

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Evaluación de Diferentes Temperaturas en el Proceso de Sanitización con ETO (Óxido de Etileno) en Semillas de Chía (*Salvia hispánica*) para Consumo

Por:

HUMBERTO HERNÁNDEZ ÁVILA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila, México

Enero del 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Evaluación de Diferentes Temperaturas en el Proceso de Sanitización con ETO (Óxido de Etileno) en Semillas de Chía (*Salvia hispánica*) para Consumo

Por:

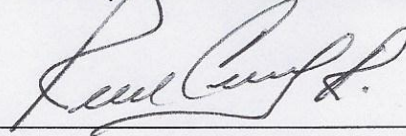
HUMBERTO HERNÁNDEZ ÁVILA

TESIS

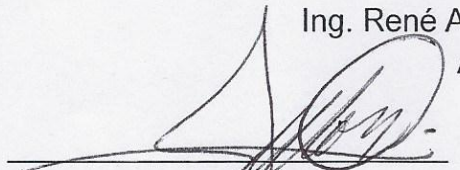
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

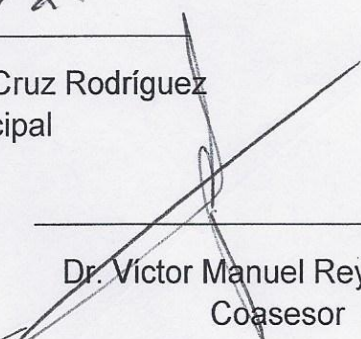
Aprobada por el Comité de Asesoría:



Ing. René Arturo De la Cruz Rodríguez
Asesor Principal



Ing. Gerardo Galindo Rodríguez
Coasesor



Dr. Víctor Manuel Reyes Salas
Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Enero del 2016

AGRADECIMIENTOS

Después de un largo camino recorrido durante el transcurso de mi carrera, le agradezco a mi Dios, que me ilumino y me invito a seguir luchando hasta el final.

A mis padres Humberto Hernández Díaz y María Ávila Hernández que estuvieron conmigo apoyándome toda la vida con tanto amor y cariño, sin dudar alguna vez para proporcionarme lo indispensable.

A mis tíos Rafael Ávila Hernández y Salvador Ávila Hernández que estuvieron siempre al pendiente de mí durante toda la carrera a los cuales los considero como mis padres.

A mis hermanos Erik y Jorge que me brindaron lo poco que tenían para que a mí no me faltara nada.

A la T.A. Martina de la Cruz Casillas

A mis profesores los cuales me aportaron todos sus conocimientos para que pudiera formarme en una persona ética, con valores y profesional.

A la MC. Sarahy del Carmen Rangel Ortega fue mi asesora y estuvo brindándome apoyo durante la realización de mi tesis.

A mis compañeros de generación por tantos conocimientos adquiridos y compartidos.

¡GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVO ESPECÍFICO	3
HIPÓTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Generalidades Semillas	4
Origen y antecedentes históricos de la Chía	5
Ubicación sistemática y características botánicas	7
Composición química de las semillas de chía	9
Aceite de chía	10
Mucílago de chía	12
Usos actuales de la chía	14
Microorganismos presentes en la semilla de chía	14
Bacterias Mesófilos y aerobias	15
Coliformes totales.....	15
Mohos y levaduras.....	16
Microorganismos patógenos	17
MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS	17
Irradiación	17
Ozono	18
Óxido de etileno	20
Características y propiedades Óxido de etileno	21
Mecanismo de acción	21
Proceso de sanitización ciclos	22
Materiales que se pueden esterilizar por ETO	22
Materiales que no se pueden esterilizar	23
Resistencia de los microorganismos frente al Óxido de etileno	23
MATERIALES Y METODOS	25
Localización Geográfica	25
Materiales	25

Material Biológico	25
Etapa I. Selección y toma de Muestras	25
Etapa II. Análisis de calidad microbiológica en laboratorio	26
Metodología	26
Siembra e Incubación	28
Conteo de microorganismos indicadores.	28
Análisis de datos	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inflorescencia de chía (<i>Salvia hispanica L.</i>) (Di Sapio, 2008).....	16
Figura 2. Semillas de chía (<i>Salvia hispanica L.</i>) (Di Sapio, 2008).....	17
Figura 3. Micrografías ópticas de semillas de chía (a) semillas secas y enteras (b) semilla entera hidratada con la formación de la “cápsula mucilaginosa”	21
Figura 4. Esquema extraído del manual: Curso de esterilización elaborado por el Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires 2009.....	30
Figura 5. Gráficos extraído del libro Esterilización en Centros Sanitarios elaborado por el CEDEST 2009.....	32
Figura 6. Comportamiento de medias de las temperatura a la que fueron expuestas las semillas al gas óxido de etileno.....	40
Figura 7. Comportamiento de medias de las disoluciones.....	41
Figura 8. Comportamiento de medias de los tipos de colonias presentes en los tratamientos.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Energía y composición centesimal correspondiente a diversos granos....	18
Cuadro 2. Caracterización comparativa de diversas fuentes de ácidos grasos ricos en ω 3.....	19
Cuadro 3. Arreglo de los tratamientos en estudio.....	34
Cuadro 4. Cuadrados medios del ANVA para la comparación de las variables.....	37
Cuadro 5. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chía.....	37
Cuadro 6. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chía.....	38
Cuadro 7. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chía.....	38
Cuadro 8. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chía.....	38
Cuadro 9. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chía.....	39
Cuadro 10. Cantidad total aproximada de microorganismos presentes en los tratamientos.....	39

RESUMEN

Ante la problemática que se presenta sobre el tema relacionado con la calidad e inocuidad de los alimentos que se consumen en crudo como lo es el caso de las semillas que proveen una importante fuente de proteínas, ha dado lugar para que realizara una investigación que tenga como finalidad la evaluación y aplicación de métodos de sanitización adecuados, de tal forma que la puesta en práctica de estos métodos permitan a la población el consumo de alimentos inocuos.

En el presente trabajo se realizó durante el período marzo - mayo de 2015, en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para determinar a qué temperatura se podrían reducir al máximo la cantidad de microorganismos presentes en la semilla de chía ya que en la actualidad está ganando auge dentro de la alimentación por sus altos beneficios nutritivos. Se utilizaron 5 tratamientos en bolsas de 10 gramos de semilla de chía sanitizada con óxido de etileno (ETO), a diferentes temperaturas; 26c°, 28c°,30°,32c° y un testigo, mediante disoluciones seriadas; -1,-2,-3,-4- con 2 repeticiones cada una para bacterias mesofilas aerobias, coliformes, hongos y levaduras.

Para evaluar la efectividad de los métodos de desinfección se realizaron análisis microbiológicos para determinar la reducción o inhibición de microorganismos tales como: mesófilos aerobios, hongos y levaduras. Tomando los resultados de los análisis microbiológicos así como los límites permisibles.

La reducción de microorganismos fue total en los tratamientos tratados con el gas óxido de etileno, lo cual asegura la efectividad del mismo, sin haber presencia en los mismos, aunque en el caso del testigo si hubo una presencia

considerable de estos patógenos; se presentaron en la disolución -1 en la repetición 1 y 2 para bacterias aerobias y mesofilos.

Palabras clave: óxido de etileno, sanitización, temperatura, microorganismos.

Correo Electronico; Humberto Hernández Avila, humheravi@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los efectos positivos o negativos de nuestra alimentación, tendrán repercusión, más tarde o más temprano, en nuestra salud. Por ello, debemos adecuar nuestra alimentación a las necesidades nutricionales de nuestro organismo, en función de la edad, género, actividad y situaciones fisiológicas especiales (embarazo, enfermedad, lactancia). A través de la alimentación obtenemos del entorno una serie de productos naturales o transformados, que contienen sustancias químicas y nutrientes. Entre los macronutrientes que componen la dieta habitual se encuentran las grasas. Si bien tienen una connotación negativa en el saber popular, debido a su asociación con las enfermedades cardiovasculares y la obesidad, en los últimos años se ha incrementado el interés científico y público en el rol de ciertas grasas denominadas ácidos grasos poliinsaturados. Es así como las autoridades sanitarias recomiendan aumentar el consumo de ácido graso poliinsaturado omega-3, en especial los de cadena larga (EPA y DHA), cuya fuente principal es el pescado. Sin embargo, las sociedades occidentales modernas tienden a incluirlo muy poco en la dieta. Posiblemente su elevado precio hace que en muchas ocasiones el consumidor prefiera otros alimentos de mayor comodidad y menor precio. Una forma eficaz de aumentar la ingesta es la fortificación o la adición de ácidos grasos omega tres a alimentos de uso cotidiano. La tecnología moderna de alimentos hace posible hoy en día que una gran cantidad de alimentos pueda ser enriquecida con ácidos grasos omega tres y, de hecho, existe en todo el mundo una gran variedad de productos alimenticios enriquecidos. Si consideramos que la producción de alimentos enriquecidos con ácidos grasos omega-3 es técnicamente difícil y requiere de métodos especiales para producir un aceite de pescado adecuado, apropiado para la adición a alimentos, sin olor ni sabor a pescado, las materias primas ricas en

omega tres de origen vegetal como la semilla de Chía (*Salvia hispánica*) y específicamente galleta con semilla de Chía es 2 una opción disponible que puede ser eficaz en la reducción de factores de riesgo de enfermedades, sustituyendo a los suplementos alimenticios sin originar cambios en los hábitos alimentarios del consumidor (Carrero, 2005).

JUSTIFICACIÓN

El tema de la calidad e inocuidad de los alimentos que consumimos hoy en día es algo preocupante en la actualidad, ya que muchos de ellos contienen microorganismos que pueden acarrear problemas severos que afectan la salud. Es necesario saber si con los métodos de sanitización utilizados, realmente se puede eliminarse la cantidad de carga microbiana.

Es por ello que este trabajo se realizó, ya que la sanitización de alimentos con el óxido de etileno es una técnica que está ganando auge en el tema de inocuidad, es por ello que se realizó un estudio comparativo utilizando como material biológico semillas de chía expuestas al gas óxido de etileno (ETO) a diferentes temperaturas en 5 tratamientos, el cual se realizó en el laboratorio de ciencia y tecnología de alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

OBJETIVO GENERAL

Conocer si el gas óxido de etileno, funciona verdaderamente como un método confiable para la sanitización de semillas que se consumen en crudo.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar en qué tratamiento se reducirá al máximo la cantidad de microorganismos patógenos sin afectar sus cualidades organolépticas.

HIPÓTESIS

Al exponer la semilla al gas óxido de etileno, la cantidad de carga microbiana se reducirá hasta niveles que no afecten la salud humana.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades Semillas

Las semillas son el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas. Éstas desempeñan una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, regeneración de los bosques y sucesión ecológica. En la naturaleza, las semillas son una fuente de alimento básico para muchos animales. También, mediante la producción agrícola, la semilla es esencial para el ser humano, cuyo alimento principal está constituido por semillas. El incremento de la población mundial junto con la reducción de recursos alimenticios provoca la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas a partir de alimentos no convencionales. Las semillas oleaginosas han adquirido un creciente interés como fuentes de proteínas comestibles (Vioque et al., 1999).

Muchas semillas son comestibles y la mayoría de las calorías humanas proceden de las semillas, especialmente de las legumbres y frutos secos. Las semillas también ofrecen la mayoría de aceites de cocina, bebidas y muchas especias y algunos importantes aditivos alimentarios. En diferentes semillas, el embrión de la semilla o el endospermo domina y proporciona la mayor parte de los nutrientes, dentro de las 10 semillas más saludables del mundo podemos encontrar: semilla de cártamo, granada, de lino, de calabaza, albaricoque, sésamo, girasol, comino, uva y chía. Estas semillas proveen una fuente invaluable de proteínas (Desai et al., 1997).

Origen y antecedentes históricos de la Chía

Salvia hispánica L. es una especie originaria de Mesoamérica cuya mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico (Beltrán-Orozco y Romero, 2003; Cahill, 2004), siendo nativa de las áreas montañosas del oeste y centro de México. Es comúnmente conocida como chía, siendo esta palabra una adaptación española al término nahua chían o chien (plural), término que en náhuatl significa “semilla de la que se obtiene aceite” (Watson, 1938).

Existen evidencias que demuestran que la semilla de chía fue utilizada como alimento hacia el año 3500 a.C., siendo cultivada en el Valle de México entre los años 2600 y 900 a.C. por las civilizaciones teotihuacanas y toltecas. Asimismo, fue uno de los principales componentes de la dieta de los aztecas junto con la quinoa, el amaranto, el maíz y cierta variedad de porotos (Rodríguez, 1992).

La chía era utilizada como materia prima para la elaboración de medicinas, alimentos y pinturas, así como en ofrendas a los dioses durante las ceremonias religiosas. Con la llegada de los españoles, las tradiciones de los nativos fueron suprimidas y la mayor parte de su agricultura intensiva y su sistema de comercialización destruidos. Muchos cultivos que habían tenido preponderancia en las dietas precolombinas fueron prohibidos por los españoles debido a su estrecha asociación con los cultos religiosos, siendo reemplazados por especies exóticas (trigo, cebada, arroz, entre otras) demandadas por los conquistadores (Engel, 1987). Así, de los cuatro cultivos básicos (chía, amaranto, quinoa y maíz) de la dieta azteca, la chía y el amaranto perdieron sus lugares de privilegio y casi desaparecieron, siendo mayores los efectos de la persecución española sobre la chía. Sin embargo, esta especie logró sobrevivir debido a la conservación de algunas tradiciones precolombinas por parte de pequeños grupos de descendientes de las naciones Nahua. Así, estos pueblos lograron vencer a los conquistadores y a las presiones de la cultura impuesta, permaneciendo aislados en el sudoeste de México y las zonas montañosas de

Guatemala. Actualmente, los descendientes de los Nahuas y de los Mayas utilizan este grano ancestral en una popular bebida denominada chía fresca (Ayerza y Coates, 2005).

Durante muchos años las semillas de chía fueron comercializadas solamente en los mercados mexicanos y utilizada como materia prima para la elaboración de la bebida denominada chía fresca, la cual era consumida por razones étnicas o religiosas. En 1965 la chía comenzó a estar disponible en comercios dietéticos del sudeste de California y Arizona y hacia finales de los años 1980s se empezó a comercializar en los Estados Unidos un alimento para mascotas (Chía Pets), incrementándose la demanda de las semillas y posibilitando la venta mayoritaria de su producción (Ayerza y Coates, 2005).

En 1991 se inició el Proyecto Regional del Noroeste de Argentina con el fin de identificar y llevar a producción comercial nuevos cultivos industriales que pudieran ayudar a diversificar la producción agrícola e incrementar las ganancias de los agricultores de dicha región. Desde su comienzo, organizaciones privadas y gubernamentales de los Estados Unidos y Argentina han trabajado en este proyecto en forma cooperativa. Durante el curso del proyecto, si bien ciertas especies, tales como “kenaf” (*Hibiscus cannabinus L.*) y “lesquerella” (*Lesquerella fendleri L.*) fueron cultivadas comercialmente por su mayor potencial para la región, la chía fue identificada como la especie más promisoría (Ayerza y Coates, 2005).

Paralelamente, los resultados de las investigaciones científicas acerca de los efectos negativos de las grasas saturadas, los ácidos grasos trans y del desbalance entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 en la dieta occidental así como los beneficios del incremento del consumo de ácidos grasos ω -3 para prevenir enfermedades cardiovasculares, depresión, cáncer y otras patologías comenzaron a tener cada vez un mayor interés. Asimismo, la información sobre la chía, fuente natural de ácidos grasos ω -3, antioxidantes y fibra dietética, acrecentó las expectativas en torno a su cultivo. En virtud de ello, su uso como alimento comenzó a expandirse fuera de México (Ayerza y Coates, 2005).

La composición química y el valor nutricional asociado, le confieren un gran potencial para incorporarla en la industria alimentaria. A su vez, la información tecnológica disponible brinda una excelente oportunidad para el desarrollo de una industria agrícola capaz de ofrecer al mundo un “cultivo nuevo y antiguo a la vez” (Ayerza y Coates, 2005). Actualmente, la European Food Safety Authority (EFSA, 2009) emitió dictamen sobre la inocuidad de las semillas enteras y trituradas como ingredientes alimentarios. Además, dicho organismo autorizó su comercialización para ser utilizadas en productos de panadería con un contenido máximo del 5%. Posteriormente, a partir de 2013 la semilla de chía se introduce como ingrediente alimentario en diversos productos tales como cereales de desayuno, mezclas de frutas, frutos secos y semillas y como semillas preenvasadas (Haros, 2013).

Ubicación sistemática y características botánicas

Según la clasificación taxonómica propuesta por Linneo, la posición sistemática de la chía (*Salvia hispánica* L.) es la siguiente:

Reino: *Vegetal o Plantae*

División: *Magnoliophyta o Angiospermae*

Clase: *Magnoliopsida o Dicotyledoneae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Subfamilia: *Nepetoideae*

Tribu: *Mentheae*

Género: *Salvia*

Especie: *hispánica*

La familia Lamiáceae cuenta con 170 géneros y más de 3000 especies de amplia distribución en regiones tropicales y templadas, de las cuales en Argentina existen alrededor de 26 géneros. Son hierbas anuales o arbustos perennes, que contienen aceites esenciales en los pelos glandulares de sus hojas y tallos, motivo por lo cual han sido domesticadas para ser utilizadas como condimentos y en la elaboración de perfumes. El género *Salvia* incluye unas 900 especies y se distribuye extensamente en varias regiones del mundo, tales como Sudáfrica, América Central, América del Norte, Sudamérica y Asia Sur-Oriental. Las plantas pueden ser herbáceas o leñosas, y sus flores muy atractivas y de varios colores (Burkart, 1979).

Salvia hispánica es una planta herbácea anual, que se desarrolla desde 1 a 1,5 m de altura según la fecha de siembra, con tallos ramificados de sección cuadrangular con pubescencias cortas y blancas. Presenta hojas opuestas con bordes aserrados de 8-10 cm de longitud y 4-6 cm de ancho. La descripción de la morfología floral de *S. hispánica* fue abordada Ramamoorthy (1985). Las flores son hermafroditas, púrpuras o blancas, pedunculadas y se encuentran reunidas en grupos de seis o más en ramilletes terminales (Figura 1).



Figura 1. Cultivo inflorescencia de chía (*Salvia hispánica* L.) (Di Sapio, 2008).

El fruto, al igual que otras especies de la familia Lamiáceae, es típicamente un esquizocarpo consistente en lóculos indehiscentes que se separan para formar 4 mericarpios parciales denominados núculas, comúnmente conocidos como semillas, los cuales son monospermiados, ovales, suaves y brillantes, de color pardo grisáceo con manchas irregulares marrones en su mayoría y algunos blancos (Ayerza y Coates, 2005).



Figura 2. Semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) (Di Sapiro, 2008)

Las características morfológicas y fenológicas que diferencian a las variedades domesticadas de las silvestres de *S. hispanica* son cálices cerrados, semillas de mayor tamaño, inflorescencias más compactas, flores más grandes, presencia de dominancia apical y uniformidad en los períodos de floración y maduración (Cahill, 2005).

Composición química de las semillas de chía

El cuadro 1. Muestra la composición de las semillas de chía y la correspondiente a los cinco cereales de mayor importancia a nivel mundial (arroz, cebada, avena, trigo, maíz). En la misma, puede observarse que el contenido de proteínas, lípidos y fibra, así como la energía aportada por la semilla de chía son mayores que los presentes en los demás granos. La chía es conocida principalmente como una importante fuente de ácidos grasos esenciales ω -3, además aporta elevados niveles de fibra dietética, compuestos

fenólicos, proteínas, minerales y vitaminas liposolubles como A, D, E y K (Tosco, 2004; Ixtaina, 2010; Capitani, 2013).

Cuadro 1. Energía y composición centesimal correspondiente a diversos granos

Grano	Energía Kcal/100g	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas
%						
Arroz	358	6,5	0,5	79,1	2,8	0,5
Cebada	354	12,5	2,3	73,5	17,3	2,3
Avena	389	16,99	6,9	66,3	10,6	1,7
Trigo	339	13,7	2,5	71,1	12,2	1,8
Maíz	365	9,4	4,7	74,3	3,3	1,2
Chía	350	19-23	30-35	9-41	18-30	4-6

United States Department of Agriculture (2002); 2Ayerza y Coates (2004); 3Diario oficial de la Unión Europea (2009).

Aceite de chía

En el año 2009, mediante Resolución Conjunta 76/2009 y 391/2009 Modificación (06/2009), se autorizó el uso de aceite de chía exclusivamente en suplementos dietarios, en los términos del Artículo 1381 del Código Alimentario Argentino (CAA, 2008).

El contenido de aceite presente en la semilla de chía es de alrededor de 33%, el cual presenta el mayor porcentaje de ácido α -linolénico conocido hasta el momento (62 - 64%) (Ayerza, 1995). Por otra parte, se ha informado elevados contenidos de ácido α -linolénico en aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana*) de alrededor de 53,9% y en lino (57,5%) (Ixtaina, 2010; Ruiz, 2013).

Actualmente, se disponen en el mercado de cuatro fuentes de ácidos grasos ω -3. Las dos más importantes en volumen de producción son las asociadas al pez “menhaden” (*Brevoortia tyrannus*) y a la semilla de lino, mientras que la fuentes minoritarias son la semilla de chía y las algas marinas. El cuadro 2 muestra una caracterización comparativa del perfil de ácidos grasos de dichas fuentes. De estas cuatro materias primas, el lino y la chía son los cultivos agrícolas que presentan la mayor concentración conocida de ácido α -linolénico, sin embargo, a diferencia del lino, la semilla de chía no tiene factores antinutricionales (Ayerza, 1995; Oomah y Kenasehuk, 1995). Las fuentes de origen vegetal a nivel terrestre presentan contenidos de ácidos grasos linoleico y linolénico mucho mayores con respecto a las fuentes marinas, así como un menor tenor de ácidos grasos saturados.

Cuadro 2. Caracterización comparativa de diversas fuentes de ácidos grasos ricos en ω -3.

AECITE	Ácido graso (% del total de ácidos grasos)										
	14:0	16:0	16:1 ¹	18:0	18:1 ²	18:2 ³	18:3 ⁴	20:4 ³	20:5 ⁴	22:5 ⁴	22:6 ⁴
“Menhaden”	8,0	15,2	10,5	7,8	14,5	2,1	1,5	1,2	13,2	4,9	8,6
Algas	4,2	14,5	27,6	0,8	5,4	2,3	1,7	4,7	27,7	-	-
Chia	-	6,9	-	2,8	6,6	19,0	63,8	-	-	-	-
Lino	-	5,5	-	1,4	19,5	15,0	57,5	-	-	-	-

14:0 = ácido mirístico; 16:0 = ácido palmítico; 16:1 = ácido palmitoleico; 18:0 = ácido esteárico; 18:1 = ácido oleico; 18:2 = ácido linoleico; 18:3 = ácido α -linolénico; 20:4 = araquidónico; 20:5 = ácido eicosapentanoico (EPA); 22:5 = docosapentanoico (DPA); 22:6 = ácido docosahexanoico (DHA); 1 ω -7; 2 ω -9; 3 ω -6; 4 ω -3

(Adaptada de Ayerza y Coates, 2005).

Cabe señalar que los aceites de chía, lino y algas marinas se diferencian del obtenido a partir del pez “menhaden”, dado que éste último contiene cantidades apreciables de colesterol (521 mg/100 g) y ácidos grasos poliinsaturados EPA (22:5) como DHA (22:6) (United States Department of Agriculture, 2002). La evidencia científica muestra que tanto EPA (22:5) como DHA (22:6) pueden ejercer efectos benéficos para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Song y col., 2000). Sin embargo, estos ácidos grasos poliinsaturados son muy susceptibles a sufrir procesos de oxidación y deterioro, lo cual está asociado a cambios indeseables de sus propiedades organolépticas (Kleiner, 2013). Dichos compuestos se oxidan más rápidamente que los ácidos linoleico, α -linolénico y araquidónico, originando productos de oxidación con implicancias desde el punto de vista toxicológico (Freese y Mutanen, 1997).

Por otra parte, en lo que respecta al enriquecimiento de alimentos con ω -3, la chía no presenta ni transmite el característico “olor a pescado”, la estabilidad de dichos ácidos grasos ω -3 es otorgada por los antioxidantes naturales presentes en la semilla (Tosco, 2004).

Mucílago de chía

El análisis comparativo del contenido de fibra de las semillas de chía (18-30%) respecto al de otros cereales, permite apreciar que la chía tiene 1,6; 2,3; 2,6; 8,3 y 9,8 veces más contenido de fibra dietética que la cebada, trigo, avena, maíz y arroz, respectivamente (ver Tabla 1.3). El contenido de fibra en la harina residual de chía -luego de la extracción de aceite- representa alrededor de un 40%, del cual un 5% corresponde a fibra soluble, denominada mucílago. Las semillas de chía contienen 5-6% de mucílago que se puede utilizar como fibra dietética (Reyes Caudillo y col., 2008).

Los mucílagos son constituyentes normales de los vegetales, producto de su metabolismo y se acumulan en células especiales dentro de los tejidos. Se localizan como material de reserva hidrocarbonado, reserva de agua en plantas

o bien como elementos estructurales en vegetales inferiores (algas), proporcionándoles elasticidad y suavidad (Lin y col., 1994).

El mucílago de las semillas de chía es un polisacárido de alto peso molecular se encuentra en las tres capas exteriores de la cubierta de la semilla. Cuando la semilla entra en contacto con el agua, el mucílago emerge inmediatamente y en un corto período se forma un "cápsula mucilaginosa" transparente que rodea la semilla (Figura 3.) (Muñoz y Col., 2012).

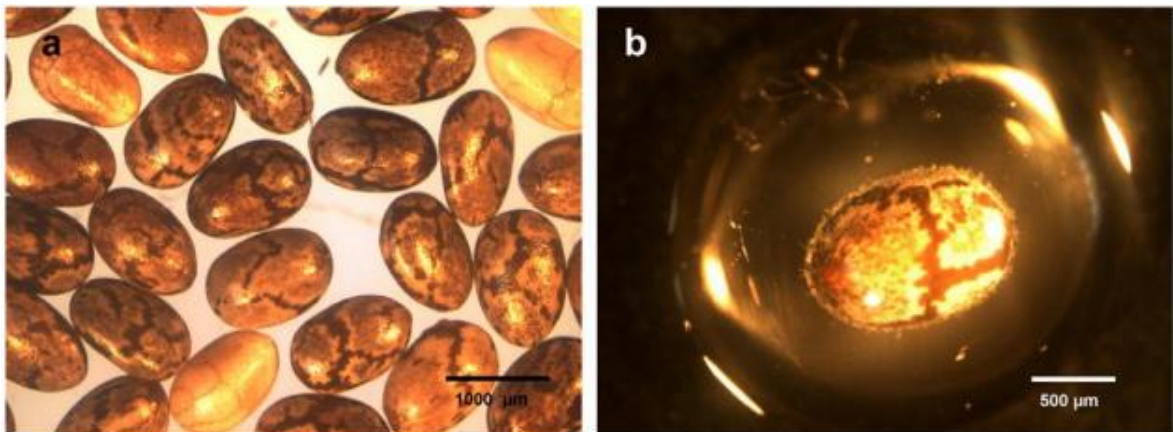


Figura 3. Micrografías ópticas de semillas de chía (a) semillas secas y enteras (b) semilla entera hidratada con la formación de la “cápsula mucilaginosa”

Las unidades estructurales que componen el mucílago de la semilla de chía, fueron descritas como un tetrasacárido con una cadena principal compuesta por unidades de (1→4)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-xilopiranosil con ramificaciones de 4-O-metil-α-D-ácido glucurónico en la posición O-2 de β-D xilopiranosil de la cadena principal. La relación de los monosacáridos β-D-xilosa, α-D-glucosa y ácido 4-O-metil-α-D-ácido glucurónico es de 2:1:1. Cabe destacar que el contenido de ácido glucurónico es elevado (aproximadamente 25%), característico de este tipo de sustancias (Lin y Col., 1994).

Usos actuales de la chía

La información existente en cuanto a sus propiedades funcionales es reciente e indica que se trata de un polímero con acción espesante (Lin y col., 1994). También se destaca por sus propiedades gelificantes, control de la sinéresis, estabilización de emulsiones, etc (Phillips y Williams, 2000). La alta solubilidad y capacidad de retención de agua del mucílago de chía le confieren potencialidad como ingrediente funcional para ser utilizado en diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (Capitani y Col., 2012; 2013).

La ingesta de mucílago de chía, sólo o en combinación con la semilla, ha demostrado tener influencia en el metabolismo de lípidos, mediante la disminución de la absorción intestinal de ácidos grasos, colesterol y el arrastre de sales biliares, aumentando la pérdida de colesterol a través de las heces, además de inhibir la síntesis endógena de colesterol y la desaceleración de la digestión y la absorción de nutrientes. Además, como constituyente de la fibra dietética soluble, origina geles de alta viscosidad que producen enlentecimiento del vaciado gástrico y brinda sensación de saciedad (Hentry y col., 1990).

Microorganismos presentes en la semilla de chía

Por lo general los microorganismos que contaminan a las semillas, se encuentran en la parte externa de los granos que han sido cosechados; estos microorganismos pertenecen a la flora natural en la que se encontraba el grano o también estos son contaminados por factores extrínsecos como son los contaminantes del suelo, aire, agua, animales, entre otros (SEPV 2013).

En los últimos años ha aumentado espectacularmente la popularidad de las semillas ya que muchos aprecian su alto valor nutritivo. Sin embargo el reciente aumento de los casos notificados de enfermedades transmitidas asociadas con semillas crudas ha suscitado preocupación entre los organismos que se ocupan de la salud pública y los consumidores en cuanto a la inocuidad de dichos productos. Entre los patógenos microbianos asociados con las semillas cabe citar mesófilos aerobios, hongos y levaduras y coliformes (SEPV 2013).

Uno de los principales hospederos de estos productos es la *Plodia interpunctella* o Palomilla, es una plaga muy común se alimenta principalmente de productos de granos y semillas almacenados, la cual estando en fase de larva o insecto adulto puede ser relativamente fácil observable, sin embargo en fase de huevo o pupa es prácticamente imposible de detectar, los alimentos quedan muy contaminados por los capullos y las heces, por lo tanto es muy importante que en todos los almacenes exista un control de producto sanitizado (SEPV 2013).

Bacterias Mesófilos y aerobias

Microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20 y 45°C con una temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 40°C. (INEN, 2006). Son microorganismos viables, la variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente. El recuento de estos microorganismos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento (NOM-092-SSA1-1994).

Según Vanderzant y Splittstoesser (1992), se agrupan en dos géneros importantes: *Bacillus* y *Sporolactobacillus* formadores de endoesporas. Las especies encontradas en los alimentos son generalmente extensas y no poseen un hábitat definido y en general no provocan enfermedades en el ser humano. Son utilizados como indicadores de la calidad del procesamiento.

Coliformes totales

Los coliformes son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35 °C fermentan la lactosa con la producción de gas bajo condiciones específicas. Estas bacterias fermentan la lactosa incubadas a 35 ±1°C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de

ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación (NOM-112-SSA-1994).

El término bacterias coliformes se utiliza para designar a las enterobacterias más frecuentemente encontradas en los productos lácteos. El recuento es una de los medios más significativos para apreciar la calidad de la leche. Son los responsables de graves enfermedades infecciosas que pueden adquirir carácter epidemiológico (González *et al.*, 2007).

Según la EPA (2002), los coliformes no constituyen una amenaza para la salud; su determinación se usa para indicar si pudiera haber presentes otras bacterias posiblemente patógenas. Su presencia indica que los alimentos podrían estar contaminados con heces fecales humanas o de animales. Los microbios que provocan enfermedades (patógenos) y que están presentes en las heces causan: diarrea, retortijones, náuseas, cefaleas u otros síntomas. Estos patógenos podrían representar un riesgo de salud muy importante para bebés, niños pequeños y personas con sistemas inmunológicos gravemente comprometidos.

Mohos y levaduras

Los hongos tienen una estructura filamentosa con ramificaciones, las levaduras son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Crecen a 25°C. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal del alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico del alimento, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Pueden sintetizar metabolitos tóxicos termorresistentes, y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. (NOM-111-SSA1-1994)

Los hongos y las levaduras en algunos tipos de quesos pueden provocar periódicamente problemas tanto económicos como sensoriales. La

contaminación es causada porque están presentes en el medio ambiente, como en las paredes y los estantes de maduración, aire, equipos, agua, salmuera, etc. (Godic y Venus, 2008).

Microorganismos patógenos

La E. coli es una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos de los animales. Son Gram negativas, anaerobias facultativas, no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. La E. coli es casi exclusivamente de origen fecal y se transmite a través de la contaminación de los alimentos y del agua, así como también de la contaminación cruzada EHEC (O157:H7). (FAO, S/A).

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS

Irradiación

Los rayos gamma se emiten desde formas radioactivas del elemento cobalto (cobalto 60) o del elemento cesio (cesio 137). La radiación gamma se usa en forma rutinaria para esterilizar productos médicos, dentales y para el hogar y también para el tratamiento de radiación contra el cáncer (FDA, 2014).

Los rayos X se producen por la reflexión de un flujo de electrones hiperenergéticos de una sustancia objetivo (por lo general un metal pesado) hacia el alimento. Además, los rayos X se usan ampliamente en la medicina y en la industria para producir imágenes de estructuras internas (FDA, 2014).

La irradiación puede servir para muchos propósitos:

- Prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos – La irradiación se puede usar para eliminar de forma efectiva los organismos que producen enfermedades transmitidas por los alimentos como Salmonella y Escherichia coli (E. coli).

- Conservación – La irradiación se puede usar para destruir o inactivar los organismos que producen la descomposición y para extender la vida de los alimentos en el anaquel.

- Control de insectos – La irradiación se puede usar para destruir insectos en el interior o sobre frutas tropicales importadas a los Estados Unidos. Además, la irradiación disminuye la necesidad de usar otras prácticas para el control de plagas que pueden dañar la fruta.

- Retraso de la germinación y la maduración – La irradiación se puede usar para inhibir la germinación (por ejemplo, de los porotos) y para retrasar la maduración de la fruta y aumentar su duración.

- Esterilización – La irradiación se puede usar para esterilizar alimentos que luego se pueden almacenar por años, sin refrigeración. Los alimentos esterilizados se pueden usar en hospitales para pacientes con sistemas inmunológicos gravemente dañados, como los pacientes con SIDA o que están sometidos a quimioterapia. Los alimentos esterilizados por medio de la irradiación están expuestos a niveles de tratamiento sustancialmente mayores que aquellos que se aprobaron para uso normal (FDA 2014).

Ozono

U.S. Patente 6,120,822 (2000) Adrian Denvir, et al.: proponen un sistema que usa ozono gaseoso para descontaminar productos agrícolas contaminados con toxinas y microorganismos. U.S. Patente 6,294,211 B1(2001) James Yuan y Edward Steiner: proponen también un proceso con ozono gaseoso para desinfectar y/o sanear productos alimenticios, el cual reduce o elimina microorganismos patógenos, bacterias o hongos y virus. El ozono es un gas que se obtiene por procesos electroquímicos, por descarga de a someter el oxígeno a radiación ultravioleta con una longitud de onda de 200 nm. El ozono ha sido usado por décadas para esterilizar y preservar alimentos. Debido a la poderosa acción oxidante del ozono, su principal uso es en la desinfección de

sustancias sólidas, líquidas y gaseosas. Así mismo posee acción antimicrobiana con poder bactericida, viricida y esporicida penetrando la pared celular de los microorganismos para finalmente destruirlos.

El ozono introducido en un ambiente cualquiera realiza tres acciones fundamentales:

Acción microbicida: Es quizá la propiedad más importante del ozono, y por la que más aplicaciones se le atribuyen. El concepto microbio, como es sabido, es muy amplio. En principio, microbio es toda forma de vida que no puede ser vista por el ojo humano, y que se requiere el uso del microscopio para ser observado. Estos seres vivos permanecen muchas veces sobre todo tipo de superficies, en todo tipo de fluidos, o bien flotan en el aire asociados a pequeñas motas de polvo, minúsculas gotas de agua en suspensión, etc. Es bastante frecuente que ellos sean responsables de la transmisión de todo tipo de enfermedades contagiosas, especialmente en sitios cerrados donde haya gran número de personas, y el aire se renueva muy lentamente. El control de algunos de estos microorganismos, llamados patógenos por su capacidad de provocar enfermedades contagiosas, ha sido una gran preocupación del hombre, desde el momento en que fueron descubiertos (The Merck Index. 2006).

Efecto bactericida: Es bien conocido desde principios de siglo, donde se empezó a usar para el tratamiento de aguas. Actualmente nos servimos de él, tanto para el tratamiento de todo tipo de aguas, como para tratar ambientes e incluso directamente sobre el organismo humano con fines terapéuticos. Una de las ventajas más importantes del ozono con respecto a otros bactericidas es que este efecto se pone de manifiesto a bajas concentraciones (0.01 p.p.m., o menos) y durante periodos de exposición muy cortos. Incluso a concentraciones ínfimas de ozono (del orden de 0.01 p.p.m.) es ya perfectamente observable un efecto bacteriostático. 8 La diferencia entre un efecto bactericida y un efecto bacteriostático es sencilla; un agente bactericida es aquel, capaz de matar a las bacterias, sin embargo un agente bacteriostático no llega a matarlas, pero si las

impide reproducirse, frenando rápidamente el crecimiento de sus poblaciones (The Merck Index. 2006).

Efecto virulicida: Los virus son pequeñas partículas, hoy consideradas frontera entre los seres vivos y la materia inerte, que no son capaces de vivir ni de reproducirse si no es parasitando células a las que ocasiona su destrucción. A diferencia de las bacterias, los virus siempre son nocivos y provocan enfermedades a todo organismo al que atacan. Enfermedades tan comunes como la gripe, el catarro, el sarampión, la viruela, varicela, rubéola, poliomielitis, y otras muchas, son debidas a virus. El ozono actúa sobre ellas oxidando las proteínas de su envoltura y modificando su estructura tridimensional. Al ocurrir esto, el virus no puede anclarse a ninguna célula próxima por no reconocer su punto de anclaje, y al encontrarse el virus desprotegido y sin poder reproducirse, muere (The Merck Index. 2006).

Óxido de etileno

El óxido de etileno es un agente microbicida de amplio espectro que destruye bacterias en estado vegetativo, incluido el bacilo de Koch. Es fungicida, esporicida, virucida, posiblemente porque puede penetrar fácilmente en el microorganismo debido a que se trata de éter cíclico de 44,05 de peso molecular, que no posee carga. El mecanismo de acción se debe al efecto de alquilación que modifica la estructura molecular de las proteínas y ácidos nucleicos celulares a través de reacciones químicas irreversibles, fenómeno que se ve facilitado por ser el óxido de etileno una molécula muy inestable que reacciona en toda proporción con sustancias orgánicas (The Merck Index. 2006).

El óxido de etileno surgió como una moda a travez de un largo periodo de búsqueda en los procesos de esterilización y sanitización de alimentos para consumo humano, es uno de los métodos más nuevos y novedosos que se emplean hoy en día (The Merck Index. 2006).

Características y propiedades Óxido de etileno

El óxido de etileno es un gas que a temperatura y presión normales, tiene un débil olor parecido al éter, más pesadas que el aire, muy solubles en agua y fácilmente licuables a presión atmosférica y temperatura de 10 ° a 11 ° C. Posee gran reactividad química, siendo además altamente inflamable explosivo y toxico, presentando en consecuencia grandes riesgos en su utilización como gas esterilizante. (The Merck Index. 2006).

La acción específica del óxido de etileno sobre materiales biológicos se debe a que es un agente alquilante particularmente activo. Esta acción se ejerce sobre aquellas moléculas susceptibles de alquilación, que son la mayoría de las moléculas orgánicas (anillo de nitrógeno de las purinas y pirimidinas y con los grupos amino de los aminoácidos y de las proteínas). La alquilación representa la sustitución de un átomo de hidrógeno por un radical hidroxietileno, modificando la estructura molecular de las proteínas, DNA, RNA y lípidos de los microorganismos, puesto que se bloquean puntos moleculares críticos que incapacitan a las moléculas para intervenir en los procesos metabólicos y reproductores. Las características físico-químicas del gas lo hacen muy activo y además posee un alto poder de penetración el que determina la mortalidad de microorganismos en lugares de difícil acceso para otros agentes. (Martí Mercadal, J. A. y Desoille, H, 2002).

Mecanismo de acción

En la célula bacteriana existen tres sitios susceptibles a ser atacados por los agentes químicos: las enzimas, las capas superficiales y el material nuclear. Estos sectores son fundamentales para la vida del microorganismo. Las proteínas enzimáticas poseen un cierto número de grupos reactivos esenciales para su actividad, entre los que se encuentran los grupos ácidos y básicos de las nucleoproteínas, grupos amino, carboxilo, sulfidrilo, imino, hidroxilos y otros. El óxido de etileno actúa alquilando los grupos antes mencionados en sus

átomos lábiles de hidrogeno, por radicales hidroxietilos, este es un proceso lento, más el cual determina finalmente la muerte del microorganismo, debido a la incapacidad de reproducirse.

Alquilación

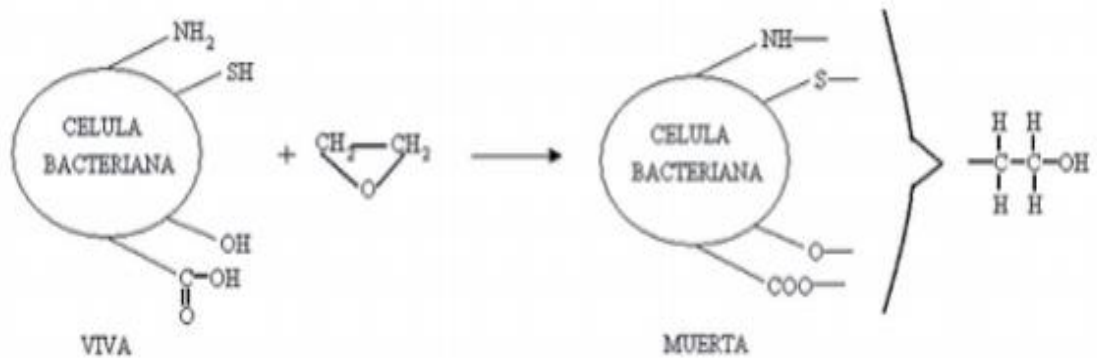


Figura 5. Esquema extraído del manual: Curso de esterilización elaborado por el Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires 2009.

Proceso de sanitización ciclos

1. Se realiza vacío para eliminar el aire de la cámara y el que pueda estar ocluído en los materiales.
2. Período para estabilizar la presión
3. Ingresa el gas
4. Vacío o barrido, una vez finalizada la difusión del gas.
5. Aireación con pulsos de aire.

Materiales que se pueden esterilizar por ETO

- Instrumental óptico (broncoscopios, laringoscopios, etc.).
- Instrumental delicado (de neurocirugía u oftalmología).

- Implantes y prótesis vasculares.
- Marcapasos.
- Cápsulas de Petri plásticas.
- Set de Respiradores.
- Reanimadores.
- Materiales plásticos.

Materiales que no se pueden esterilizar

- Textiles
- Líquidos (especialmente los acuosos).
- Materiales de PVC que hayan sido esterilizados previamente por radiaciones gamma.
- En general, todo material resistente a la temperatura, presión y humedad.

Resistencia de los microorganismos frente al Óxido de etileno

La susceptibilidad de los distintos microorganismos a los procesos de inactivación depende de numerosos factores como pH, temperatura, humedad, características de crecimiento, presencia de materia orgánica, etc. Sin embargo, el factor más importantes a tener en cuenta es la resistencia innata que poseen los microorganismos frente a el proceso de esterilización, cuya naturaleza en la mayoría de los casos reside en la diferente composición de la pared celular que regula la penetrabilidad del agente esterilizante (CEDEST, 2009).

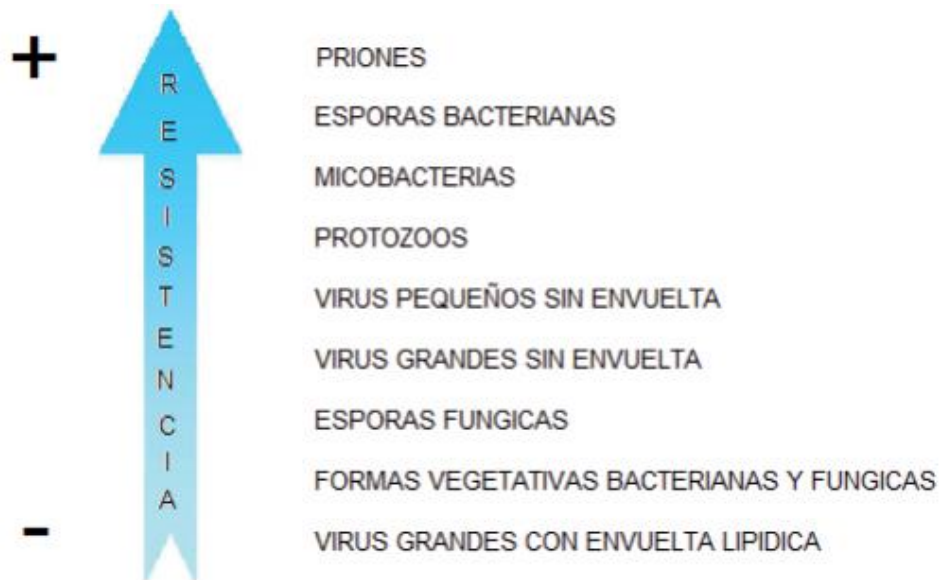


Figura 6. Gráficos extraído del libro Esterilización en Centros Sanitarios elaborado por el CEDEST (2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización Geográfica

El experimento se realizó durante el periodo marzo - mayo de 2015, en el laboratorio de Microbiología del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que se encuentra situado a 25° 22' latitud Norte y 101° latitud oeste a una altura de 1742 msnm. En Saltillo, Coahuila, México.

Materiales

Cajas Petri, tubos de ensayo, micro pipeta, puntillas para micro pipeta, matraz Erlenmeyer, agitador, autoclave, reactivos, tubos Durham, balanza analítica, vasos de precipitado, frascos, campana de flujo laminar, cámara de sanitización.

Material Biológico

Se utilizaron semillas de chíá.

Etapa I. Selección y toma de Muestras

Se tomaron muestras de la producción de semillas de chíá, de las cuales se utilizan para venta al público, con la intención de analizar que dichas semillas para consumo están verdaderamente libres de patógenos dañinos para salud y para brindar seguridad a los consumidores. Dichas muestras se tomaron al

azar de la producción total de semillas, se tomaron 5 muestras las cuales se mandaron a Monterrey a la empresa SEPV (Servicio de Esterilización Servicios y Validación) para sanitizarlas con el gas óxido de etileno (ETO). La sanitización se dio a diferentes temperaturas para evaluar el efecto de la temperatura en la eficiencia de la sanitización.

Cuadro 3. Arreglo de los tratamientos a estudio.

Tratamientos	Temperatura	Producto Químico	Tiempo de Exposición en horas
T1	26 c°	Óxido de etileno	1
T2	28 c°	Óxido de etileno	1
T3	30 c°	Óxido de etileno	1
T4	32 c°	Óxido de etileno	1
T5	testigo	Sin tratamiento	0

Semillas de Chía (*Salvia hispanica*) sanitizadas con óxido de etileno.

Etapa II. Análisis de calidad microbiológica en laboratorio

Los análisis microbiológicos se tomaron en base a las normas: NOM-092-SSA1-1994, que se utiliza como método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Se realizó el conteo de dos diferentes grupos indicadores microbianos siguiendo la metodología citada por la misma, así como de los microorganismos patógenos.

Metodología

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio.

- 1- Para bacterias mesofilas aerobias se utiliza agar bacteriológico en relación 1.5 gr de agar en 100ml de agua destilada, (preparar la cantidad necesaria).
- 2- Para hongos y levaduras se utiliza agar papa y dextrosa (PDA), para cada litro de agua destilada se añaden 39 gr. Este agar tiene que ser acidificado para brindar las condiciones óptimas para el crecimiento de hongos y levaduras, se utiliza ácido tartárico en solución al 10%, la cantidad de ácido va en relación a la cantidad requerida de PDA, (para cada litro de PDA se necesitan 14 ml de ácido tartárico). El ácido debe prepararse y esterilizarse en frascos separados, se añade al agar hasta después de la esterilización para evitar la desnaturalización de las proteínas que conforman al agar. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 mL, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe de fundirse más de una vez.
- 3- Disolver en un litro de agua destilada 1 gramo de peptona y 8.5 gramos de cloruro de sodio, dividir como se indica a continuación: Para la dilución -1 deberá contener 90 ml de agua peptonada (frasco esterilizable) y las diluciones siguientes tendrán 9 ml (tubos Durham), esterilizar.
- 4- Realizar las diluciones seriadas en agua peptonada, como se indica: Realizar las diluciones con micropipeta y puntillas estériles de 1 ml, trabajar dentro de la campana de flujo laminar, esterilizándola con el UV 15 minutos.
- 5- Dilución -1: En 90 ml de agua peptonada traspasar 10 gr de semilla.

1. Dilución -2: En 9 ml de agua peptonada traspasar 1 ml de la disolución -
2. Dilución -3: En 9 ml de agua peptonada traspasar 1 ml de la disolución -
3. Dilución -4: En 9 ml de agua peptonada traspasar 1 ml de la disolución -

Siembra e Incubación

Se realizó al momento de estar trabajando con las diluciones, colocando una muestra en cada una de las cajas petri con ayuda de una micropipeta, y trabajando dentro de la campana de flujo laminar, sellando y marcando cada una de ellas, posteriormente dejándose a temperatura ambiente, con una duración de al menos 48 horas para ver si hubo o no presencia de microorganismos.

Conteo de microorganismos indicadores.

Se procedió a tomar cada una de las cajas Petri y con ayuda de un marcador señalando cada una de las colonias presentes en la ella y posteriormente anotando la cantidad de acuerdo a la temperatura, disolución y tipo de microorganismo en los cuadros de concentración de datos. Esto para el caso de bacterias mesófilos aerobias (BMA) y hongos y levaduras que fueron los microorganismos que aparecieron en las placas, una vez transcurridas al menos 48 horas.

Análisis de datos

Los resultados microbiológicos fueron analizados con el diseño completamente al azar con arreglo factorial, mediante un análisis de varianza (ANOVA) al 99 % de confianza para evaluar si hay o no diferencias significativas, se usó la prueba tukey con un nivel de significancia del 0.01. Cabe mencionar que los datos fueron convertidos mediante la fórmula; $\log(x + 1.5)$, ya que en algunas repeticiones la cantidad de colonias estaba muy elevada y en otras había nula presencia, lo cual ejercía una alta variación de los mismos en el resultado del modelo estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4 se muestra el análisis de varianza el cual indica que existe diferencia altamente significativa ($P \leq 0.001$) para las variables temperatura, disoluciones y tipo de colonia.

Cuadro 4. Cuadrados de la media del ANVA para la comparación de las variables.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Rep	1	0.00330750	0.00330750	2.39	0.1272
Tem	4	5.77200333	1.44300083	1044.08**	<.0001
Dis	3	3.70084250	1.23361417	892.58**	<.0001
Mic	2	1.85591167	0.92795583	671.42**	<.0001
tem*dis*mic	50	14.27529167	0.28550583	206.58	<.0001

Dónde: REP= repetición, TEM= temperatura, DIS= disolución, MIC= microorganismos
 TEM*DIS*MIC= interacción de temperatura, disolución y microorganismos, ** Altamente significativo.* significativo.

Se confirmó la presencia de microorganismos, como se puede apreciar en los cuadros de concentración de datos, donde se hicieron presentes para el caso de bacterias mesofilas y aerobias y hongos y levaduras.

Cuadro 5. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chíá.

TRATAMIENTO 1 (26 C°)	Bacterias Mesofilas aerobias		Coliformes		Hongos y Levaduras	
Dilución	# de colonias		# de colonias		# de colonias	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-1	1.42	1.21	.17	.17	1.24	1.40
-2	1.21	1.02	.17	.17	1.06	1.13
-3	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-4	.17	.17	.17	.17	.17	.17

Semillas de Chíá sanitizadas con gas óxido de etileno, (Shif, log + colonia).

Cuadro 6. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chíá.

TRATAMIENTO 2 (28 C°)	Bacterias Mesofilas aerobias		Coliformes		Hongos y Levaduras	
Dilución	# de colonias		# de colonias		# de colonias	
	R1	R2	R1	R1	R1	R2
-1	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-2	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-3	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-4	.17	.17	.17	.17	.17	.17

Semillas de Chíá sanitizadas con gas óxido de etileno, (shif, log + colonia).

Cuadro 7. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chíá.

TRATAMIENTO 3 (30 C°)	Bacterias mesofilas aerobias		Coliformes		Hongos y levaduras	
Dilución	# de colonias		# de colonias		# de colonias	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-1	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-2	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-3	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-4	.17	.17	.17	.17	.17	.17

Semillas de Chíá sanitizadas con gas óxido de etileno, (shif, log + colonia).

Cuadro 8. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chíá.

TRATAMIENTO	Bacterias mesofilas aerobias		Coliformes		Hongos y levaduras	
4 (32 C°)						
Dilución	# de colonias		# de colonias		# de colonias	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-1	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-2	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-3	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-4	.17	.17	.17	.17	.17	.17

Semillas de Chíá sanitizadas con gas óxido de etileno, (shif, log + colonia).

Cuadro 9. Indicadores de las colonias presentes en las semillas de chíá.

TESTIGO	Bacterias mesofilas aerobias		Coliformes		Hongos y levaduras	
Dilución	# de colonias		# de colonias		# de colonias	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
-1	2.07	1.95	.17	.17	1.85	1.80
-2	2.02	1.88	.17	.17	1.21	1.06
-3	.17	.17	.17	.17	.17	.17
-4	.17	.17	.17	.17	.17	.17

Semillas de Chíá sanitizadas con gas óxido de etileno, (shif, log + colonia).

Para saber cuál es el valor real o este caso, la cantidad de colonias presentes en los tratamientos se pueden apreciar aplicando el Log/UFC (logaritmo inverso), de acuerdo a la repetición y a la disolución en que se encuentren, y para la cantidad total aproximada de microorganismos presentes en la semilla, se procede a sumar las colonias, promediarlas y multiplicarlas según la disolución en la que se presentaron; dilución -1 * 10, -2 *100, -3 * 1000, -4 10,000.

Cuadro 10. Cantidad aproximada de microorganismos presentes en los tratamientos.

Tratamientos	Bacterias Mesofilas y Aerobias	Hongos y Levaduras	Coliformes
Testigo	5015	955	-
Tratamiento 1	755	650	-
Tratamiento 2	-	-	-
Tratamiento 3	-	-	-
Tratamiento 4	-	-	-
Tratamiento 5	-	-	-

Semillas de chía (*Salvia hispánica*) sanitizadas con óxido de etileno.

Temperatura

Los resultados muestran que hay diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que se muestran las tendencias siguientes;

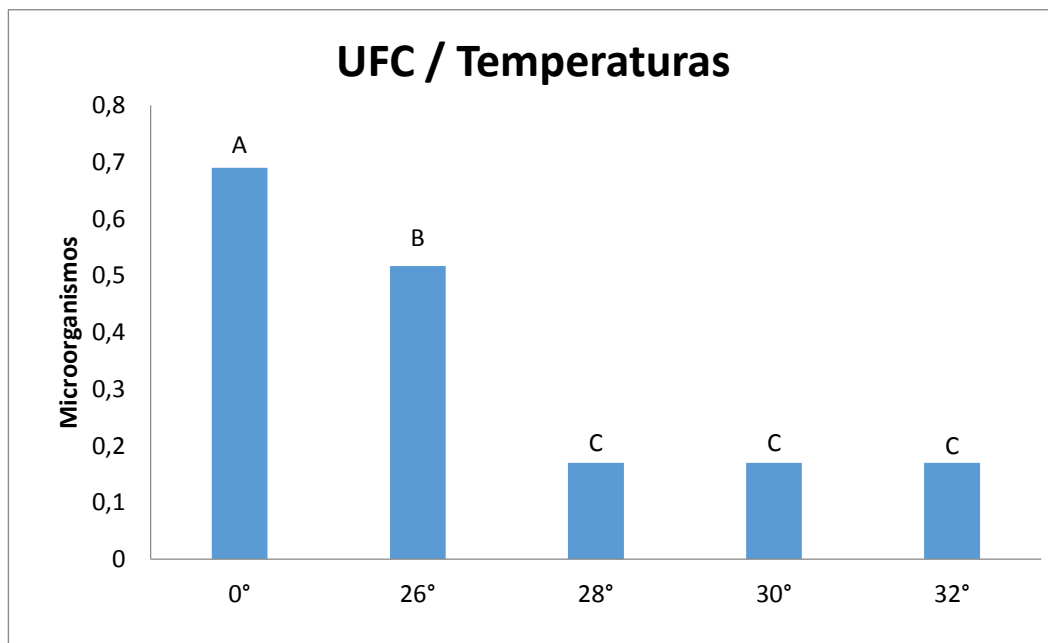


Figura 6. Comportamiento de medias de la temperatura a la que fueron expuestas las semillas de chía al gas óxido de etileno.

Se obtuvo diferencia altamente significativa, demostrándose la presencia de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en el caso del tratamiento testigo (Temperatura 0), donde demuestra una elevada cantidad de colonias, a comparación con los tratamientos; 2 (28c°), 3 (30c°) y 4 (32c°), siendo los mejores ya que se observa nula presencia de microorganismos, a excepción del tratamiento 1 (26 C°), donde hubo muy poca presencia a niveles que no se consideran dañinos para la salud.

Disoluciones

Los resultados muestran que hay diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que se muestran las tendencias siguientes;

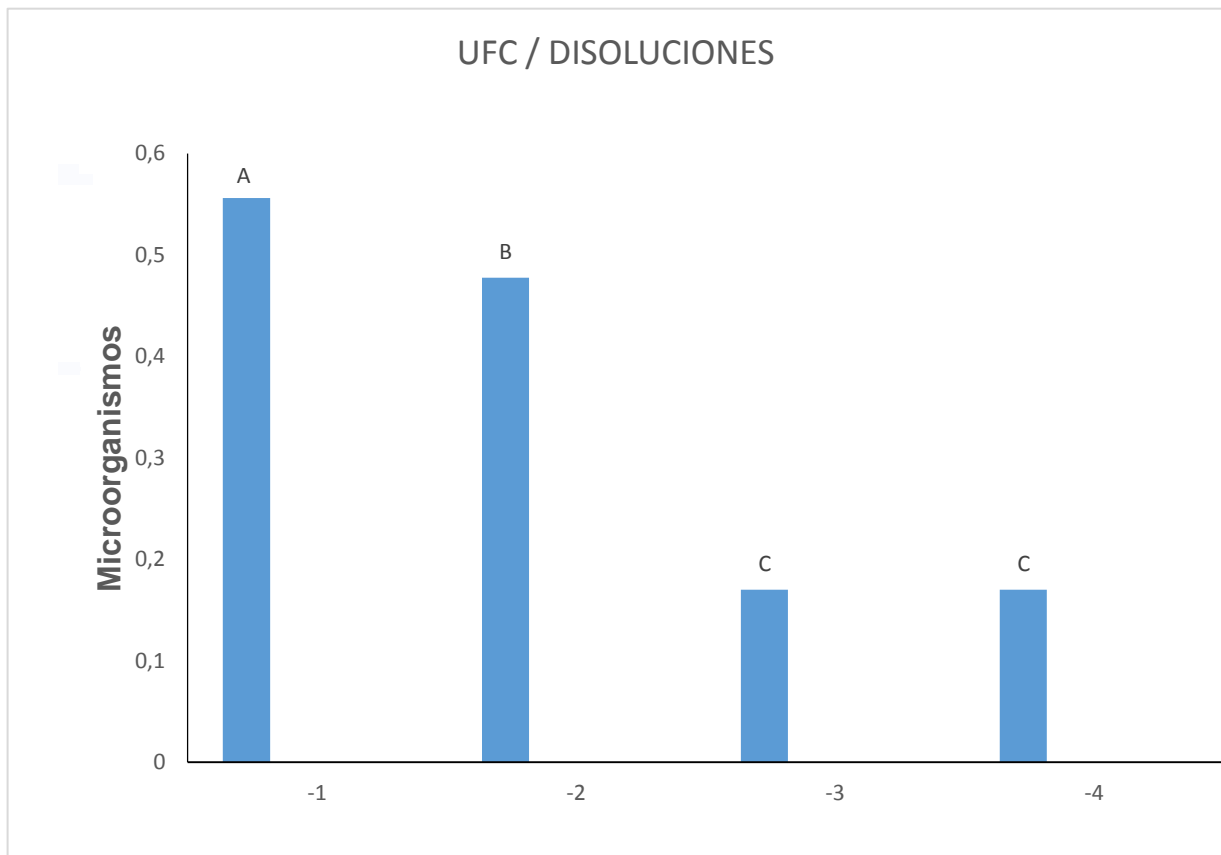


Figura 7. Comportamiento de medias de las disoluciones.

Para el caso de las disoluciones la mayor presencia de las colonias de microorganismos tuvieron lugar en la disolución -1, donde se ve claramente la mayor cantidad, seguido por la disolución -2, obteniéndose una diferencia altamente significativa con las demás disoluciones -3 y -4 donde hubo nula presencia, por lo que se concluye que a menor disolución menor será la cantidad de microorganismos.

Tipo de colonia

Los resultados muestran que hay diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que se muestran las tendencias siguientes;

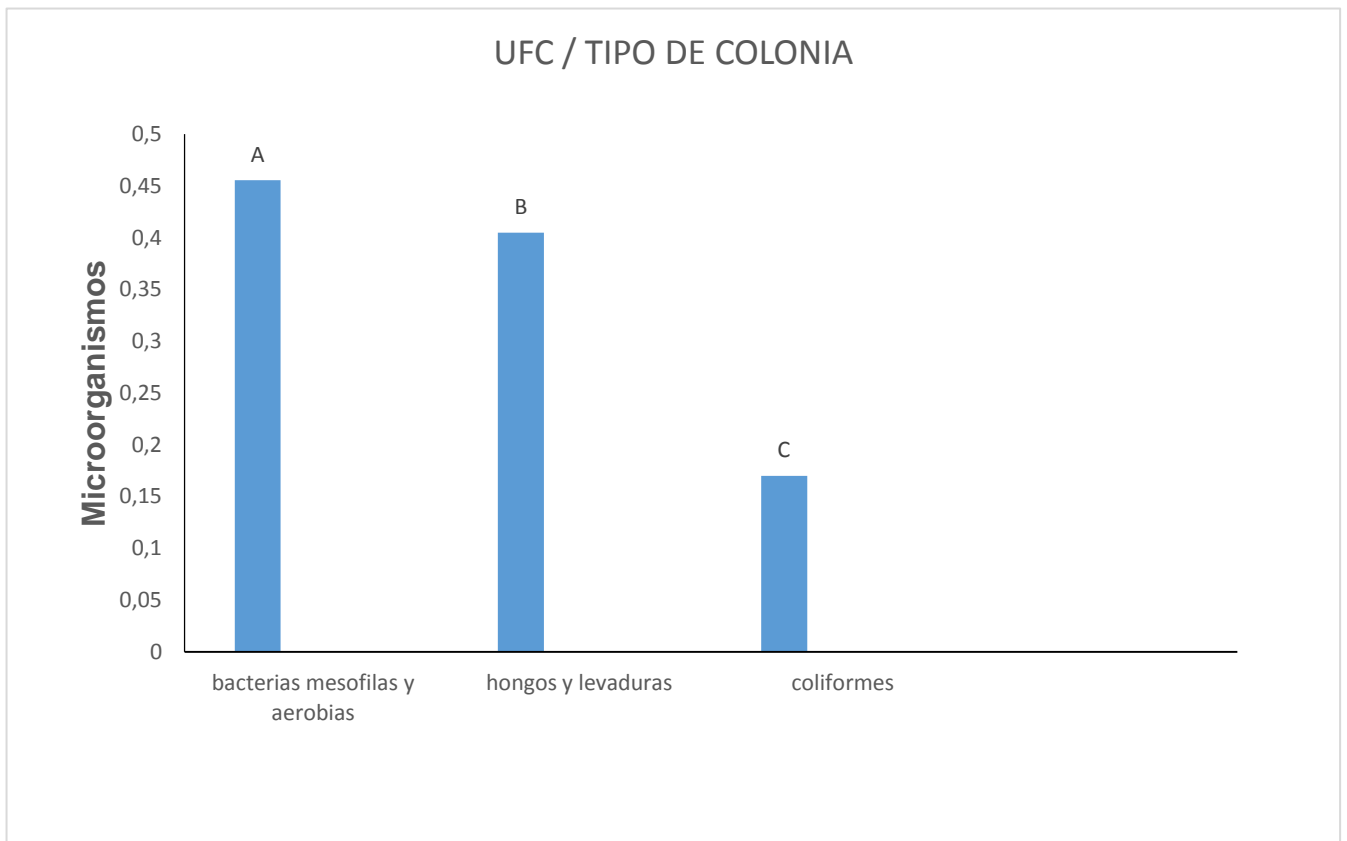


Figura 9. Comportamiento de medias de los tipos de colonias presentes en los tratamientos

Se obtuvo diferencia altamente significativa para el caso de (UFC) para el tipo de colonia, demostrándose que la resistencia de cada una de ellas es diferente al ser expuestas al gas (ETO), encontrándose una mayor presencia de bacterias mesofilas y aerobias, seguido por hongos y levaduras, y ejerciéndose un control total para el caso de coliformes.

CONCLUSIONES

- La efectividad del gas óxido de etileno se hizo presente, ya que solo hubo muy poca cantidad de microorganismos en solo un tratamiento, y dicha cantidad está en rangos muy bajos, por lo que se demuestra la importancia de someter a Sanitización aquellos alimentos que se consumen en crudo, para garantizar la seguridad e inocuidad de los productos.
- Se demostró que en el tratamiento testigo se hicieron presentes los microorganismos, lo cual se comprueba que la calidad sanitaria de la semilla antes que se ofrezca al público es deficiente, lo cual le da crédito al proceso de sanitización.
- El proceso de sanitización al que deben ser expuestas las semillas debe ser diferente si se desea erradicar algún tipo de colonia en específico, ya que se demostró una resistencia diferente al gas para cada tipo de colonia.

RECOMENDACIONES

De acuerdo con el trabajo realizado se en lista una serie de recomendaciones que pueden ayudar en el tema relacionado con la calidad e inocuidad de los alimentos y con la seguridad del proceso.

- Consumir productos que son sometidos a procesos de sanitización y esterilización de alimentos ya que proveen de seguridad al consumidor al proveer alimentos inocuos.
- Someter específicamente a sanitizar con el gas óxido de etileno ya que presenta muy alta efectividad bactericida, fungicida y virulicida, además que se puede utilizar con una gran cantidad de materiales.
- No hay necesidad de someter alimentos a altas temperaturas para no perder sus cualidades organolépticas.
- Garantiza la no destrucción o deformación de los elementos.
- Probar otros métodos de sanitización para verificar si alguno muestra mejores resultados.

LITERATURA CITADA

- Ayerza R, (Jr), (1995).** Oil Content and Fatty Acid Composition of Chía (Salvia hispanica L.) from Five Northwestern Locations in Argentina. J Am Oil Chem Soc, 72: 1079-1081. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento_completo.pdf?sequence=3. Fecha de acceso septiembre 2015.
- Ayerza R, (Jr), Coates W (2005).** Chía. Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs (1st ed.). The University of Arizona Press, Tucson (USA) 197 p. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento_completo.pdf?sequence=3 . Fecha de acceso septiembre 2015.
- Beltrán-Orozco M, C, Romero M R (2003).** Chía, alimento milenario. Rev Ind Alim, septiembre/octubre: 20-29. Disponible en <http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/157>. Fecha de acceso septiembre 2015.
- Burkart A (1979).** Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Vol. 5. Colección Científica INTA, Buenos Aires (Argentina) 606 p. Disponible en http://www.fca.unl.edu.ar/media/academica/assignaturas/12/bot_sist_agronom.pdf Fecha de acceso octubre de 2015.
- Cahill J, P (2004).** Genetic diversity among varieties of chía (Salvia hispanica L.) Gen Res Crop Evol, 51: 773. . Disponible en <http://www.uky.edu/Ag/Agronomy/PLBC/Research/pubs/Jamboonsri-12.pdf> Fecha de acceso octubre 2015.

- Cahill J, P** (2005). Human selection and domestication of chía (*Salvia hispanica* L.). *Gen Res Crop Evol*, 51: 773-781. Disponible en <http://www.uky.edu/Ag/Agronomy/PLBC/Research/pubs/Jamboonsri-12.pdf>
Fecha de acceso octubre 2015.
- Capitani M I** (2013). Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).
- Carrero, J, j, Martin-Bautista, E., Baro, I. et al.** (2005,) “Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos Omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta”. *Nutr. Hosp.* [en Línea]. vol.20, no.1, p.63-69. Disponible en: <http://wwwscielo.isciii.es> Fecha de acceso Octubre 2015.
- Código Alimentario Argentino, CAA** (2008). Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_XI.pdf. Fecha de acceso Octubre 2015.
- DESAI, B. B.** (1997). *Seeds handbook: processing and storage*. Marcel Dekker, USA. Pp. 211. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento_completo.pdf?sequence=3. Fecha de acceso octubre 2015.
- EFSA, European Food Safety Authority** (2009). Opinion on the safety of “Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds” as a food ingredient. *EFSA J* 996, 1-26. Disponible en http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/996.pdf. Fecha de acceso octubre 2015.
- EPA.** 2002. Estándares del reglamento nacional primario de agua potable (en línea). Estados Unidos. Consultado septiembre del 2015.

Engel F A (1987). De las begonias al maíz: vida y producción en el Perú antiguo. Centro de Investigaciones de Zonas Áridas. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú)

Freese R, Mutanen M (1997). α -Linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 66: 591-598.

Administración de alimentos y Medicamentos de los EE.UU. 2014. Disponible en <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/UCM262298.pdf> Fecha de acceso noviembre de 2015.

González C. Ulises, et al. 2007. "Determinación de Coliformes totales en los productos lácteos y su comparación entre dos queserías del municipio de Pijijiapan, Chiapas, México. Asociación mexicana de Bioquímica Clínica. P.98-17. Guillermo, Coronel. Et

Godic T.K., A. Venus.2008. "The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19 570- 577. Disponible en <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/558/62924s.pdf?sequence> .Fecha de acceso octubre 2015.

Haros M (2013). La chía en Europa sigue siendo una gran desconocida, y por ende sus propiedades. *Grasas Aceites*, 92 (3): 384-385. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento_completo.pdf?sequence=3. Fecha de acceso octubre 2015.

Hentry H S, Mittleman M, McCrohan PR (1990). Introducción de la chía y la goma de tragacanto en los Estados Unidos. En *Avances en Cosechas Nuevas*. Editado por Janick J, y Simon J E. Prensa de la Madera, Portland, O. 252-256

INEN, 2006. Norma Técnica Ecuatoriana. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Rep. Primera edición. Quito, Ecuador.

- Ixtaina V Y** (2010). Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispánica L.) obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de alimentos Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- Kleiner L** (2013). Chía (Salvia hispánica L.): Una buena fuente de ácidos grasos omega-3. Grasas Aceites, 92 (3): 396-400. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento_completo.pdf?sequence=3. Fecha de acceso octubre 2015.
- Martí Mercadal, J. A.** y Desoille, H. 2002. Medicina del trabajo. 2da edición. Barcelona, Masson S. A. pp 266-269. Disponible en http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3222.pdf Fecha de acceso septiembre 2015.
- National Research Council** (1989). Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academic Press, Washington DC (USA)
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994.** Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994.** Bienes y servicios. Método para la cuenta de Mohos y levaduras en alimentos.
- Oomah B D,** Kenasehuk E O (1995). Cultivars and agronomic aspects. En Flaxseed in Human Nutrition. Eds. SC Cunnane and LU Thompson. AOCS Press, Champaign (USA) pp. 43-45
- Phillips G O,** Williams P A, (2000). Introduction to food hydrocolloids. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), Handbook of Hydrocolloids. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

- Ramamoorthy T, P** (1985). Salvia L. En Flora Fanerógama del Valle de México. Volumen II (Dicotiledóneas). Eds. J Rzedowski, GC De Rzedowski, Instituto Politécnico Nacional de México, DF (México) pp. 298-310
- Ruiz C, Díaz C, Anaya J, Rojas R** (2013). Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). Rev Soc Quím Perú, 79 (1)
- Rodríguez Vallejo J** (1992). Historia de la agricultura y de la fitopatología, con referencia especial a México. Colegio de Post-graduados en Ciencias Agrícolas, Ciudad de México (México).
- Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López M A** (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. J Agric Food Chem, 107(2): 656–663
- Servicio de Esterilización Procesos y validación S.A. de C.V. 2013. Disponible en www.sepv.com.mx. Fecha de acceso noviembre 2013.
- Tortajada, F.; Castell, G.; Tornero, B.; Gimeno, C.** 2001. Micotoxinas y cáncer pediátrico (en línea). Valencia, España. Consultado septiembre del 2015. Disponible en <http://db2.doyma.es/pdf/126/126v57n03a13017206pdf001.pdf>
- The Merck Index** an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 2006. Fourteen edition. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA. pp 3802.
- Tosco G** (2004). Los beneficios de la chía en humanos y animales. Nutrientes de la semilla de chía y su relación con los requerimientos humanos diarios. Actualidades Ornitológicas, N° 119. Disponible en <http://www.ao.com.br/download/tosco.pdf>. Fecha de acceso octubre 2015.

U.S. Patent 6,120,822 (2000), Adrian Denvir, K. Scott McKenzie, T. Rogers, D. Miller, D. Hitchens, C. Andrews, Apparatus and methods of food decontamination by treatment with ozone. Disponible en <http://www.google.com/patents/US6171625> . Fecha de acceso septiembre 2015.

Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 3 ed. Washington, D. C. American Public Health Association Inc. (APHA). 1219 p.

Vioque, j., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista., J. y Millan, F. (1999) Production and characterization of extensive rapessed protein hydrolyzate. Journald of American oil chemists Society 46 (7), 819-823.

Watson G (1938). Nahuatl word in American English. American Speech, 13: 108-121.

APÉNDICE

Datos capturados del programa SAS 9.1

```
data factorial;
input trat rep tem dis mic ncol;
cards;
1 1 26 -1 1 1.42
1 2 26 -1 1 1.21
2 1 26 -1 2 0.17
2 2 26 -1 2 0.17
3 1 26 -1 3 1.24
3 2 26 -1 3 1.4
4 1 26 -2 1 1.21
4 2 26 -2 1 1.02
5 1 26 -2 2 0.17
5 2 26 -2 2 0.17
6 1 26 -2 3 1.06
6 2 26 -2 3 1.13
7 1 26 -3 1 0.17
7 2 26 -3 1 0.17
8 1 26 -3 2 0.17
8 2 26 -3 2 0.17
9 1 26 -3 3 0.17
9 2 26 -3 3 0.17
10 1 26 -4 1 0.17
10 2 26 -4 1 0.17
11 1 26 -4 2 0.17
11 2 26 -4 2 0.17
12 1 26 -4 3 0.17
12 2 26 -4 3 0.17
13 1 28 -1 1 0.17
13 2 28 -1 1 0.17
14 1 28 -1 2 0.17
14 2 28 -1 2 0.17
15 1 28 -1 3 0.17
15 2 28 -1 3 0.17
16 1 28 -2 1 0.17
16 2 28 -2 1 0.17
17 1 28 -2 2 0.17
17 2 28 -2 2 0.17
18 1 28 -2 3 0.17
18 2 28 -2 3 0.17
19 1 28 -3 1 0.17
19 2 28 -3 1 0.17
20 1 28 -3 2 0.17
20 2 28 -3 2 0.17
21 1 28 -3 3 0.17
21 2 28 -3 3 0.17
22 1 28 -4 1 0.17
22 2 28 -4 1 0.17
23 1 28 -4 2 0.17
23 2 28 -4 2 0.17
24 1 28 -4 3 0.17
24 2 28 -4 3 0.17
25 1 30 -1 1 0.17
25 2 30 -1 1 0.17
26 1 30 -1 2 0.17
26 2 30 -1 2 0.17
27 1 30 -1 3 0.17
27 2 30 -1 3 0.17
28 1 30 -2 1 0.17
28 2 30 -2 1 0.17
29 1 30 -2 2 0.17
```

29	2	30	-2	2	0.17
30	1	30	-2	3	0.17
30	2	30	-2	3	0.17
31	1	30	-3	1	0.17
31	2	30	-3	1	0.17
32	1	30	-3	2	0.17
32	2	30	-3	2	0.17
33	1	30	-3	3	0.17
33	2	30	-3	3	0.17
34	1	30	-4	1	0.17
34	2	30	-4	1	0.17
35	1	30	-4	2	0.17
35	2	30	-4	2	0.17
36	1	30	-4	3	0.17
36	2	30	-4	3	0.17
37	1	32	-1	1	0.17
37	2	32	-1	1	0.17
38	1	32	-1	2	0.17
38	2	32	-1	2	0.17
39	1	32	-1	3	0.17
39	2	32	-1	3	0.17
40	1	32	-2	1	0.17
40	2	32	-2	1	0.17
41	1	32	-2	2	0.17
41	2	32	-2	2	0.17
42	1	32	-2	3	0.17
42	2	32	-2	3	0.17
43	1	32	-3	1	0.17
43	2	32	-3	1	0.17
44	1	32	-3	2	0.17
44	2	32	-3	2	0.17
45	1	32	-3	3	0.17
45	2	32	-3	3	0.17
46	1	32	-4	1	0.17
46	2	32	-4	1	0.17
47	1	32	-4	2	0.17
47	2	32	-4	2	0.17
48	1	32	-4	3	0.17
48	2	32	-4	3	0.17
49	1	0	-1	1	2.07
49	2	0	-1	1	1.95
50	1	0	-1	2	0.17
50	2	0	-1	2	0.17
51	1	0	-1	3	1.85
51	2	0	-1	3	1.8
52	1	0	-2	1	2.02
52	2	0	-2	1	1.88
53	1	0	-2	2	0.17
53	2	0	-2	2	0.17
54	1	0	-2	3	1.21
54	2	0	-2	3	1.06
55	1	0	-3	1	0.17
55	2	0	-3	1	0.17
56	1	0	-3	2	0.17
56	2	0	-3	2	0.17
57	1	0	-3	3	0.17
57	2	0	-3	3	0.17
58	1	0	-4	1	0.17
58	2	0	-4	1	0.17
59	1	0	-4	2	0.17
59	2	0	-4	2	0.17
60	1	0	-4	3	0.17
60	2	0	-4	3	0.17

```

proc glm;
classes rep tem dis mic;
model ncol = rep tem dis mic tem*dis*mic;
means tem dis mic tem*dis*mic/tukey;
run;

```

Variable dependiente: ncol

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	60	25.60735667	0.42678928	308.80	<.0001
Error	59	0.08154250	0.00138208		
Total corregido	119	25.68889917			

R-cuadrado **Coef Var** **Raíz MSE** **ncol Media**
 0.996826 10.82542 0.037176 0.343417

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
rep	1	0.00330750	0.00330750	2.39	0.1272
tem	4	5.77200333	1.44300083	1044.08	<.0001
dis	3	3.70084250	1.23361417	892.58	<.0001
mic	2	1.85591167	0.92795583	671.42	<.0001
tem*dis*mic	50	14.27529167	0.28550583	206.58	<.0001

