un periodo de cinco semanas, éstas se llevaron a cabo a través de un diseño bifactorial de clasificación simple univariado y para el análisis sensorial del producto se realizó un análisis de clasificación simple. En la tabla 2 se presenta la descripción de los tratamientos en estudios, la segunda columna estipula los códigos que se le otorgó al test sensorial que fue llenado por los jueces afectivos.

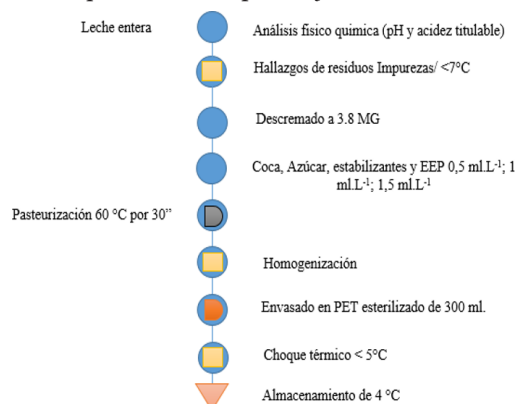


Figura 1. Flujograma de elaboración de leche chocolatada con extracto etanólico

Tabla 2. Descripción de los tratamientos en estudio

Nº	TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	NORMAS INEN
Químico sintético		3 Réplicas con Sorbato de potasio.	
Testigo		3 Réplicas con leche sin conservante.	
T1	516	3 Réplicas con EEP 0,5 mL.L ⁻¹	Referencia de la norma 2395:2011 para leches fermentadas de kumis.
T2	408	3 Réplicas con EEP 1,0 mL.L ⁻¹	
T3	315	3 Réplicas con EEP 1,5 mL.L ⁻¹	

Análisis estadísticos

El estudio que se aplicó fue un ANOVA multifactorial entre grupos, procedimiento indicado por el programa SPSS en la opción *Modelo lineal general univariante*, este MLG Factorial proporcionó un análisis de regresión y un ANOVA para una variable dependiente (respuesta). Para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Tukey, todos los ensayos se realizaron por triplicado analizando sus resultados correspondientes para las características organolépticas, con los tres tratamientos de extracto etanólico de propóleo (Vera Barahona & Vera Chang, 2018).

Análisis microbiológico

Se procedió a la realización de los diferentes análisis microbiológicos que fueron necesario aplicarse para cada uno de los tratamientos y sus réplicas, mediante las

técnicas y procedimientos adecuados. A continuación, se los describe:

Recuento total Aerobios Mesófilos

Se preparó una dilución de 1:10 de la muestra, envasándola en una botella de dilución se adicionó la cantidad apropiada de agua peptonada tamponada estéril con la muestra de leche chocolatada, se mezcló homogéneamente hasta ajustar su pH entre 6.6 y 7.2; volumétricamente 1ml de leche en 9ml de agua peptonada tamponada; de lo cual se tomó un 1ml de las disoluciones para ser adicionadas en placas de recuento rápido (petrifilmTM 3M) de aerobios mesófilos (*aerobic plate count AC*). Estas muestras se replicaron para los demás tratamientos, así mismo las “disoluciones se inocularon a 35°C ± 1°C por 48 horas en atmósfera aerobia y posteriormente se leyeron los resultados en un contador de colonias estándar”.

Recuento de coliformes

A partir de una dilución de 1:10 para cada una de las réplicas con sus respectivos tratamientos, se procedió a adicionar la cantidad apropiada del siguiente diluyente agua peptonada tamponada estéril y con pH ajustado a 7.2; se mezcló bien la muestra mediante los métodos usuales de los cuales se tomó 1ml de cada uno en placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) para “coliformes totales (Coliform counts CC) que fueron incubadas por 24 h ± 2 h a 37°C ± 1°C y por 24 h a 48h ± 2 h a 35°C + 1°C para determinar *Escherichia coli*”.

Aislamiento de *Salmonella spp*

Con la dilución de 1:10 para cada una de las réplicas con sus respectivos tratamientos, se procedió a adicionar la cantidad sugerida con un diluyente estéril de agua peptonada tamponada y con el ajuste de pH entre 6.6 y 7.2; se aplicó 1ml de la dilución a la placa placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) de *Salmonella* (Salx) y se dispersó para luego ser sometida a la “incubadora por 24 ± 2h a 35°C ± 1°C para determinar la presencia de *Salmonella*”.

Análisis microbiológico

Se procedió a la realización de los diferentes análisis microbiológicos que fueron necesario aplicarse para cada uno de los tratamientos y sus réplicas, mediante las técnicas y procedimientos adecuados. A continuación, se los describe:

Recuento total Aerobios Mesófilos

Se preparó una dilución de 1:10 de la muestra, envasándola en una botella de dilución se adicionó la cantidad apropiada de agua peptonada tamponada estéril con la muestra de leche chocolatada, se mezcló homogéneamente hasta ajustar su pH entre 6.6 y 7.2; volumétricamente 1ml de leche en 9ml de agua peptonada tamponada; de lo cual se tomó un 1ml de las disoluciones para ser adicionadas en placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) de aerobios mesófilos (*aerobic plate count AC*). Estas muestras se replicaron para los demás tratamientos, así mismo las “disoluciones se inocularon a 35°C ± 1°C por 48 horas en atmósfera aerobia y posteriormente se leyeron los resultados en un contador de colonias estándar”.

Recuento de coliformes

A partir de una dilución de 1:10 para cada una de las

réplicas con sus respectivos tratamientos, se procedió a adicionar la cantidad apropiada del siguiente diluyente agua peptonada tamponada estéril y con pH ajustado a 7.2; se mezcló bien la muestra mediante los métodos usuales de los cuales se tomó 1ml de cada uno en placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) para “coliformes totales (Coliform counts CC) que fueron incubadas por 24 h ± 2 h a 37°C ± 1°C y por 24 h a 48h ± 2 h a 35°C + 1°C para determinar *Escherichia coli*”.

Aislamiento de *Salmonella spp*

Con la dilución de 1:10 para cada una de las réplicas con sus respectivos tratamientos, se procedió a adicionar la cantidad sugerida con un diluyente estéril de agua peptonada tamponada y con el ajuste de pH entre 6.6 y 7.2; se aplicó 1ml de la dilución a la placa placas de recuento rápido (petrifilm™ 3M) de *Salmonella* (Salx) y se dispersó para luego ser sometida a la “incubadora por 24 ± 2h a 35°C ± 1°C para determinar la presencia de *Salmonella*”.

Este resultado se expresa el contenido en ácido láctico. “Un grado Dornic equivale a 0,1g/l de ácido láctico ó 0,01mL/L en gramos de ácido láctico por litro o kilogramo. NaOH (0.1N) libre de carbonatos (cada mililitro equivale a 0.009g de ácido láctico)” (Rodriguez, 2005).

La acidez se calcula mediante la ecuación siguiente: Siendo:

$$A = 0,09 \frac{V X N}{M} * 100$$

A = acidez titulable de la leche, en porcentaje de masa de ácido láctico.

V = Volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, cm³. N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

M= muestra de leche chocolatada.

$$A = 0,09 \frac{15,97 \text{ ml} \times 0,009}{10 \text{ ml}} \times 100 = 0,129$$

Ejemplo de acidez titulable de una réplica de la leche chocolatada sin conservante fue de 0.13°D.

Análisis sensorial

El procedimiento del test sensorial se efectuó con jueces afectivos que son “individuos que no tiene que ser seleccionados ni adiestrados, son consumidores escogidos al azar, representativos de la población a la cual se estima está dirigido el producto que se evalúa” (Vásquez et al., 2023). Estas pruebas se emplearon

en condiciones similares a las que normalmente se utilizan al consumir el producto. Para este análisis afectivo se detallaron las tres escalas que se tomaron en consideración. En primera instancia, se buscó la presentación de las muestras, los jueces afectivos procedieron a degustarlas; en segundo lugar, se añadió un código que no le permitió a los jueces afectivos el reconocimiento de las muestras; sin embargo, el investigador tenía conocimiento de que código correspondía a cada una. Luego los jueces afectivos tuvieron que adicionar una X en los valores de cada parámetro a evaluar en el test sensorial.

III. RESULTADOS: Resultados de la estandarización del proceso

Los estabilizantes CMC, Goma Xantán y el emulsificante Carragenina, se deben mezclar con un aditivo como el azúcar para garantizar la homogeneidad del producto; así mismo el extracto etanólico de propóleo debe ser rotaevaporado para la eliminación del solvente (etanol), debido a que este producto es de primera necesidad para niños, jóvenes y adultos. La tabla 3 que se muestra a continuación, hace referencia a los procesos previos a elaboración de la leche chocolatada, misma que se aplicó con la finalidad de comprobar si los estabilizantes y el emulsificador reaccionaban a la bebida, para esto se evaluó las características físicas como la sinéresis, presencia de flóculos y sedimentación, para evidenciar la existencia de estas características en el producto se les asignó un signo positivo de presencia.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos en estudio

Fórmula	Sinéresis	Presencia de flóculos	Sedimentación
Muestra 1: Goma Xantán 0,09 g	+	+	+
Muestra 2: Goma Xantán 0,11 g	+	+	+
Muestra 3: Goma Xantán 0,13 g + CMC		+	+
Muestra 4: Goma Xantán + Carragenina		+	+
Muestra 5: CMC + Carragenina	+		+
Muestra 6: Goma Xantán + CMC + Carragenina			
Muestra 7: Goma Xantán + CMC + Carragenina + EEP (0,5 ml.L ⁻¹ , 1 ml.L ⁻¹ , 1,5 ml.L ⁻¹)			

En la tabla 3, de resultados de estandarización del proceso se pudo apreciar que en las muestras 1 y 2, solo con la utilización de Goma Xantán de menor y mayor proporción existió una sinéresis, presencia de flóculos y sedimentación en la leche chocolatada lo que hizo que sea un estabilizante inadecuado para este producto.

En la muestra 3, con el empleo de Goma Xantán y CMC se apreció la presencia de flóculos y sedimentación, la sinéresis que ejerció anteriormente fue descartada, para esto se controló los niveles de proporción en gramos de cada uno de los estabilizantes.

La muestra 4, con el empleo de Goma Xantán y Carragenina, uno que es estabilizante y el otro emulsificador, permitió desaparecer la sinéresis que ejercía en el producto, además corroboró la permanencia de flóculos y sedimentación en el producto.

La muestra 5, tuvo presencia de sinéresis y

sedimentación por lo tanto, no existió presencia de flóculos en la leche chocolatada.

La muestra 6, fue la única con dos estabilizantes y un emulsificador, lo que permitió conocer que se necesita un emulsionante en la leche chocolatada para que homogenice el producto y lo preserve sin contar los parámetros que fueron evaluados.

Teniendo un precedente que fue la muestra 6 con los estabilizantes más el emulsificador, se procedió a adicionar a la muestra 7 el extracto etanólico de propóleo rotaevaporado, ante lo cual no existió sinéresis, presencia de flóculos, ni sedimentación durante el tiempo de prueba. Además, cumplió con lo establecido en la norma ecuatoriana 2395:2011 al presenciar una cifra inferior a 0,5 ml.L⁻¹ cantidad de alcohol en la leche saborizada.

Resultado de análisis microbiológicos

En la tabla 4, se representa el crecimiento esporádico de dos bacterias aerobios mesófilos (AC) y coliformes totales (CC) de todos los tratamientos que se hicieron desde el día 0 hasta la quinta semana, es decir, que los microorganismos de leche chocolatada (LCH) para AC demostraron un crecimiento desde la segunda semana con alrededor de $34,3\text{ufc/ml}^{-1}$ hasta alcanzar la quinta semana con niveles elevados sobre los 73ufc/ml^{-1} ; mientras que, los coliformes totales tuvieron un crecimiento desde la segunda semana de $23,3\text{ufc/ml}^{-1}$ con presencia hasta la quinta semana de $71,3\text{ufc/ml}^{-1}$.

Para el tratamiento de sorbato de potasio (SP) en AC, comenzaron a crecer desde la cuarta semana con niveles bajos de 6ufc/ml^{-1} hasta la quinta semana con $9,3\text{ufc/ml}^{-1}$. Así mismo, para los CC se obtuvieron en la cuarta semana niveles bajos sobre los $6,3\text{ufc/ml}^{-1}$ y alcanzando 13ufc/ml^{-1} en la quinta semana.

En el tratamiento de extracto etanólico de propóleo de $0,5\text{ml.L}^{-1}$ tuvieron crecimiento en la cuarta semana con niveles de $1,7\text{ufc/ml}^{-1}$ y en la quinta semana con $4,3\text{ufc/ml}^{-1}$, en coliformes totales solo se obtuvo en la quinta semana 5ufc/ml^{-1} . Los datos obtenidos fueron similares a los de Fatma et al., (2010) quienes evaluaron el extracto etanólico de propóleo como conservante natural para pescado fresco, en la cual no se presentaron coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus coagulosa* positiva ni esporas de *Clostridium sp*, entonces se reportó actividad bactericida y bacteriostática de

extracto etanólico de propóleo a $0,6\text{mg/ml}$. Además, Suarez et al., (2014) determinaron los parámetros microbiológicos y sensoriales de filetes de pescado preservado con propóleo bajo refrigeración que, revelaron carga microbiana inicial representados por mesófilos aerobios y psicófilos, y coliformes totales pero no se encontró diferencias significativas ($p>0,05$) para las diferentes concentraciones ($0,8, 1,2\text{mg/ml}$). La técnica de difusión se usó para probar el antagonismo entre el extracto de etanol de propóleo, pero no existió presencia de *Salmonella*, *E. Coli*, *S. aureus* y *Clostridium sp*, concordando con los resultados de este trabajo.

El extracto etanólico de propóleo de 1ml.L^{-1} se obtuvo a partir de la cuarta semana con niveles muy bajos de AC $1,3\text{ufc/ml}^{-1}$ y para la quinta semana $3,5\text{ufc/ml}^{-1}$ no se obtuvo presencia de coliformes totales.

Para el tratamiento con extracto etanólico de propóleo de $1,5\text{ml.L}^{-1}$, se obtuvo en la quinta semana un $<3\text{ufc/ml}^{-1}$, no hubo presencia en la quinta semana de CC. Cabe recalcar que el extracto etanólico de propóleo hizo efecto de preservante natural en la leche chocolatada, siendo un inhibidor que ayudó a eliminar este tipo de bacterias con mejores resultados que un preservante químico durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones.

En la siguiente tabla se presenta el resultado de los análisis microbiológicos en la leche chocolatada y se observa la presencia en ufc/ml^{-1} de crecimiento de aerobios mesófilos y coliformes totales, lo cual se encuentra mencionado en el texto ya descrito.

Tabla 4. Resultados de los análisis microbiológicos en la leche chocolatada en ufc/ml^{-1}

Semanas	Aerobios Mesófilos (ufc/ml^{-1})					Coliformes Totales (ufc/ml^{-1})					Escherichia coli (ufc/ml^{-1})	Salmonella (ufc/ml^{-1})	Listeria monocytogenes (ufc/ml^{-1})	
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3				4
Testigo	34,3	51,7	62,2	69,6	73,3			23,3	35,7	65,0	71,3			
Químico					6	9,3				6,3	9			
EEP 0,5 ml.L^{-1}					1,7	4,3						5		No presencia en ninguna de las semanas para cada uno de los tratamientos.
EEP 1,0 ml.L^{-1}					1,3	3,5								
EEP 1,5 ml.L^{-1}						< 3								

Resultado de análisis físico-químicos

Según la tabla 5, de los análisis físico-químicos realizados continuamente a la bebida chocolatada durante las cinco semanas de estudios fueron de acidez titulable y pH para cada uno de los tratamientos

por semana, con esto se comprobó la variabilidad del producto. A continuación, se presenta la tabla de resultados de los análisis físico-químicos por tratamiento.

Tabla 5. Resultados de análisis físico-químico de tratamiento pH y acidez titulable

VARIABLES	TRATAMIENTOS					Sig.	Error estándar
	Testigo	Químico	EEP 0,5 ml.L ⁻¹	EEP 1 ml.L ⁻¹	EEP 1,5 ml.L ⁻¹		
Acidez titulable (grados dornic)	0,157 ^c	0,150 ^{bc}	0,136 ^a	0,143 ^{ab}	0,138 ^a	0,000	0,0028
pH	5,70 ^a	6,15 ^b	6,13 ^b	6,25 ^b	6,26 ^b	0,000	0,067

a, b, c. Medias con diferentes subíndices difieren significativamente (p < 0,05).

Para el pH existió diferencia significativa para el testigo con respecto a los otros tratamientos. En la acidez titulable no existió diferencia significativa entre los tratamientos con extractos etanólicos de propóleo, pero son diferentes con los tratamientos testigos y químicos que presentaron resultados iguales entre ellos, lo cual indica que los tratamientos con extractos etanólicos de propóleo obtuvieron menor acidez titulable en comparación a los tratamientos antes descritos.

Acidez Titulable

Para la lectura de la figura 3. se narra la siguiente leyenda, sobre el lado derecho se encuentran los respectivos colores comenzando desde el 0.00 hasta el 5.00 que representan las semana de inicio y final de la investigación, del lado izquierdo se puede visualizar la respectivas cantidades proximales de acidez titulable, y por último en la parte inferior los tratamientos que fueron evaluados, las barras que se encuentran dentro de la figura tienen un círculo que simboliza cada tratamiento, que con el pasar del tiempo fueron ascendiendo, esta figura se lee desde la parte inferior con el color azul denominado día cero que representa la toma de acidez titulable para todas las muestras.

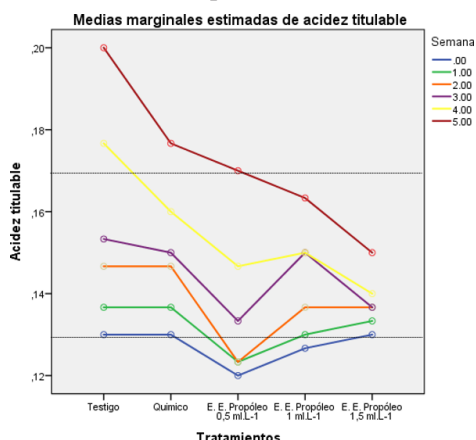


Figura 3. Análisis de tratamiento de acidez titulable

La figura 3, representa el análisis por tratamiento de acidez titulable durante los periodos de tiempo que fueron evaluados, desde el día cero hasta la quinta semana, luego de esto se presencié el comportamiento de los extractos etanólicos de propóleo en la segunda y tercera semana para el extracto etanólico de propóleo 0.5ml.L⁻¹ con 0.12 grados dornic (°D); por ende en la última semana la leche chocolatada sin conservante denominado testigo supera los 0,20°D y no es una leche apta para el consumo. Para el químico sintético sorbato de potasio supera los límites normales de 0,17°D, EEP 0,5 ml.L⁻¹ tiene 0,17°D, ligeramente sobrepasa el rango normal para la aceptabilidad de la bebida, por otra parte el extracto etanólico de propóleo de 1 ml.L⁻¹ se encuentra sobre los 0,16°D y para el extracto etanólico de propóleo (EEP) 1,5 ml.L⁻¹ con 0,15°D.

pH

Para la comprensión de la figura 4.1. se describe la siguiente leyenda, sobre el lado derecho se encuentran los respectivos colores comenzando desde el 0,00 hasta el 5,00 que representan las semanas de inicio y final de la investigación, del lado izquierdo se puede visualizar la respectivas cantidades proximales de pH, y por último en la parte inferior los tratamientos que fueron evaluados, las barras que se encuentran dentro de la figura tienen un círculo que simboliza cada tratamiento y que durante el pasar del tiempo de evaluación van decreciendo los diferentes tratamientos.

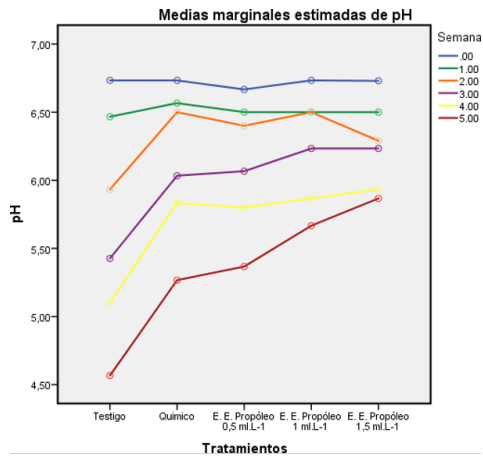


Figura 4. Análisis de tratamiento de tratamiento de pH

Según la grafica 4, se muestra que durante el día cero y la primera semana la mayoría de los tratamientos de pH se mantienen a excepción del testigo que es la leche chocolatada sin conservante denominado (LCH), durante la segunda semana el (LCH) tiene una variación de descenso que se prolonga durante las cinco semanas siendo 4,5 el pH más bajo. Durante las cinco semanas que se evaluó al tratamiento químico sintético sorbato de potasio (SP) se observa un descenso progresivo del preservante, para el parámetro de extracto etanólico de propóleo de 0.5ml.L⁻¹ está cercano a 5,5 pH; mientras que, los de 1ml.L⁻¹ y 1.5ml.L⁻¹ tienen niveles de 5,7 y 5,9 pH, éstos son los que mayor estabilidad obtienen durante las cinco semanas.

Tabla 6. Resultado de análisis físico-químicos de semana de pH y acidez titulable

Variables	SEMANAS						Sig.	Error estándar
	0	1	2	3	4	5		
Acidez Titulable (grados dornic °D)	0,127 ^a	0,132 ^{ab}	0,138 ^{bc}	0,144 ^c	0,155 ^d	0,172 ^e	0,000	0,00288
pH	6,72 ^e	6,50 ^d	6,32 ^d	5,99 ^c	5,70 ^b	5,34 ^a	0,000	0,0656

a, b, c, d, e. Media con diferencias subíndices difieren significativamente (p < 0,05)

Según la tabla 6, se presentó que existieron diferencias significativas sobre la cuarta y quinta semana de acidez titulable, pero también son diferentes con las otras semanas. Entre la primera y segunda semana para el pH, no existió diferencia significativa pero este baja considerablemente desde la tercera hasta la quinta semana, para este último puede que los extractos etanólicos de propóleo hayan incidido en la reducción de pH debido al efecto inhibitorio que existió en las muestras de la bebida chocolatada.

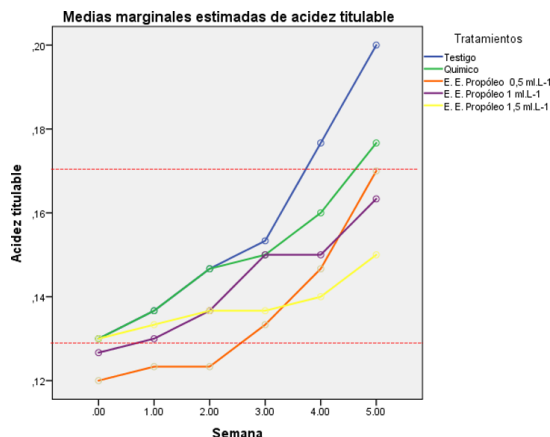


Figura 5. Análisis de semana de acidez titulable

La figura 5, representa los niveles de acidez titulable durante las cinco semanas, el comportamiento del testigo y químico señalan que hasta la segunda semana siguen la misma línea de acidez sobre los 0,14°D; mientras que, en la última semana este alcanzó niveles elevado superiores a 0,20°D, y el químico en 0,17°D. Por lo tanto, el comportamiento de los extracto etanólico de propóleo son diferentes en proporción al 0,5 y 1,0 mL.L⁻¹, respectivamente tienen valores de 0,17 a 0,16°D. El de mayor concentración de extracto etanólico de propóleo conservó la acidez titulable en la última semana de investigación en 0,15 °D.

Durante el periodo de evaluación los tres parámetros de extracto etanólico de propóleo tuvieron eficacia y se mantuvieron estables durante 5 semanas, amparados en las normas técnicas ecuatorianas INEN, (2012) para leches fluidas con ingredientes, donde los tres tratamientos estuvieron por debajo de los 0,17°D.

A continuación, la figura 6. de medias marginales estimadas de pH por semana.

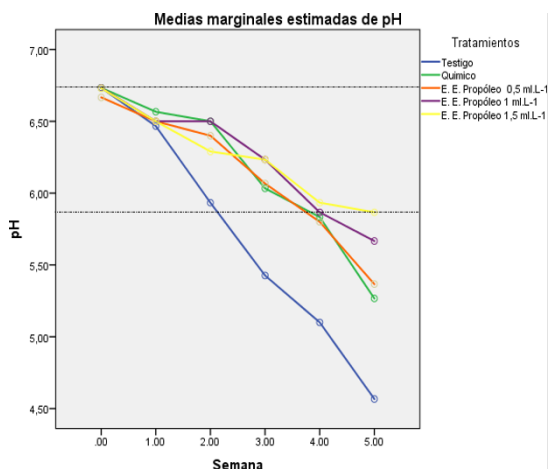


Figura 6. Análisis de semana de pH

Los parámetros de pH según la figura 6, en cada uno de los grupos se comportaron normales hasta la primera semana, luego el comportamiento por deterioro de la leche chocolatada sin conservante dio lugar a una leche ácida en la quinta semana; mientras que, el

químico sintético sorbato de potasio se asemejaría con el extracto etanólico de propóleo de 0,5 ml.L⁻¹ inferior a 5,5 de pH; la conducta de extracto etanólico de propóleo 1 ml.L⁻¹ y 1,5 ml.L⁻¹ son muy particulares, se mantienen ligeramente estables en el producto durante las cinco semanas con 5,8 de pH.

Resultado del análisis del panel sensorial

El resultado del panel sensorial fue mediante la aplicación de un test sensorial dirigido a un selecto grupo de individuos, denominados técnicamente jueces afectivos. La finalidad del test sensorial era conocer la aceptación de los encuestados, en el anexo I se encuentra el formato de test sensorial que fue aplicado a los panelistas. A continuación se presenta la tabla 7, de las medias de ANOVA, un factor para la prueba sensorial, en donde se evaluaron los tratamientos con extracto etanólico de propóleo y la incidencia en sus características organolépticas.

Tabla 7. Resultado de las medias del ANOVA de un factor para la prueba sensorial

Tratamiento	Extracto etanólico de propóleo 0,5 ml.L ⁻¹	Extracto etanólico de propóleo 1,0 ml.L ⁻¹	Extracto etanólico de propóleo 1,5 ml.L ⁻¹	Sig.	Error estándar
Apariencia	4	4,25	4,08	No existe significancia	0,342
Color	4,08	4,17	4,08		0,279
Olor	4,33	4,42	4,36		0,335
Sabor	3,67	4,5	4,17		0,358
Textura	3,83	4,58	4,08		0,359

En esta tabla se compara los resultados de las medias de un factor, para cada uno de los tratamientos y su incidencia en las características organolépticas.

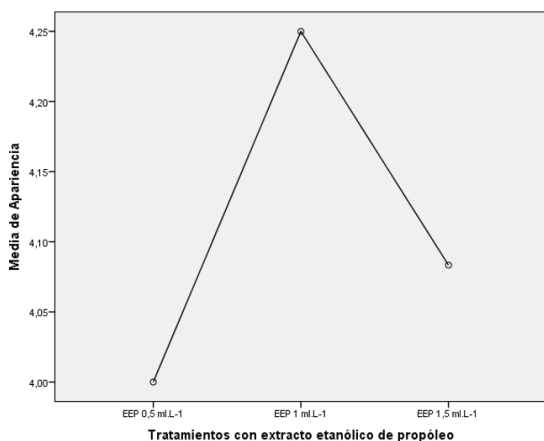


Figura 7. Media de Apariencia

La figura 7, de media de apariencia indica el nivel de aceptación dentro de los tres tratamientos de extracto etanólico de propóleo de 0,5 ml.L⁻¹, 1 ml.L⁻¹ y 1,5 ml.L⁻¹ con una escala mayor a 4,25 para el extracto etanólico de propóleo 1 ml.L⁻¹; mientras que, el de 1,5 ml.L⁻¹ tiene 4,08 y por último el de 0,5 ml.L⁻¹ es de 4,0; no existe significancia para ninguno de los tratamientos con un error típico de 0,342.

En la literatura no se reportan investigaciones de leche chocolatada en análisis sensoriales con extracto etanólico de propóleo, por lo tanto no existió discusión sobre los análisis sensoriales.

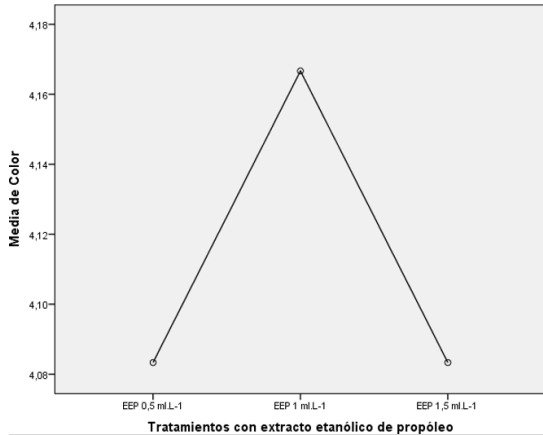


Figura 8. Media de Color

La figura 8, de la media de color indica que el de mejor tratamiento fue el extracto etanólico de propóleo (EEP) de 1 mL.L⁻¹ con 4,17; mientras los dos últimos factores evaluados están en 4,08 que son los extractos etanólicos de propóleo (EEP) de 0,5 y 1,5 mL.L⁻¹; no existe significancia pero persiste un error típico de 0,279.

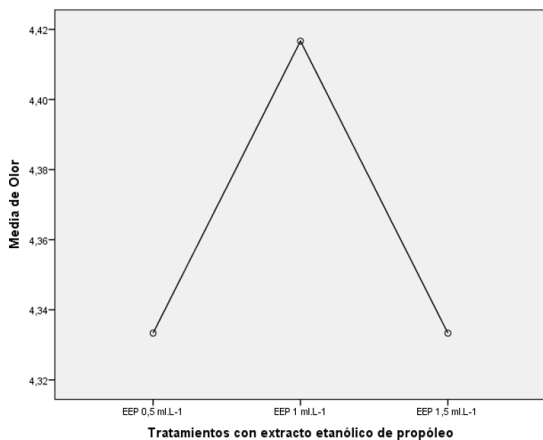


Figura 9. Media de olor

En la figura 9, en la media de olor el extracto etanólico de propóleo (EEP) 1 mL.L⁻¹ tiene mayor aceptación con 4,42 con una diferencia de 4,33 para el extracto etanólico de propóleo (EEP) de 0,5 mL.L⁻¹ y de 4,36 para extracto etanólico de propóleo (EEP) de 1,5 mL.L⁻¹, no existe diferencia significativa y el error típico fue de 0,335.

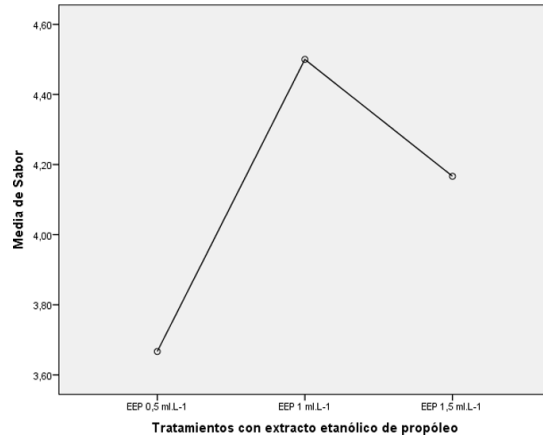
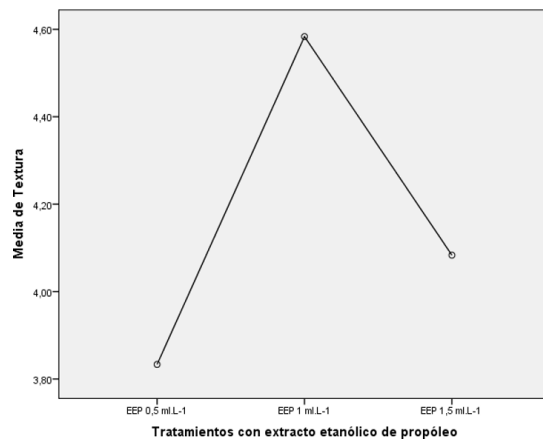


Figura 10. Media de Sabor

En la figura 10, media de sabor asemeja una mayor aceptación a extracto etanólico de propóleo (EEP) 1 mL.L⁻¹ con 4,0; mientras que, el extracto etanólico de propóleo (EEP) 0,5 mL.L⁻¹ tuvo 3,67 y el extracto etanólico de propóleo (EEP) 1,5 mL.L⁻¹ con 4,17; no existe diferencias significativas con un error típico de 0,358.



En la figura 10, media de textura se representa con 4,58 el extracto etanólico de propoleo de 1 mL.L⁻¹ es el de mayor aceptación; mientras que, el de 1,5 mL.L⁻¹ tuvo 4,08 y por último el de 0,5 mL.L⁻¹ estuvo en 3,83; no existió diferencias significativas inmersas en el parámetro de textura, se obtuvo un error típico de 0,359. Para la situación del parámetro de textura

al utilizar el extracto etanólico de propóleo incidió de manera favorable, y en este caso la elección de los jueces afectivos fue por la tendencia en las características organolépticas.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados indican que, para la elaboración de una bebida láctea chocolatada con extracto etanólico de propóleo, se debe eliminar el solvente mediante rotoevaporación y utilizar estabilizantes como la goma xantán y CMC que se añadieron en frío y caliente, sin que estas alteraran la fluidez del producto; y la participación del emulsificador en este caso la carragenina impidió el asentamiento de grumos. Con estas sustancias se garantizó la calidad de la bebida chocolatada, evitando la sedimentación, sinéresis y floculación, que de no ser empleados hubiesen alterado los sólidos presentes en la chocolatada con las diferentes dosificaciones que se utilizaron, entre ellos el extracto etanólico de propóleo.

El estudio sobre las propiedades conservadoras del extracto etanólico de propóleo en la leche chocolatada envasada en botellas plásticas, reveló mediante las muestras evaluadas que la dosis de 1ml.L-1 presentó efectos inhibitorios, que incidieron en la preservación de las características física-químicas durante el periodo indagatorio. Mientras que la dosis del sorbato de potasio, presentó un decrecimiento en la acción conservante a partir de la cuarta semana, donde se presenció aerobios mesófilos de 6ufc/ml-1 y coliformes totales 6.3ufc/ml-1.

Se establece que de las concentraciones evaluadas la que tuvo mayor aceptación por parte de los jueces afectivos fue la de 1ml.L-1 de extracto etanólico de propóleo en una leche saborizada, esto se determinó mediante la media de resultados, que evidenció una incidencia en las características organolépticas.

Las acotaciones referidas en los acápites anteriores reflejan que la utilización del extracto etanólico de propóleo en las bebidas lácteas pueden ser aplicadas sin riesgo alguno de contaminación por los microorganismos.

V. REFERENCIAS

Álvarez, M., Pineda, M., Chacón, A., & Cubrero, E. (2022). Physicochemical and sensory characteristics of whole, skimmed and lactose-free goat and bovine milks. *Agronomía Mesoamericana*, 33(2),

1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/am.v33i2.47039>

Contero, R., Requelma, N., Cachipundo, C., & Acurio, D. (2021). Calidad de la leche cruda y sistema de pago por calidad en el Ecuador. *LA GRANJA: REVISTA DE CIENCIAS DE LA VIDA*, 33(1), 31–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.17163/lgr.n33.2021.03>

Cuadros, C., Vichido, M., Montijo, E., Zárate, F., Cadena, J., Cervantes, R., Toro, E., & Ramírez, J. (2017). Actualidades en alimentación co. *Acta Pediatrica de Mexico*, 38(3), 182–201. <https://doi.org/10.18233/apm38no3pp182-2011390>

Fatma, A., Gehan, K., & Atta, O. (2010). Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria Italiana*, 46(2), 167–172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20560126>

INEN. (2012). Leche cruda. Requisitos. *Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN*, 1–7.

Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46116742014>

Suarez, H., Jiménez, Á., & Díaz, C. (2014). Determination of microbiological and sensory parameters of fish fillets with propolis preserved under refrigeration. *Revista MVZ Cordoba*, 19(3), 4214–4225. <https://doi.org/10.21897/rmvz.84>

Taipe, M., Guambi, L., Solorzano, J., Molina, C., Zambrano, T., Caiza, F., & Aranguren, J. (2022). Realidades de la ganadería bovina en la provincia de Manabí. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(4), 311–338. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i4.2588

Vásquez, L., Cortez, A., Novillo, J., & Rodríguez, A. (2024). Nutrición en la defensa inmunitaria, el papel de la leche y sus componentes naturales, revisión sistemática. *Salud, Ciencia y Tecnología*, 4(843), 1–14. <https://doi.org/10.56294/saludcyt2024843>

Vásquez, L., Vera, J., Alvarado, K., Ochoa, K., Intriago, F.,

- Raju, M., & Radice, M. (2023). Calidad sensorial de cuatro cruces experimentales de cacao adicionando pasta de frutas deshidratadas. *Revista Multidisciplinaria Desarrollo Agropecuario, Tecnológico, Empresarial y Humanista*, 5(1), 1–9. <https://investigacion.utc.edu.ec/index.php/dateh/article/view/803>
- Velázquez, G., Collado, R., Cruz, R., Velasco, A., & Rosales, J. (2019). Reacciones de hipersensibilidad a aditivos alimentarios. *Revista Alergia Mexico*, 66(3), 329–339. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.613>
- Vera Barahona, J., & Vera Chang, J. F. (2018). *Resumen de principios de diseños experimentales* (G. Compás (ed.); 1st ed.).
- Villamil, R., Robelto, G., Mendoza, M., Guzmán, M., Cortés, L., Méndez, C., & Giha, V. (2020). Desarrollo de productos lácteos funcionales y sus implicaciones en la salud: Una revisión de literatura. *Revista Chilena de Nutricion*, 47(6), 1018–1028. <https://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v47n6/0717-7518-rchnut-47-06-1018.pdf>