



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE
VARIEDADES DE ORÉGANO COMO CONSERVANTE
ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE Y DE LAS
PROPIEDADES SENSORIALES DE ALIMENTOS:
QUESOS COTTAGE, RICOTA Y ACEITE DE OLIVA**

Claudia Mariana Asensio

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, Octubre 2013

Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.

Córdoba, Octubre 2013

Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.

**UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE VARIEDADES DE ORÉGANO
COMO CONSERVANTE ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE Y DE LAS
PROPIEDADES SENSORIALES DE ALIMENTOS: QUESOS COTTAGE, RICOTA
Y ACEITE DE OLIVA**

Claudia Mariana Asensio

Comisión Asesora de Tesis

Director: Dr. Nelson R. Grosso

Asesores: Dr. Enrique I. Lucini
Dra. Valeria Nepote

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Mirta S. Demo

Dr. Enrique I. Lucini

Dra. Paula Zunino

Presentación formal académica estimada

8 de Noviembre de 2013

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me ayudaron en estos años a poder realizar este trabajo. Gracias por la paciencia, dedicación y solidaridad de conocimientos y afecto. Esta tesis es producto de muchísimas personas que me ayudaron a aprender, todo lo que era nuevo para mí. Los agradecimientos son infinitos, aunque seguramente entrarán en una hoja, dado mi poca habilidad con las palabras.

A mi director, Rubén, por la confianza, el apoyo, la paciencia y sobre todo la oportunidad. Gracias Rubén!

A mis compañeras-amigas, Ceci, Pato y Mari. Por auto-apoyarnos, por las contribuciones técnicas y las de otro tipo. Sin su ayuda y consejos no hubiese llegado. A Rubencito, por enseñarme con mucha paciencia y exigencia las primeras técnicas. A algunos que ya no están...Lucre, a los nuevitos, Paulina por todos los momentos compartidos dentro del laboratorio. Enriquee!! Qué manera de reírme con vos, gracias por tus consejos, peleas y sobre todo por hacerme sentir que siempre cuento con vos!.

A Vale y Guille, por la paciencia y el compromiso con el que me ayudaron con oliva-orégano, sin ustedes faltaría una parte de esto.

A Mirta, Mechi y Nico, también infinito agradecimiento. Comenzamos esterilizando ansas y terminamos comiendo asados. Gracias por hacerme sentir parte de su hogar. Tengo el mejor recuerdo de mi paso por Río IV.

A mis compañeros de Rutgers, por su ayuda y compañerismo. A Jim Simon por el apoyo, la confianza y la libertad. Rodolfo y Adol por todos eso, y mucho más: por recibirme en su casa, ayudarme, llevarme-traerme y hacerme sentir que estaba cerca. A la familia Zavala, mi familia postiza, por adoptarme.

A mis amigas del alma, por su amistad y aliento !

A Duilio por nunca dejar de apoyarme. Gracias por acompañarme.

DEDICATORIA

A mi mamá y mi papá. Por su esfuerzo y amor.

RESUMEN

En nuestro país se producen cuatro variedades de oréganos: Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo. Esta planta aromática además de ser consumida cotidianamente como aromatizante de comidas puede ser destinada a la producción de aceites esenciales. El uso de aceites esenciales como conservantes naturales cobra especial importancia en la industria alimenticia, ya que estos compuestos son reconocidos como seguros (GRAS) para ser usados en forma intencionada en alimentos. Los aceites esenciales de orégano constituyen una alternativa como potenciales agentes antioxidantes y antimicrobianos prolongando la vida útil de los alimentos, especialmente aquellos ricos en grasas insaturadas, como es el caso del aceite de oliva, y aquellos que tienen alta actividad agua y que son susceptibles al deterioro microbiano, como es el caso de los quesos de pasta blanda como la ricota y el Cottage. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar in-vitro las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de aceites esenciales de las variedades de orégano producidas en Córdoba, Argentina, y evaluar el efecto conservante de dichos aceites esenciales sobre alimentos con alto contenido graso como el aceite de oliva y de humedad como los quesos de pasta blanda (ricota y Cottage) para preservar la calidad química, sensorial, nutricional y microbiológica de dichos productos. Para responder a estos objetivos se realizaron a) la determinación de la composición físico-química de los aceites esenciales de orégano (AE) de las variedades Mendocino (Men), Compacto (Com), Cordobés (Cor) y Criollo (Crio), b) la actividad antioxidante de los aceites esenciales mediante los test DPPH, FRAP; ABTS; ORAC y carotenos/linoleico, c) la actividad biocida de los aceites esenciales contra bacterias gram positivas y negativas, levaduras, hongos filamentosos y nemátodos; d) análisis sensoriales sobre productos alimenticios como queso ricota y aceite de oliva adicionados con aceites esenciales de orégano midiendo la aceptabilidad por parte de los consumidores y e) estudios de almacenaje para evaluar cambios químicos, sensoriales y microbiológicos que se producen en quesos de pasta blanda (ricota y Cottage) y aceite de oliva preparados con el agregado de aceites esenciales de orégano. Los diferentes AE de orégano presentaron distinta composición química, actividad antioxidante y biocida. El AE Crio presentó mayor actividad antioxidante para los métodos ABTS (TEAC de 0,21 Mm Tr/mg AE), FRAP (0,18 mM Ac Asc/mg AE) y ORAC (TE de 1,38 mM Tr/mg AE) y fue el que presentó el mejor comportamiento antimicrobiano con respecto a los demás AE exhibiendo bajos valores de CIM y con capacidad bactericida (CBM) contra *E. coli* y *B. cereus* al igual que AE Cor. El AE Men fue el más aceptado sensorialmente en las pruebas de aceptabilidad por parte de los consumidores cuando se los incluyó en los alimentos. Los AE tuvieron mayor actividad biológica pero presentaron menor aceptabilidad al ser incluidos en los alimentos. El aceite de oliva saborizado con AE Cor almacenado en Oscuridad presento mayor estabilidad y preservó con niveles mayores de intensidad los atributos sensoriales positivos del producto. En las muestras de queso Cottage el AE Cor mostró al final del almacenaje menores contenidos de ácidos láctico, acético y cítrico, y menor número de microorganismos mesófilos totales que el resto de los tratamientos. También estas muestras presentaron mejor relación de ácidos grasos saturados/insaturados al final del almacenaje resultados que indican que el AE Cor tiene una muy buena actividad antioxidante y antimicrobiana cuando es aplicada sobre alimentos. En general los AE de especies de orégano presentaron buena aptitud para la conservación de alimentos impidiendo el deterioro oxidativo en aceite de oliva y en quesos (ricota y Cottage), además de mostrar buena actividad antimicrobiana en productos con alta actividad agua como el queso Cottage.

Palabras Clave: orégano, aceites esenciales, oliva, queso.

ABSTRACT

Four different oregano varieties Mendocino, Compacto, Cordobés, and Criollo are farmed In Córdoba province. This aromatic herb besides are consumed daily as food seasoning but also, could be used for the production of essential oils. The use of essential oils as natural preservative agents is particularly important in the food industry, since these compounds are recognized as safe (GRAS). Essential oils of oregano are an alternative as potential antioxidant and antimicrobial agents for prolonging the shelf life of products, especially in food with high unsaturated fats, such as olive oil, and in foods with high water activity that are susceptible to microbial spoilage, such as cottage cheese and ricotta. The aim of this thesis study was to evaluate antioxidant and antimicrobial properties in vitro of essential oils of oregano varieties produced in Cordoba, Argentina, and to assess the preserving effect of these essential oils on high-fat foods as oil olive and on high humidity food as ricotta and cottage cheese to preserve the chemical, sensory, nutritional, and microbiological quality of these products. To reach these objectives several activities were performed: a) determination of physical and chemical composition of oregano essential oils (EO) of the varieties Mendocino (Men), Compacto (Com), Cordobés (Cor), and Criollo (Crio), b) antioxidant activity of essential oils by the DPPH, FRAP, ABTS; ORAC and carotenes / Linoleic tests, c) biocide activity of oregano essential oils against gram positive and negative bacteria, yeast, filamentous fungi and nematodes, d) sensory analyzes on cheese/ricotta and olive oil added with essential oils to determine acceptability for consumers e) storage studies to evaluate chemical, sensory, and microbiological changes produced in soft cheeses (ricotta and Cottage) and olive oil prepared with the addition of oregano essential oils. EO of oregano varieties showed differences in chemical composition, antioxidant and biocide activities. Crio EO had higher antioxidant activity in ABTS (TEAC: 0.21 Mm Tr/mg EO), FRAP (0.18 mM Asc Ac/mg EO), and ORAC methods (TE: 1.38 mM Tr/mg EO) and exhibited the highest antimicrobial performance presenting lower MIC values and bactericidal capacity (MBC) against *E. coli* and *B. cereus*, followed by Cor EO. Men EO had the greatest sensory acceptability for the consumers when this EO was included in food product. The EO were more active biologically but had lower acceptance when they were included in food. Olive oil flavored with Cor EO stored in darkness showed higher storage stability and preserved with higher ratings the positive sensory attributes in olive oil. Cottage cheese sample with Cor EO presented at the end of the storage lower lactic, acetic, and citric acid contents, and fewer total mesophilic microorganisms than other treatments. These Cottage cheese samples also presented better saturated/unsaturated fatty acids ratio at the end of storage which indicates that the Cor EO has a very good antioxidant and antimicrobial activity when is added to a food product. In general, oregano EO showed good aptitude for food preservation by preventing oxidative deterioration in olive oil and cheeses (ricotta and Cottage), and showed good antimicrobial activity in high water activity products like cheese Cottage.

Keywords: oregano, essential oils, olive, cheese.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABLAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVIII
CAPITULO 1	1
INTRODUCCION	1
EL OREGANO	3
PRODUCCION Y COMERCIALIZACION	4
PROBLEMATICA DEL CULTIVO DE OREGANO EN LA ARGENTINA	5
OREGANO: USOS Y APLICACIONES	6
LOS ALIMENTOS.....	7
Los Lípidos	8
Los Antioxidantes	12
Actividad agua y microorganismos.....	17
Agentes Antimicrobianos.....	19
Aspectos sensoriales de los alimentos	20
ALIMENTOS ORGANICOS	26
ADITIVOS ALIMENTARIOS	27
EL ACEITE DE OLIVA	28
PRODUCTOS LÁCTEOS: QUESOS.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	33
HIPOTESIS.....	42
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS ESPECIFICOS	42
CAPITULO 2	44

COMPOSICION FISICO-QUIMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CUATRO VARIEDADES DE OREGANO CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE CORDOBA.....	44
INTRODUCCION	44
MATERIALES Y METODOS.....	46
MATERIALES.....	46
METODOS.....	46
Extracción de aceite esencial y análisis por cromatografía gaseosa	46
Análisis físicos de los aceites esenciales.....	47
Análisis de actividad antioxidante.	47
ANALISIS ESTADISTICO	51
RESULTADOS Y DISCUSION	52
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	52
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	56
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES	57
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	65
CAPITULO 3	68
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	68
INTRODUCCION	68
MATERIALES Y METODOS.....	69
MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS UTILIZADOS.....	69
Aceites esenciales.....	69
Soluciones	69
Medios de cultivo sólidos	69
METODOS.....	77
Aislamiento, conservación y propagación de cepas.....	77
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	78
ACTIVIDAD ANTIFUNGICA	80
ENSAYO DE LETALIDAD DE NEMATODOS.....	81
ANALISIS ESTADISTICO	82
RESULTADOS Y DISCUSION	83

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	83
Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de difusión en disco.....	84
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los aceites esenciales de orégano. Técnica de Micro dilución en Caldo.....	86
Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales de orégano	89
ACTIVIDAD ANTI-FUNGICA	91
Concentraciones inhibitoria mínima (CIM) sobre <i>Penicillium discolor</i>	91
Ensayo de bio-actividad sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
ENSAYO DE LETALIDAD DE NEMATODOS.	94
CONCLUSIONES.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	98
CAPITULO 4	103
ANALISIS SENSORIAL DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS CON ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO	103
INTRODUCCION	103
PRUEBAS DESCRIPTIVAS	104
PRUEBAS DISCRIMINATIVAS.....	105
PRUEBAS AFECTIVAS.....	105
MATERIALES Y METODOS.....	107
MATERIALES.....	107
MÉTODOS.....	107
Análisis Descriptivo de los Aceites Esenciales de Orégano	107
Análisis descriptivo aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano.....	109
Análisis Descriptivo de ricota saborizada con aceite esencial de orégano.	111
Análisis de Aceptabilidad de Aceite Esencial de Oréganos.....	113
Análisis de aceptabilidad de aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano.	114
Análisis discriminativo de aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano.	115
ANALISIS ESTADISTICO	117
RESULTADOS Y DISCUSION	118

ANALISIS DESCRIPTIVO Y ACEPTABILIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES DE OREGANO	118
ANALISIS DESCRIPTIVO DEL ACEITE DE OLIVA SABORIZADO CON ACEITES ESENCIALES DE OREGANO.....	123
ANALISIS DESCRIPTIVO RICOTA SABORIZADA CON AE DE OREGANOS.....	124
ANALISIS DE ACEPTABILIDAD Y DISCRIMINATIVO DEL ACEITE DE OLIVA SABORIZADO CON ACEITES ESENCIALES DE OREGANO.....	125
CONCLUSIONES.....	130
BIBLIOGRAFIA.....	131
CAPITULO 5	133
INTRODUCCION	133
EL ACEITE DE OLIVA.....	133
PRODUCTOS LACTEOS: RICOTA Y QUESO COTTAGE	134
MATERIALES Y METODOS.....	139
MATERIALES.....	139
METODOS.....	139
Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y sensoriales en aceite de oliva virgen saborizado con aceite esencial de orégano.....	139
Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y sensoriales en ricota saborizada con aceite esencial de orégano.....	142
Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y microbiológicos en queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano.....	144
ANALISIS ESTADISTICO	147
RESULTADOS Y DISCUSION	148
ESTUDIO DE ALMACENAJE: EVALUACION CAMBIOS QUIMICOS Y SENSORIALES EN ACEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEN SABORIZADO CON ACEITE ESENCIAL DE OREGANO.....	148
Estudio de almacenaje. Evaluación de cambios químicos del aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de orégano.....	148
Estudio de almacenaje. Análisis Sensorial del aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de orégano.....	164
ESTUDIO DE ALMACENAJE. CAMBIOS QUIMICOS Y SENSORIALES EN RICOTA SABORIZADA CON ACEITE ESENCIAL DE OREGANO.....	174
Cambios químicos de Ricota con el agregado de aceite esencial de orégano.....	174
Cambios sensoriales de Ricota con el agregado de aceite esencial de orégano.....	176
ESTUDIO DE ALMACENAJE. EVALUACION DE CAMBIOS QUIMICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN QUESO COTTAGE SABORIZADO CON ACEITE ESENCIAL DE OREGANO.....	185

Cambios químicos en queso cottage orgánico con el agregado de aceites esenciales de orégano y timol.....	185
Cambios microbiológicos en queso cottage orgánico con el agregado de aceites esenciales de orégano y timol.....	211
CONCLUSIONES.....	216
BIBLIOGRAFIA.....	218
CONCLUSIONES GENERALES.....	225

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.1.** Relaciones entre la presión de vapor de agua (g) respecto de la estabilidad alimentaria y el crecimiento microbiano 18
- Fig. 2.1.** Porcentaje relativo de los compuestos mayoritario de las cuatro variedades de oréganos estudiadas (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino). 54
- Fig. 2.2.** Índice de Refracción (A) y Densidad (B) para los aceites esenciales de las 4 variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino 57
- Fig. 2.3.** Actividad antioxidante determinada por los métodos ABTS y FRAP de los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino. A) TEAC: Capacidad Antioxidante equivalente en Trolox B) AEAC: Capacidad Antioxidante del Ácido Ascórbico..... 60
- Fig. 2.4.** Actividad Antioxidante (AA, %) evaluados mediante el test ácido linolénico/ β -caroteno para distintas concentraciones de los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino 61
- Fig. 2.5.** Actividad antioxidante determinada por ORAC de los aceites esenciales de las variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo, y Mendocino. 63
- Fig. 3.1.** Resultados de la actividad anti-levaduras para los aceites esenciales de orégano Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo evaluadas en tres concentraciones distinta contra *Saccharomyces cerevisiae*. 94
- Fig. 3.2.** Porcentaje de mortalidad de nemátodos evaluada en tres concentraciones distintas de los aceites esenciales de orégano Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo. 95
- Fig. 4.1.** Intensidades de los atributos en forma de diagrama tela de araña de las pruebas descriptivas de los aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo..... 120
- Fig. 4.2.** Intensidades de los atributos de los aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo que presentan diferencias significativas entre las muestras ($\alpha=0,05$, LSD Fisher). 121
- Fig. 4.3.** (A) Análisis de aceptabilidad de los aceites esenciales de las variedades de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino para los atributos color y olor. (B) Diferencias significativas entre muestras ($\alpha=0,05$, test LSD Fisher, MLM) para los atributos olor y color. (C) Distribución en porcentajes de las respuestas de aceptabilidad considerando los puntos de la escala hedónica para el AE Mendocino (Olor) y el AE Criollo (Color). 122
- Fig. 4.4.** (A) Prueba de aceptabilidad de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano para los atributos olor, color y sabor. (B) (C) y (D) Diferencias significativas entre muestras para cada uno de los atributos evaluados y distribución de la escala hedónica (en porcentajes) de la muestra más aceptada en cada atributo (MLM, LSD Fisher, $\alpha = 0,05$, $n = 3$). 128

- Fig. 5.1.** Contenidos de (a) K232 (b) K268; (c) clorofilas (mg/kg); (d) índice de peróxidos (meqO₂/kg) y (e) acidez libre (%) para los tratamiento de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de diferentes variedades de orégano expuestos a la luz (CL, LCom, LCor, LCrio y LMen) durante 126 días de almacenaje. 153
- Fig. 5.2** Biplot de la primera y segunda componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP). Variables dependientes analizadas: contenidos de clorofilas, contenido de carotenos, índice de anisidina (IAN), índice de peróxido (IP), dienos conjugados (DC), trienos conjugados (TC) y acidez libre (Acidez). Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente). 161
- Fig. 5.3.** Dendograma del Análisis de Cluster de las muestras de aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de diferentes variedades de orégano. Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente). Variables dependientes: contenidos de clorofilas, contenido de carotenos, índice de anisidina, índice de peróxido, dienos conjugados, trienos conjugados y acidez libre.. 163
- Fig. 5.4.** Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test LSD Fisher) a partir de Modelos Generalizados, Lineales y Mixtos para los siguientes atributos sensoriales: A) Picante; B) Amargo; C) Sabor Orégano y D) Rancio. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano de diferentes variedades: Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) y Mendocino (Men). Tratamientos: aceite de olive sin aceite esencial con exposición a la luz (CL) y en oscuridad (CO), aceite de oliva con aceites esenciales de orégano expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen)..... 168
- Fig. 5.5** Biplot de la primera y segunda componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano. Variables dependientes: atributos frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio. Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente). 171
- Fig. 5.6.** Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente).

VARIABLES DEPENDIENTES: atributos frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio.
..... 174

Fig. 5.7. (A) Índice de peróxidos (meqO₂/kg) y (B) contenido de ácido láctico (%) para las muestras de ricota saborizada con aceite esencial de orégano para los días 0 y 35 de almacenaje. Tratamientos: ricota sin agregados (Control), ricota con el agregado de aceite esencial de orégano Compacto (Compacto), Cordobes (Cordobes), Criollo (Criollo) y Mendocino (Mendocino). Letras distintas para un mismo periodo entre tratamientos indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, estimado por MGLM, test DCG). 177

Fig. 5.8. Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test DCG) a partir de MGLM para las muestras de ricotas adicionadas con aceite esencial de orégano durante el almacenaje de 35 días a 4 °C evaluando los siguientes atributos sensoriales: (A) ácido, (B) dulce, (C) fermentado, (D) caseína, (E) leche, (F) oxidado, (G) sabor orégano, (H) brillo, (I) humedad y (J) color. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para 0 y 35 días de almacenaje. 179

Fig. 5.9 Biplot de la primera y la segunda componentes del análisis de componentes principales. Variables dependientes: índice de peróxido (IP), contenido de ácido láctico (AC Láctico) y tributos sensoriales analizados durante 35 días de almacenaje de ricota a 4 °C. Tratamientos: ricota control (Control) y ricota con el agregado de aceites esenciales de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino. 184

Fig. 5.10. Contenidos de (A) hidroperóxidos, (B) dienos conjugados y (C) ácido láctico como acidez total titulable en muestras de queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol almacenadas durante 30 días a 40°C 188

Fig. 5.11 Variación en el perfil de ácidos grasos (A) 12:0, (B)12:1, (C)14:1, (D)16:2, (E)17:0, (F) ac. Oleico, (G) ac. Elaídico, (H) ac. Linoleico; (I) ac. Linoelaídico y (J) ac. Linolénico en las muestras de queso Cottage saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (40 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno. 196

Fig. 5.12 Variación en el contenido de ácidos grasos (a) insaturados y (b) saturados y (c) en la relación saturados/insaturados (S/I) en las muestras de queso Cottage saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (40 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno. 199

Fig 5.13 Variación de los contenidos de ácidos orgánicos (A) láctico, (B) cítrico, (C) pirúvico, (D) fórmico, (E) acético y (F) propiónico en muestras de queso Cottage saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (30 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno. 204

- Fig. 5.14.** Variación de los contenidos de ácidos orgánicos (A) láctico, (B) acético, (C) cítrico, (D) pirúvico y (E) fórmico en muestras de queso Cottage saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (30 días a 23 °C). **208**
- Fig. 5.15.** Biplot de la primera y la segunda componentes del análisis de componentes principales (ACP). Variables dependientes: contenido de ácidos orgánicos acético, cítrico, fórmico, láctico y pirúvico. Tratamientos: muestras control de queso Cottage sin agregado de aceite esencial (Con), con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio), y Mendocina (Men) y timol (thy) almacenados durante 30 días bajo dos temperaturas diferentes (23 °C y 40 °C). **210**
- Fig. 5.16** Variación en el recuento de microorganismos mesófilos totales en muestras de queso Cottage con el agregado de aceites esenciales de orégano de la variedades Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) y Mendocino (Men) y timol (Thy) almacenadas 30 días (A) 23 °C y (B) 40 °C. Con = Control, muestra sin agregado. **215**
- Fig. 5.17.** Diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$) para muestras de queso Cottage adicionadas con aceite esencial de orégano y timol (Con = Control, Com = AE Compacto, Crio = AE Criollo, Cor = AE Cordobés, Men = AE Mendocino y Thy = timol) almacenadas durante 30 días a dos temperaturas diferentes (23 °C y 40 °C). **216**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Presión de vapor relativa y crecimiento de microorganismos en los alimentos..	18
Tabla 2.1. Porcentaje relativo de los compuestos identificados en cuatro especies de orégano estudiadas: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.	54
Tabla 2.2. Regresiones lineales y R2 ajustados para el ensayo de DPPH y valores de concentración inhibitoria 50 (CI 50) de los aceites esenciales de las variedades de orégano evaluadas: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.	58
Tabla 2.3. Regresiones lineales y R2 ajustados para el ensayo de ácido linolénico/ β -caroteno y valores de concentración inhibitoria 50 (CI50) de los aceite esencial de las variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo, y Mendocino.....	62
Tabla 3.1. Microorganismos aislados de alimentos utilizados para los test de actividad antimicrobiana.	77
Tabla 3.2 Características de cada microorganismo en medios selectivos y diferenciales....	83
Tabla 3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos por técnica de Difusión en Disco (10 μ l/disco).	85
Tabla 3.4 Concentración Inhibitoria Mínima (mg/mL) de los aceites esenciales de las 4 variedades de orégano evaluadas por la técnica de micro dilución en caldo.....	87
Tabla 3.5 Concentración bactericida mínima de los aceites (μ g/mL) de loa aceites esenciales de orégano de las cuatro variedades: Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo.	89
Tabla 3.6 Diámetro de los halos de crecimiento de los aceites esenciales de orégano de las variedades Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo sobre Penicillium discolor.....	92
Tabla 3.7 Regresiones lineales y valores de concentración letal 50 del ensayo de letalidad de nemátodos para los aceites esenciales de orégano Compacto, Cordobés, Criollo, and Mendocino.	95
Tabla 4.1. Planilla de evaluación entregada a los jueces con la lista de los descriptores y definiciones	109
Tabla 4.2. Planilla de atributos, definiciones, intensidad de referencia y muestra “warm up” entregada durante el proceso de evaluación de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano.	111
Tabla 4.3. Lista de atributos, definiciones, intensidades de referencia y muestra “warm up” usada durante la evaluación de ricota adicionada con aceites esenciales de orégano.....	113
Tabla 4.4. Escala hedónica usada para las pruebas de aceptabilidad de aceites esenciales de orégano.	.115

Tabla 4.5. Escala hedónica usada en las pruebas de aceptabilidad de aceites de oliva saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.....	116
Tabla 4.6 Planilla correspondiente usada en las pruebas discriminativas Dúo-Trío para evaluar muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.....	117
Tabla 4.7 Planilla correspondiente usada en las pruebas discriminativas Comparación Pareada para evaluar muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.	118
Tabla 4.8. Resultados del análisis de correlación de los atributos sensoriales de las pruebas descriptivas de los aceites esenciales de orégano	123
Tabla 4.9. Análisis descriptivo del aceite de oliva adicionado con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino sometidos a dos condiciones de almacenaje Luz (L) y Oscuridad (O).....	124
Tabla 4.10. Intensidades de los atributos de ricota adicionadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino evaluadas por análisis sensorial descriptivo.	127
Tabla 4.11. Nivel de significancia detectado en el análisis de Comparaciones pareadas de las muestras de aceite de oliva con la adición de aceites esenciales de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.	130
Tabla 5.1. Variedades de quesos sin madurar.....	136
Tabla 5.2 Valores promedios (n = 3) de los indicadores químicos de oxidación medidos en aceite de oliva extra-virgen con el agregado de aceite esencial de orégano analizados en los días 0, 63, 126 de almacenaje.	156
Tabla 5.3 Ecuaciones de regresión y R ² ajustados para las variables dependientes: K232 y K268, contenidos de clorofila y carotenos, acidez libre, índice de peróxidos e índice de anisidina en muestras de aceite de oliva expuestas a la luz y en oscuridad: control (L-C y D-C) con el agregado de aceite esencial de orégano de las variedades Compacto (L-Com y D-Com), Cordobés (L-Cor y D-Cor), Criollo (L-Crio y D-Crio), y Mendocino (L-Men y D-Men) almacenadas durante 126 días a temperatura ambiente.	159
Tabla 5.4 Medias y desvíos estándares para grupos de tratamientos de aceite de olive obtenidos del dendograma considerando las variables químicas.....	164
Tabla 5.5. Atributos Positivos y Negativos analizados en aceite de oliva saborizados con aceites esenciales de orégano evaluados durante el almacenaje.....	167
Tabla 5.6 Ecuaciones de regresión y R ² ajustados para los atributos sensoriales frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio en muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano durante 126 días de almacenaje.....	169

Tabla 5.7 Medias y desvíos estándares para los grupos obtenidos del dendrograma de las muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano considerando las variaciones de las intensidades de los atributos sensoriales durante el almacenaje.	174
Tabla 5.8 Matriz de correlación obtenida del análisis de correlación de Pearson para los atributos sensoriales parámetros químicos evaluados en el estudio de muestras de ricotas con el agregado de aceites esenciales de orégano	183
Tabla 5.9 Valores medios del perfil de ácidos grasos (día 0 y día 40 del almacenaje), ecuaciones de regresión y R ² ajustados de muestras de queso Cottage saborizado con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol del estudio de almacenaje realizado durante 40 días a 40°C.	193

LISTA DE ABREVIATURAS

%AA: actividad antioxidante

α : alfa

δ : delta

γ : gamma

$\mu\text{g/mL}$: microgramo/mililitro

μL : microlitro

μm : micrometro

$\mu\text{L/mL}$: microlitro/mililitro

12:0: ácido laúrico

12:1: ácido lauroleico

14:0: ácido mirístico

14:1: ácido miristoleico

16:0 ácido palmítico

16:1 ácido palmitoleico.

17:0: ácido margárico.

18:0: ácido esteárico

18:1: ácido oleico

18:2: ácido linoleico

20:0: ácido araquídico

20:1: ácido eicosenoico

22:0: ácido behénico

24:0: ácido lignocérico

A: absorbancia de la muestra 60 min.

A: amarillo

A: muestras almacenadas a 23°C

AAPH: 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride.

ABC: área bajo la curva.

Abs: absorbancia de la solución aceite-hexano.

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt.

Ac: absorbancia del control

ACP: análisis de componentes principales.

Act: absorbancia del control 60 min.

AE: aceite esencial/es

AEAC: Ascorbic Equivalent Antioxidant Capacity (Capacidad antioxidante equivalente del ácido ascórbico).

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados.

Ai: absorbancia de la muestra en el tiempo 0.

AL: acidez libre.

ALC: ácido linoleico conjugado

AO: aceite de oliva.

AOs: ácidos orgánicos.

AO: amarillo oscuro

AON: amarillo oscuro naranja.

As: absorbancia después de la reacción con p-anisidina

AS: amarillo suave

ATS: agar tripticasa soja.

ATT: acidez total titulable.

Aw: actividad agua

BHA: butil hidroxil Anisol

BHT: butil Hidroxil Tolueno

BP: Bair Parker.

BS: bismuto sulfito

C: muestra control

CAA: Código Alimentario Argentino

CBM: concentración bactericida mínima.

CCC: caldo cerebro corazón.

CG-EM: cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masa

CI50: concentración inhibitoria cincuenta

CIM: concentración inhibitoria mínima.

CL50: concentración letal 50.

cm: centímetro

CMH: caldo müller hilton.

CO₂: dióxido de carbono

Com: aceite esencial variedad "Compacto"

Cor: aceite esencial variedad "Cordobés"

CP: componentes principales.

Crio: aceite esencial variedad "Criollo"

CTS: aaldo tripticasa soja.

DC: contenido de dienos conjugados

DEC: doble enlaces conjugados.

DMSO: dimetil sulfóxido

DPPH: radical DiPhenyl Picryl Hydrazyl

E: muestras almacenadas en estufa a 40°C

EMAG: ésteres metílico de ácidos grasos.

EMB: levine con eosina azul de metileno.

ET: Equivalentes Trolox.

eV: electrón-voltio

FID: detector de ionización de llama

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Reductor del ion ferrico).

g/100g: gramo/100 gramos

g: gramo

GRAS: Generalmente Reconocidos como Seguros

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

HP: hidroperóxidos.

IAN: índice de anisidina

IC50: concentración inhibitoria del 50%

ICTA Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

IP: índice de peróxido

IR: índice de refracción.

K232: dienos conjugados

K268: trienos conjugados.

Kg: Kilogramo

KOH: hidróxido de potasio

L: luz

Men: aceite esencial variedad "Mendocino"

mEq: miliequivalentes

mg/g: miligramo/gramo

mg/Litro: miligramo/litro

mg/mL: miligramo/mililitro

MGLM: modelos generales lineales y mixtos.

min.: minuto

mL/g: mililitro/gramo

mL/min: mililitro/minuto

mL: mililitro

mM/mg: mili moles por miligramo.

mm: milimetro

MRS: agar para lactobacilos.

MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina

MS: manitol Salado

MSD: detector de masas.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

MYP: manitol, yema de huevo, polimeyina.

N: normalidad de una solución.

Na OH: hidróxido de sodio.

Na₂S₂O₃: tiosulfato de sodio

nm: nanómetro

° C/min: grado centígrado/minuto

° C: grado centígrado

O/L: relación Oleico/Linoleico

O: oscuridad.

O₂: oxígeno

-OH: grupo hidroxilo

p/p: porcentaje peso/peso

PBS: buffer fosfato salino.

PICM: porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio.

ppm: partes por millón

PUFA: polyunsaturated fatty acid

r: coeficiente de correlación de Pearson.

SS: salmonella- shigella

TAG: triacilglicéridos

TAH: transferencia de un átomo de hidrógeno

TBA: análisis con ácido tiobarbitúrico

TBHQ: Tert-Butil Hidro Quinona

TC: trienos conjugados.

TEAC: capacidad antioxidante equivalente de trolox.

TES: transferencia electrón simple

TPTZ: radical 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UFC: unidades formadoras de colonias.

UNC: Universidad Nacional de Córdoba

USDA: United States Department of Agriculture

UV: ultravioleta

v/v: porcentaje volumen/volumen

VH: valor hidroperóxido.

X: variable independiente

Y: variable dependiente

β : beta

$\mu\text{eq O}_2/\text{kg}$: micro equivalentes de oxígeno por kilogramo.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las hierbas aromáticas y especias conforman un grupo de especies vegetales que se caracterizan por su contenido de sustancias aromáticas, sápidas, colorantes o excitantes que se encuentran en distintos órganos, tales como frutos, semillas, raíces, hojas, flores o inflorescencias. Sus aplicaciones son muy amplias e incluyen desde el uso culinario hasta la extracción de moléculas aromáticas para integrar una gama variada de productos como por ejemplo, ser parte de la composición de repelentes de insectos o formar productos de limpieza. En Argentina, el sector de producción de hierbas aromáticas tiene gran complejidad y mucha potencialidad: se registran hoy alrededor de 40 especies botánicas producidas e industrializadas o bien importadas y elaboradas en el territorio nacional. Con ellas se abastece a la industria alimenticia, cosmética, de limpiadores y desinfectantes, de perfumería, entre otras. Además son muy diversos los procesos y grados de industrialización de los productos finales (selección, deshidratado, trituración, molienda, extracción de aceites esenciales y oleorresinas, etc.) (Parra y Cameroni, 2009; Ascerbi y Ruesta, 2012). Hay seis regiones donde se cultivan las aromáticas en el país: Litoral, Mesopotamia, Cuyo, NOA, Sur y Centro. Dentro de esta última región se consideran las provincias de Córdoba y el noroeste de San Luis. Es un área de importancia tanto en lo referido a la obtención de materia prima vegetal, como de esencias. Entre las especies cultivadas se destacan: romero, albahaca, lavandin, eucalipto, orégano, tomillo, estragón, melisa, ruda, angélica, vetiver, salvia moscatel, salvia común, menta inglesa, ajeno, coriandro, chilca, y suico. Esta última es una especie nativa interesante para la extracción de un aceite esencial muy apreciado en perfumería (Ascerbi y Ruesta, 2012).

Los componentes de las hierbas aromáticas y especias forman parte de gran variedad de productos incorporados a la vida cotidiana, por lo que amplían en forma permanente su horizonte de aplicaciones en distintas actividades industriales. Con respecto a los alimentos las especias pueden ser adicionadas de diversas formas (hojas enteras, hojas trituradas, extractos aislados, etc.) y con distintos objetivos, por ejemplo, aderezar o mejorar el aroma, sabor y color de los alimentos y bebidas. En algunos casos, además pueden aportar propiedades antioxidantes y sirven para preservar el producto. En la elaboración de alimentos procesados la incorporación de

aromas es primordial. El agregado de hierbas aromáticas y especias complementa el sabor de los alimentos y le otorga características organolépticas más atractivas. Estos productos son, por ejemplo, importantes insumos de embutidos y conservas, ya que hacen al sabor y aroma característicos de la mayoría de los mismos. El agregado de hierbas aromáticas y especias colabora con la generación del sabor distintivo de un producto, entendiéndose como tal al complejo conjunto de propiedades olfativas y gustativas percibidas en la degustación, que pueden estar influenciadas por propiedades táctiles y térmicas. Actualmente también se elaboran alimentos tipo gourmet con el agregado de mezclas poco tradicionales de sabores y aromas. Esto posibilita ampliar la oferta de alimentos que generan en los consumidores nuevas sensaciones sápidas y olfativas.

Para la extracción de un extracto determinado el procedimiento se relaciona con el tipo de compuesto a ser extraído. La selección de un posible procedimiento óptimo de extracción puede incrementar la concentración relativa de compuestos antioxidantes provenientes de las plantas (Suhaj, 2006).

Los extractos obtenidos de plantas aromáticas, generalmente, se obtienen por medio de destilación, extracción y prensado en frío (Smith *et al.*, 2005). Para obtener polifenoles de plantas se utilizan tres técnicas: extracción utilizando solventes, extracción en fase sólida y extracción supercrítica (Suhaj, 2006). Para la obtención de aceites esenciales se utiliza hidrodestilación (Zygodlo y Juliani, 2003). Para propósitos industriales el etanol y la hidrodestilación son mejores procedimientos para la extracción, ya que si quedan residuos en los aceites esenciales no acarrea problemas de seguridad.

Los aceites esenciales de especias aromáticas han sido estudiados principalmente desde un punto de vista de la química del aroma y fragancia. Su principal uso en los alimentos es para contribuir a aromatizar y mejorar sensorialmente los productos. Los aceites esenciales y sus componentes son productos naturales considerados no peligrosos para la salud humana, y que actualmente se le atribuyen importantes propiedades funcionales, lo cual resulta atractivo para los consumidores (Singh y Majumdar, 1999). Muchos autores, han reportado propiedades antioxidantes (Baratta *et al.*, 1998; Youdim y Deans, 2000) y antimicrobianas (Burt, 2004; Holley y Patel, 2005) las cuales son aportadas, ya sea por las especias y/o sus aceites esenciales

(Azizi *et al.*, 2009). En relación al orégano, en el Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba han realizados estudios que han demostrado que los aceites esenciales del orégano son antioxidantes muy efectivos que previenen el deterioro oxidativo de lípidos de algunos alimentos con alto contenido graso (Olmedo *et al.*, 2008; Olmedo *et al.*, 2009; Olmedo *et al.*, 2012)

El orégano

El orégano ha sido conocido y utilizado durante siglos. El mundo entero descubrió esta aromática después de la Segunda Guerra Mundial, con la expansión del consumo de pizza, ya que desde la Edad Media se le agregaba una hierba, la variedad *Majorana*, confundida con orégano, ya que la misma se trataba de una planta silvestre (Kintzios, 2000; Kintzios, 2002).

“Orégano” es el nombre común con que se denomina a más de 60 especies vegetales utilizadas en todo el mundo principalmente como condimento. La mayoría de ellas pertenecen a las familias Lamiaceae (oréganos europeos, *Origanum* sp) y Verbenaceae (oréganos Mexicanos, *Lippia* sp) (Ietswaart, 1980; Kintzios, 2002). Esta hierba aromática es originaria de la Región Mediterránea. Dado que la mayoría de los taxones de orégano crecen naturalmente en Turquía, se sugiere a este país como el centro de distribución del género (Baser, 2002). Las especies de orégano más utilizadas pertenecen al género *Origanum*, nombre derivado de los vocablos griegos oros (montaña) y granos (adorno u ornamento) (Kintzios, 2002).

Durante los últimos 150 años no menos de 70 especies, subespecies, variedades e híbridos reconocidos como orégano han recibido más de 300 nombres científicos (Kintzios, 2002). La mayoría de los híbridos de orégano identificados cuentan con escasos ejemplares en la naturaleza. De hecho algunos de ellos sólo se encontraron cultivados en jardines como es el caso de *Origanum x applii* (Ietswaart, 1980).

En nuestro país se encuentra documentada la existencia de siete taxones pertenecientes al género *Origanum*: *Origanum vulgare* ssp *vulgare* L., *Origanum majorana* L., *Origanum vulgare* ssp. *virens* (Hoffmanns et Link) Iestsw., *Origanum vulgare* ssp. *viride* (Boissier) Hayek, *Origanum x applii* (Domin.) Boros, *Origanum x majoricum* Cambes. y *Origanum dictamnus* L. (Rouquaud y Videla 2000; Arizio *et al.*, 2006.).

Producción y Comercialización

A nivel mundial, los principales productores y exportadores de orégano son Turquía (Baser, 2008.; Koksall *et al.*, 2010) Grecia, Israel, Albania, Indonesia y Egipto (Musa Özcan y Aydar, 2008; Koksall *et al.*, 2010). En Latinoamérica, tradicionalmente los principales productores son México, Chile y Perú (Arizio *et al.*, 2006; Musa Özcan y Aydar, 2008; Koksall *et al.*, 2010).

En el ámbito nacional, la producción de esta especie aromática ha atravesado distintas situaciones. Durante los años `90 la demanda de orégano se cubría casi totalmente con producto importado, principalmente de Chile y Perú. Esta situación condujo a la caída de la producción nacional y transformó al orégano en la principal hierba aromática importada, limitando los bajos niveles de exportación a material procesado (producto con mayor valor agregado) (Arizio *et al.*, 2006). En el 2001, la devaluación de la moneda local marcó la disminución de las importaciones, pasando de las 1000 toneladas en ese año a 378 toneladas importadas en 2002. Entre 2003 y 2004, las importaciones comenzaron a incrementarse, mientras que la producción nacional todavía no alcanzaba a recuperarse; pero el tipo de cambio (competitivo para las exportaciones) determinó un crecimiento de la producción nacional que, lentamente, comenzó a satisfacer la demanda del mercado interno dejando pequeños saldos exportables. Sin embargo, en el transcurso de 2005 y 2006, continuaron registrándose importaciones provenientes de Chile y Perú. Durante 2006, el crecimiento de la producción local de orégano comenzó a hacerse evidente (Arizio *et al.*, 2006; Caempa , 2008) debido, principalmente, al aumento de la superficie implantada, a la mejora de la calidad y al mayor rendimiento de la hierba deshidratada (Arizio *et al.*, 2006).

A partir de 2006 esta especie se ubica entre las principales hierbas aromáticas exportadas. En ese año 2007, 27% del volumen de orégano se destinó a la exportación, convirtiéndose en el principal producto aromático exportado (Maggi, 2008a); situación que se repitió en el período enero-mayo de 2008, durante el cual el volumen exportado de esta especie ascendió al 70% del total de hierbas aromáticas (Maggi, 2008b) En 2009 y 2010, el orégano se ubicó en tercer lugar dentro de las hierbas exportadas representando el 17,4% del total de las exportaciones (Parra y Cameroni, 2009; Cameroni, 2010). Durante los años 2007, 2008, 2009 y 2010 se introdujeron al

país más de 900 toneladas de orégano, de las cuales el 75% procedió de Chile (Maggi, 2008a; Parra y Cameroni, 2009)

Con respecto a las exportaciones, que comenzaron a incrementarse a partir del 2001, sus principales destinos fueron España, Francia y Alemania. El 93,4% del volumen de orégano exportado durante el 2003 tuvo como destino Francia. En 2004 y 2005 España apareció como el principal destino de exportación concentrando el 74,3% y el 37,16 del volumen total. En el 2006, Brasil se convierte en el principal comprador de esta especie aromática, adquiriendo el 50,9% del volumen total. Durante 2007, 2008, 2009 y 2010 Brasil se posicionó como el primer destinatario del orégano exportado concentrando el 17,5%, 52%, 23% y 24% de las exportaciones de cada año, respectivamente (Arizio *et al.*, 2006; Cameroni, 2010).

Problemática del cultivo de orégano en la Argentina

En los últimos años la producción nacional de orégano alcanzó a cubrir la demanda del mercado interno, dejando márgenes crecientes de producción destinados a la exportación (Caempa, 2008). Por otro lado, siguen siendo numerosas las problemáticas que afectan al cultivo de orégano, como por ejemplo, el orégano producido se cultiva sin tener en cuenta la variedad, la sanidad o las prácticas de cosecha y poscosecha, que permitan conservar un producto con características organolépticas adecuadas y libres de contaminaciones.

Además, existe una escasa identificación taxonómica y evaluación agronómica de los materiales vegetales en cultivo, lo que hace difícil realizar una tipificación de la producción por variedad comercial. En lo referente a enfermedades y plagas, aunque los aceites esenciales tienen efectos tóxicos y/o repelentes sobre microorganismos e insectos (Kodifis *et al.*, 2003), los cultivos de orégano en Argentina se ven afectados por enfermedades y plagas como: a) el tizón foliar (*Alternaria alternata*) que, aunque no se manifiesta todos los años, le produce severos daños, b) manchas foliares causadas por *Colletotrichum dematium*, c) el ataque de *Phoma herbarum* y *Rhizoctonia solani*, d) la podredumbre gris producida por la presencia *Botritis cinerea* (tizón) y *Puccinia rubsaameni* (roya de la hoja), y e) la aparición de oídio ocasionada por *Erysiphe galeopsidis* (Arizio *et al.*, 2006; Di Fabio, 2008). También se ha registrado alta mortandad de plantas en coincidencia con la presencia de *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. (Gaetán *et al.*, 2007). En cuanto al ataque de insectos, el cultivo de orégano puede verse afectado

por áfidos (Aphididae), minadores de la hoja (*Lyriomiza* spp.) y trips (Thripidae) (Kalogeropoulos *et al.*, 2010). Tanto los virus del mosaico de la alfalfa (AMV) como el virus del mosaico de las cucurbitáceas (CMV), afectan también al cultivo de orégano los cuales son transmitidos por áfidos (Arizio *et al.*, 2006; Di Fabio, 2008).

Orégano: Usos y Aplicaciones

El orégano se utiliza principalmente como condimento (Arizio *et al.*, 2006; Di Fabio, 2008; Dambolena *et al.*, 2010). Se emplea como aromatizante de diversas formulaciones de licores, salsas de tomate y productos horneados (como pizzas y panes) y en aderezos para ensaladas (Kula *et al.*, 2007; Koksai *et al.*, 2010). Como hierba medicinal se destacan sus propiedades antiespasmódicas, estimulantes, expectorantes, estomáquicas, diuréticas, antisépticas y cicatrizantes (Varela *et al.*, 2007; Arias Toledo, 2009). Estudios farmacológicos demostraron la actividad colerética, espasmolítica y antihipertensiva (Baser, 2008.). Se lo utiliza también como calmante en pomadas y compresas ya que alivia dolores reumáticos y en la industria cosmética para la elaboración de perfumes y jabones (Skoula y Harborne, 2002; Arizio *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha reportado la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral de los aceites esenciales de orégano. Al respecto, se ha observado una fuerte actividad antibacteriana contra distintas especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Boerema *et al.*, 2006; Alves de Azeredo *et al.*, 2010) y un efecto inhibitor sobre *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Brucella abortus* y *Helicobacter pylori* (Lin *et al.*, 2004; Sahin, 2004.). También se destaca el efecto biocida sobre distintas especies pertenecientes al género *Candida* (Brum Cleff *et al.*, 2010; Sahin *et al.*, 2004.), lo que muestra al aceite esencial del orégano como un potencial tratamiento alternativo de la candidiasis. Se ha observado el mismo efecto inhibitor sobre hongos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* y *Trichophyton* (Sahin *et al.*, 2004.).

En la industria alimenticia cobran especial importancia el uso de aceites esenciales ya que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (21 CFR Sec. 182.10, 182.20, 482.40 y 182.50) dice que los complejos naturales de sabores o “*flavors*” como los

aceites esenciales, son reconocidos como seguros (GRAS) para ser usados en forma intencionada en alimentos (Smith *et al.*, 2005). Dado a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales del orégano (Milos y Jerkovic, 2000; Tsimogiannis y Oreopoulus, 2006; Bhale *et al.*, 2007 ; Dambolena *et al.*, 2010), esta hierba aromática o sus aceites esenciales pueden ser utilizados como conservantes naturales de alimentos que permiten prolongar la vida útil de los mismos, especialmente aquellos ricos en grasas poli-insaturadas (Lagouri *et al.*, 1993). Los aceites esenciales reducen la oxidación e inhiben la proliferación de microorganismos en carnes (Botsoglou *et al.*, 2003), embutidos (Cardona Henao y Francis, 2009.), carnes de peces y moluscos y frutas frescas (Musa Özcan *et al.*, 2008.).

Los Alimentos

Los alimentos son materiales que, en sus formas naturales, procesados o cocidos, son consumidos por los seres humanos como alimento y para el disfrute. Los términos "alimento" y "disfrute" introducen dos propiedades importantes de alimentos: el valor nutricional y el valor hedónico. El primero es relativamente fácil cuantificar, ya que todos los nutrientes importantes son conocidos y sus efectos se definen. La definición hedónica del valor de una comida es más difícil, porque debe tener en cuenta todas las propiedades de un alimento, como el atractivo visual, olor, sabor y textura, que interactúan con los sentidos. Un requisito adicional de un alimento es que sea libre de materiales tóxicos. La química de los alimentos está implicada no sólo en la aclaración de la composición de las materias primas y productos finales, sino también en los cambios que se producen en los alimentos durante su producción, procesamiento, almacenamiento y la cocción. La naturaleza altamente compleja de los alimentos es resultado de múltiples reacciones deseadas y no deseadas que son controlados por una variedad de parámetros. Para obtener información significativa sobre estas reacciones, es necesario crear sistemas modelo de alimentos. Se puede partir del análisis composicional del alimento y seguir las reacciones de un solo componente o de una mezcla sencilla de ellos (Belitz *et al.*, 2009).

La seguridad es el primer requisito de cualquier alimento. Esto significa que un alimento debe estar libre de cualquier químico perjudicial o contaminante microbiano en el momento de su consumo. Muchas reacciones pueden alterar la calidad o la seguridad alimentaria (Belitz *et al.*, 2009). El deterioro de los alimentos por lo general consiste en una serie de eventos primarios

seguido por eventos secundarios, que a su vez, se hacen evidentes como atributos de calidad alterados.

Los Lípidos

Los alimentos contienen varios tipos de compuestos lipídicos, sin embargo, los triacilgliceroles (TAG) y fosfolípidos (FL) son los más abundantes e importantes. El análisis exacto y preciso de los lípidos en los alimentos es importante para determinar el etiquetado nutricional, así como para la promoción y la comprensión de los efectos de las grasas y aceites en la funcionalidad de los alimentos (Akoh y Min, 2002). Al mismo tiempo, el conocimiento sobre las características estructurales de los lípidos puede permitir: el desarrollo de productos diseñados para una función o aplicación en particular, los componentes constitutivos y el valor nutritivo, la estandarización y la uniformidad de identidad, así como la promoción y la comprensión de los efectos de las grasas y aceites en la funcionalidad de los alimentos.

Los lípidos son uno de los componentes principales de los alimentos de origen vegetal y animal. No hay una definición precisa disponible para el término lípido, sin embargo, que por lo general incluye una amplia categoría de compuestos que tienen algunas propiedades comunes y composicionales similares (Carpenter *et al*, 1993). Entre las más conocidas definiciones se encuentra la de Christie, (1982): “los lípidos son una gran variedad de productos naturales que incluyen ácidos grasos y sus derivados, esteroides, terpenos y carotenoides, que tienen en común una marcada solubilidad en solventes orgánicos como éter di etílico, hexano, benceno, cloroformo o metanol”. Kates, (1986), dice que los lípidos son sustancias que (a) son insolubles en agua, (b) solubles en solventes orgánicos, (c) que contienen largas cadenas carbonadas en sus moléculas y (d) que están presentes o derivan de organismos vivos. Gurr, (1971) por otro lado, plantea que “los lípidos son un grupo heterogéneo de sustancias, que tienen en común la propiedad de ser insolubles en agua pero su solubilidad en solventes no polares como el cloroformo, hidrocarburos o alcoholes es común”.

A pesar del uso común las definiciones basadas en la solubilidad, tienen sus problemas obvios. Algunos compuestos que son considerados lípidos, como ácidos grasos de cadena corta (C1-C4) son completamente miscibles en agua e insolubles en solventes no polares. Algunos investigadores han aceptado esta definición de solubilidad estrictamente y han excluido a los

ácidos grasos de cadena corta C1-C3 de la definición de lípidos, manteniendo al ácido butírico (C4) solo por su presencia en grasas de productos lácteos. Por otro lado, algunos compuestos son considerados lípidos, como ácidos grasos trans, que no son directamente derivados de un organismo vivo. El desarrollo de lípidos a-calóricos sintéticos y lípidos reducidos en calorías complican aún más esta cuestión, porque pueden ser no solubles. Junto con los hidratos de carbono y proteínas, los lípidos constituyen los principales componentes estructurales de los tejidos. Sin embargo, las características comunes y únicas de los lípidos se refieren a su solubilidad en lugar de sus características estructurales (Akoh y Min, 2002; Belitz *et al.*, 2009).

Los ácidos grasos, a su vez son saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados comienzan con ácido metanoico (fórmico). Los ácidos metanoico, acético, y propanoico son poco comunes en las grasas naturales y con frecuencia se omiten las definiciones de los lípidos. Sin embargo, se encuentran en muchos productos alimenticios. Omitiendo estos ácidos grasos, ya que son solubles en agua se podría argumentar también la eliminación ácido butírico, pero es difícil dada su importancia en grasas lácteos. La solución más simple es aceptar a los ácidos carboxílicos de cadena muy corta como ácidos grasos, al tiempo que se reconoce la rareza de las grasas naturales de estos compuestos solubles en agua (Akoh y Min, 2002). Con respecto a los ácidos grasos insaturados, por mucho, el ácido graso monoinsaturado más común es el ácido oleico (18:1 ω 9), aunque más de 100 ácidos grasos monoinsaturados han sido identificados en la naturaleza (Chapkin, 1992). La posición del doble enlace más común es ω 9. Sin embargo, ciertas familias de plantas acumulan ácidos grasos “inusuales”. Por ejemplo, aceite de semilla de *Eranthis* contienen ω 5. Ácido erúxico (22:1 ω 9) se encuentra en niveles altos (40-50%) en las semillas de crucíferas como la colza y mostaza (Aitzetmuller, 1996).

Debido a su grado de instauración, los lípidos son muy susceptibles a la autooxidación. Esta se produce a través de un mecanismo de radicales libres auto-sostenible que genera hidroperóxidos (productos primarios), que a su vez se someten a la ruptura para formar diferentes aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos (productos secundarios). La presencia de los productos secundarios de oxidación de lípidos influye en la calidad general de un lípido (Min y Kim, 1999; Min y Boff, 2002). La oxidación puede alterar el sabor y la calidad nutricional de los alimentos y producir compuestos tóxicos, todos los cuales pueden hacer que los alimentos sean menos aceptable o inaceptable para los consumidores (Jung *et al.*, 1998). Los productos de

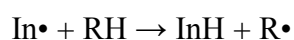
oxidación típicamente incluyen compuestos de bajo peso molecular que son volátiles y otorgan sabor indeseable (Lee y Min, 1988).

Para muchos alimentos que contienen lípidos, se toman medidas especiales para reducir o prevenir la oxidación, tales como la eliminación de oxígeno, la adición de antioxidantes, y uso de materiales de envases con barrera para gases. La tasa de la oxidación depende de varios factores, incluyendo la temperatura, la presencia de inhibidores o de catalizadores, y de la naturaleza de los sustratos (Frankel, 1984, 2005). Los ácidos grasos insaturados son más susceptibles a la oxidación que los ácidos grasos saturados, una propiedad que se debe principalmente a la energía de activación baja en el inicio de la formación de radicales libres para la auto-oxidación del oxígeno triplete (Holman y Elmer, 1947; Lea, 1952).

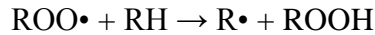
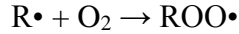
Durante su almacenamiento, la oxidación de lípidos es una de las principales causas de deterioro de la calidad, inclusive a temperaturas refrigeradas (como en el caso de los productos lácteos) o congeladas. A menudo visto en las etapas posteriores de almacenamiento, las pérdidas de calidad se manifiestan a través de una variedad de mecanismos. A pesar de que la oxidación de lípidos suele causar una disminución en la aceptación de los consumidores, en algunos casos la oxidación de lípidos conduce a la mejora de la calidad del producto. Un ejemplo es la producción enzimática de aromas de pescado fresco (Min y Kim, 1999; Min y Lee, 1999).

Los dos componentes principales implicados en la oxidación de lípidos son los ácidos grasos insaturados y el oxígeno. En el proceso de oxidación, se añade oxígeno de la atmósfera a cierto ácido graso, se crean intermediarios inestables que con el tiempo se descomponen para formar compuestos con aroma y sabor desagradable. Aunque existen oxidaciones enzimáticas y fotogénicas, el proceso más común y más importante por el cual ácidos grasos insaturados interactúan con el oxígeno, es un mecanismo de radicales libres que se caracteriza por tres grandes fases:

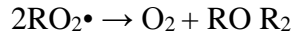
Iniciación:



Propagación:



Terminación:



La iniciación se produce cuando el hidrógeno es tomado a partir de un ácido graso insaturado, lo que resulta en un lípido con radicales libres, que a su vez reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical peróxido lipídico. La fase de propagación de la oxidación es fomentada por las interacciones lípido-lípido, con lo que el peróxido lipídico toma un radical hidrógeno a partir de una molécula adyacente, lo que resulta en un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical libre lipídico (McCord y Fridoich, 1968; Akoh y Min, 2002). Las interacciones de este tipo siguen 10 a 100 veces antes de que los dos radicales libres se combinan para terminar el proceso (McCord y Fridoich, 1968; McCord y Fridoich, 1969). Magnificaciones adicionales del proceso de oxidación, se producen a través de reacciones de ramificación, también conocidas como iniciación secundaria: $Fe^{+2} + LOOH \rightarrow LO\cdot + OH\cdot$. Los radicales producidos proceden de hidrógenos tomados de ácidos grasos insaturados.

Por sí mismos, los hidroperóxidos lipídicos no se consideran perjudiciales para la calidad de los alimentos; sin embargo, son aún más degradados en compuestos que son responsables de sabores desagradables conocidos como “off-flavors”. El mecanismo principal para la formación de aldehídos a partir de hidroperóxidos de lípidos es la ruptura de los dos enlaces C-C en cada lado del grupo hidroperóxido. Dos tipos de aldehídos se forman a partir de la ruptura del enlace carbono: aldehídos alifáticos derivados del terminal metilo de la cadena de ácido graso y aldehídos todavía unidos a la molécula lipídica originaria. Los aldehídos insaturados pueden ser oxidado adicionalmente, formando productos volátiles adicionales (Frankel, 2005).

Para terminar la secuencia de repetidas propagaciones, ocurren dos tipos de reacciones: acoplamiento radical-radical y disrupción radical-radical, un proceso en el que dos productos

estables se forman a partir de un átomo A• y B• mediante un proceso de transferencia de un átomo o grupo. En ambos casos, se forman productos no radicales. Radicales peróxidos secundarios y primarios terminan de manera eficiente por un mecanismo en el que el tetróxido se descompone para dar un oxígeno molecular, un alcohol, y un compuesto de carbonilo (Porter, 1980; Porter, 1990; Fennema *et al.*, 2008).

La tasa de oxidación de los ácidos grasos aumenta en relación a su grado de insaturación. La tasa relativa de auto-oxidación de los ácidos oleico, linoleico y linolénico es en el orden de 1:40-50:100 sobre la base de la absorción de oxígeno y 01:12:25 sobre la base de formación de peróxido (Hsieh *et al.*, 2001). Por lo tanto, los aceites que contienen proporciones relativamente altas de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) pueden experimentar problemas de estabilidad. La liberación de productos de los hidroperóxidos, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, e hidrocarburos poseen sabores ofensivos y desagradables. Estos compuestos también pueden interactuar con otros componentes de los alimentos y cambiar sus propiedades funcionales (Sherwin, 1978; O'Brien, 2009).

Los Antioxidantes

Los antioxidantes retrasan el inicio de la oxidación o disminuyen la tasa en la que sucede. Estas sustancias pueden ser componentes naturales de los alimentos, pero también pueden ser añadidos intencionalmente a los productos o se forman durante el procesamiento. Su papel no consiste en mejorar la calidad de los alimentos, pero sí mantenerla y prolongar su vida útil. Los antioxidantes usados en alimentos debe cumplir ciertos requisitos para que sea viable, ser económicos, no tóxico, eficaces a bajas concentraciones, estables, capaces de sobrevivir al procesado y su color, sabor, olor no deben afectar significativamente sobre las características del producto. La elección del antioxidante a utilizar depende de la compatibilidad del producto y la reglamentación (Giese, 1996). Los antioxidantes se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción en antioxidantes primarios y antioxidantes secundarios. Algunos antioxidantes tienen más de un mecanismo de acción y se conocen como antioxidantes múltiples (Coppin, 1983).

1. Antioxidantes primarios o tipo 1. Son antioxidantes aceptadores de radicales libres que demoran o inhiben el paso de iniciación o también, interrumpen el paso de propagación de autooxidación. Estos antioxidantes reaccionan con radicales lipídicos y peróxido y los convierten

en productos no radicalarios más estables. Los antioxidantes primarios donan átomos de hidrógeno al radical lipídico y producen derivados de lípidos y radicales antioxidantes que son más estable y menos disponibles para promover aún más la auto-oxidación (Porter, 1980). Estos antioxidantes son más eficaces si se añaden durante la etapa de inducción e iniciación, cuando no se haya producido la etapa de propagación cíclica. La adición de antioxidantes a las grasas que ya contienen cantidades sustanciales de peróxidos rápidamente resultará en la pérdida de la función antioxidante (Buck, 1991). Los antioxidantes primarios son mono-o poli fenoles con diversas sustituciones de anillo. La sustitución con grupos donantes de electrones en posiciones orto y para con respecto al grupo hidroxilo de fenol aumentan la actividad antioxidante del compuesto. Los antioxidantes primarios más comúnmente utilizado en los alimentos son compuestos sintéticos como por ejemplo: hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG), y terbutil hidroquinona (TBHQ). Sin embargo, unos pocos componentes naturales de los alimentos también actúan como antioxidantes primarios y se añaden comúnmente a los alimentos. Los tocoferoles son los antioxidantes naturales primarios más utilizados. Los carotenoides son otro grupo de compuestos naturales que tienen actividad antioxidante primaria, aunque el mecanismo difiere de los compuestos fenólicos (Akoh y Min, 2002).

2. Antioxidantes secundarios o tipo 2. Son preventivos, actúan a través de numerosos mecanismos. Estos antioxidantes frenan la velocidad de oxidación de distintas formas, pero no convierten a los radicales libres en productos más estables. Los antioxidantes secundarios pueden quelar metales pro oxidantes y desactivarlos, reponer hidrógeno para antioxidantes primarios, descomponer a los hidroperóxidos en especies no radicales, desactivar oxígeno singlete, absorber la radiación ultravioleta, o actúan eliminado el oxígeno. A estos antioxidantes se hace referencia a menudo como sinergistas porque promueven la actividad antioxidante de los antioxidantes tipo 1. Ácido cítrico, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, lecitina, y ácido tartárico son buenos ejemplos de agentes sinérgicos (Akoh y Min, 2002).

Muchos consumidores están preocupados por la seguridad de los alimentos y sobre los efectos potenciales de los aditivos sintéticos en su salud. A pesar de la eficacia superior, de bajo costo, la estabilidad de los antioxidantes sintéticos, la sospecha sobre estos compuestos recae en

cuestiones de seguridad alimentaria y son seriamente sospechados de generar problemas irreversibles sobre la salud (Asensio *et al.*, 2013; Olmedo *et al.*, 2013; Quiroga *et al.*, 2013).

Los antioxidantes sintéticos se añaden intencionadamente a los alimentos para inhibir la oxidación de lípidos. Los antioxidantes sintéticos aprobados para su uso en los alimentos incluyen BHA, BHT, palmitato de ascorbilo, y TBHQ entre otros. La síntesis de antioxidantes de uso alimentario se ve limitada por el aumento de los costos de investigación y desarrollo, costos asociados con la evaluación de la seguridad, y el tiempo requerido para obtener la reglamentación y aprobación. Estas restricciones, así como la creciente preferencia de los consumidores por los aditivos alimentarios naturales, ha llevado a la industria a impulsar el desarrollo de antioxidantes de fuentes naturales (Haumann, 1990; Belitz *et al.*, 2009).

Los consumidores están preocupados por la seguridad de los alimentos y por los efectos potenciales de los aditivos sintéticos en su salud. La sospecha de que los antioxidantes sintéticos pueden dar lugar a la carcinogenicidad ha dado lugar a una disminución de su uso (Namiki, 1990; Nepote *et al.*, 2004). Una tendencia hacia el uso de "aditivos alimentarios naturales" en la industria alimentaria ha sido evidente desde hace bastante tiempo como resultado de la demanda del consumidor. Existen algunos conservantes naturales en los alimentos, mientras que otros pueden ser añadidos al producto o pueden surgir como resultado de procesar o cocinar. Antioxidantes naturales en alimentos tales como ácido cítrico y ácido ascórbico se utilizan ampliamente en la industria alimentaria. La investigación reciente se ha centrado en el aislamiento y la identificación de antioxidantes eficaces de origen natural (Akoh y Min, 2002).

Gran cantidad de investigaciones se han dedicado a la identificación de los antioxidantes de varias fuentes naturales. El ácido ascórbico y tocoferoles son los antioxidantes naturales comerciales más importantes. Otras fuentes de antioxidantes naturales incluyen carotenoides, flavonoides, aminoácidos, proteínas, proteínas hidrolizadas, productos de reacción de Maillard, fosfolípidos y esteroides. También, numerosos antioxidantes fenólicos de origen natural han sido identificados en fuentes y extractos vegetales (Nepote *et al.*, 2002; Olmedo *et al.*, 2008; Belitz *et al.*, 2009). Antioxidantes naturales permiten a los procesadores de alimentos producir productos estables con "etiquetas limpias" con todos los ingredientes naturales. Por otro lado estos productos con antioxidantes naturales pueden tener varios inconvenientes, incluyendo altos

niveles de uso, sabor indeseable y/o contribuciones de color, y la falta de estabilidad debido a la baja eficiencia antioxidante (Akoh y Min, 2002). La seguridad de los antioxidantes naturales no debe darse por sentado. La principal ventaja de estas sustancias presentes en numerosos alimentos es que la prueba de seguridad es de inferior rigurosidad que la requerida para los productos sintéticos. No se requiere ninguna prueba de seguridad si el antioxidante es un constituyente natural de los ingredientes GRAS. Además, algunos antioxidantes naturales derivados de las especias, las hierbas, y las reacciones de Maillard puede aparecer como aromatizantes en lugar de antioxidantes, una distinción técnica que sirve para eximir a las sustancias de los requisitos de pruebas de seguridad (Akoh y Min, 2002). Los principales antioxidantes naturales son:

1. Tocoferoles y tocotrienoles
2. Ácido ascórbico y sales de ascorbato
3. Carotenoides
4. Antioxidantes enzimáticos
5. Proteínas y sustancias relacionadas
6. Productos de la reacción de Maillard
7. Fosfolípidos
8. Esteroles
9. Gomas
10. Antioxidantes derivados de plantas.

Los antioxidantes presentes en las plantas incluyen homólogos de vitamina E, carotenoides, proteínas, entre otros compuestos. Las plantas producen una amplia variedad de metabolitos fenólicos que al someterse a la oxidación tienen el potencial de minimizar los efectos de autooxidación. Varios compuestos fenólicos, además de vitamina E, han demostrado potencial para su uso como antioxidantes de los alimentos o que ya están sirviendo como tal. Los antioxidantes fenólicos más comunes incluyen el ácido gálico (como un constituyente de galotaninos poliméricos y elagitaninos) y ácidos protocatéquiconico, fenilpropanoides y metabolitos de vías mixtas como flavonoides, y suberinas (Croteau *et al.*, 2000; Thornfeldt, 2005).

Los flavonoides son productos secundarios del metabolismo de la planta y constan de antocianinas, catequinas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, y proantocianidinas. Varios de los flavonoides tienen actividad antioxidante relacionada con su capacidad de quelar metales. Los flavonoides también actúan como antioxidantes primarios y eliminadores de aniones superóxido (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996). Los ácidos fenólicos están estructuralmente relacionados con flavonoides y sirven como precursores de su biosíntesis. Los ácidos fenólicos como cafeico, p-cumárico, ferúlico y ácidos sinápicos, hidroxicoumarinas, y ácidos hidroxibenzoico (4-hidroxibenzoico, elálgico, ácidos gálicos, gentísico, protocatéquico, salicílico y vanílico) son compuestos fenólicos que pueden formar complejos metálicos. La actividad antioxidante de estos compuestos varía en gran medida y también es dependiente del sistema de alimentos.

Flavonas y flavonoles se encuentran en las frutas como glucósidos. Estos compuestos también son frecuentes en los vegetales, el té y el vino (Rice-Evans y Miller, 1996). Ácidos fenólicos, ácidos orgánicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos tienen potencial como antioxidantes de los alimentos. El contenido fenólico específico de compuestos en las plantas puede ser muy baja, lo que requiere grandes cantidades de la materia prima para obtener cantidades suficientes de estos antioxidantes (Pratt, 1992).

Se han identificado numerosas plantas como fuentes de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. La lista de los recursos naturales antioxidantes está creciendo como resultado de la cantidad de investigación que se está llevando a cabo para aislar e identificar estos compuestos en las plantas (Pratt, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1995; Akoh y Min, 2002).

En el caso de las especias y hierbas aromáticas han sido usadas como saborizantes durante miles de años. Se cree que la actividad antioxidante de estas especias aromáticas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y especialmente ácidos fenólicos y flavonoides (Ridgway *et al.*, 1996). El fuerte sabor de las especias se opone a su uso en muchos productos alimenticios. Los investigadores han tratado de identificar y aislar determinados componentes antioxidantes de las especias que no contribuyan con sabores fuertes o color a los alimentos. Hasta la fecha, sólo el romero y la salvia (plantas Perilla) son comercialmente disponibles como extractos antioxidantes sin sabor, inodoro e incoloro. El uso de estos productos

está aumentando significativamente junto con el aumento de la demanda de alimentos con aditivos naturales buscado por cierto tipo de consumidores (Madhavi *et al.*, 1996).

Actividad agua y microorganismos

El agua es el constituyente predominante en muchos alimentos. Como medio, el agua, fomenta reacciones químicas, y es un reactivo directo en los procesos hidrolíticos. Por lo tanto, la eliminación del agua de los alimentos o la unión por el aumento de la concentración de sal común o azúcar retarda muchas reacciones e inhibe el crecimiento de microorganismos, mejorando así la vida útil de muchos alimentos. A través de la interacción física con proteínas, polisacáridos, lípidos y sales, el agua contribuye de manera significativa a la textura de los alimentos. El secado y/o el almacenamiento a bajas temperaturas son los métodos más antiguos para la preservación de los alimentos con alto contenido de agua (Belitz *et al.*, 2009).

El contenido de agua por sí sola no es un indicador fiable de carácter perecedero. Esta situación es atribuible, en parte, a diferencias en la intensidad con la que se asocia el agua con los componentes no acuosos cuyas asociaciones fuertes son menos capaces de soportar actividades degradantes, como el crecimiento de microorganismos y de reacciones químicas hidrolíticas. El término "actividad de agua" (aw) fue desarrollado para dar cuenta de la intensidad con la que se asocia el agua con diversos constituyentes no acuosos. Una disminución de la actividad agua en el alimento, retarda el crecimiento de microorganismos, ralentiza reacciones catalizadas por enzimas (en particular hidrolasas) y, por último, retarda el pardeamiento no enzimático. En contraste, con la tasa de auto-oxidación de lípidos que aumenta en alimentos secos (Fennema *et al.*, 2008). La actividad agua se correlaciona bastante bien con tasas de crecimiento microbiano y muchas reacciones de degradación, siendo indicador de vida útil del producto y la seguridad microbiana (Johnson y Lin, 1987).

El contenido de vapor de agua y la estabilidad de los alimentos están altamente relacionados como se observa en la siguiente figura:

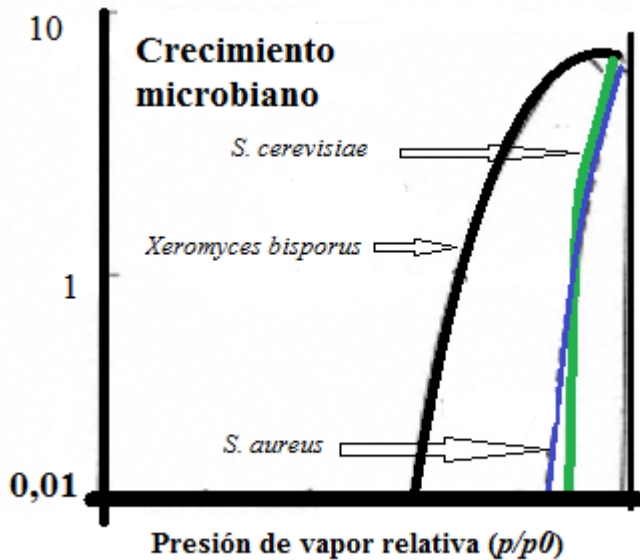


Fig 1.1 Relaciones entre la presión de vapor de agua (g) respecto de la estabilidad alimentaria y el crecimiento microbiano.

La siguiente tabla muestra que a medida que disminuye la presión de agua de los alimentos el crecimiento microbiano también lo hace.

Tabla 1.1 Presión de vapor relativa y crecimiento de microorganismos en los alimentos

Rango de presión de vapor relativa.	Microorganismos generalmente inhibidos por menores presiones de vapor en este rango	Alimentos en este rango de presión de vapor
1.00–0.95	<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	Alimentos altamente perecederos (frescos) y las frutas en conserva, verduras, carne, pescado y leche, salchichas cocidas y panes; alimentos que contiene hasta aproximadamente el 40% (p/p) de sacarosa o cloruro de sodio 7%
0.95–0.91	<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Serratia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , levaduras (<i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i>)	Algunos quesos (Cheddar, Swiss, Münster, Provolone), embutidos (jamón), de jugo de fruta concentrados, los alimentos que contiene hasta 55% (p/p) de sacarosa o 12% de cloruro de sodio.
0.91–0.87	Muchas levaduras (<i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Hansenula</i>), <i>Micrococcus</i>	Salame, bizcochuelos y quesos secos, margarina; alimentos que contienen hasta 65% (p/p) sacarosa (saturada) o cloruro de sodio al 15%

Tabla 1.1 (Continuación). Presión de vapor relativa y crecimiento de microorganismos en los alimentos

Rango de presión de vapor	Microorganismos generalmente inhibidos por menores presiones de vapor en este rango	Alimentos en este rango de presión de vapor generalmente
0.80–0.75	La mayoría de las bacterias halófilas, mycotoxigenicas como <i>Apergillum</i> sp.	Mermelada, mazapanes, frutos brillantados, malvaviscos
0.75–0.65	Mohos xerófilos, <i>Saccharomyces bisporus</i>	Copos de avena contienen aproximadamente 10% de humedad; turrone de cereales, dulce de azúcar, bombones, mermelada, miel, azúcar de caña, algunos frutos secos, nueces
0,65-0,60	Levaduras osmofílicas (<i>Saccharomyces rouxii</i>), y algunos hongos (<i>Aspergillus echinulatus</i> , <i>Monascus bisporus</i>)	Los frutos secos contienen 15-20% de Humedad, y algunos caramelos y caramelos de miel
0.50	No hay proliferación microbiana	Pastas que contiene aproximadamente 12% de humedad; especias que contiene aproximadamente 10% de humedad
0.40	No hay proliferación microbiana	Polvo de huevo entero contiene aproximadamente 5% humedad
0.30	No hay proliferación microbiana	Galletas, crackers que contienen 3-5% humedad
0,20	No hay proliferación microbiana	Leche entera en polvo que contiene 2-3% de humedad; verduras seca que contienen aproximadamente 5% de humedad; hojuelas de maíz que contienen aproximadamente 5% de humedad; galletas estilo rústico, galletas

Agentes Antimicrobianos

La eliminación de la microflora mediante métodos físicos no siempre es posible, en estos casos, se necesita del uso de agentes antimicrobianos. El espectro de compuestos utilizado para este propósito apenas ha cambiado en el tiempo. No es fácil de encontrar nuevos compuestos con mayor actividad biológica, de toxicidad insignificante para los mamíferos y costo aceptable (Belitz *et al.*, 2009).

Por otro lado, los consumidores prefieren alimentos mínimamente procesados elaborados sin conservantes químicos (Appendini y Hotchkiss, 2002). La industria alimentaria investiga cada vez más la sustitución de las técnicas tradicionales de conservación de alimentos (tratamientos térmicos intensos, salado, secado y conservación química) por otros nuevos. Además, la legislación alimentaria ha restringido el uso de algunos agentes antimicrobianos sintéticos basados en una posible toxicidad para los consumidores (Burt, 2004). Es por esto que los productos naturales obtenidos de plantas surgen como una importante alternativa para el control de microorganismos. Algunas especias han demostrado tener compuestos que proporcionan seguridad microbiológica en alimentos. Muchos de estos compuestos como eugenol, citral, pineno, timol, ácido cinámico y carvacrol se caracterizan por una actividad antimicrobiana prominente (Konning *et al*, 2004). Algunos investigadores han encontrado actividad antimicrobiana en aceites esenciales de *O. vulgare* contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (Baydar *et al.*, 2004). Por lo tanto, existe una creciente demanda de conocimiento exacto de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aceites esenciales para permitir un equilibrio entre la aceptabilidad sensorial y la eficacia antimicrobiana (Lambert *et al*, 2001).

Aspectos sensoriales de los alimentos

Los consumidores son los que tienen la última palabra a la hora de elegir un alimento, por lo cual es de gran importancia conocer el significado de calidad de un alimento de acuerdo a lo que ellos consideran apropiado. Desde este punto de vista, se puede definir la calidad de un alimento como “la combinación de los atributos o características de un producto que tiene significancia en la determinación del grado de aceptabilidad del producto por el consumidor”, y aquí tiene principal importancia la “calidad sensorial” del alimento (Cardello, 1997; Meilgaard *et al.*, 2010).

El concepto “organoléptico” significa que causa una impresión sobre un órgano o sentido en particular: la vista, el oído, el tacto, el olfato y el gusto. Las características físicas y químicas de los alimentos son estímulos para los ojos, oídos, piel y músculos, nariz y boca, cuyos receptores inician los impulsos que viajan hasta el cerebro donde ocurre la percepción o correlación de las impresiones sensoriales, que determina que un alimento se acepte o se rechace (Anzaldúa-Morales, 1994).

Es importante considerar las propiedades organolépticas de los alimentos y su evaluación desde el punto de vista de los sentidos humanos. Los sentidos se describen como de naturaleza física o química dependiendo del origen de los estímulos que se perciben (Anzaldúa-Morales, 1994; Meilgaard *et al.*, 2010).

La vista. Es un sentido físico que permite juzgar la apariencia de un alimento en términos de su forma, textura y color. La apariencia de un alimento es la primera clave para su identificación y con frecuencia predice el grado de satisfacción o placer que se obtendrá al comerlo. El sentido de la vista reside en el ojo que es el órgano encargado de recibir los estímulos. La propiedad sensorial más importante asociada con el sentido de la vista es el color, ya que ésta puede hacer que un alimento sea aceptado o rechazado de inmediato por el consumidor, sin siquiera haberlo probado. Existen además, otras propiedades o atributos sensoriales detectados por medio de este sentido, tales como la forma, la superficie, el tamaño y brillo.

El oído. Es un sentido físico que tiene una función secundaria en la aceptación de los alimentos. Participa principalmente en la detección de la textura de los alimentos. El sonido no solo se transmite por el aire, sino que las vibraciones pueden ser conducidas por los huesos. Esto sucede con los sonidos de masticación de los alimentos, los cuales suelen ser tomados en cuenta en la evaluación de la textura.

El tacto. Este sentido está localizado en las terminaciones nerviosas que están situadas justo debajo de la piel de todo el cuerpo. Son especialmente importantes, en el caso de la evaluación sensorial de los alimentos, las percepciones táctiles por medio de los dedos, la palma de la mano, la lengua, las encías, la parte interior de las mejillas, la garganta y el paladar. En esos lugares es donde se detectan atributos de textura de los alimentos. El tacto sirve para percibir una variedad de sensaciones tales como la temperatura del medio y los objetos, el peso de estos, las características de su superficie y, otras sensaciones que en conjunto determinan la textura.

El gusto. Es un sentido químico que responde a la acción de los componentes de los alimentos en los receptores de las papilas gustativas que se localizan principalmente en la lengua. Para ser detectados, los componentes químicos portadores del sabor deben disolverse en los

fluidos de la boca. Las papilas de la punta de la lengua perciben el dulzor de los alimentos, mientras que los gustos salado y ácido se detectan en los costados de dicho órgano. Las papilas caliciformes, en la parte posterior de la lengua, perciben el amargor de las sustancias. El gusto de un alimento puede ser salado, dulce, amargo o ácido; mientras que el sabor “*sui generis*” del alimento consiste en una combinación de gusto y aroma.

El olfato. Es también un sentido químico, que responde a los componentes con propiedades inherentes de volatilidad (modificadas por la temperatura) que llegan al tejido olfativo de la nariz. Este sentido es muy importante, ya que nos permite percibir el olor de los objetos que nos rodean. Es importante diferenciar entre olor y aroma. El primero es la percepción de sustancias volátiles (fragante o fétida) por medio de la nariz. En cambio el aroma es la detección después de haberse puesto el alimento en la boca; es decir que se trata del aire que va de la boca a las fosas nasales arrastrando volátiles del alimento.

Los atributos sensoriales de los alimentos son los que se detectan por medio de los sentidos. Hay algunos que se perciben por medio de un solo sentido, mientras que otros son detectados por dos o más sentidos (Anzaldúa-Morales, 1994; Lawless y Heymann, 2010):

El color. Esta propiedad es la percepción de la luz de una cierta longitud de onda reflejada por un objeto. El color es la única propiedad sensorial que puede ser medida en forma instrumental más efectivamente que en forma visual.

El olor. Es la percepción, por medio de la nariz, de sustancias volátiles liberadas por los objetos. En el caso de los alimentos, esta propiedad es diferente para cada uno y no ha sido posible establecer clasificaciones ni taxonomías completamente adecuadas para los olores. Además, dentro del olor característico, o *sui generis*, de un alimento existen diferentes componentes: su intensidad o potencia; su persistencia que se da cuando aún después de haberse retirado la sustancia olorosa, la persona continua percibiendo el olor debido a que las fosas nasales y la mucosa que recubre el interior de éstas quedan saturadas de la sustancia volátil, y el acostumbramiento que las personas experimentan con los olores después de un cierto tiempo. La causa de esto último, es que el olor produce una impresión muy fuerte en el cerebro, tal que impide que se continúe percibiendo el mismo y algunos casos otros olores diferentes. En función

de esta característica de este atributo, las pruebas para la medición de olor deben ser rápidas, para no dar tiempo a que los jueces pierdan la capacidad de evaluar, y no se deben presentar demasiadas muestras en una misma sesión.

El aroma. Esta propiedad consiste en la percepción de las sustancias olorosas o aromáticas de un alimento después de haberse puesto el mismo en la boca. Dichas sustancias se disuelven en la mucosa del paladar y la faringe, y llegan a los centros sensores del olfato. El aroma es el principal componente del sabor de los alimentos. Ya que el aroma no es detectado por la nariz sino en la boca, ésta puede quedar insensibilizada a los aromas y sabores por el uso y el abuso del tabaco, drogas o alimentos picantes o muy condimentados.

El gusto o “Sabor Básico” de un alimento puede ser ácido (agrio), dulce, salado o amargo; o bien, puede haber una combinación de dos o más de estos cuatro. Esta propiedad es detectada por medio de la lengua. Para las pruebas de sabor es necesario conocer la habilidad de los jueces para la percepción del gusto del alimento, así como la concentración del umbral del sabor que es la concentración mínima a la cual la mayoría de los jueces pueden percibir correctamente el gusto en cuestión.

El sabor. Este atributo de los alimentos es muy complejo, ya que combina tres propiedades: el olor, el aroma y el gusto. Es por esto, que su medición y apreciación son más complejas que las de cada propiedad por separado. El sabor es lo que diferencia a un alimento de otro y no el gusto, ya que si se prueba un alimento con los ojos cerrados y la nariz tapada, solamente se podrá juzgar si es dulce, salado, amargo o ácido. En cambio, en cuanto se perciba el aroma, se podrá decir, de qué alimento se trata. Los jueces para las pruebas de sabor no deben haberse puesto perfume antes de participar de las degustaciones, ya que el olor a perfume puede interferir con el sabor de las muestras. El sabor, a veces se ve influido por el color y la textura. Es dependiente del tiempo, ya que hay sabores que se perciben más rápidamente que otros. Otra característica del sabor relacionada con el tiempo es la persistencia, la cual es conocida también como dejo o regusto. Hay alimentos con sabor que dejan un cierto gusto después de haberlos probados. Un ejemplo de esto es el caso de la sacarina que se usa como sustituyente del azúcar, la cual deja un regusto amargo o metálico desagradable.

La textura. Es la propiedad sensorial de los alimentos que es detectada por los sentidos del tacto, la vista y el oído, y que se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación. No es posible definir una textura deseable, ya que una característica de textura puede ser deseable en un alimento mientras que en otro haría que éste fuese completamente repugnante. Por lo tanto, es necesario definir para cada tipo de alimento cuales son los atributos que merecen mayor atención. Las propiedades o características de textura han sido clasificadas en tres categorías: atributos mecánicos, geométricos y de composición. Los primeros dan una indicación del comportamiento mecánico del alimento ante la deformación. Los atributos geométricos son aquellos relacionados con la forma o la orientación de las partículas del alimento, como por ejemplo, la fibrosidad, que nos indica la presencia de fibras y su resistencia; o la granulosidad, la cristalinidad, la porosidad, la esponjosidad, etc. Los atributos de composición son los que aparentemente indican la presencia de algún componente en el alimento, como serían la humedad, la grasosidad, la harinosidad, etc.

Entendiendo que son los atributos sensoriales se puede definir la evaluación sensorial como el análisis de alimentos u otros materiales por medio de los sentidos. La palabra sensorial deriva del latín “sensus”, que quiere decir sentido. La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. Este tipo de análisis tiene la ventaja de que la persona que efectúa las mediciones lleva consigo sus propios instrumentos de análisis, o sea: sus cinco sentidos. Las pruebas sensoriales son utilizadas en diversos tipos de industrias, tales como la industria alimentaria, la perfumera, la farmacéutica, la industria de pinturas, etc (Anzaldúa-Morales, 1994; Lawless y Heymann, 2010).

La evaluación sensorial de los alimentos, constituye hoy en día un pilar fundamental para el diseño y desarrollo de nuevos productos alimenticios. Sin duda, el poder medir en el laboratorio el grado de satisfacción que brindará un determinado producto, nos permite anticipar la aceptabilidad que éste tendrá. La evaluación sensorial trabaja en base a paneles de degustadores denominados jueces, que hacen uso de sus sentidos como herramienta de trabajo. Los jueces se seleccionan y entrenan con el fin de lograr la máxima veracidad, sensibilidad y reproducibilidad en los juicios que emitan, ya que de ello depende en gran medida el éxito y confiabilidad de los resultados (Anzaldúa-Morales, 1994; Lawless y Heymann, 2010; Meilgaard *et al.*, 2010).

La selección y el entrenamiento de las personas que tomarán parte de la evaluación sensorial constituyen un factor que influye en el éxito y la validez de las pruebas. Es necesario determinar, en primer lugar, el número de jueces que deben participar, y después hay que seleccionarlos, explicarles en forma adecuada como han de realizar sus evaluaciones, y darles el entrenamiento adecuado. Existen cuatro tipos de jueces que pueden ser empleados en diferentes tipos de análisis sensoriales (Anzaldúa-Morales, 1994; Lawless y Heymann, 2010):

Juez Experto: es una persona que posee gran experiencia en probar un determinado tipo de alimento. Posee una gran habilidad para percibir las diferencias entre muestras y distinguir y evaluar las características del alimento. Estos jueces deben mantenerse en forma para realizar su trabajo por lo que deben abstenerse de fumar, consumir alimentos muy condimentados o bebidas demasiado calientes y nunca deben consumir (fuera de las pruebas) el producto con el que suelen trabajar (Anzaldúa-Morales, 1994). Su habilidad, experiencia y criterio son tales que en las pruebas que efectúa es suficiente contar con solo su respuesta.

Juez Entrenado: estos jueces poseen habilidad para detectar alguna propiedad sensorial o algún sabor o textura particular en el objeto de estudio. Estos jueces han recibido cierta enseñanza teórica y práctica acerca de la evaluación sensorial y saben qué es exactamente lo que se desea medir en una prueba. Cuando se llevan a cabo pruebas sensoriales con este tipo de jueces, el número requerido es de al menos 7 y como máximo 15. Los jueces entrenados se emplean principalmente en pruebas sensoriales descriptivas, en las cuales se trata de definir las propiedades del objeto de estudio y medirlas de la manera más objetiva determinando su magnitud o intensidad (Meilgaard *et al.*, 2010).

Juez Semi entrenado o “de laboratorio”: se trata de personas que han recibido un entrenamiento teórico similar al de los jueces entrenados, pero que sólo van a diferenciar entre muestras y no van a medir propiedades o utilizar escalas (Anzaldúa-Morales, 1994)

Juez Consumidor: se trata de personas que no tienen que ver con las pruebas, ni trabajan con alimentos como investigadores o empleados en una fábrica procesadora de alimentos, ni han efectuado evaluaciones periódicas. Por lo general son personas tomadas al azar, ya sea en la calle, en una tienda, escuela, supermercado, etc. Es importante en este caso escoger jueces que

sean consumidores habituales del producto a probar, o en el caso de productos nuevos que sean potenciales consumidores (Anzaldúa-Morales, 1994; Meilgaard *et al.*, 2010).

El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo con diferentes pruebas sensoriales, según sea la finalidad para la que se efectúa. Existen tres tipos de pruebas sensoriales: las pruebas afectivas, las discriminativas y las descriptivas que serán descriptas en profundidad en el capítulo 4 (Anzaldúa-Morales, 1994; Sancho *et al.*, 1999; Lawless y Heymann, 2010; Meilgaard *et al.*, 2010).

Alimentos orgánicos

Los alimentos orgánicos tienen su origen en sistemas de producción orgánica. La producción orgánica responde a un sistema en el cual las prácticas culturales, biológicas y mecánicas deben ser integradas y responder a las condiciones sitio-específicas donde se desarrolla el sistema. Estas prácticas, a su vez deben promover el reciclaje de recursos, promover el equilibrio ecológico y la conservación de la biodiversidad (USDA, 2013).

Así, los alimentos orgánicos son producidos por agricultores que enfatizan el uso de recursos renovables y la conservación de suelo y agua para mejorar la calidad del medio ambiente para las generaciones futuras. La industria de la producción de alimentos orgánicos es muy regulada. En la actualidad, la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Japón y otros muchos países requieren que los productores obtengan certificaciones especiales para que comercialicen sus alimentos como orgánicos dentro de sus fronteras. Antes de que un producto sea etiquetado como "orgánico", un certificador aprobado por el gobierno inspecciona el establecimiento donde se cultivan los alimentos para asegurarse de que el agricultor está siguiendo todas las reglas necesarias para cumplir con los estándares orgánicos. Los sistemas de certificación orgánica mundialmente más conocidos son: Australia (NASAA Organic Standard), Unión Europea (EU-Eco-regulation), Reino Unido (DEFRA), India (NPOP, National Program for Organic Production), Japón (JAS Standards), Estados Unidos (National Organic Program (NOP) Standards) (Allen y Albala, 2007; USDA, 2013).

Los alimentos orgánicos procesados, normalmente, contienen sólo ingredientes orgánicos. La carne orgánica, pollo, huevos y productos lácteos provienen de animales criados

sin el uso de antibióticos ni hormonas de crecimiento. Los alimentos orgánicos, también, son producidos sin el uso de los pesticidas más convencionales, fertilizantes hechos con ingredientes sintéticos o aguas residuales, bioingeniería, o radiación ionizante. Si hay ingredientes no orgánicos presentes, un cierto porcentaje de los ingredientes del total del alimento vegetal o animal deben ser orgánicos (95% en los Estados Unidos , Canadá y Australia) (Blair, 2012). Los alimentos que dicen ser orgánicos deben estar libres de aditivos artificiales, y evitan normalmente ser procesados con métodos materiales y condiciones artificiales, tales como la maduración química, la irradiación de los alimentos, y la incorporación de ingredientes genéticamente modificados. Los pesticidas son permitidos siempre y cuando no sean sintéticos (USDA, 2013).

A partir de esto se puede sostener que, la incorporación de aceites esenciales, reconocidos como seguros (GRAS, en inglés), permitiría la conservación de las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos y a su vez incorporar o mantener la etiqueta de orgánicos. Esto no solo permitiría obtener alimentos más saludables sino también otorgarles valor agregado a estos productos y acceder a mercados mundiales más competitivos. La demanda de alimentos orgánicos se debe principalmente a la preocupación por la salud personal y por el medio ambiente (Cunha y Pinto da Moura, 2004; Winter y Davis, 2006). Las ventas mundiales de alimentos orgánicos crecieron en más de un 170 por ciento desde 2002, llegando a más de 63000 millones dólares en 2011. El mercado de las ventas de alimentos orgánicos está creciendo rápidamente entre 5 y 10 por ciento en los Estados Unidos, según la Asociación de Comercio Orgánico, superando significativamente el volumen de crecimiento de las ventas en dólares de los productos alimenticios convencionales. Las ventas de alimentos orgánicos Mundial pasó de 23 mil millones \$ EE.UU. en 2002 a \$ 63000 millones en 2011 (USDA, 2013).

Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios son sustancias (o una mezcla de sustancias) que se añaden a los alimentos y están involucrados en su producción, elaboración, envasado y/o almacenamiento sin ser un ingrediente importante en cuanto a cantidad. Aditivos o sus productos de degradación en general permanecen en los alimentos, pero en algunos casos pueden ser eliminados durante la transformación (Belitz *et al.*, 2009).

Los aditivos pueden utilizarse para incrementar:

- Valor Nutritivo de los Alimentos: aditivos tales como vitaminas, minerales, aminoácidos ácidos y derivados de aminoácidos.
- Calidad Sensorial de los Alimentos: color, olor, sabor y consistencia o textura, que pueden disminuir durante el procesamiento y almacenamiento. Estas disminuciones se pueden corregir o reajustar por aditivos tales como pigmentos, **compuestos de aroma** o potenciadores del sabor. Desarrollo de "mal sabor", derivados de la oxidación de grasa o el aceite, se puede suprimir con aditivos antioxidantes.
- La vida útil de los alimentos: Debido a las actuales formas de producción y distribución de alimentos es necesario prolongar vida útil de los mismos. La extensión de la vida útil implica protección contra deterioro microbiano, físicos y químico no deseados.

Los aditivos alimentarios y sus productos de degradación deben ser no tóxicos en sus niveles recomendados de uso. Los aditivos se deben aplicar sólo cuando es necesario mantener durante más tiempo la calidad nutritiva o el valor sensorial de los alimentos, o para su procesamiento o manipulación.

En este trabajo se hace hincapié en un solo grupo de aditivos alimentarios: las sustancias aromáticas. El uso de sustancias aromáticas de origen natural o sintéticas es de gran importancia, ya que son el grupo de aditivos alimentarios más utilizados. Las sustancias aromáticas son compuestos volátiles que son percibidos por los sitios receptores de olor correspondiente al tejido olfativo nasal (Belitz *et al.*, 2009). El concepto de sustancias aromáticas, como el de sustancias gustativas, debe utilizarse libremente, ya que un compuesto podría contribuir al típico olor o sabor de un alimento, mientras que en otro alimento puede causar un olor o sabor defectuoso, lo que resulta desagradable. En este grupo de sustancias se encuentran los aceites esenciales.

El aceite de oliva

El olivo (*Olea europea*) pertenece a la familia Oleraceae. La producción de aceite de oliva está concentrada mayoritariamente en los países mediterráneos, en los cuales se encuentra el 99% de la superficie del olivar y se genera el 98% de la producción mundial del aceite de

oliva. La gran concentración de olivos en ciertas regiones se explica por las condiciones climáticas que necesita el olivo para dar frutos, caracterizadas por veranos secos y calurosos (Luchetti, 2003).

A primera vista el aceite de oliva parece tener escasa importancia, tanto en la producción como en el consumo a nivel mundial, en comparación con otros aceites vegetales comestibles. El aceite de oliva representa sólo el 3% del consumo humano en aceites vegetales y es ampliamente superado por los aceites de soja (27%), palma (20%), colza (15%) y girasol (12%). En términos del comercio mundial el aceite de oliva representa el 2% del volumen total de venta de los aceites comestibles. Sin embargo en términos del valor del producto representa un notable porcentaje del comercio mundial (15%) ya que su valuación por unidad de producto es significativamente mayor que el de otros aceites alternativos (Luchetti, 2003).

En Argentina, como consecuencia de la implementación de la ley 22.021 (ley de diferimiento impositivo), el cultivo del olivo ha experimentado, en los últimos años un crecimiento sostenido. Se estimó que para el año 2010 se superarían las 115.000 ha cultivadas (Torres y Maestri, 2006).

El olivo es el cultivo frutal con mayor superficie en la provincia de Córdoba. La producción se localiza en la región noroeste, departamento de Cruz del Eje, en menor proporción en Ischilín, y en el Valle de Traslasierra (departamentos San Javier y San Alberto). En Cruz del Eje se encuentran unas 5000 ha de plantación; el 70% de la producción de aceituna se destinan a la fabricación de aceites siendo las variedades Arbequina, Manzanilla y Frantoio las más cultivadas para éste propósito. En Traslasierra se encuentran unas 1000 ha cultivadas, siendo la variedad Arbequina la que se produce casi exclusivamente y cuyo destino es la producción de aceite de oliva (Tagarelli, 2006).

La actividad olivícola en la provincia de Córdoba es llevada a cabo aproximadamente por 150 productores. La principal variedad distribuida es la Arbequina, de origen español; considerada una variedad rústica por su resistencia a bajas temperaturas y tolerancia a la salinidad. Históricamente las primeras plantaciones de la variedad Arbequina en el NO de la

provincia de Córdoba, fueron realizadas con olivos provenientes de España (Correa-Tedesco *et al.*, 2010).

Las cualidades nutricionales y terapéuticas del aceite de oliva se han demostrado en numerosos trabajos de investigación. El papel del aceite de oliva en las enfermedades cardiovasculares, en la prevención de la aterosclerosis, en el desarrollo óseo y del sistemas nervioso, en las funciones digestivas, en nutrición y dietética, son unas de las tantas líneas de investigación que existen. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo predominante del aceite de oliva disminuye los niveles de presión sanguínea. Otras investigaciones demostraron que la resistencia a la insulina de diabéticos no insulino dependientes se ve mejorada por la dieta basada en aceite de oliva en comparación con la dieta alta en carbohidratos. Actualmente, se pueden valorar las investigaciones científicas que demuestran el efecto en la prevención de enfermedades cardiovasculares y enfermedades relacionadas con la peroxidación celular, y tales investigaciones constituyen una herramienta vital para las actividades de educación e información sobre los beneficios que existen en el consumo del aceite de oliva (Luchetti, 2003; De Pablo *et al.*, 2004; Zampelas y Kafatos, 2004; Olmedo *et al.*, 2009; Asensio *et al.*, 2011).

Al ser el aceite de oliva un alimento lipídico, es susceptible a la oxidación de sus ácidos grasos constituyentes. El sabor rancio como resultado de reacciones de oxidación de lípidos hace que los alimentos sean inaceptable para los consumidores (Nepote *et al.*, 2009). La adición de antioxidantes es una de las maneras más simples técnicamente de la reducción de la oxidación de grasas, conservar el sabor y el color, y la disminución de la destrucción de vitaminas (Karpínska *et al.*, 2001).

Productos lácteos: quesos

El queso, se obtiene a partir de la leche cuajada después de la eliminación de suero y por maduración de la cuajada en presencia de microflora especial (Belitz *et al.*, 2009). La gran abundancia de variedades de queso, aproximadamente 2.000 en todo el mundo, hace que se puedan clasificar desde muchos puntos de vista, según:

- La leche utilizada (vaca, cabra u oveja).

- La formación de la cuajada (usando ácidos, extracto de cuajo u una combinación de ambos).

- La textura o consistencia, o el contenido de agua (%) en queso sin grasa. Los grupos más importantes de queso en función del contenido de agua son:

Extra duros: <51%

Duro: 49-56%

Semiduro: 54-63%

Semisólido: 61-69%

Soft: > 67%

- Contenido de grasa (% de materia seca). Según este criterio, los grupos más importantes son:

Queso doble crema (60-85% de grasa);

Queso crema (≥ 50);

Queso entero (≥ 45);

Queso graso (≥ 40);

Queso Semi graso (≥ 20);

Queso Magro (máx. 10).

El primer paso al elaborar el queso es ajustar el contenido de grasa de la leche al nivel deseado y, cuando es necesario, también el contenido de proteína. Para mejorar la coagulación, se incorporan aditivos que incluyen: sales de calcio (mejoran la coagulación de las proteínas y la textura del queso), nitratos (para inhibir microflora anaerobia formadora de esporas) y pigmentos de color. La leche cruda o pasteurizada preparada se mezcla a 18-50 °C en una tina

con un cultivo iniciador (bacterias lácticas o propiónicas; hongos tales como *Penicillium camemberti*, *P. candidum*, *P. roqueforti*, etc). La leche se coagula en una masa blanda, semisólida, llamada cuajada, después de la fermentación láctica, o después de la adición de cuajo, o alguna otra combinación, tal como el tratamiento ácido y cuajo. Este gel de proteína es cortado en cubos mientras se calienta y entonces se agita suavemente. El suero se drena mientras la cuajada que contiene grasa retenida se somete a un proceso reafirmante (sinéresis). El proceso y el cultivo iniciador determinan las propiedades de la cuajada. Cuando la consistencia deseada se ha logrado, la cuajada y el suero de leche se separan, entonces se procede al moldeado (Belitz *et al.*, 2009).

Los nuevos métodos de fabricación de queso tienen como objetivo incluir las proteínas del suero de la cuajada, en lugar de la eliminación con el suero de leche. Además de dar un mayor rendimiento (12-18%), estos procesos ayudan a economizar en los costos de tratamientos de aguas residuales.

Los quesos son alimentos, no solo con alto contenido lipídico, sino también con alta actividad agua, lo que los hace susceptibles a la oxidación de sus lípidos y al deterioro microbiológico, lo cual afecta seriamente sus propiedades sensoriales (Belitz *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAFIA

- Aitzetmuller, K. 1996. An unusual fatty acid pattern in Eranthis seed oil. *Lipids* 31: 201–205.
- Akoh, C. A. C. & Min, D. B. 2002. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Akoh, C. A. C. & Min, D. B. (Eds.). Dekker, USA. 1005 pp.
- Alves de Azeredo, G., Montenegro Stamford, T. L., Campos Nunesc, P., Gomes Netoc, N. J., Gomes de Oliveirac, M. E. & Leite de Souzac, E. 2010. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44: 1541-1548.
- Allen, G. J. & Albala, K. 2007. *The Business of Food: Encyclopedia of the Food and Drink Industries*. Allen, G. J. & Albala, K. (Eds.). Washington, D C. ABC-CLIO. p. 288.
- Anzaldúa-Morales, A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría & en la práctica. Anzaldúa-Morales, A. (Eds.). Zaragoza, España. Acribia. 220 pp.
- Appendini, P. & Hotchkiss, J. H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 3: 113-126.
- Arias Toledo, B. 2009. Diversidad de usos, prácticas de recolección & diferencias según género & edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8: 389 –401.
- Arizio, O., Curioni, A., Sanchez Vallduvi, G. & García M. 2006. El cultivo de orégano (*Origanum sp*). En: *Plantas Aromáticas y Madicinales: Labiadas*. Arizio, O. y Curioni, A. (Eds.). Editorial Hemisferio Sur. pp. 57-92
- Ascerbi, M. & Ruesta M. 2012. Hierbas aromáticas y especias. Análisis de Cadena Alimentaria. Sector Condimentos y especias. Dirección Nacional de Alimentos. Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina. Hierbas%20arom%Elticas%20y%20especias.htm Acceso: Junio, 2013
- Asensio, C. M., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science* 76: 445-450.
- Asensio, C. M., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2013. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of food Science and Technology* doi:10.1111/ijfs.12233.
- Azizi, A., Yan, F. & Honermeier, B. 2009. Herbage yield, Essential oil content and composition of three oregano populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Journal of Industrial Crops Products* 29: 554-561.

- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M. y Ruberto, G. 1998. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential oil Research* 10: 618-627.
- Baser, K. H. C. 2002. Part III - Taxonomy and chemistry: The Turkish *Origanum* species. En: *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. Baser, K. H. C. (Eds.). pp. 109-126
- Baser, K. H. C. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Desing* 14: 3106-3120.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G. & Karadoğan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15: 169-172.
- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Belitz, H. D., Grosch, W. y Schieberle, P. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 1070 pp. pp.
- Bhale, S. D. X., Z., Prinyawiwatkul, W., King, J. M. & Godber, J. S. 2007 Oregano and rosemary extracts inhibit oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhaden oil *Journal of Food Science* 7: 504-508.
- Blair, R. 2012. *Organic Production and Food Quality: A Down to Earth Analysis*. Wiley, B. (Ed.). Oxford, UK. Wiley-Blackwell. pp.
- Boerema, J. A., Clemens, R. & Brightwell, G. 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 2: 192- 201
- Botsoglou, N. A., Grigoropoulou, S. H., Botsoglou, E., Govaris, A. & Papageorgiou, G. 2003. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science* 65: 1193-1200.
- Brum Cleff, M. M., Xavier, A. R., Schuch, M., Araújo Meireles, L. F., Alves Rodrigues, M. C., and Braga de Mello, J. R. 2010. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 116-123
- Buck, D. F. 1991. Antioxidants. En: *Food Additives User's Handbook* J. Smith (Ed.). London. Blackie and Son. pp. 1
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94: 253–223.
- Caempa. 2008. Cámara Argentina de Especieros, Molineros de Pimentón y Afines. X Reunión Técnica, Foro de Orégano Argentino. , in, X Reunión Técnica, Foro de Orégano Argentino. , Alta Gracia, Córdoba – Argentina., CAEMPA.

- Cameroni, M. G. 2010. Hierbas Aromáticas y Especies – Informe Sectorial N° 2. Mayo-Junio 2010. Agosto, 2010. Publicado en internet, disponible en: www.alimentosargentinos.gov.ar/especies.
- Cardello, A. V. 1997. The end of sensory science? *Cereal Foods World* 42: 915-918.
- Cardona Henao, E. & Francis M. 2009. . Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*. *Biosalud* 8: 58-70.
- Carpenter, D. E., Ngvainti, J. N. & Lee S. 1993. Lipid analysis. En: *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*. Carpenter, D. M. S. a. Carpenter D. E. (Eds.). Arlington, VA. AOAC Press. pp. 85–104
- Coppen, P. P. 1983. The use of antioxidants. En: *Rancidity in Foods* Alenn, J. C. y Hamilton, R. J. (Eds.). New York. Applied Science Publishers. pp. 67
- Correa-Tedesco, G., Rousseaux, M. C. & Searles, P. S. 2010. Plant growth and yield responses in olive (*Olea europaea*) to different irrigation levels in an arid region of Argentina. *Agricultural Water Management* 97: 1829-1837.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Grisse, W. y Jones, R. (Eds.). American Society of Plant Physiologists. pp.
- Cunha, L. M. & Pinto da Moura, A. 2004. Conflicting demands of agricultural production and environmental conservation: consumers' perception of the quality and safety of food. En: *Ecological agriculture and rural development in Central and Eastern European countries*. Filho & Leal, W. (Eds.). Landsale, EEUU. IOS Press. pp. 147–148
- Chapkin, R. 1992. Reappraisal of the essential fatty acids. En: *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. Chow, C. (Ed.). Dekker, NY. Dekker. pp. 429–436.
- Christie, W. W. 1982. *Lipid Analysis*. Christie, W. W. (Ed.). Oxford. Pergamon Press., pp.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. & Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1115-1120.
- De Pablo, M. A., Puertollano, M. A. & Álvarez de Cienfuegos, G. 2004. Olive oil and immune system functions: potential involvement. *Grasas y Aceites* 55: 42-51.
- Di Fabio, A. 2008. El cultivo y su efecto sobre la calidad en orégano. *Boletín Cámara Argentina de especias y afines*: 1-11.
- Fennema, O. R., Damodaran, S. & Parkin, K. L. 2008. *Fennema's food chemistry*. Fennema, O. R. (Eds.). Boca Raton, FL. CRC. 1069 pp.

- Frankel, E. N. 1984. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in Lipid Research* 23: 197-221.
- Frankel, E. N. 2005. *Lipid Oxidation*. Frankel, E. N. (Eds.). Bridgewater. The Oily Press. 489 pp.
- Gaetán, S. A. M., Madia M. S. & Curioni A. O. 2007. . Especies del género *Fusarium* asociadas al declinamiento del orégano en la Argentina. . *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas* 6 342 – 343.
- Giese, J. 1996. Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*: 50-72.
- Gurr, M. I. & James, A. T. 1971. *Lipid Biochemistry and Introduction*. Gurr, M. I. (Eds.). Cornell, NY. Cornell University Press. pp 231.
- Haumann, B. 1990. Antioxidants: Firms seeking products they can label as “natural.”. *INFORM*: 1:1002.
- Holman, R. T. & Elmer, O. C. 1947. The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. *Journal of American Oil Chemistry Society* 24: 127-129
- Holley, R. A. & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273-292.
- Hsieh, P.-C., Mau, J.-L. & Huang, S.-H. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology* 18: 35-43.
- Ietswaart, J. 1980. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). Doctoral Thesis., en Leiden, Leiden University. Leiden, Alemania
- Johnson, M. R., and Lin R. C. 1987 FDA views on the importance of aw in good manufacturing practice. En: *Water Activity: Theory and Applications to Food*. Beuchat, L. B. R. and Johnson M. R. (Eds.). New York. Marcel Dekker. pp. 287–294.
- Jung, M. Y., Yoon, S. H., Lee, H. O. & Min, D. B. 1998. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. *Journal of Food Science* 63: 408-412.
- Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., Gioxari, A., Chioua, A. & Makris, D. P. 2010. Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoidrich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT - Food Science and Technology* 43: 882–889.
- Karpińska, M., Borowski, J. & Danowska-Oziewicz, M. 2001. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry* 72: 5-9.
- Kates, M. 1986. *Techniques of Lipidology*. (Eds.). New York. Elsevier. pp.

- Kintzios, S. E. 2000. Oregano: The Genera *Origanum* and *Lippia*. En: Profile of the multifaceted prince of the herbs. Kintzios, S. E. (Eds.). London, UK. Taylor & Francis. pp.
- Kintzios, S. E. 2002. Part I – Introduction: Profile of the multifaceted prince of the herbs. En: Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. Kintzios, S. E. (Eds.). Londres, UK. Taylor & Francis. pp. 3-8
- Kodifis, G., Bosabalidis, A. M. & Moustakas, M. 2003. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). *Annals of Botany* 92: 635-645.
- Koksal, O., Gunes, E., Orkan Ozer, O. & Ozden, M. 2010. Analysis of effective factors on information sources at Turkish oregano farms. *African Journal of Agricultural Research* 5: 142-149.
- Konning, G. H., Agyare, C. & Enninson, B. 2004. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia* 75: 65-67.
- Kula, J., Majda, T., Stoyanova, A. & Georgiev, E. 2007. Chemical composition of *Origanum vulgare* L. essential oil from Bulgaria. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 10: 215-220.
- Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S. & Boskou, D. 1993. Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *LWT - Food Science and Technology* 197: 20-23.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P. & Nychas, G. 2001. A study of the Minimum Inhibitory Concentration and mode of action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91: 452-462.
- Lawless, H. T. & Heymann, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. Lawless, H. T. & Heymann, H. (Eds.). New York, USA. Springer. 596 pp.
- Lea, C. H. 1952. Methods for determining peroxide in lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3: 586-594.
- Lee, E. C. & Min, D. B. 1988. Quenching Mechanism of β -Carotene on the Chlorophyll Sensitized Photooxidation of Soybean Oil. *Journal of Food Science* 53: 1894-1895.
- Lin, Y. T., Labbe, R. G. & Shetty, K. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied Environmental Microbiology* 70: 5672-5678.
- Luchetti, F. 2003. Introducción al estudio del Aceite de Oliva. En: *El Manual del Aceite de Oliva*. Aparicio R., H. J. (Eds.). Madrid, España. Editorial Mundi-Prensa pp. 13-31.

- Madhavi, D. L., Desphande, S. S. & Salunkhe, D. K. 1996. Summary, conclusions, and future research need. En: Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health perspectives. D. L. Madhavi, S. S. D., and D. K. Salunkhe (Eds.). Dekker, NY. pp. 471.
- Maggi, E. 2008a. Sector Aromático – Informe de Coyuntura Febrero 2008. Agosto, 2012. Disponible en: www.alimentosargentinos.gov.ar/especies.
- Maggi, E. 2008b. Sector Aromático – Informe de Coyuntura Octubre 2008. Agosto, 2010. Disponible en: www.alimentosargentinos.gov.ar/especies.
- McCord, J. M &, Fridoich, I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 243: 5753–5760.
- McCord, J. M. & Fridoich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T. & Civille, G. V. 2010. Sensory Evaluation Techniques. Meilgaard, M. C. y Carr, B. T. (Eds.). Boca Raton, Florida, USA. Taylor & Francis. 416 pp.
- Milos, M. M. J. & Jerkovic I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp hirtum*) *Food Chemistry* 71: 79-83.
- Min, D. B. & Kim, H. J. 1999. Chemistry of Lipid Oxidation. En: Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress. Min, D. B. y Kim, H. J. (Eds.). New York, USA. Kluwer Plenum Publishers. pp. 175-187.
- Min, D. B. & Lee, H. O. 1999. Chemistry of lipid oxidation. . En: Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress. R. Teranishi, F. L. W., and I. Hornstein (Eds.). New York. Kluwer Plenum. pp. 175–187.
- Min, D. B. & Boff, J. M. 2002. Food Lipids (Chemistry, Nutrition and Biotechnology). En: Food lipids. Akoh, C. y Min, D. B. (Eds.). New York. Marcel Dekker. pp. 335–364
- Musa Özcan, M. A., D & Aydar A. O. 2008. The use of oregano (*Origanum vulgare L.*) essential oil and hydrosol in green olive fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51 601-605.
- Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. . *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 29: 273.
- Nepote, V., Grosso, N. R. & Guzman, C. A. 2002. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites* 53: 391-395.
- Nepote, V., Grosso, N. R. & Guzman, C. A. 2004. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hypogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* 92: 41-49.

- Nepote, V., Olmedo, R. H., Mestrallet, M. G. & Grosso, N. R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science* 74: S1-S8.
- O'Brien, R. D. 2009. *Fats and oils, formulating and processing for applications*. O'Brien, R. D. (Ed.). Boca Raton, FL. CRS Press. 744 pp.
- Olmedo, R., Nepote, V., Mestrallet, M. G. & Grosso, N. R. 2008. Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried-salted peanuts. *International Journal of food Science and Technology* 43: 1935-1944.
- Olmedo, R. H., Asensio, C., Nepote, V., Mestrallet, M. G. & Grosso, N. R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2128-2136.
- Olmedo, R. H., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2012. Sensory and chemical stability in coated peanuts with the addition of essential oils and synthetic antioxidants. *Grasas y Aceites* 63: 5-13.
- Olmedo, R. H., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology* in press: 1-9.
- Parra, P. & Cameróni, M. G. 2009. Área Hierbas Aromáticas y Especies – Informe de Coyuntura Mensual Agosto 2009. Activo agosto 2010. Disponible en: www.alimentosargentinos.gov.ar/especies.
- Porter, N. A. 1990. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry). En: *Membrane Lipid Oxidation*. Porter, N. A. (Eds.). CRC Press. Boca Raton, FL, 1990, pp. 33–62. pp.
- Porter, W. L. 1980. Recent trends in food applications of antioxidants. En: *Autoxidation in Food and Biological Systems* Simic, M. G. y Karel, M. (Eds.). New York, USA. Plenum Press. pp. 143.
- Pratt, D. E. 1992. Natural antioxidants from plant material. En: *Phenolic Compounds in foods and Their Effects on Health* M.-T. Huang, C.-T. H., and C. Y. Lee, (Eds.). Washington, DC. ACS Symposium Series, American Chemical Society. pp. 54.
- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A. & Nepote, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of food Science and Technology* 48: 642-649.
- Rajalakshmi, D. & Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. En: *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives* Madhavi, D. L., Desphande, S. S. y Salunkhe, D. K. (Eds.). New York. Dekker. pp. 65

- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. y Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22: 375-383.
- Rice-Evans, C. A. & Miller, N. J. 1996. The relative antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Transact. J* 24: 790.
- Ridgway, T., O'Reilly, J., West, G., Tucker, G. & Wiseman, H. 1996. Potent antioxidant properties of novel apple-derived flavonoids with commercial potential as food additives. *Biochem. Soc. Transact. J* 24: 391.
- Rouquaud, M. & Videla. E. 2000. Oréganos de Mendoza (Argentina). *Rev Facultad Ciencias Agrarias Mendoza* 32: 23-32.
- Sahin, F. G., M. Daferera, D. Sökmen, A. Sökmen, M. Polissiou, M. Agar, & Özer H.. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15: 549-557.
- Sancho, J., Bota, E. & Castro, J. J. 1999. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Sancho, J. & Castro J. J. (Eds.). Barcelona, España. Edición Universita de Barcelona. 319 pp.
- Sherwin, E. R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 55: 809-814.
- Singh, S. & Majumdar, D. K. 1999. Evaluation of the gastric antiulcer activity of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holy Basil). *Journal of Ethnopharmacology* 65: 13-19.
- Skoula, M. & Harborne, J. B. 2002. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. En: *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. Kintzios, S. E. (Eds.). London, UK. Taylor & Francis. pp. 67-108.
- Smith, R. L., Cohen, S. M., Doull, J., Feron, V. J., Goodman, J. I., Marnett, L. J., Portoghese, P. S., Waddell, W. J., Wagner, B. M., Hall, R. L., Higley, N. A., Lucas-Gavin, C. & Adams, T. B. 2005. A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 43: 345-363.
- Suhaj, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 531-537.
- Tagarelli, A. S. 2006. Olivos. Análisis de la Cadena Alimentaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Ministerio de Economía y Producción. Bs As. Octubre, 2012. www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_33/cadenas/olivo_olivo.htm.
- Thornfeldt, C. 2005. Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatological Surgery* 31 873-880.

- Torres, M. M. & Maestri, D. M. 2006. The effects of genotype and extraction methods on chemical composition of virgin olive oils from Traslasierra Valley (Cordoba, Argentina). *Food Chemistry* 96: 507-511.
- Tsimogiannis, D. S., M. & V. Oreopoulou 2006. Isolation and characterization of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). *International Journal of Food Science and Technology* 41: 39-48.
- USDA 2013. National Organic Program. Agosto 2013. <http://www.ams.usda.gov/nop/NOP/standards/DefineReg.html>.
- Varela, B. G., Ganapol, M. J. & Gurni, A. A. 2007. Estudio anatómico preliminar en hojas de oréganos comercializados en la ciudad de Buenos Aires (Argentina). *Bol. Lat. Caribe Plant. Med. Arom.* 6:388-389.
- Winter, C. K. & Davis, S. F. 2006. Organic Foods. *Journal of Food Science* 71: 117-124.
- Youdim, K. A. & Deans, S. G. 2000. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *British Journal of Nutrition* 83: 87-93.
- Zampelas, A. & Kafatos, A. G. 2004. Olive oil intake in relation to cardiovascular diseases. *Grasas y Aceites* 55: 24-32.
- Zygadlo, J. A & Juliani H. R. 2003. Study of essential oil composition of aromatic plants from Argentina. En: *Series Recent Progress in Medicinal Plants* in D.K. Majumdar, J. N. G. V. K. S., *Phytochemistry & Pharmacology II*, USA, Science and Technology Publishe.

HIPÓTESIS

Los aceites esenciales provenientes de especies y variedades de orégano que crecen en Argentina disminuyen el deterioro oxidativo de los lípidos e inhiben el crecimiento microbiológico de alimentos, y paralelamente mejoran las características sensoriales y aumentan aceptabilidad por parte de los consumidores en los alimentos en los que se los incluyen como conservantes tales como en quesos de pasta blanda y aceite de oliva.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de aceites esenciales de especies y variedades de orégano producidos en Argentina evaluando in-vitro distintos indicadores químicos de oxidación lipídica y analizando sus acciones antimicrobianas sobre una amplia gama de microorganismos relacionados a la seguridad alimentaria; y relacionar los resultados antimicrobianos y antioxidantes con la composición química de los aceites esenciales de los distintos tipos de oréganos estudiados.

Estudiar el efecto conservante a nivel antioxidante de los lípidos y a nivel antimicrobiano de diferentes tipos de alimentos. En tal sentido, se trabajó sobre alimentos con alto contenido de humedad y graso como quesos de pasta blanda y aceite de oliva, a los cuales se les incluyeron los aceites esenciales de las variedades de orégano estudiadas a fin de evaluar si se mejoraba la conservación de su calidad química, sensorial, nutricional y microbiológica durante el período de vida útil del producto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la composición físico-química de los aceites esenciales de cuatro variedades de orégano que constituyen plantas aromáticas de importancia regional dado el volumen de producción que tienen a nivel regional y nacional.

2. Determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano a nivel de laboratorio midiendo diversos indicadores químicos que permitan tener una clara noción de la potencialidad conservante de las diferentes composiciones de los aceites esenciales utilizados en este estudio.
3. Determinar la actividad biocida de los aceites esenciales de orégano probados en diferentes microorganismos tanto bacterias Gram positivas y Gram negativas como distintos tipos de hongos que tengan importancia sobre la seguridad de los alimentos.
4. Realizar análisis sensoriales sobre quesos/ricota y aceite de oliva adicionados con los aceites esenciales estudiados para determinar cómo afecta la inclusión de dichos aceites esenciales sobre las propiedades sensoriales de los alimentos.
5. Realizar estudios de almacenaje de diferentes productos alimenticios, tales como quesos de pasta blanda y aceite de oliva, los cuales fueron adicionados con aceites esenciales de las variedades de oréganos estudiadas para evaluar cambios químicos, sensoriales y microbiológicos que se producen durante el período de conservación de estos alimentos a fin de establecer acción perseverante de los diferentes aceites esenciales estudiados.

CAPÍTULO 2

COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CUATRO VARIEDADES DE OREGANO CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

INTRODUCCIÓN

Los oréganos pertenecen al grupo de las hierbas aromáticas y son utilizados típicamente como condimento en la cocina (Kintzios, 2002). El orégano es la especie aromática más utilizada, desde el punto de vista botánico corresponden al género *Origanum*, que incluye más de 70 especies, subespecies, variedades e híbridos. Su sabor y aroma son debidos parcialmente a la presencia de aceites esenciales que se acumulan en los tricomas de hojas, y están compuestos por monoterpenos, sesquiterpenos, y fenilpropanoides. Esta hierba aromática también tiene numerosos beneficios terapéuticos (diaforético, antiséptico, antiespasmódico, y tónico) y se utiliza en las medicinas alternativas u homeopáticas o en medicina natural en muchos países (Souza *et al.*, 2007). Los aceites esenciales de orégano se han utilizado en muchas aplicaciones: como agentes saborizantes en alimentos y bebidas, en perfumes, como fungicidas e insecticidas, en productos farmacéuticos, veterinarios, e industriales (Rehder *et al.*, 2004).

El interés creciente en las hierbas y especias, como fuentes de antioxidantes naturales es debido a sus implicaciones para la salud y la funcionalidad. Una propiedad importante de algunos componentes del aceite esencial en los sistemas alimentarios, es su solubilidad tanto en aceite como en agua. Los antioxidantes obtenidos a partir de plantas aromáticas comestibles, entre los que se encuentran los aceites esenciales, es que los mismos son aceptados por los consumidores, se consideran seguros por provenir de recursos naturales y tienen propiedades funcionales y sensoriales que remarcan su inclusión en determinados alimentos (Gaspar y Leeke, 2004).

En la Argentina, el orégano es el cultivo de plantas aromáticas más importante, no sólo debido a la demanda de los consumidores, sino también por mayor superficie cultivada. El 56% de las explotaciones donde se cultiva el orégano tienen alrededor de 5 hectáreas y el 75% de todos los establecimientos concentran menos de diez hectáreas. Las principales zonas de producción se encuentran en la provincia de Córdoba (25% de la producción nacional) y en las provincias del sudoeste de Mendoza (50%) y San Juan (15%).

La identificación botánica de las especies de *Origanum* de Argentina demuestran que la llamada “Mendocino” corresponde a un híbrido *Origanum x majoricum*, la denominada “Compacto” pertenece a *Origanum vulgare ssp vulgare* y los tipos “Cordobés” y “Criollo” son clones, ambos pertenecen a la especie *Origanum vulgare ssp hirtum* y sus diferencias se deben principalmente a características fenotípicas. Las diferencias entre las especies en cuanto a su comportamiento agronómico, son consistentes con la identificación taxonómica (Torres *et al.*, 2010).

En Argentina, la especie *Origanum sp.* se utiliza principalmente como condimento, para el consumo doméstico, la industria y para la exportación. Hoy en día, hay una demanda nacional no satisfecha de los productos obtenidos de orégano, especialmente su aceite esencial. Esta mayor demanda estimula el desarrollo de nuevas áreas edafo-climáticas para la ampliación de la producción agronómica, lo cual lleva progresivamente a un aumento del volumen de la cosecha de año a año.

Las propiedades antioxidantes de un aceite esencial pueden cambiar en función del cultivo, origen, estado vegetativo, y la estación de crecimiento de las plantas. En la provincia de Córdoba el orégano comercial proviene de cuatro variedades diferentes Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino (Asensio *et al.*, 2012).

El objetivo de este capítulo es determinar la composición físico-química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de especies de *Origanum sp* cultivadas en la Estación Experimental del Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, con la finalidad de evaluar la potencialidad antioxidante de estos aceites esenciales y su relación con los principales componentes químicos, para posteriormente indagar esta actividad antioxidante cuando los mismos son incluidos en diferentes tipos de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizaron las hojas y las inflorescencias de cuatro variedades de orégano:

- (a) *Origanum x majoricum* “Mendocino” (Men)
- (b) *Origanum vulgare ssp vulgare*, “Compacto” (Com)
- (c) *Origanum vulgare ssp hirtum* clon “Cordobés” (Cor)
- (d) *Origanum vulgare ssp hirtum* clon “Criollo” (Crio).

Las muestras de Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo se recogieron en abril de 2010 de la Estación Experimental de la Facultad Ciencias Agropecuarias (UNC), Córdoba (C) (centro de Argentina).

MÉTODOS

Extracción de aceite esencial y análisis por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas.

Las muestras de hojas y flores se destilaron por arrastre con vapor de agua durante 2 horas en un aparato de tipo Clevenger. Los aceites esenciales (AE) se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se mantuvieron en viales de color ámbar a -18 ° C hasta su análisis.

Las muestras de AE se analizaron por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas usando una columna capilar HP-5 (30 m, 0,25 mm ID, 0.25µm Film) en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Wilmington, DE, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas y un detector de ionización de llama. Las condiciones de la columna fueron las siguientes: Helio, flujo constante se fijó en 1 mL/min. La temperatura de entrada fue de 220 °C, con una rampa de temperatura de 60 °C por 1 min, luego 4 °C/min, y finalmente se mantuvo a 200 °C por 15 min. La temperatura para el FID se fijó en 220 °C y para el MSD a 280 °C. El análisis cualitativo se basó en una comparación de los tiempos e índices de retención en ambas columnas, y se complementó la identificación por comparación de los espectros de masas con los datos correspondientes de literatura y de la bibliotecas de espectro de masas Wiley (275) (Juliani y Simon, 2008).

Análisis físicos de los aceites esenciales.

La densidad de los aceites esenciales se midió a 23 ° C usando un picnómetro de 2 mL. El Índice de refracción se determinó con un refractómetro de mesada (Fisher Scientific Abbe) a 23 °C.

Análisis de actividad antioxidante.

Los métodos para medir actividad antioxidante involucran dos mecanismos distintos, donde los antioxidantes desactivan los radicales: TES (Transferencia de un Electrón Simple) o TAH (Transferencia de un Átomo de Hidrogeno). Las pruebas TES miden la habilidad de un potencial antioxidante de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto (metales, carbonilos y radicales). Estas reacciones se traducen generalmente en un cambio de coloración. El mecanismo TAH mide la clásica habilidad de un antioxidante de secuestrar radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrogeno. El resultado final es el mismo, independientemente del mecanismo, pero la cinética y el potencial para reacciones laterales difieren para cada compuesto (Huang *et al.*, 2005). Reacciones de transferencia de electrones y de protones acoplados pueden ocurrir en paralelo, y el mecanismo dominante en un determinado sistema puede ser determinado por la estructura y las propiedades antioxidantes, la solubilidad y el sistema disolvente (Prior *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante del aceite esencial se determinó a través de los siguientes test, los cuatro primeros corresponden a mecanismos TES y el último a uno TAH.

a. DPPH. La actividad secuestrante de radicales libres de los aceites esenciales se determinó de acuerdo al procedimiento realizado por Quiroga *et al.* (2011) utilizando como reactivo al 1,1-difenil-picril-hidrazil radical (DPPH). Se añadieron los aceites esenciales a evaluar en 3,9 mL de solución metanólica, 0,05 mM de DPPH, y sus concentraciones finales fueron 5,77, 2,77, 1,39 y 0,69 g/mL. La solución se colocó en oscuridad durante 30 minutos. El control se preparó utilizando agua en lugar de los aceites esenciales. Se determinó la disminución de la absorbancia de la solución a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (UV-V Espectrofotómetro con arreglos de diodos, Hewlett Packard HP 8452 A, USA). La actividad secuestrante de radicales libre de las muestras fue expresada como porcentaje de inhibición del DPPH y fue calculada de acuerdo a la ecuación:

Porcentaje de inhibición = $[(Ab - Aa)/Ab] \times 100$ (ec. 2.1)

donde Ab y Aa son los valores de absorbancias tomados después de 30 minutos correspondientes al blanco y a la muestra con aceite esencial, respectivamente.

La concentración inhibitoria 50% (CI50) se calculó a partir de la curva obtenida representando el porcentaje de inhibición frente a las concentraciones de aceites esenciales finales (Loizzo *et al.*, 2009).

b. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). El poder reductor férrico (FRAP) mide la actividad antioxidante en medio acuoso en relación al ácido ascórbico. Este ensayo mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el Fe^{+3} y se utiliza para evaluar la actividad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (AEAC). La reacción mide la reducción del férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a un producto de color. El poder de reducción parece estar relacionado con el grado de hidroxilación y grado de conjugación de los polifenoles. Sin embargo, FRAP no puede detectar compuestos que actúan como aceptor de radicales (transferencia H), en particular tioles y proteínas. Esto causa una subestimación grave. Para este estudio, se colocaron 10 μ L de aceite esencial o blanco (agua) y 990 μ L de reactivo de FRAP en un tubo de reacción, que consistió en cloruro férrico y TPTZ en buffer acetato (pH 3,6). La absorbancia se midió después de 5 minutos a 593 nm. Se llevó a cabo una curva de calibración con diluciones seriadas de ácido ascórbico con el fin de determinar la actividad antioxidante ácido ascórbico (AEAC) (Benzie y Strain, 1996; Juliani *et al.*, 2009).

c. ABTS. Este ensayo se basa en el protocolo desarrollado por Re *et al.*, (1999), con modificaciones menores. Los aceites esenciales se diluyeron en etanol. Después de la adición de 1 mL de solución de ABTS diluido (SIGMA ® St. Louis, MO) en etanol (absorbancia $0,7 \pm 0,02$) se incorporaron 10 μ L de aceites esenciales, o Trolox (SIGMA ® St. Louis, MO) y la lectura de la absorbancia fue registrada a temperatura ambiente (22 °C) después de 25 min. La concentración de aceites esenciales que dieron el mismo porcentaje de inhibición de la absorbancia del catión radical ABTS en 734 nm (HP 8453 Espectrofotómetro UV-visible) se usó para estimar en términos de capacidad antioxidante equivalente de Trolox como 1 mM de Trolox (TEAC mM). La TEAC de los aceites esenciales se expresó como mM Trolox/mL.

Compuestos similares reaccionan tanto el TEAC y FRAP debido a que el potencial redox de Fe (III)-TPTZ es comparable con la de ABTS $\text{¥} + (0,68 \text{ V})$. Las condiciones de reacción difieren, sin embargo: TEAC se lleva a cabo a un pH neutro y el FRAP se lleva a cabo a pH ácido 3,6 para mantener la solubilidad de hierro. La reacción a bajo pH disminuye el potencial de ionización que impulsa la transferencia de electrones y aumenta el potencial redox, causando un cambio en el mecanismo de reacción dominante. Por lo tanto, TEAC y FRAP pueden dar valores relativos comparables, pero los valores de FRAP son generalmente más bajos que los valores TEAC para una serie determinada de compuestos antioxidantes.

d. Test Carotenos/Linoleico. Para el ensayo de blanqueo β -caroteno, se disolvieron aproximadamente 10 mg de β -caroteno (SIGMA ® St. Louis, MO) en 10 mL de cloroformo. La solución de cloroformo caroteno (0,2 mL) se agregó en un matraz de ebullición que contenía 10 mg de ácido linoleico (SIGMA ® St. Louis, MO) y 200 mg de Tween 40 (SIGMA ® St. Louis, MO). El cloroformo se eliminó utilizando un evaporador rotatorio a 40 °C durante 5 min, se añadió lentamente 50 mL de agua destilada al residuo y con agitación vigorosa, para formar una emulsión. La emulsión (5 mL) se añadió a un tubo que contenía 0,2 mL de la solución de muestras y la absorbancia se midió inmediatamente a 470 nm contra un blanco, que consistió en una emulsión sin β -caroteno. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 50 °C y la oxidación de la emulsión se monitoreó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 470 nm durante un período de 60 min. Las concentraciones de aceite esencial evaluados fueron: 10, 15, 20 y 25 mg/mL. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición en relación con el control después de una incubación de 60 min usando la siguiente ecuación (de Oliveira *et al.*, 2012) :

$$\% \text{ AA} = 100 [1 - (\text{Ai}-\text{A}) / \text{Ac}-\text{Act}] \text{ (1), (Ec. 2.2)}$$

Donde % AA es la actividad antioxidante; Ai es la muestra de absorbancia en el tiempo 0; A es la absorbancia de la muestra a 60 min; Ac es la absorbancia del control en tiempo de 0, Act es la absorbancia del control a los 60 min.

e. ORAC. Este método mide la inhibición por parte de antioxidantes de las oxidaciones inducidas por radicales peróxido y por lo tanto refleja la ruptura de la clásica cadena de actividad antioxidante en la transferencia de átomos de H. En el ensayo básico, el radical peróxido

reacciona con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente que puede ser fácilmente cuantificado por fluorescencia. La capacidad antioxidante es determinada por la tasa de disminución de la fluorescencia y la cantidad de producto formado en el tiempo. El cálculo de los efectos protectores de un antioxidante (AOX) es a partir de las áreas de caída de fluorescencia netas bajo las curvas integradas (ABC) $[ABC_{AOX} - ABC_{no\ AOX}]$. Los valores ORAC generalmente se han reportado como equivalentes de Trolox. Se genera una curva estándar mediante el ABC de cinco concentraciones estándares de Trolox y los equivalentes de trolox son calculados utilizando una relación entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva de disminución de la fluorescencia. El ensayo ORAC proporciona una fuente controlable de radicales peróxido que modelan las reacciones de antioxidantes con lípidos tanto en los alimentos, como en sistemas fisiológicos. Este método puede ser adaptado para determinar actividad antioxidante tanto para compuestos hidrófilos como hidrófobos mediante el cambio de la fuente de radicales y disolvente.

Para este estudio, se hicieron diluciones en 75 mM PBS, pH 7 de todos los reactivos y la muestra. Se utilizó Tween 40 para emulsionar los aceites esenciales. Se prepararon soluciones madres de fluoresceína 1 mM y 2,5 mM de Trolox que se almacenaron a -20 °C. Se diluyó fluoresceína (6 nM) y se añadieron 150 µL en cada pocillo de una placa de 96. A continuación, se añadieron a cada pocillo por triplicado 25 µL de Trolox (50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 µM) y las muestras. La placa se pre-incubó a 37 °C durante 30 min. Se preparó una solución fresca de AAPH 127 mM y se añadieron 25 µL a cada pocillo después de pre-incubación. Las lecturas de fluorescencia se registraron cada minuto durante 75 minutos con un paso de banda de 485 nm, 20 nm, y un filtro de excitación de 528 nm, en un lector de microplacas Sinergia HT Multi-Detección (Bio-Tek, Winooski, VT). El área debajo de la curva (ABC) se calculó mediante la fórmula: $0,5 \frac{R2}{R1} \frac{r3}{r1} \dots \frac{R75}{R1} \frac{R76}{R1} * 0,5$, en la que R1 es la primera lectura, R2 es la segunda lectura y así sucesivamente. . La ABC neta se estimó restando el ABC del blanco a la del estándar o muestra. Una línea de regresión fue generada por el trazado de la concentración de Trolox por la ABC neta. Para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos con concentraciones conocidas en un determinado rango de concentraciones, el ABC neta se calculó para cada compuesto y se representó frente a cada concentración.

Para determinar los equivalentes de Trolox (ET) de cada muestra, se calculó la relación de la pendiente (m) del análisis de regresión lineal del compuesto con la pendiente de regresión lineal de Trolox:

$$\text{ET (intervalo de concentraciones)} = m \text{ compuesto} / m \text{ Trolox (Ec. 2.3)}$$

Los equivalentes de Trolox calculados, se pueden utilizar para el análisis comparativo de la capacidad antioxidante de las diversas muestras ensayadas (Prior *et al.*, 2003; Prior *et al.*, 2005; Brescia, 2012).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron ejecutados en tres repeticiones. Sobre los resultados obtenidos, se realizaron los siguientes cálculos estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2012).

1. Determinación de medias y desvíos estándar.
2. Análisis de varianza y test de LSD Fisher, $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de los aceites esenciales

Los principales compuestos que se detectaron en los aceites esenciales de las 4 variedades de orégano se enumeran en la Tabla 2.1 y la figura 2.2. La composición química de las especies de *Origanum* tienen una cierta similitud, pero se encontraron diferencias significativas entre las muestras. En general, los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano analizadas en este estudio, tuvieron altas cantidades de trans-sabineno hidratado, terpinen-4-ol, timol y terpineno. Dambolena *et al.* (2010) informaron que los componentes principales de los aceites esenciales de oréganos argentinos son los mono terpenos de trans-sabineno hidratado (27,77-36,77%) y timol (17,77 a 30,77%), con una cantidad más pequeña de terpineno (3,13-4,63%), limoneno (2,1-3,6%), sabineno cis-hidrato (1,43-3,37%), terpinen-4-ol (3,23-5,3%), y carvacrol (traza 3,57%). En los resultados de este trabajo de tesis, *Origanum x majoricum* (Men) presentó la mayor cantidad de trans sabineno hidrato de (28,12%). *Origanum vulgare spp vulgare* (Com) también mostró una gran cantidad de este compuesto (27,2%) y fue el que más γ -terpinene presentó (9,8 %), seguido por el orégano Cordobés (8,04%), que a su vez mostró un contenido de timol intermedio con respecto a las otras especies (14,39%). Trans-sabineno hidratado, timol y γ -terpineno fueron reportados como compuestos típicos de *O. vulgare ssp. Vulgare* (Dambolena *et al.*, 2010). Kulisic *et al.*, (2004) informaron de que los principales compuestos de *Origanum vulgare L., ssp. hirtum* son los monoterpenos fenólicos como timol (35%) y carvacrol (32%) y los hidrocarburos monoterpénicos como γ -terpineno (10,5%), ρ -cimeno (9,1%) y α -terpineno (3,6%). En este trabajo, las especies *Origanum vulgare spp hirtum* de Córdoba (clones Criollo y Cordobés) presentaron mayor concentración de timol en su composición química (17,14% y 18,58, respectivamente) seguidos por *Origanum vulgare spp vulgare* (Compacto), siendo el híbrido *Origanum x majoricum* el que más bajo contenido registró de este compuesto (12,09%). El mayor contenido de terpinen-4-ol lo presentó el AE de orégano criollo (9,52%), significativamente diferente con respecto a las otras especies estudiadas.

Se detectaron diferencias significativas tanto en los componentes mayoritarios como así también en los compuestos presentes en cantidades menores al 10% (porcentaje relativo). Las especies de orégano cultivadas en la provincia de Córdoba presentaron alta concentración de β -pineno (Crio = 5,91%, seguido de Com = 1,84%), y orto-cimeno (Men = 7,78% y Crio = 6,29%).

En cuanto a cis-ocimeno, las variedades Com, Cor, Crio y Men mostraron más del 1,5%, en su composición química. Mientras que las variedades Cordobés y Criollo presentaron más de 2% de α -terpineol. En cuanto al carvacrol, compuesto muy destacado por sus propiedades antioxidante, se encontró en una concentración de 1,81% en el AE de orégano Mendocino, mientras que en las otras especies este compuesto se detectó en cantidades inferiores al 0,5%.

Las especies *Origanum vulgare ssp. vulgare* y *ssp. virens* han sido mencionadas por ser ricas en compuestos acíclicos y sesquiterpenoides pero no se encontraron muestras argentinas que sean ricas en compuestos sabinílicos (Dambolena *et al.*, 2010). La posición y el grado de hidroxilación de compuestos fenólicos son de primordial importancia en la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Los monoterpenos oxigenados más activos son los dos fenoles timol y carvacrol. Por otro lado, se sabe que los monoterpenos hidrocarburos tienen menos o ninguna actividad antioxidante, pero con una notable excepción, tres componentes monocíclicos como terpinoleno, 1-terpineno y γ -terpineno, y en menor medida, un compuesto bicíclico, el sabineno. En particular, α y γ -terpineno tienen una actividad antioxidante comparable a la de α -tocoferol. En cuanto a los hidrocarburos sesquiterpenos, como el cariofileno, este tipo de actividad es muy baja. Además, los sesquiterpenos oxigenados, cuya actividad antioxidante es comparable a la de los monoterpenos oxigenados, como el óxido de cariofileno y el germacreno D, están presentes en las variedades Com, Cor y Crio con valores mayores al 1%, (Ruberto y Baratta, 2000). La relación entre el contenido de un compuesto antioxidante en particular y la actividad del antioxidante de un aceite esencial o una mezcla de componentes es difícil de explicar teniendo en cuenta sólo la base de un análisis cuantitativo y la actividad individual de cada componente, debido a la acción sinérgica que tiene lugar entre los constituyentes fenólicos presentes en los extractos naturales, que seguramente contribuye a las diferencias en la capacidad antioxidante de los extractos que se obtienen de plantas (Rice-Evans *et al.*, 1995)

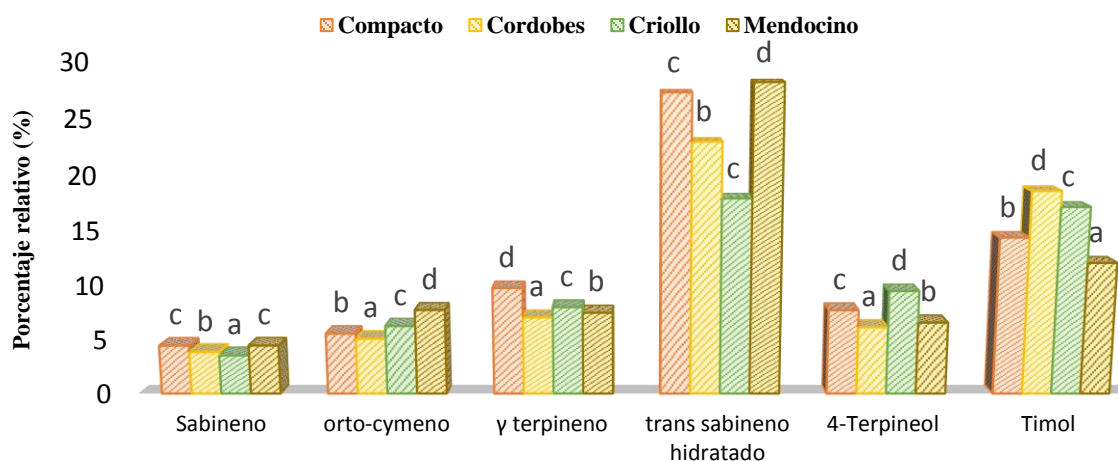


Fig.2.1. Porcentaje relativo de los compuestos mayoritario de los aceites esenciales de las cuatro variedades de oréganos estudiadas (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino).

1. Letras distintas para cada compuesto indican diferencias significativas entre los aceites esenciales ($\alpha=0,05$) $n=3$. LSD Fisher.

Tabla 2.1. Porcentaje relativo de los compuestos identificados en las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

IR	Compuesto	Compacto ^a	Cordobés ^a	Criollo ^a	Mendocino ^a				
854	Hexenal	0,07	b	0,04	a	0,04	a	0,06	a
931	α -Tujeno	0,74	a	0,85	c	0,79	b	0,91	d
939	α -Pino	0,76	d	0,75	d	0,76	d	0,63	c
954	Camphene	0,23	c	0,41	e	0,49	d	0,12	b
977	Sabineno	4,48	b	3,9	ab	3,57	a	4,49	b
980	β Pino	1,84	e	1,36	c	5,91	d	1,02	b
987	3-Octanona	0,49	d	0,11	b	0,12	b	0,27	c
992	Myrceno	1,83	a	1,79	a	1,66	a	1,66	a
996	3-Octanol	0,22	d	0,06	b	0,07	b	0,08	c
1006	α Felandreno	0,18	a	0,18	a	0,23	b	0,19	a
1013	δ 3-Careno	0,05	b	0,03	b	0,04	a	0,04	a
1020	α Terpineno	2,91	a	2,62	a	3,31	b	3,01	a
1028	orto-Cymeno	5,6	d	5,13	c	6,29	e	7,78	d
1033	β -Felandreno	1,82	a	1,85	a	1,93	a	1,95	a
1036	1,8 Cineol	0,08	b	0,12	c	0,14	c	0,07	b

Tabla 2.1 (continuación) Porcentaje relativo de los compuestos identificados en las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

IR	Compuesto	Compacto ^a	Cordobés ^a	Criollo ^a	Mendocino ^a				
1040	cis Ocimeno	1,4	b	2,76	e	2,45	d	1,62	b
1051	tras Ocimeno	0,23	c	0,33	d	0,31	d	0,19	b
1063	γ Terpineno	9,8	d	7,09	a	8,04	c	7,53	b
1071	cis Sabineno hidrato	1,83	a	3,3	b	2,98	b	3,44	b
1090	Terpinoleno	0,95	a	0,82	a	1,14	b	0,97	a
1100	trans Sabineno hidrato	27,23	c	22,94	b	17,9	a	28,12	d
1113	Mentatrieno	0,04	a	0,91	d	0,91	d	0,32	c
1125	dehidro Sabineno centona	0,76	a	0,78	a	0,96	b	0,84	a
1130	Camfolenal	0	a	0,03	e	0,03	e	0	a
1132	Terpinen 1-ol	0,03	a	0	a	0	a	0	a
1144	cis β-Terpineol	0,4	a	0,4	a	0,56	b	0,44	b
1154	Carahanaenona	0,1	a	0,04	a	0,06	a	0,03	a
1170	Borneol	0,53	c	1,47	d	1,83	d	0,42	b
1181	Terpinen 4-ol	7,76	a	6,18	a	9,52	b	6,61	a
1187	8-Cimenol	0,09	a	0,08	a	0,11	a	0,08	a
1192	α Terpineol	1,45	a	2,33	c	2,57	cd	2	b
1197	cis Dehidro carvona	0,2	a	0,22	a	0,28	a	0,25	a
1206	trans Dehidro carvona	0,03	a	0	a	0	a	0,06	b
1209	γ Terpineol	0,18	a	0,2	a	0,28	b	0,2	a
1237	Timol metil eter	3,66	c	0,27	a	0,29	a	1,08	b
1247	Carvacrol metil eter	1,47	c	1,3	b	1,31	b	1,65	d
1258	Linalool acetato	0	a	1,06	b	1,07	b	1,81	c
1286	α Terpinen 7 al	0,03	a	0,02	a	0,03	a	0,03	a
1289	Bornil acetato	0,01	a	0,13	c	0,18	d	0,07	b
1292	Timol	14,39	a	18,58	b	17,14	b	12,09	a
1301	Carvacrol	0,05	a	0,21	a	0,23	a	1,81	b
1389	β Burboneno	0,23	b	0,13	b	0,18	b	0,05	a
1425	Caryofylleno	0,99	a	2,81	b	2,85	b	2,16	ab
1434	β Copaeno	0,06	b	0,04	b	0,05	b	0	a
1460	α Humoleno	0,1	a	0,14	a	0,14	a	0,2	
1479	γ Gurguyeno	0	a	0,01	a	0	a	0,02	a
1486	D Germacreno	1,49	b	1,23	b	1,01	b	0,3	a
1500	Bicyclogermacreno	1,4	b	1,71	d	1,37	a	1,54	c
1511	β Bisaboleno	0,29	a	0,73	b	0,74	b	0,23	a
1527	δ Cadineno	0,04	a	0,06	a	0,09	a	0,03	a

Tabla 2.1 (continuación) Porcentaje relativo de los compuestos identificados en las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

IR	Compuesto	Compacto ^a	Cordobés ^a	Criollo ^a	Mendocino ^a
1588	Oxido de Cariofileno	0,17 a	0,37 a	0,53 b	0,3 a
1643	Epoxi Aloaromadendreno	0,03 a	0,07 a	0,09 b	0,07 a

^a Letras distintas indican diferencias significativas para cada compuesto entre los aceites esenciales estudiados ($\alpha=0,05$) $n=3$. LSD Fisher.

Características físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano presentaron una densidad que osciló entre 0,898 y 0,908 g/cm³ (Fig. 2.2B), no hubo diferencias significativas entre los mismos. Los índices de refracción (IR) estuvieron en el rango de 1,476 a 1,481 (Fig. 2.2A). Se encontraron diferencias significativas entre las muestras en este parámetro físico de los aceites esenciales. AE Mendocino presentó el valor más bajo, mientras que AE de Criollo el más alto. El AE Mendocino fue también la muestra que presentó el valor más bajo de densidad. Las diferencias en densidad e índice de refracción se relacionan a diferencias en la composición química. Juliani y Simon (2008) informaron que las muestras con menor contenido de fenoles tienen menor IR y valores de densidad. En este caso, el AE de Mendocino fue la muestra con menor contenido de timol (12,09%), menor densidad y menor IR.

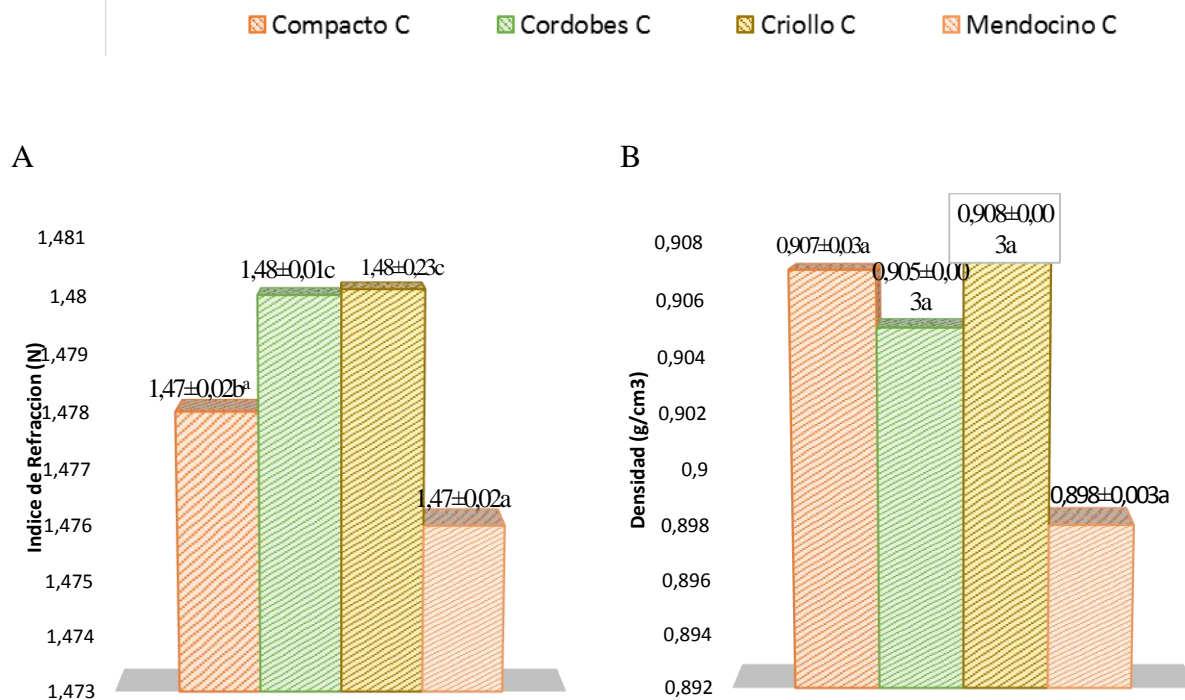


Fig 2.2 Indice de Refraccion (A) y Densidad (B) para los aceites esenciales de las 4 variedades de oregano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

^aLetras distintas indicand diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas. ($\alpha=0,05$) n=3. LSD Fisher.

Actividad antioxidante de los aceites esenciales

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano se determinó por diferentes métodos. Los resultados variaron según la variedad analizada y el ensayo utilizado.

Ensayo DPPH. Se evaluó la actividad secuestrante de radicales libre de los aceites esenciales de orégano utilizando el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Las concentraciones que dieron lugar a una inhibición del 50% (CI50) de la actividad anti-radicalaria se presentan en la Tabla 2.2. Las muestras fueron capaces de reducir el radical violeta DPPH estable a DPPH H amarillo. Se obtuvieron valores de CI50 que fueron desde 5.814 L / mL en AE Com a 1,5814 L / mL para el AE Cor. Los aceites esenciales de las variedades Cordobés, Criollo y Mendocino tuvieron los menores valores de CI50. Un valor bajo IC50 indica una mayor

actividad antioxidante. Esta potencial actividad antioxidante podría estar relacionado con la composición química, especialmente en los aceites esenciales Cordobés y Criollo, que al tener una mayor concentración del fenol timol podría ser un indicador de mayor actividad antioxidante.

Tabla 2.2. Regresiones lineales y R^2 ajustados para el ensayo de DPPH y valores de concentración inhibitoria 50 (CI 50) de los aceites esenciales de las variedades de orégano evaluadas: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

Aceite esencial	β_0^a	$\beta_1^{a,b}$	R^2	IC 50^b
Compacto	13.53	21.89	b 0.97	5.3134 b ± 0.34
Cordobés	38.75	11.28	a 0.9	1.5814 a ± 0.05
Criollo	34.29	21.24	b 0.96	2.0776 a ± 0.05
Mendocino	39.47	12.74	a 0.92	1.5896 a ± 0.1

^aRegresión lineal: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$; donde Y = variable dependiente (IC); β_0 = constante que es igual al valor de Y cuando $X=0$; β_1 = coeficientes de X; X = variable independiente (porcentaje de inhibición).

^bANOVA y LSD Fisher tests: Pendiente (β_1) de cada variable e IC50 de las muestras, seguidas por la misma letra para cada columna indican diferencias no significativas ($\alpha = 0.05$)

Ensayo ABTS. La capacidad antioxidante de los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano, evaluadas contra el radical ABTS y siguiendo el método colorimétrico, se muestran en la Figura 2.3 (A). Los resultados se expresaron en mM de Trolox/mg de AE. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras. El aceite esencial de la muestra que exhibió una mayor actividad antioxidante fue el de la variedad de orégano Criollo (0,2102 mM/mg). Este valor fue significativamente diferente al resto de las muestras. El aceite esencial de orégano Mendocino fue el que presentó menor capacidad antioxidante (0,16304 mM/mg). El AE Crio presentó grandes cantidades de o-cymeno, γ -terpinene, hidrato de trans-sabineno, y de los monoterpenos oxigenados terpinen-4-ol y el timol. Todos estos compuestos son conocidos por tener propiedades antioxidantes. La presencia de grupos funcionales en los anillos terminales de los compuestos aromáticos modula la actividad reductora del ABTS + (Müller *et al.*, 2011).

Método FRAP. Los cuatro aceites esenciales evaluados tuvieron la capacidad de reducir el complejo férrico di-TPTZ utilizado en el método FRAP. El ensayo de reducción de potencial antioxidante del hierro es el más significativo y eficaz para evaluar la capacidad de los antioxidantes para donar electrones (Prior *et al.*, 2005). Se encontraron diferencias significativas entre las muestras. AE Crio fue la muestra que presentó mayor capacidad antioxidante

equivalente de ácido ascórbico (0,184 mM/mg), siendo significativamente diferente al resto de las muestras. AE Men fue la muestra que presentó el valor más bajo (0,072 mM/mg) (Fig 2.3 (B)). La actividad reductora de ion férrico está influenciada principalmente por el tamaño del sistema de dobles enlaces conjugados (DEC) y las funciones hidroxilo de los compuestos fenólicos, como la vitamina E, ácidos fenólicos y flavonoides (Müller *et al.*, 2010). Las muestras con mayor contenido de monoterpenos que presentan DEC como o-cymeno, α -terpineno y timol tienen esta característica. Los resultados del test FRAP pueden variar dependiendo de la escala de tiempo de análisis. Fenoles de reacción rápida que se unen al hierro o degradan a compuestos con menor o diferente reactividad, se analizan mejor con tiempos de reacción cortos. Algunos polifenoles reaccionan más lentamente y requieren tiempos de reacción más largos para la detección. Sin embargo, en contraste con otras pruebas de poder antioxidante total, el ensayo FRAP es simple, rápido, de bajo costo, y robusto (Pulido *et al.*, 2000; Prior *et al.*, 2005).

La capacidad de los antioxidantes para capturar los radicales libres (ABTS) y la capacidad de reducir el hierro (FRAP) están estrechamente relacionadas ($R^2 = 0,68$). Estos resultados proporcionan una confirmación adicional de la respuesta diferencial sobre la base de los principales constituyentes químicos en los aceites esenciales (Juliani *et al.*, 2009). Así, los compuestos deben reaccionar de manera similar en un ensayo TEAC y en un FRAP, lo que debería conducir a una buena correlación entre los resultados (Prior *et al.*, 2005). Sin embargo, las condiciones de reacción entre estos ensayos se diferencian, sobre todo debido al valor del pH (FRAP = 3,6; TEAC = 7,4). Los resultados de este ensayo dieron una correlación $R = 0,65$ entre el FRAP y ABTS. Por lo tanto, TEAC y FRAP pueden dar valores relativos comparables, pero teniendo en cuenta que los valores FRAP son generalmente más bajos que los valores TEAC para una serie dada de compuestos antioxidantes. A menudo, los valores FRAP tienen una mala relación a otras medidas de antioxidantes (Prior *et al.*, 2005).

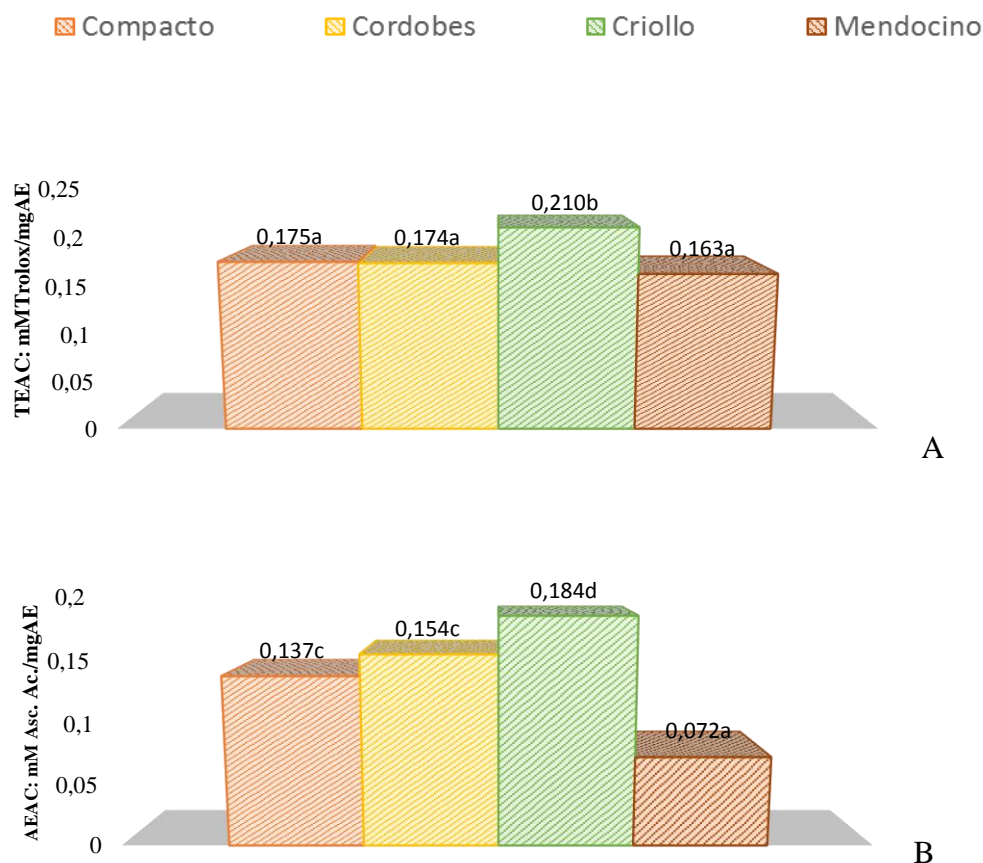


Fig 2.3. Actividad antioxidante determinada por los metodos ABTS y FRAP de los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino. A) TEAC: Capacidad Antioxidante equivalente en Trolox B) AEAC: Capacidad Antioxidante del Ácido Ascórbico.

¹Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas ($\alpha=0,05$, $n=3$, LSD Fisher).

Ensayo ácido linoleico/ β -caroteno. En el sistema denominado modelo ácido linoleico/ β -caroteno, el β -caroteno sufre una rápida decoloración en la ausencia de un antioxidante. Esto es debido a la oxidación conjunta del β -caroteno y el ácido linoleico, que genera radicales libres. Como resultado, el β -caroteno se oxida y se descompone en parte, posteriormente el sistema pierde su cromóforo y el color naranja característico que se mide espectrofotométricamente. Se puede observar (Fig. 2.4) que la actividad antioxidante aumentó con la cantidad de aceite esencial, y las muestras de aceite esencial de las variedades de orégano

estudiadas difirieron una de las otras. El AE Com fue el que presento mayor actividad antioxidante para este test con una IC50 de 12,86, siendo significativamente diferente al resto de las muestras. Los AE Crio y Men presentaron valores de IC50 similares (14,64 y 15,00 $\mu\text{g AE/mL}$, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellas. Los compuestos que contienen átomos de hidrógeno en las posiciones alílicas y/o bencílicas deberían mostrar mejor actividad en esta prueba debido a la relativa fácil captura del hidrógeno atómico a partir de estos grupos funcionales por radicales peróxidos formados en traspaso de esta prueba (Safaei-Ghomi *et al.*, 2009).

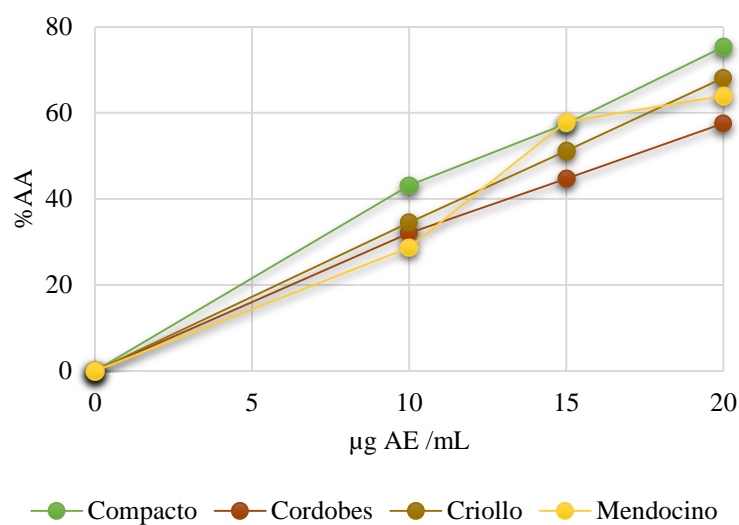


Fig. 2.4. Actividad Antioxidante (AA, %) evaluados mediante el test ácido linolénico/ β -caroteno para distintas concentraciones de los aceites esenciales de las cuatro variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

Tabla 2.3. Regresiones lineales y R^2 ajustados para el ensayo de ácido linolénico/ β -caroteno y valores de concentración inhibitoria 50 (CI50) de los aceite esencial de las variedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo, and Mendocino.

Aceite esencial	β_0^a	$\beta_1^{a\ b}$	R^2	IC 50 ^b ($\mu\text{g AE/mL}$)
Compacto	3,752	1,764 b	0,99	12,86 a
Cordobés	2,884	1,116 a	0,99	16,95 c
Criollo	3,404	0,159 b	0,99	14,64 b
Mendocino	3,387	0,469 a	0,99	15,00 b

^a Regresión lineal: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$; donde Y = variable dependiente (IC) ; β_0 = constante que es igual al valor de Y cuando $X=0$; β_1 = coeficientes de X ; X = variable independiente (porcentaje de inhibición).

^b ANOVA y LSD Fisher tests: Las pendiente (β_1) de cada variable y el IC50 de las muestras seguidos por letras distintas para cada columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

ORAC. El ensayo ORAC es conocido por ser el más relevante de todos los métodos descritos anteriormente, ya que en él se utiliza una fuente de radicales de importancia biológica (Cavar *et al.*, 2012). El ORAC utiliza la técnica de área bajo la curva (ABC) y por lo tanto combina tanto el tiempo y el grado de inhibición de los radicales libres por acción de un antioxidante en una cantidad única. En este estudio (Fig. 2.5), los resultados arrojados por ORAC ubicaron al AE de orégano Criollo como el que presentó mayor actividad antioxidante, significativamente superior al resto de los aceites esenciales (TE: 1,39 mMTrolox/mgAE).

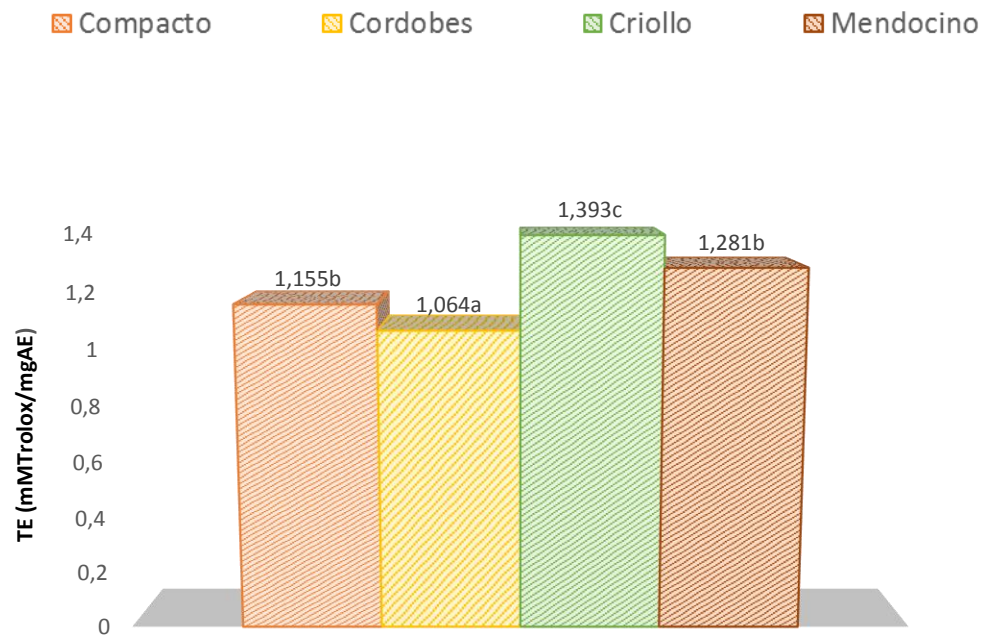


Fig 2.5. Actividad antioxidante determinada por ORAC de los aceites esenciales de las varedades de orégano: Compacto, Cordobés, Criollo, y Mendocino.

Abreviaturas: TE: Equivalentes en Trolox de cada muestra para un rango de concentraciones.

Letras distitas indican diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas ($\alpha=0,05$, $n=3$, LSD Fisher).

CONCLUSIONES

Todos los aceites esenciales de las variedades de orégano presentan distinta composición química y actividad antioxidante.

Los aceites esenciales de las variedades Cor y Crio presentan los porcentajes más elevados de timol (18,58 y 17,14, respectivamente) y el Crio el más elevado de 4-terpineol (9,52). Ambos compuestos conocidos por tener gran actividad antioxidante.

Los aceites esenciales de oréganos de las variedades Cor y Crio presentan similar índice de refracción y, particularmente el aceite esencial de la variedad Crio tiene la mayor densidad.

El aceite esencial de orégano de la variedad Crio muestra mayor actividad antioxidante para los métodos ABTS (TEAC: 0,21 mM/mg AE), FRAP (0,18 mM Ac Asc/mg AE) y ORAC (TE: 1,38 mM Tr/mg AE).

Se podría sugerir una diferencia de actividad antioxidante en las especies debida a la composición química que presentan.

BIBLIOGRAFIA

- Asensio, C. M., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2012. Sensory Attribute Preservation in Extra Virgin Olive Oil with Addition of Oregano Essential Oil as Natural Antioxidant. *Journal of Food Science* 77: 294-230.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*: 70-76.
- Brescia, P. J. 2012. Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assays with Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader - ORAC Antioxidant Tests. , in *Applications Scientist*, B. I., Inc., Winooski, VT.
- Cavar, S., Maksimovica, M., Vidica, D. & Paric, A. 2012. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. . *Journal of Industrial Crops Products* 37: 479– 485.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. & Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1115-1120.
- de Oliveira, T. L. C., de Carvalho, S. M., de Araújo Soares, R., Andrade, M. A., Cardoso das, G., Ramos, M. E. M. & Picollia, H. R. 2012. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *LWT - Food Science and Technology* 45: 204-212.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat versión 2012., in Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gaspar, F. & Leeke, G. 2004. Essential Oil from *Origanum vulgare* L. ssp. *virens* (Hoffm. et Link) Letswaart: Content, Composition and Distribution Within the Bracts. *Journal of Essential Oil Research* 16: 82-84.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- Juliani, H. R. & Simon, J. E. 2008. Chemical Diversity of *Lippia multiflora* Essential Oils from West Africa. *Journal of Essential Oil Research* 20: 49-55.
- Juliani, H. R., Koroch, A. R. & Simon, J. E. 2009. Chemical Diversity of Essential Oils of *Ocimum* Species and Their Associated Antioxidant and Antimicrobial activity. En: *Essential Oils and Aromas: Green Extractions and Applications*. Varshney, F. y Allaf, K. (Eds.). Dehradun, India. Chemat, Har Krishan Bhalla & Sons. pp. 284-295

- Kintzios, S. E. 2002. Part I – Introduction: Profile of the multifaceted prince of the herbs. En: *Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia**. Kintzios, S. E. (Eds.). Londres, UK. Taylor & Francis. pp. 3-8.
- Kulusic, T., Radoni, A., Katalinic, V. & Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85: 640-663.
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., Cindio, B. D., Houghton, P. J., Menichini, F. & Frega, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry* 117: 174-180.
- Müller, L., Theile, K. & Böhm, V. 2010. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Molecular and Nutrition Food Research* 54: 731–742.
- Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129: 139-148.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L. W., Wu, X. L., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D. J., Ou, B. X. & Jacob, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 3273-3279.
- Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 3396-3402.
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. & Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of food Science and Technology* 46: 2648-2655.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biomedical Medicina* 26: 1231-1237.
- Rehder, V. L. G., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Sartoratto, A., Figueira, G. M. & Duarte, M. C. T. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum apalii* e *O. vulgare*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6: 67-71.

- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. & Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22: 375-383.
- Ruberto, G. & Baratta, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167-174.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z. & Batooli, H. 2009. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry* 115: 1524–1528.
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O. & Trajano, V. N. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control* 18: 409-413.
- Torres, L. E., Chaves, A. G., Barboza, G., Brunetti, P., Bustos, J. A., Massuh, Y., Ocaño, S., Castillo, N. & Ojeda, M. S. 2010. Evaluation of the agronomic performance and taxonomic characterization of four clones of oregano (*Origanum sp.*). *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 91-93.

CAPÍTULO 3

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

INTRODUCCIÓN

El género *Origanum sp.* incluye más de 70 especies, subespecies, variedades e híbridos. Hay más de 60 especies de plantas utilizadas como condimento debido a su famoso aroma y sabor (Kintzios, 2002). En la Argentina, el orégano es una hierba aromática importante considerando la superficie de cultivo. Esta hierba aromática se utiliza principalmente como condimento, para elaborar subproductos industriales y para la exportación (CAEMPA, 2008). En Córdoba se cultivan cuatro variedades diferentes: Cordobés, Criollo, Mendocino y Compacto (Torres *et al.*, 2010). Hay un interés creciente para usar el aceite esencial de orégano como conservante dadas sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas (Azizi *et al.*, 2009). En este Capítulo se investigarán las cualidades del aceite esencial de orégano como antimicrobiano y antifúngico.

En la conservación de los alimentos, existe una lucha continua contra los microorganismos que los contaminan haciéndolos no apt para el consumo humano. Hay diferentes microorganismos que generan preocupación en las organizaciones de la salud. *Bacillus cereus* es un bacilo gram-positivo, que se ha relacionado con la carne cruda y procesada, verduras, arroz y productos lácteos. *B. cereus* se asocia a dos tipos de enfermedades transmitidas por los alimentos: diarreas y las del tipo emético, causadas por dos toxinas diferentes y se la considera una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria en el mundo industrializado (Granum, 1997). *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno humano que causa un amplio espectro de infecciones, que van desde infecciones superficiales en heridas hasta septicemias que ponen la vida en peligro y causan shock tóxico (Bore *et al.*, 2007). La intoxicación alimentaria estafilocócica es muy frecuente, y es considerada la tercera causa más importante de enfermedad en el mundo entre aquellas transmitidas por los alimentos (Boerema *et al.*, 2006; Normanno *et al.*, 2007). *E. coli* es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo y que normalmente vive en el tracto intestinal humano y animal. Sin embargo, algunas cepas causan diarreas graves como las entero patógenas, entero-toxigénicas, entero-invasiva, entero-agregativas y cepas entero-hemorrágica (Doyle *et al.*, 1997).

Cada año se incrementa el número de consumidores que prefieren alimentos mínimamente procesados y elaborados sin conservantes químicos (Appendini y Hotchkiss, 2002). La industria alimentaria investiga cada vez la forma de sustituir técnicas tradicionales de conservación de alimentos (tratamientos térmicos intensos, salado, secado y conservación química) por otras nuevas. Esto se debe en parte, a que los consumidores buscan alimentos sabrosos, nutritivos, naturales y fáciles de conservar. Además, la legislación en cuestiones alimentaria ha restringido el uso de algunos agentes antimicrobianos sintéticos dado que algunos compuestos constituyen un riesgo potencial de toxicidad para los consumidores (Burt, 2004).

Algunas especias han demostrado tener compuestos que proporcionan seguridad microbiológica en alimentos. Una opción interesante es incorporar en los sistemas alimentarios aceites esenciales como conservantes de origen natural. El objetivo de este capítulo fue evaluar en microorganismo aislados de los alimentos, bacterias de ácido lácticas, hongos, levaduras y nematodos la actividad biocida de los aceites esenciales de las variedades de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS UTILIZADOS

Aceites esenciales

Los aceites esenciales utilizados se obtuvieron por hidrodestilación (Zygodlo y Juliani, 2000) siguiendo el procedimiento que fue descrito en el Capítulo I.

Soluciones

- **Solución de resazurina al 0.01%**

Sal de Resazurina Sódica.....0,01 g

Agua destilada c.s.p. 100 mL

Medios de cultivo sólidos

- **Agar-Agar al 0,15%**

Agar-Agar 1,5 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

- **Agar Base con Cetrimida (Agar Cetrimide)**

Gelatina peptona	20 g
SO ₄ K ₂	10,4 g
Cl ₂ Mg.....	1,4 g
Cetrimida	0,3 g
Agar	13,6 g
Glicerina	10 mL
Agua destilada.....	1000 mL

pH: 7,1

- **Agar Müeller-Hinton (AMH)**

Infusión de carne.....	300 g
Peptona ácida de caseína.....	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH: 7,4

- **Agar Trypticase-Soya (ATS)**

Tripteína.....	15 g
Peptona de soya	5 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

pH: 7,3

- **Agar Salmonella y Shigella (Agar S-S)**

Pluripeptona.....	5 g
Extracto de carne	5 g
Lactosa	10 g

Sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio.....	8,5 g
Tiosulfato de sodio.....	8,5 g
Verde brillante	0,000033 g
Rojo neutro	0,025 g
Agar	13,5 g
Agua destilada.....	1000 mL

pH: 7

- **Agar de Levine con Eosina Azul de Metileno (EMB)**

Peptona.....	10 g
Lactosa	10 g
Eosina y azul de metileno	0,065 g
Agar	15 g
Agua Destilada.....	1000 mL

pH : 7,1

- **Agar Baird-Parker (BP)**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de Carne.....	5 g
Extracto de Levadura	1g
Cloruro de litio.....	5 g
Agar	20 g
Glicina.....	12 g
Piruvato de sodio	10 g
Agua Destilada.....	1000 mL

pH: 7,1

A cada fracción de 90 mL de medio base fundido y templado a 45 °C se le agregó:

a) 1 mL de solución de telurito de potasio 3% P/V.

b) 5 mL de emulsión yema de huevo.

- **Agar Bismuto Sulfito (BS)**

Polipeptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Dextrosa	5 g
Fosfato disódico	4 g
Sulfato ferroso.....	0,3 g
Indicador de sulfito-bismuto	8 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada.....	1000 mL

- **Agar M.R.S para Lactobacillus.**

Proteosa peptona N°3	10 g
Extracto de carne	8 g
Extracto de levadura	4 g
Glucosa	20 g
Manoleato de sorbitán.....	1 mL
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio.....	5 g
Citrato de amonio.....	2 g
Sulfato de magnesio.....	0.2 g
Sulfato de manganeso.	0.05 g
Agar	13 g

pH final: 6.4±0.2

- **Agar Cerebro Corazón (ACC).**

Extracto de Cerebro de Ternera	12.5 g
Extracto de Corazón de Buey	5 g

Triptosa 10 g
 Cloruro de Sodio 5 g
 Fosfato Disódico 2.5 g
 Agar-agar..... 15 g
 Agua Destilada..... 1000 mL
 pH : 7,2 - 7,6

- **Agar Tood Hewitt (ATH).**

Infusión cerebro corazón 3.10 g
 Peptona..... 20 g
 Glucosa 2 g
 Cloruro de Sodio 2 g
 Fosfato Disódico 0.4 g
 Carbonato de sodio 2.5 g
 Agar-agar..... 15 g
 Agua Destilada 1000 mL
 pH : 7,8

- **Agar Leche Descremada al 1%.**

Solución de Leche Descremada 10% (p/v)..... 10 mL
 Agar Triticasa Soya (base)..... 90 mL

Leche Descremada: se esterilizó 100 mL de agua destilada y se agregó 10 g de leche descremada en polvo. A la base se la fundió y se la templó a 45-50 °C, y posteriormente se le agregó la solución de leche descremada.

- **Agar Manitol Salado –Chapman(MS).**

Extracto de carne 1 g
 Polipeptona 10 g
 ClNa 75 g

Manitol..... 10 g
Rojo fenol0,025 g
Agar-agar 15 g
Agua destilada 1000 mL

- **Agar Chocolate (ACH).**

ACC 35 g/L luego del autoclavado se le agregó en caliente sangre de carnero desfibrinada hasta alcanzar una concentración final de 5%, y se homogenizó.

- **Agua de Peptona para Diluciones**

Peptona..... 1 g
Agua Destilada..... 1000 mL

pH : 7

Medios de cultivo líquidos

- **Caldo Müeller-Hinton (CMH) al 0,15%**

Infusión de carne..... 2 g
Hidrolizado de caseína..... 17,5 g
Almidón 1,5 g
Agar 1,5 g
Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,4

- **Caldo Tripticasa-Soya (CTS)**

Tripteína..... 17 g
Peptona de soya 3 g
Cloruro de sodio..... 5 g
Fosfato dipotásico 2,5 g
Glucosa 2,5 g
Agua destilada c.s.p. 1000 mL

pH: 7,3

- **Caldo Cerebro Corazón (CCC)**

Extracto de Cerebro de Ternera	12,5 g
Extracto de Corazón de Buey	5 g
Triptosa	10 g
Cloruro de Sodio.....	5 g
Fosfato Disódico	2,5 g
Agua Destilada.....	1000 mL

pH : 7,2 - 7,6

- **Caldo M.R.S para *Lactobcillus*.**

Proteosa peptona N°3.....	10 g
Extracto de carne	8 g
Extracto de levadura	4 g
Glucosa	20 g
Manoleato de sorbitán.....	1 mL
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio.....	5 g
Citrato de amonio.....	2 g
Sulfato de magnesio.....	0.2 g
Sulfato de manganeso.	0.05 g
Agua destilada.....	1000 mL

pH final: 6.4 ± 0.2

- **Caldo Todd Hewitt para *Streptococcus***

Infusión cerebro corazón	3.10 g
Peptona.....	20 g
Glucosa	2 g
Cloruro de Sodio.....	2 g
Fosfato Disódico	0.4 g
Carbonato de sodio	2.5 g

Agar-agar.....15 g
Agua Destilada..... 1000 mL

pH : 7,8

- **Caldo Papa Glucosado para *Penicillium discolor***

Solución de papa.....200g/L
Glucosa anhidra.....20grs
Agua destilada.....1000ml

pH final: 4.5

Una solución de ácido tartárico al 10%, se utilizó para corregir el pH.

Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas fueron cedidas por el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, donde previamente fueron aisladas de alimentos y tipificadas según las normas de la “International Commission on Microbiological Specifications for Food” (Tabla 3.1).

Las cepas *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus* fueron cedidas por el Dr. Carlos Creton de Laboratorios Biochemical.

Tabla 3.1: Microorganismos aislados de alimentos utilizados para los test de actividad antimicrobiana.

	Cepas Microbianas	Origen
GRAM POSITIVAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	queso cremoso
	<i>Staphylococcus aureus</i>	bandeja de carne
	<i>Bacillus cereus</i>	hojas de orégano
	<i>Streptococcus termophilus</i>	starter de queso
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	starter de queso
GRAM NEGATIVAS	<i>Escherichia coli</i>	agua de pozo
	<i>Salmonella sp.</i>	helado de sambayón
	<i>Salmonella sp. 6hb</i>	ternero enfermo
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	hojas de cedrón

Inóculo Fúngico

Penicillium discolor se aisló de queso sardo y se repicó en medio líquido (Caldo Papa Glucosado). Posteriormente fue identificado.

Levadura

Se utilizó una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nematodos

Panagrellus redivivus fue la especie utilizada para el modelo de actividad nematocida.

MÉTODOS

Aislamiento, conservación y propagación de cepas

Las cepas se sembraron en estrías por agotamiento en cajas de Petri con medios selectivos y diferenciales (EMB, BP, BS, SS, MS, MRS, MYP) con el objetivo de corroborar que los microorganismos se encontraran puros.

Las cepas aisladas *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa* se repicaron en Caldo Tripticasa Soya (CTS) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Estas cepas se conservaron en ATS inclinado, a una temperatura de 4 °C y fueron repicadas cada mes.

Streptococcus termophilus se cultivó en CCC e incubado a 42°C durante 24 h. Para su conservación se lo incubó en leche descremada estéril con glicerol (20%) y se almacenó a -20°C.

Lactobacillus helveticus se cultivó en Caldo MRS a 37°C en microaerofilia durante 24 h. Para su conservación se lo incubó en leche descremada estéril con glicerol (20%) y se almacenó a -20°C.

Penicillium discolor se sembró en Agar extracto de Malta para obtener cultivos frescos y verificar su pureza. Los cultivos primarios se incubaron a 24 °C, en oscuridad, durante una semana. Para la identificación del aislamiento se realizaron, a partir del cultivo fresco, siembras en cinco medios: Agar Czapek, Agar Extracto de Malta, Agar Czapek Extracto de Levadura, Agar Creatina Sacarosa y Agar Extracto de Levadura Sacarosa. Los cultivos se incubaron a 24 °C, en oscuridad, durante una semana. Se realizaron preparados entre portaobjetos y cubreobjetos. Para las observaciones microscópicas se utilizó como líquido de montaje el azul de algodón 0,1% en ácido láctico 85%. Se examinó, además, la producción de alcaloides del indol (Lund, 1995). La determinación del aislamiento se realizó a través de la observación e interpretación de sus características culturales, fisiológicas y morfológicas según Samson *et al.*, (2000). Se identificó a *Penicillium discolor* Frisvad, Samson, Leeuwenhoek.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Ensayos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano

a. Preparación del inóculo microbiano.

A partir de un cultivo en CTS de cada microorganismo incubado a 37 °C por 18 horas, se realizaron diluciones factor 10 hasta lograr una DO = 0,04 a 620 nm (10⁶ UFC/mL).

Se realizó el recuento de microorganismos mesófilos viables totales (aerobios y anaerobios facultativos). Se utilizó el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie en medio agar nutritivo. Se incubaron las placas de Petri a 37 °C durante 24 h. Los resultados fueron expresados en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (ICMSF, 1983)

b. Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de difusión en disco

Se sembraron, con espátula de Drigalsky, 0,2 mL (10^6 UFC/mL) de un cultivo en CTS de 18 h de incubación, en placas de Petri conteniendo AMH. Se impregnaron 10 μ L de cada aceite esencial en discos de papel de filtro. Se colocaron los discos en las placas de agar previamente sembradas, dejándolas 30 minutos a temperatura ambiente para que el compuesto difunda. Se incubaron a 37 °C durante 24 h y luego se midieron los halos de inhibición de crecimiento microbiano. Se realizaron los controles positivos con discos de penicilina-estreptomicina a una concentración de 10 μ g/mL (Gallucci *et al.*, 2009).

c. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de aceites esenciales. Técnica de microdilución en caldo

Los aceites esenciales fueron diluidos en factor dos en Dimetil sulfóxido (DMSO). Se utilizó un cultivo microbiano en CMH con 0,15% de agar, con una densidad de inóculo incapaz de reducir al indicador redox resazurina. Para el ensayo, se utilizaron microplacas de 96 pocillos. De la columna 1-9 se colocaron 170 μ L del inóculo microbiano suplementado con 20 μ L de la dilución de cada aceite. En la columna 11 se colocó 170 μ L del inóculo suplementado con 20 μ L de CMH-0,15% de agar (control positivo)/DMSO. En la columna 12 se colocaron 170 μ L de CMH-0,15% de agar con 20 μ L de DMSO (control negativo). Se incubó la placa durante 3,5 h a 37 °C, tiempo suficiente para lograr que el inóculo microbiano aumente por lo menos 1 logaritmo. Después de la incubación, se colocaron 10 μ L de la solución de resazurina en cada pocillo, realizando una segunda incubación de 2 h. El resultado se visualizó por cambio de color de azul (oxidado) a rosa (reducido), siendo la CIM la máxima dilución que permanezca azul (Mann y Markham, 1998; Gallucci *et al.*, 2009).

Para *S. termophilus* se siguió la misma metodología, utilizando como medio de cultivo CCC e incubando la placa a 42 °C.

Para *L. helveticus* se utilizó caldo MRS, incubando las microplacas en microaerofilia.

d- Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los aceites esenciales de orégano

Para realizar la CBM, se sembraron placas de AMH con 100 μ L de aquellas diluciones que presentaron color azul. Se incubaron a 37 ° C por 24 h. La mínima concentración con ausencia de crecimiento fue considerada como CBM (Youdim y Deans, 2000).

S. termophilus y *L. helveticus* fueron sembrados e incubados en sus condiciones óptimas (42°C y 37°C en microaerofilia, respectivamente).

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias *in vitro* de *Penicillium discolor*

El hongo *Penicillium discolor* previamente aislado y tipificado, se sembró bajo cámara de flujo laminar (Marca: Sanyo; Tipo: “Bio Clean Bench”, Modelo: MCV B131S) en cápsulas de Petri con 15 mL de medio de cultivo líquido “caldo de papa y glucosa” (Lucini, 2003), y se llevó a pH 4,5 con ácido cítrico al 10% P/V con la finalidad de evitar desarrollo bacteriano. Los AE se solubilizaron en etanol absoluto y se agregaron diferentes cantidades al medio de cultivo para obtener un gradiente de concentraciones finales con dispersión homogénea. La solución de aceite esencial y etanol se realizó de manera tal que las cantidades que se agregaron al medio no superaban el 1% v/v (Lopes da Silva *et al.*, 2003). Se incluyeron testigos sin ningún agregado y testigos sin aceite esencial pero con el agregado de etanol absoluto en idéntica proporción que la del tratamiento de mayor concentración para confirmar la ausencia de efectos con respecto al crecimiento del testigo. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y los hongos fueron mantenidos en cámara de cultivo a 18 °C \pm 1 °C.

Cinco días después de la siembra se realizó la medición del diámetro de crecimiento del micelio con un calibre en dos direcciones perpendiculares sobre el micelio y se obtuvo la media de esos valores. La actividad antifúngica de las diferentes concentraciones se expresó en términos de porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PICM) y se calculó según la siguiente fórmula (Lucini, 2003)

$$\text{PICM} = \frac{\text{Diámetro Promedio Testigo} - \text{Diámetro Promedio Tratamiento}}{\text{Diámetro Promedio Testigo}} \times 100 \text{ (Ec.3.1)}$$

Se consideró CIM a la concentración de aceite esencial a partir de la cual el PICM fue igual al 100%.

Ensayo de bio-actividad contra *Saccharomyces cerevisiae*

Para este ensayo se utilizó el indicador redox amarillo pálido 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) que se reduce dando un color azul oscuro (MTT-formazan) debido a la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Esta reducción del MTT se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm. El ensayo MTT es rápido, cuantitativo y se compara favorablemente con las técnicas tradicionales de plaqueo para la evaluación de la viabilidad de células (Mosmann, 1983; Kuhn *et al.*, 2003). Se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* disponible comercialmente como un modelo de actividad antilevaduras de los aceites esenciales.

Se probaron tres concentraciones diferentes de los AE Com, Cor, Crio y Men (5, 10, 15 mg/mL). Euconazole se utilizó (300 mg/mL) como control positivo, mientras que se usó agua como control negativo. El ensayo se llevó a cabo en una placa de 48 pozos. En primer lugar, 50 µL de AE, controles positivos y negativos se pusieron en cada pocillo por triplicado, seguidos por 200 µL de la solución de levadura. Luego se incubaron durante 2 h a 30 °C. Después de añadir 20 µL de MTT, se incubaron durante 2 h más. Se utilizó un lector de microplacas Sinergia HT Multi-Detección (Bio-Tek, Winooski, VT) a 570 nm para medir el cambio de color. Cuando se añade MTT amarillo, la deshidrogenasa mitocondrial de la levadura cambiará el MTT a formazán púrpura, detectando así las levaduras vivas. Mientras que en los pozos que contienen extractos activos que matan a las levaduras el MTT permanecerá amarillo.

ENSAYO DE LETALIDAD DE NEMATODOS.

El nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* sirve como organismo modelo para determinar la letalidad de extractos de plantas contra este género. Esta especie es una ventaja para la prueba de productos naturales, ya que es fácil de crecer y mantener, y no representa ningún riesgo para la salud humana. El ensayo de actividad nematocida se llevó a cabo en una placa de 96 pozos y se evaluaron la bio-actividad de los AE de orégano. Se añadieron 100 µL de

suspensión de nematodos (*Panagrellus redivivus*) a cada pocillo. Como control positivo se utilizó una solución de CuSO₄ (160 mg/mL), y como control negativo agua. Se pusieron 5 µL de las soluciones de aceites esenciales (10, 15, 20 se añadieron mg/mL), del control positivo y el control negativo sobre los pocillos con nematodos por triplicado. La placa se incubó durante 4 h a 23°C. Los nematodos muertos y vivos se contaron bajo una lupa para determinar el porcentaje de letalidad. Se determinó también la concentración letal 50 (CL50) (Kong *et al.*, 2006).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se llevaron a cabo en tres repeticiones. Sobre los resultados obtenidos se realizaron los siguientes cálculos estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2012).

1. Determinación de medias y desvíos estándar.
2. Análisis de varianza y test de LSD Fisher, $\alpha = 0.05$.
3. Análisis de Componentes Principales (ACP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana

A partir de los microorganismos, se procedió a obtener colonias puras por siembra en estrías por agotamiento en medios selectivos y diferenciales los cuales fueron incubados en las condiciones óptimas de microorganismo (descriptas anteriormente). Luego del período de incubación las cepas fueron transferidas a tubos con agar inclinado (ATS) para su conservación a 4° C, a excepción de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus termophilus*. En la Tabla 3.2 se describen las características obtenidas para cada microorganismo cuando fueron cultivados en medios selectivos y diferenciales.

Tabla 3.2: Características de cada microorganismo en medios selectivos y diferenciales.

Microorganismo	Medio	Resultado
<i>S.aureus</i> (queso)	1.BP	1. Colonias negras, producción de lipasas y lecitinasas
	2.MS	2.utiliza manitol
<i>S.aureus</i> (carne)	1.BP	1. Colonias negras, producción de lipasas y lecitinasas
	2.MS	2.Utiliza manitol
<i>Bacillus cereus</i>	MYP	Colonias rosas con halos de precipitado
<i>S.termophilus</i>	1.Agar Leche descremada	1.no creció
	2.Toot Hewitt	2. no creció
	3.Agar Chocolate	3. redondas, amarillas
<i>L.helveticus</i>	M.R.S	Irregular, transparentes
<i>Escherichiacoli</i>	E.M.B	Lac +. Brillo metálico
<i>Salmonella sp.</i>	1.BS	1.marrón oscuras con brillo metálico
	2.SS	2. transparentes con centro negro
<i>Salmonella sp.</i> 6hb	1.BS	1.marrón oscuras con brillo metálico
	2.SS	2. transparentes con centro negro
<i>P.aeruginosa</i>	Cetrimide	Pigmento fluorescente

Referencias: BP (Bair Parker), MS (Manitol Salado), MYP (Manitol Yema de Huevo Polimetina), E.M.B (Eosina Azul de Metileno), BS (Bismuto Sulfito), SS (Salmonella Shigella)

L. helveticus es un bacilo gram-positivo largo. El intervalo de temperatura de crecimiento es de 35 a 45 °C, siendo la temperatura óptima de 37 a 42°C. Este crece bien en leche a una temperatura de 37 a 42 °C. El pH óptimo para el crecimiento es de aproximadamente 4,5 a 7.

En este estudio, este microorganismo fue incubado a 37 °C en estufa de micro-aerofilia (5% CO₂). Se observó que *L. helveticus* no toleró repiques sucesivos de un mismo cultivo en caldos MRS, por lo que se procedió a conservar la cepa a -20 °C en leche descremada con 20% de glicerol. Para esto se preparó una solución de leche descremada al 10% (previamente se esterilizó el agua destilada y luego se agregó la leche en polvo en condiciones de esterilidad). Esta solución fue inoculada con el microorganismo, previamente incubado a 37 °C por 24 h en Caldo MRS. Posteriormente se colocó la solución de leche con microorganismos en estufa con condiciones de microaerofilia por 24 h hasta la obtención de un coágulo de leche. Este fue fraccionado en eppendorf estériles que posteriormente fueron conservados a -20 °C.

S. thermophilus es un diplococo capsulado Gram-positivo, homofermentativo y termorresistente, que se desarrolla entre 37-45 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento 42 °C, pero puede resistir 50 °C e incluso 65 °C por media hora. *S. thermophilus* fue incubado en estufa a 42 °C en condiciones aeróbicas. Al no tolerar repiques sucesivos, al igual que *L. helveticus*, se procedió a la conservación de la cepa en congelados que fueron elaborados de la misma manera que éste microorganismo.

Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales por técnica de difusión en disco

Los aceites esenciales de todas las variedades de orégano demostraron actividad contra todos los microorganismos evaluados a excepción de *P. aeruginosa* que no fue inhibido por ninguno de los mismos. El diámetro de los halos de inhibición presentó variaciones para cada microorganismo y aceite esencial (Tabla 3.3). En general, las bacterias gram positivas resultaron ser los microorganismos más sensibles. *B. cereus* fue el más afectado por todos los aceites esenciales seguida de *S. aureus*. Las zonas de inhibición de *B. cereus* fueron desde 34 mm para AE Com y 27 mm para AE Cor. La zona de inhibición de AE Com para *E. coli* (23,5 mm), *S.*

aureus (26 mm) y *B. cereus* (34 mm) fueron notables. *Salmonella sp* tuvo zonas de inhibición más pequeñas para AE Com (12,5 mm).

Tabla 3.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales sobre cepas aisladas de alimentos por técnica de Difusión en Disco (10µl/disco)

AE/Microorganismo	Aceites Esenciales de Orégano (Zona de inhibición mm) ^a							
	Compacto	DE	Cordobés	DE	Criollo	DE	Mendocino	DE
<i>S. aureus</i>	26	0,29 c	23	0,21 b	25	0,25 d	25.5	0,35 d
<i>B. cereus</i>	34	0,41 d	27	0,3 c	28	0,36 d	28.5	0,35 d
<i>E. coli</i>	23.5	0,41 c	16.5	0,3 b	17	0,36 c	20	0,35 c
<i>Salmonella sp</i>	12.5	0,41 b	12	0,3 b	11.5	0,36 b	10.5	0,35 b
<i>P. aeruginosa</i>	0	0,41 a	0	0,3 a	0	0,36 a	0	0,35 a
<i>S. termophilus</i>	10	0,35 b	5	0,41 b	10,5	0,3 b	15	0,35 b
<i>L.helveticus</i>	No creció		No creció		No creció		No creció	

^a ANOVA y test LSD Fisher: muestras seguidas por la misma letra para cada columna indican diferencias no significativas ($\alpha = 0.05$)

Las bacterias Gram positiva demostraron ser más sensibles que las Gram negativa a la acción de los aceites esenciales, siendo este efecto observado en otro trabajo que investigó los aceites esenciales de cilantro y eucaliptus (Delaquis *et al.*, 2002). Esto puede ser explicado por el hecho de que las bacterias Gram positivas carecen de membrana externa y poseen una capa de mureína que no ofrece resistencia al paso de sustancias, entonces los aceites esenciales pueden alcanzar fácilmente la membrana citoplasmática en donde, probablemente, ejercen su acción alterando su estructura y en consecuencia sus funciones (Sikkema *et al.*, 1995).

Cabe aclarar que los valores de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos utilizando los distintos métodos existentes están influenciados por la composición del aceite esencial probado, el microorganismo (cepa de colección o aislada de diferentes fuentes), temperatura y tiempo de incubación, concentración y edad del inóculo. Cuando se aplica el método de difusión por discos de papel, la inhibición depende de la capacidad del aceite esencial para difundir uniformemente en la superficie del agar y de los vapores liberados por el aceite sobre la bacteria (Kalemba y Kunicka, 2003; Nychas *et al.*, 2003).

S. aureus es causante de muchas patologías que afectan tanto al humano como a los animales y ha sido descrito como agente etiológico tanto en procesos supurativos como en infecciones alimentarias. *B. cereus* es un microorganismo formador de esporas y causante de enfermedades alimentarias. Esta bacteria crece en el suelo y en las plantas y a partir de allí contamina los alimentos. *B. cereus* demostró ser el microorganismo más sensible a la acción de todos los aceites esenciales con halos de inhibición mayores a 2,7 cm. En el alimento cocido sobreviven las esporas de este microorganismo, las cuales germinan por el shock térmico al que son sometidas. El mantenimiento del alimento en calor a menos de 48 °C, en ausencia de competidores, permite que el microorganismo crezca y produzca la toxina (Granum, 1997).

Es importante destacar la actividad de los aceites esenciales sobre las bacterias gram-negativas, tanto contra *E.coli*, como contra *Salmonella* sp. El aceite esencial de orégano compacto es el que exhibió mayor actividad mostrando halos de inhibición de 2,35 y 1,25 cm respectivamente. Las bacterias gram-negativas son menos sensibles a los compuestos antimicrobianos debidos en parte a la gran complejidad de su pared celular, la cual está compuesta por péptido glicano y una membrana externa constituida por fosfolípidos, proteínas y lipo polisacáridos (Madigan *et al.*, 1998). Entre estas bacterias, las *Pseudomonas* muestran una mayor resistencia a estos antimicrobianos y parece ser menos sensibles a la acción de AE de orégano (Wilkinson *et al.*, 2003). No obstante como esta especie bacteriana es responsable del deterioro de los alimentos almacenados a bajas temperaturas, a menudo han sido utilizadas como objetivos de ensayos de actividad antimicrobiana. Se ha determinado, por diversos estudios, que son necesarias altas concentraciones de aceites esenciales y/o sus componentes, en combinación con distintos métodos de conservación de alimentos para ejercer un efecto bacteriostático o bactericida sobre este microorganismo (Careaga *et al.*, 2003; Holley y Patel, 2005). En este estudio no se observó actividad antibacteriana de los aceites esenciales sobre *Pseudomonas*.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) sobre bacterias de los aceites esenciales de orégano. Técnica de Micro dilución en Caldo

La CIM se realizó teniendo en cuenta los resultados de la actividad inhibidora obtenida por el método de difusión en disco. La concentración inhibitoria mínima de AE de orégano fue evaluada contra seis diferentes microorganismos: cuatro bacterias gram-negativas y dos gram-

positivas. Todos los AE presentaron actividad antimicrobiana contra los microorganismos probados. Los resultados se observan en la Tabla 3.4.

Paralelo a esta experiencia se realizó el recuento de microorganismos viables con el fin de conocer las UFC/mL que se enfrentaban a los distintos aceites, arrojando los siguientes resultados:

- *S. aureus*: 2,68E+07 UFC/mL
- *B. cereus*: 4,50E+05 UFC/mL
- *Salmonella sp.*: 5,80E+08 UFC/mL
- *E. coli*: 7,20E+10 UFC/mL
- *S. termophilus*: 8,75E+09 UFC/mL
- *L. helveticus*: 1,41E+06 UFC/mL

Tabla 3.4: Concentración Inhibitoria Mínima (mg/mL) de los aceites esenciales de las 4 variedades de orégano evaluadas por la técnica de micro dilución en caldo

Microorganismo	Aceite Esencial de Orégano			
	Mendocino ^a (0,0486 - 9,49E-05)	Compacto ^a (0,0486 - 2,37E-05)	Cordobés ^a (0,0486 - 1,18 E-05)	Criollo ^a (0,0486 - 1,18 E-05)
<i>S. aureus</i>	3,80E-04 ^c 2	7,59E-04 ^c 3	7,59E-04 ^c 3	1,90E-04 ^c 1
<i>S. termophilus</i> ^b	3,80E-04 ^c 2	>2,37E-05 ^a 1	1,91E-05 ^a 1	>1,18E-05 ^a 1
<i>B. cereus</i>	1,90E-04 ^b 3	9,49E-05 ^b 2	7,59E-04 ^c 4	>1,18E-05 ^a 1
<i>L. helveticus</i> ^b	>9,49E-05 ^a 1	>2,37E-05 ^a 1	>1,18E-05 ^b 1	>1,18E-05 ^a 1
<i>Salmonella sp.</i>	2,43E-02 ^d 4	1,52E-03 ^d 3	7,59E-04 ^c 2	1,90E-04 ^c 1
<i>E. coli</i>	7,59E-04 ^c 2	7,59E-04 ^c 2	7,59E-04 ^c 2	9,49E-05 ^b 1

^a ANOVA y LSD muestras seguidas por la misma letra para cada columna indican diferencias no significativas ($\alpha = 0.05$) y muestras seguidas por un mismo número para cada fila indican diferencias no significativas ($\alpha = 0.05$). ^b Los valores que presentan el símbolo > significa que el valor de CIM se corresponde con concentraciones inferiores a ésta, la última evaluada.

Las cepas gram-positivas fueron más sensibles que las de las gram-negativas a la actividad AE de orégano. El AE Crio fue el más efectivo con valores de CIM inferiores a 1,18 E-05 mg/mL para *L. helveticus*, *S. termophilus* y *B. cereus* (Tabla 3.4). Este AE también tuvo buena actividad frente a *S. aureus* (CIM: 1,90 E-04 mg mL⁻¹), *Salmonella sp* (CIM: 1,90 E-04 mg mL⁻¹) y *E. coli* (CIM: 9,49 E-05 mg mL⁻¹) presentando diferencias significativas en la

actividad con respecto a los otros AE de orégano. Bajas concentraciones de AE de orégano como 0,25-12 mg mL⁻¹ ya han sido descritas como eficaces contra bacterias gram-positivas. *B. cereus*, *S. aureus* y *M. luteus* (Delaquis *et al.*, 2002).

Las bacterias fermentativas ácido-lácticas *L. helveticus* y *S. termophilus* se vieron fuertemente inhibidas por la presencia de aceites esenciales. *L. helveticus* fue el microorganismo más sensible observado en este ensayo, con valores de CIM $\geq 1,18 \text{ E-}05 \text{ mg mL}^{-1}$ (Criollo) a $\geq 9,49 \text{ E-}05 \text{ mg mL}^{-1}$ (Mendocino). Todos los aceites esenciales de orégano fueron también muy activos frente a *S. termophilus* con valores que fueron de CIM $\geq 1,18 \text{ E-}05 \text{ mg mL}^{-1}$ (Criollo) a $3,80 \text{ E-}04 \text{ mg mL}^{-1}$ (Mendocino). Los AE también fueron activos contra los microorganismos *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella sp* y *E. coli* pero se requirieron mayores cantidades de AE.

Sobre *B. cereus* la CIM del aceite esencial de orégano Mendocino fue de $1,90 \text{ E-}04 \text{ mg/mL}$ y el aceite esencial de orégano Compacto exhibió una CIM = $9,49 \text{ E-}05 \text{ mg/mL}$, siendo el más efectivo de todos los aceites esenciales contra este microorganismo. El orégano Cordobés presentó la misma actividad frente a todos los microorganismos patógenos de alimentos, tanto para bacterias gram-positivas como gram-negativas (CIM = $7,59 \text{ E-}04 \text{ mg/mL}$).

Las bacterias gram-negativas son conocidas por ser más resistentes a un amplio número de agentes antimicrobianos que las gram-positivas (Delaquis *et al.*, 2002). A pesar de la presencia de porinas con baja especificidad, la membrana exterior muestra una permeabilidad muy baja a compuestos hidrofóbicos. Se ha demostrado que los compuestos altamente lipofílicos, tales como esteroides, penetran relativamente fácilmente a través de la membrana externa de varias bacterias (Helander *et al.*, 1998). Los efectos de los diferentes componentes de AE en la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias gram-negativas incluyen daño inducido a la estructura de la membrana celular, acompañada con la declinación de la viabilidad (Cox *et al.*, 2000). En este estudio, *E. coli* y *Salmonella sp.* mostraron una alta sensibilidad a cada aceite esencial de orégano (Tablas 3.3 y 3.4), pero *Pseudomonas aeruginosa* no se vio afectada por ellos (Tabla 3.3). Una MIC de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ fue observada en AE de orégano Mejorana contra *E. coli* utilizando el método de difusión en el medio de agar (Ezzeddine *et al.*, 2001). Por otra parte, también, se informó de la actividad de AE de orégano Mejorana contra *E. coli* a concentraciones superiores a $0,1 \text{ mg/mL}$ *in vitro* (Baratta *et al.*,

1998). La variabilidad en la actividad antimicrobiana puede ser debido a diferencias en el método de ensayo básico, el tipo de emulsionante utilizado y el tiempo de incubación.

Se puede observar que para algunas muestras no se encontró el punto de corte debido a su gran actividad. A partir de estos resultados se puede determinar que los aceites esenciales de orégano poseen una fuerte actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias gram-positivas y gram-negativas, en concordancia con resultados obtenidos por Moreira *et al.* (2005) y Oussalah *et al.* (2006), lo que podría permitir la utilización de estas muestras oleosas como conservantes naturales de alimentos, pudiendo prevenir el crecimiento de patógenos alimentarios o de microorganismos que alteran alimentos (Baydar *et al.*, 2004). Sin embargo no sería posible su agregado junto con microorganismos lácticos *S. termophilus* y *L. helveticus* ya que frenan su crecimiento y no se podría producir el producto lácteo deseado.

Determinación de la concentración bactericida mínima de los aceites esenciales de orégano

A partir de la determinación de la CIM por técnica de microdilución en caldo, se realizó la determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) de los aceites esenciales de orégano. Todos los aceites esenciales estudiados mostraron actividad inhibidora para las cepas evaluadas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Concentración bactericida mínima de los aceites ($\mu\text{g/mL}$) de los aceites esenciales de orégano de las cuatro variedades: Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo.

Microorganismo	CBM (mg/mL) de los aceites esenciales de orégano			
	Mendocino	Compacto	Cordobés	Criollo
<i>S. aureus</i>	no presenta	no presenta	no presenta	no presenta
<i>S. termophilus</i>	no presenta	no presenta	1,52E-03	no presenta
<i>L. helveticus</i>	1,52E-03	no presenta	no presenta	no presenta
<i>E. coli</i>	no presenta	no presenta	no presenta	6,08E-03
<i>B. cereus</i>	no presenta	no presenta	no presenta	6,08E-03
<i>Salmonella sp.</i>	no presenta	no presenta	no presenta	no presenta

Los AE de orégano Cor, Crio y Men mostraron actividad bactericida mientras AE Com presentó actividad bacteriostática. El aceite esencial de orégano Criollo demostró actividad bactericida sobre las cepas contaminantes de alimentos ya que presentó valores de CBM para *E. coli* y *B. cereus* de 6,08 E-03 mg/mL. Para el orégano Mendocino se obtuvo un valor de CBM de 1,52 E-03 mg/mL sobre *L. helveticus*. El AE Cor presentó CBM de 1,52 E-03 mg/mL para *S. termophilus*.

Los componentes que constituyen los AE son los que confieren sus propiedades biológicas. Los monoterpenos oxigenados muestran actividad distintiva frente a los microorganismos. Los compuestos que contienen alcoholes poseen mayor actividad que los que presentan carbonilos (Zygadlo y Juliani, 2000). Los compuestos con estructuras fenólicas son conocidos por ser agentes inhibidores microbianos con efecto bactericida o bacteriostático dependiendo de la concentración utilizada. Los monoterpenos carvacrol, eugenol y timol son los compuestos fenólicos que tienen la mejor actividad inhibidora (Gallucci *et al.*, 2009). La importancia del grupo hidroxilo en el fenol para la actividad es fundamental, dado que se observó que el carvacrol tiene mayor actividad con respecto a su metil éster. Además, la posición que tiene el grupo hidroxilo en el anillo ejerce una influencia sobre la eficacia, ya que se mostraron diferencias en la actividad de carvacrol y timol contra bacterias gram-negativas y gram-positivas (Veldhuizen *et al.*, 2006).

Carvacrol y cimeno fueron informados como causantes de una disminución en el potencial de membrana, lo que sugiere la fuga de iones en *B. cereus* (Ultee *et al.*, 2002). Los fenoles carvacrol y timol tienen mayor actividad antimicrobiana que cimeno debido a la presencia del grupo hidroxilo. El cimeno probablemente actúa sinérgicamente con carvacrol y/o timol produciendo la expansión de la membrana, lo que resulta en su desestabilización. Esta actividad sinérgica entre carvacrol y cimeno se ha descrito previamente (Ultee *et al.*, 2002). Cabe señalar que el carvacrol, eugenol, geraniol y timol fueron capaces de inhibir MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) con biofilm al mismo valor de CIM, lo que significa que estos terpenos podrían ser capaces de pasar a través de distintas capas y mantener los efectos inhibitorios y bactericidas. Los terpenos mencionados cimeno y timol estuvieron presentes en mayores concentraciones en los AE Cor (5,13% y 18,59%) y Criollo (6,29 y 17,14 %), respectivamente.

El terpineol se encontró en mayor porcentaje en AE Cor y Crio (2,33 y 2,57%, respectivamente). Este compuesto, también tiene un grupo hidroxilo pero no posee una alta actividad antimicrobiana. Esta baja actividad podría ser causada por la ausencia de un sistema de electrones deslocalizados (enlaces dobles) y, en consecuencia, la incapacidad del grupo hidroxilo para liberar su protón (Ultee *et al.*, 2002).

Los terpenos de los AE tienen actividad antimicrobiana por sí mismos, sin embargo, no siempre esta actividad está de acuerdo con la del AE completo. Las mezclas complejas de estos terpenos determinan relaciones sinérgicas o antagonistas entre ellos (Fyfe *et al.*, 1998). Algunos estudios han concluido que los AE tienen una mayor actividad antibacteriana que la mezcla de los principales componentes, lo que sugiere que los componentes menores son críticos para la actividad. Estos componentes menores pueden tener un efecto sinérgico o pueden contribuir de alguna manera a mejorar la actividad antimicrobiana (Mann y Markham, 1998).

Según los resultados de actividad antimicrobiana que arrojo este estudio, los AE Crio y Cor fueron más activos que los AE Men y Com (Tabla 3.3 y 3.4), probablemente debido a la composición química dada por la mayor presencia de timol y cimeno/cimol, y la acción sinérgica que tiene lugar entre estos terpenos.

La aplicación de los AE de orégano, actuando como antimicrobianos naturales, agregados sobre alimentos sería notablemente superior a la de los productos procesados de forma convencional y, por lo tanto, se podrá satisfacer la demanda de grupos de los consumidores que tienden a una alimentación saludable (Delgado *et al.*, 2004).

Actividad anti-fúngica

Concentraciones inhibitoria mínima (CIM) sobre *Penicillium discolor*

Los resultados de concentración inhibitoria mínima de los aceites esenciales de orégano sobre *Penicillium discolor* se encuentran en la Tabla 3.6. Se consideró como la concentración inhibitoria mínima del AE evaluado, cuando el diámetro del halo de crecimiento fue cero. Se observó que se requirió de menor concentración de AE Men para inhibir el crecimiento del hongo (700 ppm) con respecto a los otros AE de orégano. Los AE Cor y Crio presentaron el mismo

valor de CIM (800 ppm). *P. discolor* suele aislarse de quesos tratados con natamicina, tal como se hizo en este estudio. La nantamicina es un anti fúngico de uso alimentario que suele usarse para “pintar” los quesos cuando comienzan el proceso de maduración.

Existen numerosos estudios sobre la incorporación de aceites esenciales para el control de hongos en alimentos. El aceite esencial de orégano Mexicano (*L. berlandieri Schauer*) mostró ser efectivo cuando se incorpora en bio-films de amaranto, quitosano y almidón para controlar a *A. niger* y *P. digitatu* (Ávila-Sosa, 2012). Martin-Sanchez *et al.* (2011) incorporaron AE de orégano por inmersión a salchichas para controlar el crecimiento de hongos en su superficie. También el AE de orégano (*Origanum syriacum* L. var. *Bevanii*) fue pulverizado en la superficie de tomates para controlar a *B. cinérea* (Soylu *et al.*, 2010). Por último extractos de orégano fueron utilizados para controlar el crecimiento y la germinación de esporas de *A. carbonarius*, *A. niger*, y *A. wentii* aislados de alimentos. Concentraciones entre 1-2,5 mL/100 mL causaron la completa inhibición de la germinación de las esporas de los hongos antes mencionados (Kocia-Tanackov *et al.*, 2012).

Tabla 3.6. Diámetro de los halos de crecimiento de los aceites esenciales de orégano de las variedades Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo sobre *Penicillium discolor*.

Concentración (ppm)	Diámetro del halo de crecimiento (cm)							
	Aceite esencial							
	Mendocino		Compacto		Cordobés		Criollo	
	Media ¹	DE ¹	Media ¹	DE ¹	Media ¹	DE ¹	Media ¹	DE ¹
control	8,83	±0,28	9	±0	9	±0	8,83	±0,28
1000	-	-	0	±0	-	-	-	-
900	-	-	7	±0,70	-	-	-	-
800	-	-	9	±0	0	±0	0	±0
700	0	±0	9	±0	2,5	±0,70	1	±0,78
600	3,66	±0,35	9	±0	7,16	±0,70	2,66	±1,5
500	4,33	±0,57	9	±0	7,5	±1,06	-	-
400	s/d	±	9	±0	8,5	±0,83	7,16	±0
300	8,9	±0,17	9	±0	8,5	±0,86	7,66	±0,83
100	9	±0	9	±0	-	-	8,66	±0,28

¹ Medias (n=3) y Desvíos Estándar (DE) obtenidos de cada concentración evaluada.

Ensayo de bio-actividad sobre *Saccharomyces cerevisiae*

Los resultados de la bio-actividad de los aceites esenciales de orégano contra la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se presentan en la Fig. 3.1. Todos los AE evaluados mostraron una mejor actividad que el control positivo en dosis de 15 mg/mL. Se encontraron diferencias significativas entre los aceites esenciales. AE Com fue la muestra que mostró mejor actividad. Algunos estudios han encontrado un fuerte efecto biocida de extractos de *O. vulgare* (eliminación total del inóculo microbiano) después de 3 días de interacción (Sagdiç *et al.*, 2002). *O. vulgare* también fue informado como inhibidor del crecimiento / supervivencia de varias levaduras que contaminan los alimentos (Souza *et al.*, 2007). El AE de *O. vulgare* mostró eficacia para inhibir el crecimiento de levaduras ensayadas con valores de MIC de 20 y 0,6 mL determinados por medio de difusión sólida y bioensayo de micro-placa, respectivamente (Rasooli, 2007). Los grupos funcionales de los componentes de los aceites esenciales juegan un papel importante. Por ejemplo, los componentes con estructuras fenólicas son capaces de disolverse en la membrana, penetrando por lo tanto dentro de la célula, donde interactúan con los mecanismos metabólicos celulares (Baydar *et al.*, 2004). Existe una asociación entre la composición química de los aceites esenciales y la actividad de la levadura. El AE de *O. vulgare spp vulgare* ha mostrado en su composición ser rico en compuestos fenólicos como carvacrol, γ -terpineno, α -terpineno, timol, p-cimeno, γ -terpineol, sabineno, mirceno, cariofileno, germanceno y espatulenol, en donde estos compuestos pueden ser responsables de una prominente actividad antimicrobiana (Souza *et al.*, 2007). En este estudio, el AE Com presentó elevada concentración de terpinen-4-ol, γ -terpineno y timol (7,76, 9,8 y 14,39 %, respectivamente). Se ha demostrado previamente que existe una actividad anti-levaduras de los AE, la cual se relaciona con la composición, la configuración estructural de los componentes y los grupos funcionales que portan los componentes de los AE (Bozin *et al.*, 2006). Este estudio confirma la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano, en particular la actividad anti-levadura de *O. vulgare*. En función de estos resultados y de estudios preliminares, sin lugar a duda que los aceites esenciales de *Origanum* constituyen una alternativa de compuestos antimicrobianos naturales que pueden aplicarse para la conservación de alimentos, es más, estos aceites esenciales deberían ser considerados seriamente para aplicarse en escala industrial.

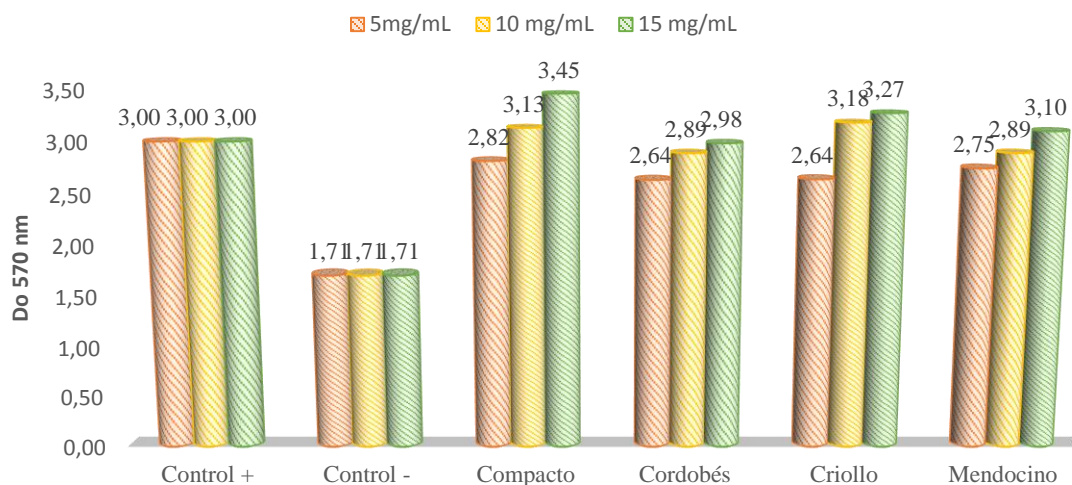


Figura 3. 1. Resultados de la actividad anti-levaduras para los aceites esenciales de orégano Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo evaluadas en tres concentraciones distinta contra *Saccharomyces cerevisiae*.

Ensayo de letalidad de nematodos.

Los resultados de letalidad de los aceites esenciales de orégano obtenidos en los ensayos de inmersión se muestran en la Fig. 3.2. La respuesta varió de acuerdo a la variedad de orégano y la concentración que se aplicaban los aceites esenciales. Todos los AE evaluados tuvieron actividad nematocida. Para una concentración de 10 mg/mL el AE Com registró el máximo valor de mortalidad del 50%, seguido por las muestras de AE Cor y Crio, y con una concentración 20 mg/mL el AE Men tuvo una mortalidad del 100 %. La actividad nematocida de los AE, también se evaluó comparando los valores de Concentración letal 50 (CL50) cuyos resultados se presentan en la Tabla 3.7. Sobre la base de los valores de CL50, las muestras AE Cor y Crio fueron las más eficaces en matar el 50% de los organismos evaluados (12,54 y 12,65 mg/mL, respectivamente), no registrándose diferencias significativas entre ambas. El AE Men mostró toxicidad moderada (CL₅₀ = 13,66 mg/mL) y por último, el AE Com manifestó una toxicidad débil (14,69 mg/mL). Los aceites esenciales de las plantas pueden ser considerados potenciales nematocidas naturales, algunos de ellos son selectivos, a menudo se degradan a productos no tóxicos y tienen poco efecto que sean nocivos sobre los organismos no blanco y el medio ambiente (Chitwood, 2002). Hay pocos informes sobre la actividad nematocida, la investigación en síntomas de intoxicación y el modo de acción de los productos químicos y nematocidas naturales que tengan importancia práctica. La información disponible es limitada y en algunos

casos, nematodos inmóviles tratados con algunos materiales y productos químicos derivados de plantas fueron descritas como muertos lo cual genera incertidumbre sobre el uso de estos compuestos (Jourand *et al.*, 2004). El modo de acción de los aceites esenciales sobre nematodos puede ser atribuido, ya sea a las diferencias en bioactividad dada por la composición química o por el modo de acción de los compuestos de los aceites esenciales sobre los nematodos. Para darle un uso práctico como nematocida a estas sustancias, estudios adicionales son necesario tales como aquellos que analicen su acción sistémica, translocación y difusión, así como la fitotoxicidad, formulación y estabilidad (Kong *et al.*, 2006).

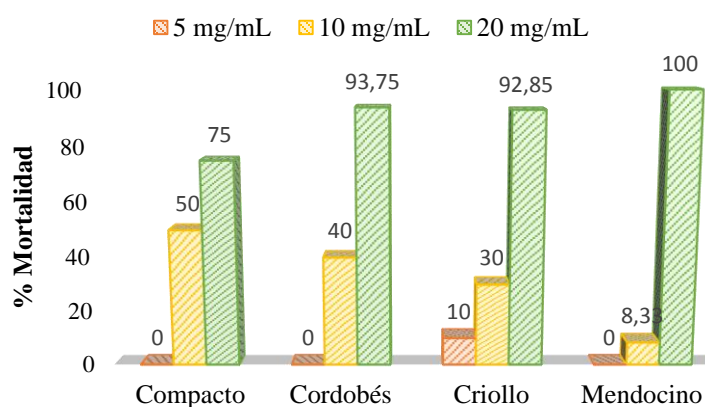


Figura 3.2. Porcentaje de mortalidad de nematodos evaluada en tres concentraciones distintas de los aceites esenciales de orégano Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.

Tabla 3.7. Regresiones lineales y valores de concentración letal 50 del ensayo de letalidad de nematodos para los aceites esenciales de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

	Aceite esencial			
	Compacto	Cordobés	Criollo	Mendocino
β_0	-12,5	-26,88	-21,43	-45,83
Pendiente (β_1)	4,43 a	6,13 c	5,65 b	7,01 d
CL50	14,69 b	12,54 a	12,64 a	13,66 ab

^a Regresión lineal: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$; cuando $Y =$ variable dependiente (CL) ; $\beta_0 =$ constante que es igual al valor de Y cuando $X=0$; $\beta_1 =$ coeficientes de X ; $X =$ variable independiente (porcentaje de inhibición).

^b ANOVA y test LSD Fisher : Pendiente (β_1) de cada variable y CL50 de las muestras seguidas por la misma letra diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

CONCLUSIONES

- Todos los aceites esenciales de orégano que fueron ensayados ejercen acción antimicrobiana evaluada por técnica de difusión en disco sobre todos los microorganismos patógenos de alimentos evaluados siendo *B. cereus* el más sensible y *P. aeruginosa* el más resistente.
- Como resultado de este estudio, se informan valores de CIM al evaluar la capacidad antimicrobiana de los diferentes aceites esenciales de orégano mediante la técnica de microdilución en caldo para todos los microorganismos patógenos de alimentos probados.
- Todos los aceites esenciales de orégano presentan actividad antimicrobiana, ya sea ésta bacteriostática o bactericida. La capacidad bacteriostática es de suma importancia en la industria alimenticia, ya que permite inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes de alimentos.
- El aceite esencial de orégano Criollo presenta el mayor efecto antimicrobiano con respecto a los aceites esenciales de las otras variedades, con valores bajos de CIM y con capacidad bactericida (CBM) contra *E. coli* y *B. cereus*. Para esta última bacteria no se llegó a encontrar el punto de corte con el aceite esencial de orégano Criollo corroborando así la alta sensibilidad de este microorganismo y la capacidad inhibitoria de este aceite esencial.
- La aplicación de aceites esenciales de orégano junto a microorganismos starters como *L. helveticus* y *S. termophilus* es probable que no sea posible debido a que los aceites esenciales inhiben el crecimiento de estas cepas a concentraciones iguales o menores de las que son necesarias para detener el crecimiento de los patógenos de alimentos. En este sentido, lo recomendable puede ser incorporar los aceites esenciales de orégano después de producido el “coágulo” durante la formación del queso, a fin de preservarlo de la proliferación de microorganismos no deseados: patógenos y alteradores de alimentos.

- El aceite esencial de orégano Mendocino presenta la menor CIM para inhibir el crecimiento de *P. discolor*, seguidos por los aceites esenciales de orégano Cordobés y Criollo que tienen similar comportamiento.
- Todos los aceites esenciales de orégano tienen similar actividad contra *Saccharomyces serviciae*, inclusive mejor que el antibiótico utilizado como control positivo.
- Los aceites esenciales de orégano Cordobés y Criollo presentan menores CL50 en cuanto a la actividad nematicida.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que los aceites esenciales de las variedades de orégano Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo poseen una fuerte actividad biocida y pueden ser utilizados como agentes controladores de patógenos en alimentos.

BIBLIOGRAFIA

- Appendini, P. & Hotchkiss, J. H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 3: 113-126.
- Avila-Sosa, R., Palou, E., Jimacnez Mungua, M. T., Nevarez-Moorillan, G. V., Navarro Cruz, A. R. & Lopez-Malo, A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Int. J Food Mic.* 153:66-72.
- Azizi, A., Yan, F. & Honermeier, B. 2009. Herbage yield, Essential oil content and composition of three oregano populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Journal of Industrial Crops Products* 29: 554-561.
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M. & Ruberto, G. 1998. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential oil Research* 10: 618-627.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G. & Karadoğan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15: 169-172.
- Boerema, J. A., Clemens, R. & Brightwell, G. 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 2: 192- 201
- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, O., Mari Rodel, T. & Holck, A. 2007. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* 153: 2289-2303.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. & Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 1822-1828.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94: 253–223.
- CAEMPA 2008. Cámara Argentina de Especies, Molineros de Pimentón y Afines. Foro del Orégano Argentino., in CAEMPA, Foro del Oregano Argentino, Alta Gracias, Corodoba, Caempa.
- Careaga, M., Fernandez, E., Dorantes, L., Mota, L., Jaramillo, M. E. & Hernandez-Sanchez, Z. H. 2003. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 83: 331-335.

- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. & Wyllie, S. G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- Chitwood, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Revision of Phytopathology* 40: 221-249.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. & Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74: 101-109.
- Delgado, B., Fernandez, P., Palop, A. & Periago, P. 2004. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiology* 21: 327-334.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat versión 2012., in Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doyle, P., Zhao, T., Meng, J. & Zhao, S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Roberts, T. A. y Skinner, F. A. (Eds.). Washington D.C. ASM Press., pp. 171-191.
- Ezzeddine, N. B., Abdelkefi, M. M., Ben-Aissa, R. & Chaabouni, M. M. 2001. Antibacterial screening of *Origanum majorana* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential oil Research* 13: 285-297.
- Fyfe, L., Armstrong, F. & Stewart, J. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils derivatives of benzoic acid. The development of synergistic antimicrobial combinations. *International Journal of Antimicrobial Agents* 9: 195-199.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J. & Demo, M. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavor and Fragrance Journal* 24: 348-354.
- Granum, E. 1997. *Bacillus cereus*. En: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Roberts, T. A. & Skinner, F. A. (Eds.). Washington D.C, USA. ASM Press. pp. 327-336.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. & Von Wright, A. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3590-3595
- Holley, R. & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273-292.

- ICMSF 1983. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos. Acribia., E. (Eds.). Zaragoza, España. ICMSF. pp.
- Jourand, P., Rapior, S., Fargette, M. & T., M. 2004. Nematostatic effects of a leaf extract from *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots. *Nematology* 6: 79-84.
- Kalemba, D. & Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry* 10: 813-829.
- Kintzios, S. E. 2002. Part I – Introduction: Profile of the multifaceted prince of the herbs. En: *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. Kintzios, S. E. (Eds.). Londres, UK. Taylor & Francis. pp. 3-8.
- Kocia-Tanackov, S., Dimia, G., Tanackov, I., Pejin, D. a., Mojovia, L. & Pejin, J. 2012. The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus spp.* and on sterigmatocystin biosynthesis. *LWT - Food Science and Technology* 49: 14-20.
- Kong, J. O., Lee, S. M., Moon, Y. S., Lee, S. G. & Ahn, Y. J. 2006. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils against *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Journal Asia-Pacific Entomology* 9: 173-178
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. 2003. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 506-508.
- Lopes da Silva, T., Pinheiro, H. M. & Roseiro, J. C. 2003. Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 880–888.
- Lucini, E. I. 2003. Cambios en la composición lipídica del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotium cepivorum* Berk por acción de terpenos. Tesis Doctoral., in, Facultad Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Cordoba, Universidad Nacional de Cordoba.
- Lund, F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology* 20: 60-64.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 1998. *Biología de los Microorganismos*. Brock, K. (Eds.). Madrid, España. Prentice Hall International. 70-75 pp.
- Mann, C. M. & Markham, J. L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84: 538-544.
- Martin-Sanchez, A. M., Chaves-Lopez, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenandez-Lopez, J. & Pacrez-Alvarez, J. 2011. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish

- fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Science* 89: 35-44.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., del Valle, C. E. & Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Sc Tech* 38: 565-570.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65: 55-63.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M. & Parisi, A. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115: 290-296.
- Nychas, G. J. E., Tassou, C. C. & Skandamis, P. N. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Roller, P. (Eds.). Woodhead Publishers. pp. 176-200.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. y Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Cont* 18: 414-420.
- Rasooli, I. 2007. Food Preservation. A Biopreservative Approach. *Food* 1: 111-136.
- Sagdıç, O., Kusçu, A., Ozkan, M. & Özçelik, S. 2002. Effect of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *E. coli* 0157:H7. *Food Microbiology* 19: 473-490.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filteborg, O. 2000. Introduction to Food and Air-Borne Fungi. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. y Filteborg, O. (Eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Germany. Utrecht. 389 pp.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M. & Poolman, B. 1995. Mechanism of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiology* 59: 201-221.
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O. & Trajano, V. N. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control* 18: 409-413.
- Soylu, E. M., Kurt, A. & Soyly, S. 2010. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* 143: 183-189.
- Torres, L. E., Chaves, A. G., Barboza, G., Brunetti, P., Bustos, J. A., Massuh, &, Ocaño, S., Castillo, N. & Ojeda, M. S. 2010. Evaluation of the agronomic performance and taxonomic characterization of four clones of oregano (*Origanum sp.*). *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 91-93.

- Ultee, A., Bennik, M. H. J. & Moezelaar, R. 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology* 58: 1561-1568.
- Veldhuizen, E. J. A., Tjeerdsma-Van Bokhoven, J. L. M., Zweijtzer, C., Burt, S. A. & Haagsman, H. P. 2006. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 1874-1879.
- Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T. & Cavanagh, H. M. A. 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 76-81.
- Youdim, K. A. & Deans, S. G. 2000. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *British Journal of Nutrition* 83: 87-93.
- Zygodlo, J. A. & Juliani, H. R. 2000. Bioactivity of essential oil components. *Current Topic in Phytochemistry* 3: 201-214.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS SENSORIAL DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS CON ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO

INTRODUCCIÓN

Los sentidos humanos se han utilizado durante siglos para evaluar la calidad de los alimentos. Las personas construyen juicios constantemente acerca de los alimentos que comemos o bebemos a diario. Según Henry Adams (1918), todo el mundo lleva su propia regla del gusto y se divierte aplicándola, triunfante, donde quiera que viaje. Esto no quiere decir que todos los juicios son útiles o que alguien está calificado para participar en una prueba sensorial. En el pasado, la producción de alimentos de calidad, a menudo dependía de la agudeza sensorial de un solo experto quien estaba a cargo de la producción o de la toma de decisiones acerca de cambios en los procesos, a fin de asegurarse de que el producto tendría características deseables. Esta fue la tradición histórica de maestros cerveceros, catadores de vino, jueces de productos lácteos, inspectores de alimentos y otros que actúan como árbitros de evaluación sensorial. En la actualidad estas autoridades individuales son reemplazadas con grupos de personas que participan en métodos de prueba específicos que toman la forma de experimentos planeados. A partir de esto se reconoció que los juicios de un grupo de personas es, en general, más confiable que el de un solo individuo y que implicaba un riesgo menor. En segundo lugar, un único experto puede o no reflejar lo que los consumidores o segmentos del consumo público puedan desear en un producto (Stone y Sidel, 1985; Lawless y Heymann, 2010).

La principal preocupación de cualquier especialista en evaluación sensorial es asegurar que el método es apropiado para responder a las preguntas que se hizo sobre el producto a evaluar. Tres tipos de pruebas sensoriales son las más comúnmente utilizadas, las denominadas afectivas, descriptivas y discriminativas, en donde cada una de ellas tiene un objetivo diferente y utiliza diferentes criterios para seleccionar jueces.

Pruebas descriptivas

Los métodos de análisis descriptivo involucran la detección (identificación) y la cuantificación por parte de un panel de jueces (5 a 15 personas) de propiedades o atributos de los productos alimenticios. Los paneles más chicos son adecuados para productos típicos de supermercado, mientras que paneles más grandes son necesarios para alimentos de producción masiva como cerveza y gaseosas, donde las pequeñas diferencias son importantes (Meilgaard *et al.*, 2010).

Los panelistas, en esta prueba deben ser capaces de describir lo que detectan sensorialmente. El aspecto cualitativo de un producto lleva a la definición sensorial de dicho producto e incluye las propiedades de apariencia, aroma, sabor, textura que lo diferencian de otro. Los panelistas deben aprender a identificar, diferenciar y puntuar los atributos y decidir su presencia o ausencia en la muestra (Meilgaard *et al.*, 2010).

Esta imagen del producto es útil para la investigación, el desarrollo y la manufactura ya que:

- Define las propiedades sensoriales de un producto para nuevos desarrollos.
- Define las características/especificaciones de control para determinadas aplicaciones.
- Documenta los atributos de un producto antes de un test a consumidores y ayuda en la selección de atributos a ser incluidos en el cuestionario a consumidores y contribuye en la explicación de los resultados del test de consumidores.
- Evalúa cambios sensoriales de un producto a través del tiempo para determinar vida útil, “packaging”, etc.

El análisis descriptivo ha demostrado ser la más completa herramienta de evaluación sensorial e incluye distintos tipos de técnicas de análisis. En este capítulo se desarrollarán aspectos metodológicos de “Flavor Profile Method” para la determinación del perfil sensorial de los aceites esenciales de orégano, un método híbrido “Quantitative Descriptive Analysis” y “Spectrum Analysis” que se utilizará para describir sensorialmente aceite de oliva y ricota adicionados con los aceites esenciales de orégano.

Pruebas Discriminativas

Estas pruebas sensoriales son las más simples y se limitan a intentar responder si existe cualquier diferencia perceptible entre dos tipos de productos. El análisis de datos es sobre la base de las estadísticas de frecuencias y proporciones (contando las respuestas correctas e incorrectas). A partir de los resultados de esta prueba, se infieren las diferencias basadas en las proporciones de jueces sensoriales que son capaces de elegir un producto correctamente de un conjunto de productos similares o un control. Entonces, la capacidad para discriminar diferencias se pueden inferir a partir de decisiones constantes sobre un nivel esperado por el azar (Lawless y Heymann, 2010).

Los test discriminativos pueden ser preparados en cientos de formas diferentes, pero en la práctica, los procedimientos han adquirido nombres individuales y usos particulares. Hay dos grandes grupos de test:

- Diferencia general: Estos test responden a la pregunta si hay una diferencia general entre las muestras, son utilizados para ver si los jueces distinguen diferencia alguna entre las muestras analizadas. Entre estos métodos se encuentran las pruebas: Dúo-Trio y Triángulo.
- Diferencia en un atributo de la muestra: Estos test responden a la pregunta si existe una diferencia para un determinado atributo entre dos o más muestras. Los jueces deben concentrarse en un atributo específico y descartar el resto. Las pruebas más conocidas son las denominadas Comparaciones Pareadas y Comparaciones Múltiples.

Pruebas Afectivas

La tercera clase principal de pruebas sensoriales son la que tratan de cuantificar el grado de satisfacción o desagrado de un producto determinar la preferencia sobre un determinado tipo de producto. En el caso de las pruebas de preferencias el objetivo principal es ofrecer a la gente una opción alternativa entre los productos y ver si hay una clara tendencia a elegir uno de ellos por la mayoría de los encuestados. El problema con las pruebas de elección es que no son muy informativas sobre la magnitud del gusto o desagrado de los encuestados.

Normalmente una prueba afectiva implica una muestra de 75 a 150 consumidores que son usuarios regulares del producto. La prueba incluye varias versiones alternativas del producto y debería ser llevada a cabo en una zona central o en una instalación de pruebas sensoriales. La cantidad de jueces de un panel de una prueba afectiva depende de la variabilidad de las respuestas individuales, si esta variabilidad es muy grande surge la necesidad de compensar con un mayor número de personas para asegurar una estadística con potencia y sensibilidad. Esta prueba también proporciona una oportunidad para buscar segmentos de personas a las que les pueden gustar diferentes estilos de un producto, por ejemplo, diferentes colores o sabores. También puede servir para sondear información de diagnóstico relativa a la razones de gusto o disgusto de un producto (Lawless y Heymann, 2010).

El objetivo de este capítulo fue caracterizar sensorialmente a los aceites esenciales de las variedades de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino por medio de métodos descriptivos y evaluar sensorialmente productos alimenticios elaborados con la inclusión de estos aceites esenciales: aceite de oliva y ricota.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Se utilizó el aceite esencial (AE) de las variedades de orégano Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo. El aceite de oliva extra virgen fue adquirido en Finca di Fieno (Camino Las Rosas, Km. 3.3, Cruz del Eje, Córdoba, Argentina). Se utilizó ricota entera La Serenísima en sachet de 500 g (La Serenísima, Almirante Brown 97, Gral. Rodríguez, Buenos Aires, Argentina).

MÉTODOS

Análisis Descriptivo de los Aceites Esenciales de Orégano

Esta prueba fue realizada con el objetivo de determinar el perfil sensorial de las cuatro variedades de orégano estudiadas. Un total de nueve jueces entrenados participaron en el análisis descriptivo. Un muestreo previo fue realizado para la selección de los jueces. Después de ser seleccionados, todos los jueces mostraron calificaciones perfectas en las pruebas de sensibilidad del gusto y en capacidad de identificar 5 de 7 sabores que se encuentran comúnmente en los alimentos (Meilgaard *et al.*, 2010). Los jueces sensoriales fueron entrenados siguiendo las recomendaciones de Meilgaard *et al.* (2010).

El procedimiento llevado a cabo para la evaluación sensorial de los aceites esenciales de orégano consistió en un método híbrido utilizando el procedimiento de perfil sensorial “Flavor Profile” (Cairncross y Sjostrom, 1950; Caul, 1957; Meilgaard *et al.*, 2010) pero con una escala de calificación de cinco puntos (1 = no detectable, 2 = poco detectable; 3 = poco fuerte; 4 = moderado fuerte; 5 = fuerte) (Gacula, 1997; Meilgaard *et al.*, 2010).

Una lista de definiciones y descriptores se les entregó a los jueces en cada evaluación (Tabla 4.1). Para la evaluación, el aceite esencial de orégano (0,5 mL) fue colocado en tiras individuales de papel absorbente (10 cm de largo x 0,5 cm de ancho) codificadas con números de tres dígitos. Las muestras se evaluaron bajo luz fluorescente a temperatura ambiente. Un diseño de bloques completamente al azar se utilizó para la evaluación de las muestras. Los datos fueron registrados en planillas diseñadas especialmente para este análisis sensorial (Tabla 4.1).

También se realizó un análisis descriptivo del color de acuerdo al procedimiento descrito por (Juliani y Simon, 2008) en el que se clasificaron los aceites esenciales de orégano de acuerdo al color en función de las siguientes categorías: A = amarillo; AS = amarillo suave; AO = amarillo oscuro; AON = amarillo oscuro naranja.

Tabla 4.1. Planilla de evaluación entregada a los jueces con la lista de los descriptores y definiciones.

Producto: Aceite Esencial de orégano

Género:

Edad:

Tabla 1.Descripcion del aroma del aceite esencial			Muestra N°					Muestra N°					
Descriptor	Explicación		ND	PD	PF	MF	F	ND	PD	PF	MF	F	
1	Animalic	Olores asociados a los animales											
2	Balsámico	Dulce y parecido a vainilla											
3	Cítrico	Olores a frutas cítricas											
4	Coníferas	Notas frescas a resina de piñas verdes recién cortadas											
5	Floral	Olores a las flores fragantes											
6	Hojas Verdes	Olores a las hojas verdes machacadas											
7	Herbáceo/Herbal	Olores a hierbas culinarias											
8	Medicinal	Olores que sugieren medicamentos											
9	Menta	Notas dadas por las hojas de menta cuando son cortadas											
10	Resina	Olores a resina											
11	Picante	Olores a hierbas culinarias picantes											
12	Madera	Olores a maderas exóticas											
13	Plástico	Olor a resina											
14	Quemado	Olor liberado cuando por ejemplo un papel se quema											

Escala		
1	No detectable	ND
2	Poco detectable	PD
3	Poco fuerte	PF
4	Moderadamente fuerte	MF
5	Fuerte	F

Análisis descriptivo aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano.

La evaluación sensorial de los aceites de oliva con la adición de aceite esencial de orégano se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Nacional de Córdoba (ICTA-UNC). Los panelistas fueron reclutados de acuerdo a los criterios del (COI, 2007). En una primera etapa, un muestreo se llevó a cabo por el líder del panel quien entrevistó y seleccionó a individuos con las siguientes características: (a) disponibles para todas sesiones, (b) interesadas en participar, y (c) capaces de comunicar verbalmente las observaciones con respecto al producto. También fueron incluidos los criterios descriptos por (Meilgaard *et al.*, 2010): (d) personas con edad 25 a 56, (f) personas que no tienen alergias a los alimentos, (e) no fumadores; y (f) personas que consuman aceites vegetales no tradicionales regularmente. Al final de esta primera etapa, 25 individuos habían sido reclutados. El proceso de selección de los jueces se realizó de acuerdo a la (COI, 2007). En la segunda etapa de la selección, se evaluaron los panelistas de acuerdo con el método de clasificación de intensidad (Rosales *et al.*, 1984; COI, 2007). Por último, se seleccionaron 8 jueces (5 mujeres y 3 hombres) que mostraron un buen nivel de percepción, memoria olfativa, gustativa y organización intelectual para dar el orden correcto para los 4 estímulos considerados.

La capacitación de los jueces sensoriales seleccionados es necesaria para familiarizarlos con las numerosas variantes olfato-gustativos encontradas y desarrollar la metodología sensorial específica de aceite de oliva. El entrenamiento consistió en 15 sesiones de 2 h, en donde los jueces realizaron la evaluación individual de las intensidades de cada atributo de aceite de oliva. Los resultados se discutieron en grupo coordinado por el líder del panel hasta que el consenso fue alcanzado. Los descriptores utilizados por el panel fueron los especificados por (COI, 2010) para el aceite de oliva virgen. Los descriptores para atributos positivo fueron: frutado (F), picante (P) y amargo (A) y el atributo negativo: rancio (R). Sabor orégano (SO) también se incluyó como un nuevo atributo para este estudio. La varianza y promedio para cada atributo se calculó en cada sesión de evaluación. Una lista de las definiciones e intensidades de las referencias de aceite de oliva para cada atributo se utilizó para el entrenamiento (Tabla 4.2). Las intensidades de los atributos de una muestra “warm up” se desarrolló durante el entrenamiento (Plemmons y Resurreccion, 1998). Para comprobar el desempeño de los panelistas, se les dio muestras de referencia cuyas intensidades para cada atributo estaban previamente definidas. La varianza

individual en las puntuaciones obtenidas por cada panelista para estas muestras de verificación permitió determinar si los panelistas mantenían sus habilidades y consistencia. Cuando la varianza de los panelistas al evaluar las intensidades de los atributos de aceite de oliva fue menor que 5%, se consideró el panel calibrado. Todos los panelistas que participaron en este estudio tenían 2 años de experiencia al menos de realizar evaluación sensorial de aceites de oliva.

Las muestras se evaluaron en cabinas individuales bajo luz fluorescente. La temperatura ambiente se mantuvo entre 20 y 25 °C. La evaluación de las muestras se llevó a cabo siguiendo la norma (COI, 2010). Las muestras se sirvieron en frascos marrón oscuros tapados con vidrios de reloj para la conservación del aroma y el sabor. Previamente a la evaluación, las muestras se calentaron a 28±2 °C mediante baño de agua caliente. Todas las muestras fueron preparadas simultáneamente 1 h antes de la evaluación de manera que el espacio de cabeza tuviera tiempo suficiente para desarrollarse. La muestra de aceite de oliva (14mL) se agregó a cada vaso el cual fue identificado con un código de 3 dígitos. El orden de servido de las muestras fue al azar. Rodajas de manzana verde y una taza de agua se entregaron a los panelistas para enjuagar la boca y eliminar sabores residuales entre muestras. La lista de las intensidades definitivas de la referencia y definiciones fueron dejadas en todas las cabinas, junto al procedimiento de evaluación (Tabla 4.2) para que estuvieran disponibles para los jueces.

Tabla 4.2. Planilla de atributos, definiciones, intensidad de referencia y muestra “warm up” entregada durante el proceso de evaluación de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano.

Atributos ^a	Definición ^b	Referencia	Intensidad	
			Referencia	Warm up ^{c,g}
<i>Atributos positivos</i>				
Frutado	Sensaciones olfativas de sabor frutado percibido a través de la parte posterior de la nariz, que dependen de cuan: fresca, madura o inmadura y la variedad de las aceitunas.	Manzana Granny Smith ^e	8.0	5.5
Picante	Sensación táctil penetrante de los aceites procedentes de aceitunas todavía verdes que se percibe en toda la cavidad bucal.	Aceite de oliva virgen ^d	7.3	4.8
Amargo	Sabor característico obtenido de aceitunas verdes o en envero se percibe en la región "V" de la lengua.	Aceite de oliva virgen ^d	4.0	2.7

Tabla 4.2. (Continuación) Planilla de atributos, definiciones, intensidad de referencia y muestra “warm up” entregada durante el proceso de evaluación de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano.

Sabor Orégano	Sabor característico del aceite esencial de orégano obtenido por hidrodestilación.	Aceite esencial Orégano Mendocino ^f	10.0	4.5 ⁱ
Atributos Negativos				
Rancio	Sabor de los aceites que han sido sometidos a un intenso proceso de oxidación.	Aceite de oliva rancio	7.5	5.0

^a Atributos enumerados por orden según la percepción de los panelistas

^b Las definiciones de atributos se basaron en COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 3

^c Las calificaciones de intensidad se basan en escalas de líneas estructuradas de 10 cm.

^d Aceite de oliva virgen proporcionada por el Consejo Oleícola Internacional 2009

^e Manzana Granny Smith.

^f El aceite esencial de orégano "Mendocino" cosecha 2010 Agronomía Estación Experimental (Universidad Nacional de Córdoba).

^g Warm up: Aceite de Oliva Empeltre Finca Paso Viejo con sabor a 0,05% de aceite esencial Mendocino.

Se analizaron las muestras de aceite de oliva saborizadas con cada uno de los aceites esenciales de orégano de 4 variedades estudiadas: Compacto, Mendocino, Criollo y Cordobés. Se utilizó un sistema de recolección automática disponible en la sala de evaluación sensorial del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (FCEFYN, UNC) en el que se programó la pantalla para registrar la intensidad de cada atributo mediante una escala lineal de 10 cm, en la que 0 (cero) y 10 (diez) significaban los valores mínimo y máximo, respectivamente, los datos se sincronizaron con un ordenador.

Análisis Descriptivo de ricota saborizada con aceite esencial de orégano.

La evaluación sensorial de las muestras de ricota adicionadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA, UNC). Un total de 7 jueces entrenados (5 mujeres y 2 hombres) participaron en el análisis descriptivo de la ricota saborizada con AE de orégano. Los panelistas fueron seleccionados y entrenados para esta prueba descriptiva de acuerdo a los procedimientos descrito por (Meilgaard *et al.*, 2010). Se realizó un entrenamiento de 40 horas distribuidas en 3 semanas. Cada sesión de entrenamiento duró 2 h. Se utilizó para la

evaluación sensorial de este producto un híbrido del Método Cuantitativo de Análisis Descriptivo (Tragon Corp., Redwood City, California, EE.UU.) y el Método Spectrum TM (Espectro sensorial, Inc., Chatham, NJ, EE.UU.) (Grosso y Resurreccion, 2002; Riveros *et al.*, 2010; Olmedo *et al.*, 2013). Una planilla con la lista de definiciones y las intensidades de la referencia se entregaron a los jueces durante las sesiones de entrenamiento. La intensidad de los atributos de la muestra “warm up” se desarrolló durante el entrenamiento (Plemmons y Resurreccion, 1998). Se utilizó una escala lineal no estructurada de 100 mm para evaluar la intensidad de los atributos. Las muestras fueron evaluadas en cabinas individuales iluminadas con luz fluorescente, acondicionadas a temperatura ambiente. La lista de las intensidades definitivas de la referencia y definiciones fueron dejadas en todas las cabinas, junto al procedimiento de evaluación (Tabla 4.3) para que estén disponibles para los jueces señoriales durante las sesiones de evaluación.

Para la evaluación de las muestras, se colocaron 10 g de producto en vasos de plástico con tapas codificados cada uno con números de 3 dígitos. Las muestras se analizaron mediante un diseño de bloques completos al azar. Se utilizó el mismo sistema de recolección de datos que ya fue descrito para la evaluación descriptiva del aceite de oliva.

Tabla 4.3. Lista de atributos, definiciones, intensidades de referencia y muestra “warm up” usada durante la evaluación de ricota adicionada con aceites esenciales de orégano.

Atributos ^a	Definición	Referencias		WARM UP
		Nombre	Intensidad _b	Intensidad _b
<i>Atributos positivos</i>				
Color	Apariencia asociada al color crema	crema de leche ^c	58	40
Brillo	Cantidad de luz reflejada por la superficie	Poroto ^d	30	16
Humedad	Percepción sobre la cantidad de agua desprendida sobre la superficie	Manzana verde ^e	15	14
Gusto a crema	Sabor asociado a la caseína, queso	Crema de leche ^c	65	50
Leche caliente	Sabor asociado a la lactosa de la leche cuando se calienta	leche calentada ^f	80	50
Dulce	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución sacarosa.	Glucosa 2%	20	18

Tabla 4.3 (Continuación). Lista de atributos, definiciones, intensidades de referencia y muestra “warm up” usada durante la evaluación de ricota adicionada con aceites esenciales de orégano.

Salado	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución salada como la de cloruro de sodio.	Cloruro de sodio 2%	25	5
Amargo	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución amarga como la cafeína.	Cafeína 0,5%	20	3
Acido	El gusto percibido en la lengua asociado a una agente ácido como el ácido cítrico	Ácido cítrico 0,5%	20	10
Intensidad orégano 0,02	Sabor característico del aceite esencial de orégano obtenido por hidrodestilación.	Aceite esencial orégano Mendocino ^g	100	42
<i>Atributos negativos</i>				
Oxidado	Sabor de los aceites que han sido sometidos a un intenso proceso de oxidación	Crema de leche	5	0
Fermentado	Gusto percibido en la lengua asociado al vinagre	soluc. Vinagre agua 20%	80	10

^a Atributos enumerados por orden según la percepción de los panelistas

^b Las calificaciones de intensidad se basan en escalas de líneas estructuradas de 10 cm.

^c Crema de leche “La Serenísima” entera, Argentina

^d Porotos obtenidos comercialmente en “Grandiet”, provincia de Córdoba, Argentina.

^e Manzana Granny Smith.

^f Leche “La Serenísima” entera, Argentina, calentada a 80°C

^g El aceite esencial de orégano "Mendocino" cosecha 2010 Estación Experimental Facultad de Agronomía (Universidad Nacional de Córdoba).

Análisis de Aceptabilidad de Aceite Esencial de Oréganos

La prueba de aceptabilidad por parte de jueces consumidores se realizó con las muestras de los aceites esenciales orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino). La aceptabilidad se llevó a cabo sobre un grupo (n = 75) de personas que fueron reclutadas en New Brunswick, New Jersey (USA), de acuerdo a los siguientes criterios: (a) edad entre 18 y 65 años, (b) no fumadoras, (c) sin alergias a los alimentos, y (d) consumidores de productos que contiene orégano, al menos dos veces a la semana.

Para la evaluación de la muestra, los aceites esenciales se prepararon tal como se describió para el análisis descriptivo, colocándoles sobre una tira de papel absorbente. Se les

pidió evaluar el color primero y luego el olor. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos donde 1 = me disgusta extremadamente y 9 = me gusta extremadamente. Los atributos evaluados fueron color, olor y sabor (Tabla 4.4) (Meilgaard *et al.*, 2010).

Tabla 4.4. Escala hedónica usada para las pruebas de aceptabilidad de aceites esenciales de orégano.

ESCALA	Muestra N°		Muestra N°		Muestra N°	
	Olor	Color	Olor	Color	Olor	Color
1 Me disgusta extremadamente						
2 Me disgusta mucho						
3 Me disgusta bastante						
4 Me disgusta ligeramente						
5 Ni me gusta, ni me disgusta						
6 Me gusta ligeramente						
7 Me gusta bastante						
8 Me gusta mucho						
9 Me gusta extremadamente						

Análisis de aceptabilidad de aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano.

Se realizaron pruebas de aceptabilidad de consumidores en muestras de aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano (Com, Cor, Crio y Men), en producto fresco (día 0 de almacenamiento). El análisis de aceptabilidad se llevó a cabo sobre un grupo de personas (n =100) que fueron reclutadas en Córdoba (Argentina), de acuerdo a los siguientes criterios: (a) edad entre 18 y 65 años, (b) no fumadoras, (c) personas sin alergias a los alimentos, y (4) consumidores de aceite de oliva, al menos dos veces a la semana.

Para la evaluación de la muestra, se colocaron 2 mL de aceite de oliva sobre una rebanada (3 x 3 x 1 cm de largo, ancho y espesor) de pan blanco (Pan Liviano, Fargo SA, Córdoba, Argentina). Las muestras se sirvieron sobre pirotines en un plato de plástico descartable, codificadas con números de 3 dígitos. Cinco muestras de aceite de oliva (Control, Com, Cor, Crio y Men) fueron presentadas a los jueces consumidores de forma aleatoria durante el día de evaluación. Se solicitó a los jueces oler primero y luego degustar las muestras para evaluar aroma y sabor (Tabla 4.5). Los participantes fueron instruidos para consumir toda la muestra y luego enjuagarse la boca con agua y comer una rodaja de manzana Granny Smith, entre muestras para minimizar cualquier efecto residual. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos donde 1 = me

disgusta extremadamente y 9 = me gusta extremadamente. Los atributos evaluados fueron color, olor y sabor (Tabla 4.5) (Meilgaard et al., 2010).

Tabla 4.5. Escala hedónica usada en las pruebas de aceptabilidad de aceites de oliva saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.

ESCALA		Muestra N°			Muestra N°			Muestra N°		
		Olor	Color	Sabor	Olor	Color	Sabor	Olor	Color	Sabor
1	Me disgusta extremadamente									
2	Me disgusta mucho									
3	Me disgusta bastante									
4	Me disgusta ligeramente									
5	Ni me gusta, ni me disgusta									
6	Me gusta ligeramente									
7	Me gusta bastante									
8	Me gusta mucho									
9	Me gusta extremadamente									

Análisis discriminativo de aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano.

Se realizaron pruebas discriminativas Comparaciones Pareadas y Dúo-Trio sobre muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo siguiendo el procedimiento descrito por (Meilgaard *et al.*, 2010). Un grupo de veinte jueces conformados por docentes y estudiantes de postgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina participaron de evaluaciones discriminativas. Las muestras se sirvieron tal como se describió para la prueba de consumidores.

Las pruebas Dúo-Trío son simple y fácil de interpretar. Presentan la ventaja que una de las muestras es una referencia, lo cual evita confusiones en lo que respecta a la diferencia que hay que identificar. La desventaja es que los jueces deben probar tres muestras. Este método se utilizó para saber si existían diferencias entre dos muestras, correspondiente a los aceites esenciales de orégano. Se utilizó la prueba balanceada 100%, esto quiere decir que todas las muestras fueron referencia y muestra problema a la vez. A cada juez se le presentaron tres muestras, una de las cuales estaba marcada como “referencia”, mientras que las otras dos eran

las muestras codificadas desconocidas. Se le solicitó a los jueces que eligieran cual era la muestra desconocida similar a la de referencia (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Planilla correspondiente usada en las pruebas discriminativas Dúo-Trío para evaluar muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.

DUO TRIO

Nombre: _____ Fecha: _____
Producto: Aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano
Instrucciones:

Frente a usted hay una Referencia, y dos muestras Codificadas. Una de las muestras es idéntica a la Referencia, la otra es diferente.

Pruebe las muestras de izquierda a derecha y diga cuál de las Muestras es diferente a la Referencia. Marque con una X el recuadro correspondiente. NOTA: Si no encuentra diferencia entre las muestras, elija una al azar.

Referencia	Muestra: Código 523	Muestra: Código 787
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Observaciones:

La prueba de comparaciones pareadas sirve para detectar diferencias de un solo atributo entre muestras, en este estudio el atributo fue el aceite esencial de orégano. Esta prueba sensorial es la más utilizada. Es muy simple y sirve en muchos casos para determinar como primera medida si deben aplicarse otros test sensoriales más complejos. Se les entregó a los jueces dos muestras, una fue la control y la otra fue la muestra saborizada con aceite esencial de orégano (Com, Cor, Crio y Cordobés). Ambas muestras fueron codificadas y se les solicitó a los jueces que identificaran cuál de las dos muestras fue la adicionada con el aceite esencial de orégano (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Planilla correspondiente usada en las pruebas discriminativas Comparación Pareada para evaluar muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.

COMPARACIÓN PAREADA	
Nombre:	Fecha:
Producto: Aceite de oliva saborizado con aceite esencial	
Marque con una X la muestra que tiene sabor a orégano	
Muestra 325	Muestra 582
COMENTARIOS :	

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron en tres repeticiones. Sobre los resultados obtenidos se calcularon los siguientes estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2012).

3. Determinación de medias y desvíos estándar.
4. Análisis de varianza y test de LSD Fisher, $\alpha = 0.05$
5. Estimación de Modelos Lineales y Mixtos, test LSD Fisher, $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Descriptivo y Aceptabilidad de los Aceites Esenciales de Orégano

Los atributos analizados en las prueba descriptivas fueron los aromas: animálico, balsámico, cítrico, coníferas, floral, hojas verdes, herbáceo, medicinal, menta, resina, picante, madera, plástico y quemado. Los resultados de intensidad de los atributos de los aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo se muestran en las Fig. 4.1 y 4.2. El perfil de aroma mostró una variabilidad significativa entre las muestras aceites esenciales, al igual que la composición química de las muestras.

En general, los atributos que presentaron mayores intensidades (moderadas a fuertes) en el los aceites esenciales de orégano fueron: conífera, hojas verdes, herbáceo, menta y madera. El AE Men obtuvo valores de intensidad más altos para los aromas cítrico, floral, medicinal y resina, mientras que el AE Com tuvo los aromas más altos para animálico, herbáceo y AE Cor para picante y madera. Las muestras de AE Cor y Crio tuvieron, en general, valores intermedios para todos los atributos. Los aromas que presentaron diferencias significativas entre las muestras fueron: balsámico, cítrico, floral, herbácea, medicinal y menta (Fig. 4.2). En cuanto a color, las muestras de AE Com, Cor y Crio fueron encontradas amarillas, mientras que AE Men fue clasificada como amarillo claro.

Los aceites esenciales ricos en monoterpenos como p-cimeno y α -terpineno tienen aromas herbáceo y cítrico más intensos. Por otra parte, los aceites esenciales ricos en monoterpenos oxigenados como el timol, carvacrol y terpineol tienen fuertes notas picantes, que se relaciona con el aroma resinoso (Juliani *et al.*, 2007; Juliani y Simon, 2008).

Los resultados de aceptabilidad de los aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo se muestran en la Fig. 4.3. Todas las muestras tuvieron una aceptación por encima de 5 (ni me gusta ni me disgusta) para los atributos olor y color. La muestra AE Men fue la más aceptada en cuanto al olor. Esto podría estar relacionado con su perfil aromático, el cual los consumidores puedan asignar mayor aceptabilidad cuando en AE tiene mayor intensidad de aroma herbáceo, menta y medicinal característico de AE Men tal como se observó en los resultados de las pruebas descriptivas. Con respecto al color, AE Crio fue la que presentó mayor aceptabilidad.

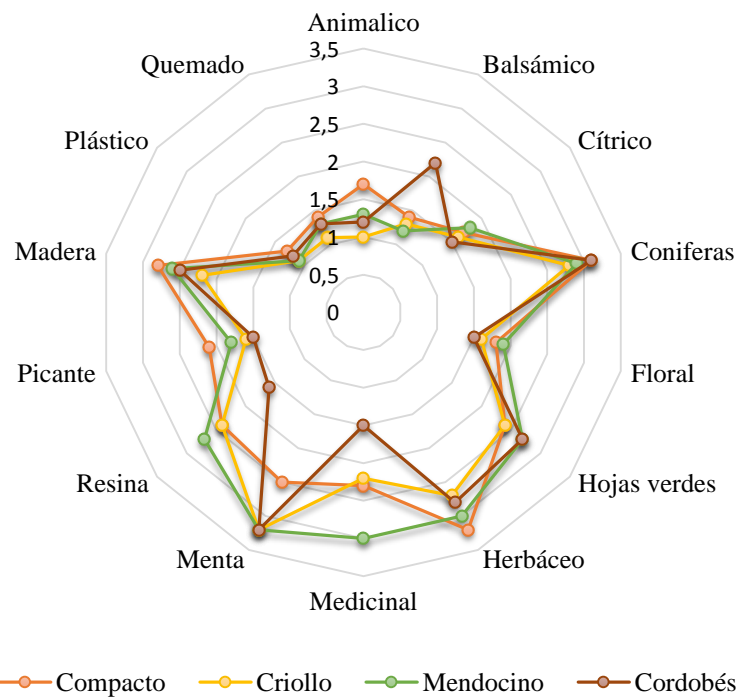


Figura 4.1. Intensidades de los atributos en forma de diagrama tela de araña de las pruebas descriptivas de los aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo.

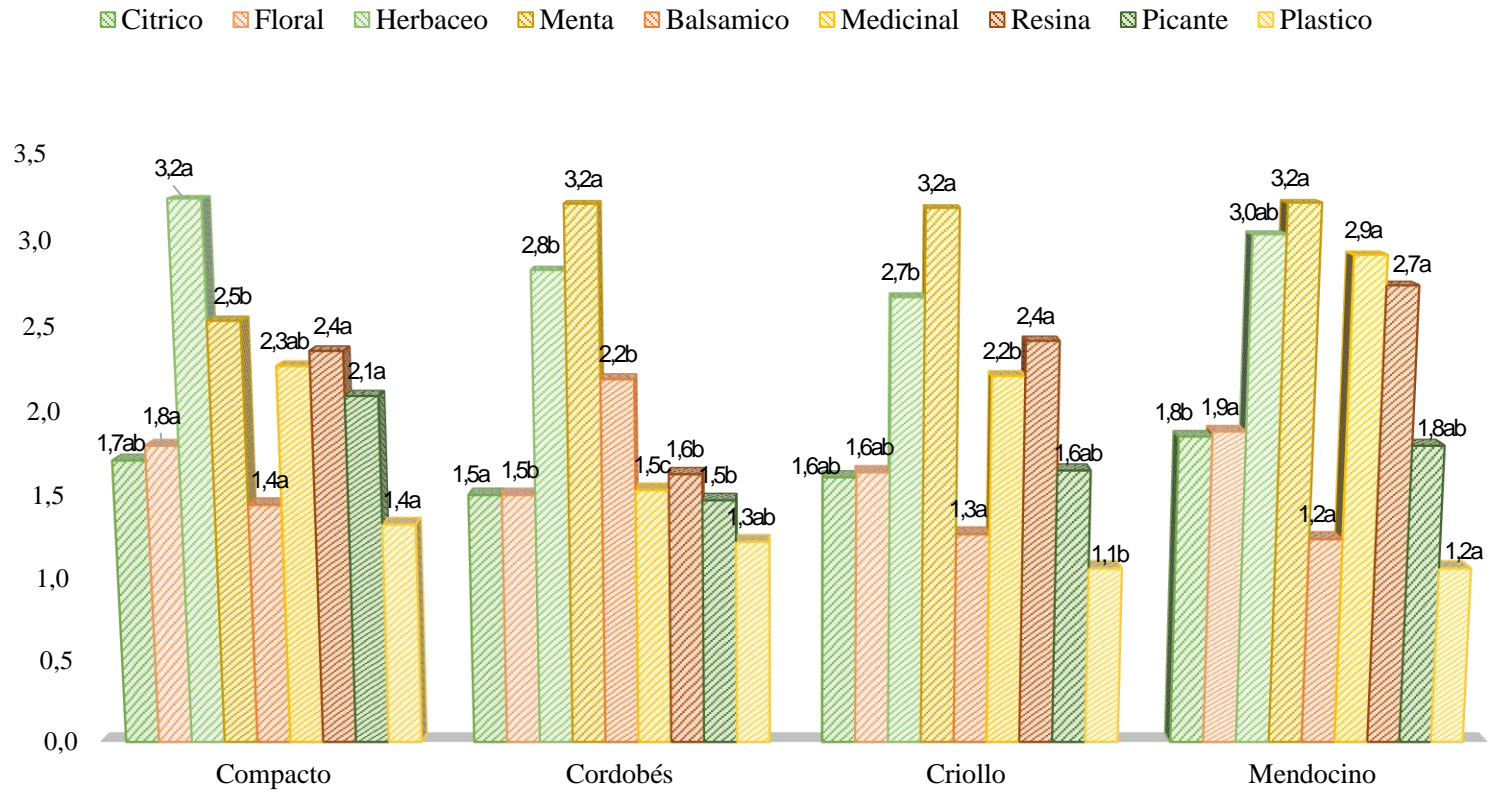
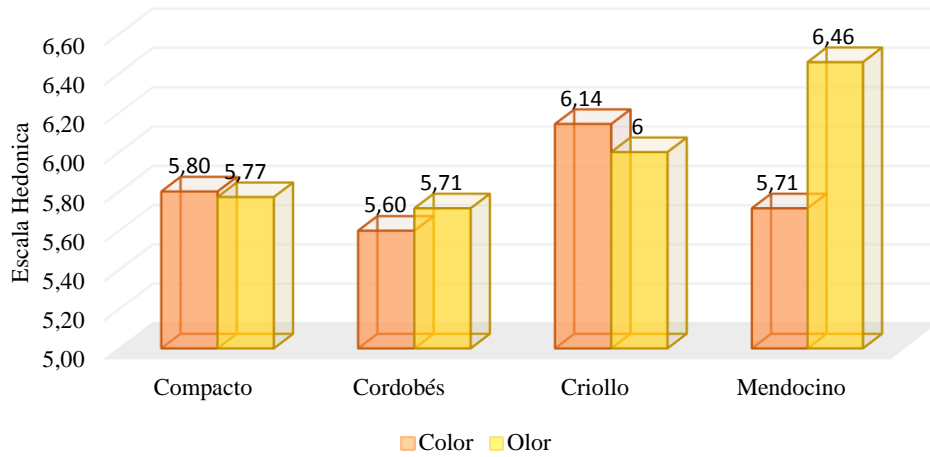
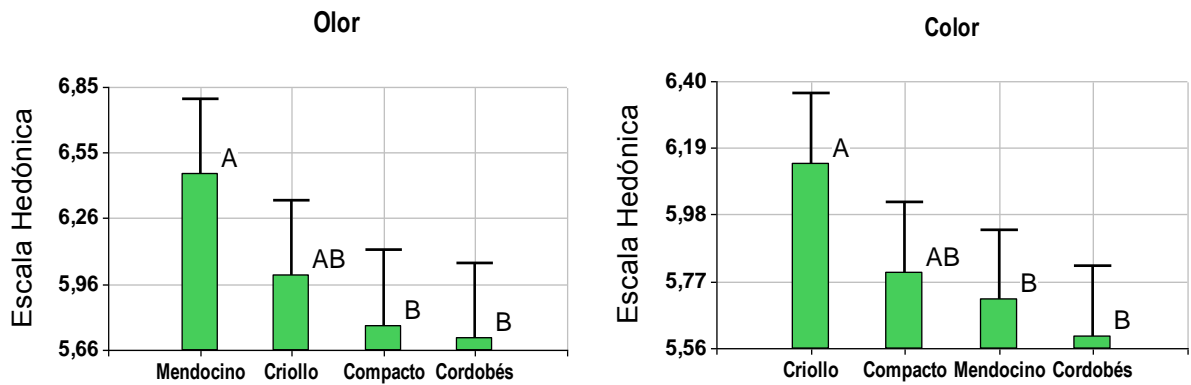


Figura 4.2. Intensidades de los atributos de los aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo que presentan diferencias significativas entre las muestras ($\alpha=0,05$, LSD Fisher).

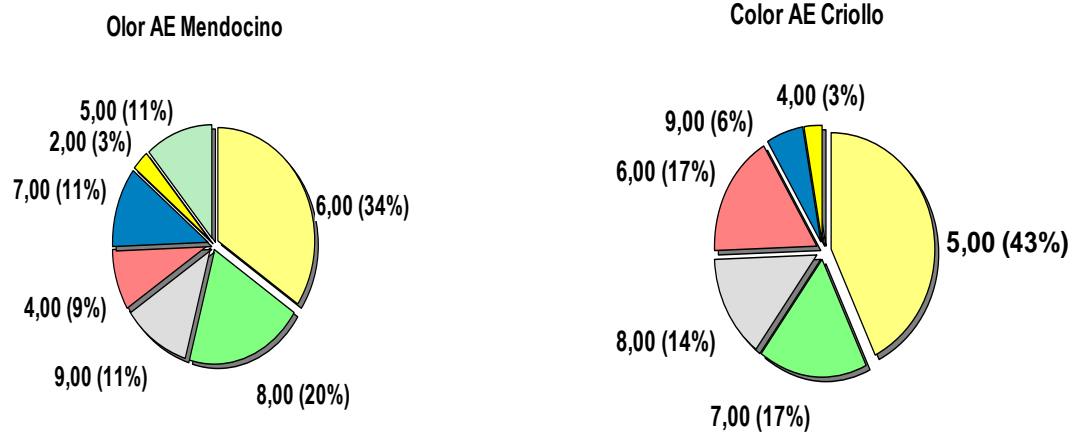
Acceptabilidad de los Aceites Esenciales de Oréganos



A



B



C

Figura 4.3 (A) Análisis de aceptabilidad de los aceites esenciales de las variedades de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino para los atributos color y olor. (B) Diferencias significativas entre muestras ($\alpha=0,05$, test LSD Fisher, MLM) para los atributos olor y color. (C) Distribución en porcentajes de las respuestas de aceptabilidad considerando los puntos de la escala hedónica para el AE Mendocino (Olor) y el AE Criollo (Color).

Tabla 4.8. Resultados del análisis de correlación de los atributos sensoriales de las pruebas descriptivas de los aceites esenciales de orégano.

	Animalico	Balsámico	Cítrico	Coníferas	Floral	Hojas Verdes	Herbáceo	Medicinal	Menta	Resina	Picante	Madera	Plástico	Quemado
Animalico	1	0,12	0,01	0,5	0,19	0,32	0,72	0,02	0,08	0,35	2,00E-03	0,1	2,80E-03	0,01
Balsámico	-0,1	1	3,80E-05	0,16	1,90E-03	0,98	0,23	0,01	0,08	0,6	0,54	0,97	0,06	0,98
Cítrico	0,16	0,26	1	9,30E-04	3,00E-10	0,35	0,35	0,59	0,97	1,60E-05	0,02	2,50E-03	0,04	0,1
Coníferas	0,04	0,09	0,21	1	0,01	2,60E-05	0,03	0,25	1,60E-05	0	7,20E-07	0	0,1	0,32
Floral	0,08	0,2	0,39	0,16	1	2,20E-04	0,73	1	0,62	0,32	0,03	0,03	1,40E-05	0,8
Hojas Verdes	0,06	1,60E-03	0,06	0,27	0,24	1	0,01	0,56	0,72	8,80E-04	3,60E-03	2,00E-09	0,01	0,16
Herbáceo	0,02	0,08	-0,06	0,14	-0,02	0,16	1	0,14	0,05	7,40E-05	1,20E-03	0,01	0,4	0,5
Medicinal	0,15	-0,16	-0,03	0,07	0	0,04	0,1	1	5,70E-04	0,64	7,50E-07	0,92	0,6	0,86
Menta	-0,11	0,11	-2,20E-03	0,27	0,03	-0,02	0,12	0,22	1	4,60E-03	7,40E-04	0,11	0,43	0,9
Resina	0,06	0,03	0,27	0,5	0,06	0,21	0,25	0,03	0,18	1	6,90E-09	0	0,29	0,48
Picante	0,2	-0,04	0,15	0,31	0,14	0,19	0,21	0,31	0,22	0,36	1	4,40E-07	0,01	1,60E-06
Madera	0,11	2,70E-03	0,19	0,47	0,14	0,37	0,16	-0,01	0,1	0,56	0,32	1	0,06	0,01
Plástico	0,19	0,12	0,13	0,11	0,28	0,17	0,05	-0,03	0,05	0,07	0,17	0,12	1	3,40E-10
Quemado	0,16	-1,40E-03	0,11	0,06	0,02	0,09	0,04	-0,01	0,01	0,05	0,3	0,16	0,39	1

La correlación entre las variables sensoriales analizadas en los aceites esenciales de orégano se muestra en la Tabla 4.8. Únicamente se consideraron las correlaciones como significativas cuando $p \leq 0,01$. De acuerdo al análisis de correlaciones de los atributos sensoriales evaluados, se observó que el aroma cítrico se encontró positivamente correlacionado con floral ($r = 0,39$), madera con coníferas ($r = 0,47$), madera con hojas verdes ($r = 0,37$), picante con resina ($r = 0,37$), madera con resina ($r = 0,56$) y quemado con plástico. A partir de este análisis se podría esperar que las muestras con alto valor de madera tengan también alto aroma a coníferas y resina, tal como se observó en este estudio.

Análisis descriptivo del aceite de oliva saborizado con aceites esenciales de orégano.

El análisis descriptivo del aceite de oliva (AO) adicionado con aceites esenciales de orégano se realizó sobre las muestras frescas correspondientes al día 0 del almacenaje. Los resultados de las intensidades de los atributos sensoriales de las muestras de aceite de oliva se presentan en la Tabla 4.9. Se evaluaron 5 atributos, 4 positivos (frutado, picante, amargo y sabor a orégano) y uno negativo (rancio) encontrándose diferencias significativas ($\alpha=0,05$) en cuatro de ellos. Las muestras adicionadas con aceites esenciales de orégano mostraron una tendencia a disminuir la intensidad del atributo frutado, mientras que en los otros atributos en estas muestras (con AE), incrementaron su intensidad. Las muestras de AE Cor fueron las que presentaron mayores valores de intensidad en los atributos amargo y sabor orégano para ambas condiciones de almacenaje luz (L) y oscuridad (O). Por otro lado, las muestras AE Crio presentaron la máxima intensidad para el atributo picante.

Tabla 4.9. Análisis descriptivo del aceite de oliva adicionado con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino sometidos a dos condiciones de almacenaje Luz (L) y Oscuridad (O).

Tratamientos	Frutado ¹	Picante ¹	Amargo ¹	Sabor orégano ¹	Rancio ¹
Control-L ²	5.8± 0.11 ^b	2.98±0.13 ^{bc}	3.3±0.16 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Com-L ²	5.5±0.13 ^{ab}	3.72±0.2 ^{bc}	3.67±0.2 ^a	5.63±0.29 ^{cd}	0±0 ^a
Cor-L ²	5.55±0.14 ^{ab}	4.3±0.38 ^a	3.85±0.08 ^{ab}	6.15±0.27 ^d	0±0 ^a
Crio-L ²	5.13±0.26 ^a	5.35±0.15 ^c	3.62±0.29 ^a	4.88±0.32 ^{bc}	0±0 ^a
Men-L ²	5.53±0.13 ^{ab}	5.03±0.27 ^{bc}	3.28±0.16 ^a	4.38±0.5 ^b	0±0 ^a
Control-O ²	5.8±0.1 ^b	5±0.13 ^{bc}	3.3±0.16 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Com-O ²	5.5±0.16 ^{ab}	5±0.2 ^{bc}	3.37±0.23 ^a	5.63±0.29 ^{cd}	0±0 ^a

Tabla 4.9 (Continuación). Análisis descriptivo del aceite de oliva adicionado con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino sometidos a dos condiciones de almacenaje Luz (L) y Oscuridad (O).

Tratamientos	Frutado ¹	Picante ¹	Amargo ¹	Sabor orégano ¹	Rancio ¹
Cor-O ²	5.55±0.14 ^{ab}	4.6±0.27 ^{ab}	4.35±0.35^b	6.15±0.27^d	0±0 ^a
Crio-O ²	5.35±0.13 ^a	5.36±0.27^c	3.62±0.36 ^a	4.9±0.32 ^{bc}	0±0 ^a
Men-O ²	5.55±0.13 ^{ab}	5.23±0.21 ^{bc}	3.34±0.19 ^a	4.65±0.42 ^b	0±0 ^a

1. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas para cada atributo ($\alpha=0,05$, n = 3, LSD Fisher).

2. Com (Aceite de oliva con AE Compacto), Cor (Aceite de oliva con AE Cordobés), Crio (Aceite de oliva con AE Criollo) y Men (Aceite de oliva con AE Mendocino); L (tratamientos expuestos a la luz); O (tratamientos en oscuridad);

Análisis Descriptivo de Ricota saborizada con AE de orégano.

Los resultados de las intensidades de los atributos sensoriales obtenido por el análisis descriptivo de las muestras de ricota (R) adicionadas con los aceites esenciales de orégano evaluadas en el día 0 del almacenaje (muestras frescas) se presentan en la Tabla 4.10. Se describieron 12 atributos sensoriales en las muestras de ricota encontrándose diferencias significativas ($\alpha=0,05$). Las muestras de ricota adicionadas con aceites esenciales de orégano mostraron valores de intensidad más altos que el control para los atributos amargo y ácido, mientras que el atributo dulce se fue significativamente más bajo en al muestras R-Crio. Este mismo tratamiento obtuvo el valor más alto de intensidad para el atributo fermentado. La muestra R-Control presentó mayor intensidad en los atributos caseína y leche, efecto que se puede atribuir a la ausencia de aceites esenciales de orégano y simultáneamente incrementa los atributos amargo y ácido. La intensidad del gusto dulce también se vio disminuida por la adición de aceite esencial de orégano. En cuanto a los atributos de apariencia, la muestra R-Cor fue significativamente superior en brillo, humedad y color.

Análisis de aceptabilidad y discriminativo del aceite de oliva saborizado con aceites esenciales de orégano.

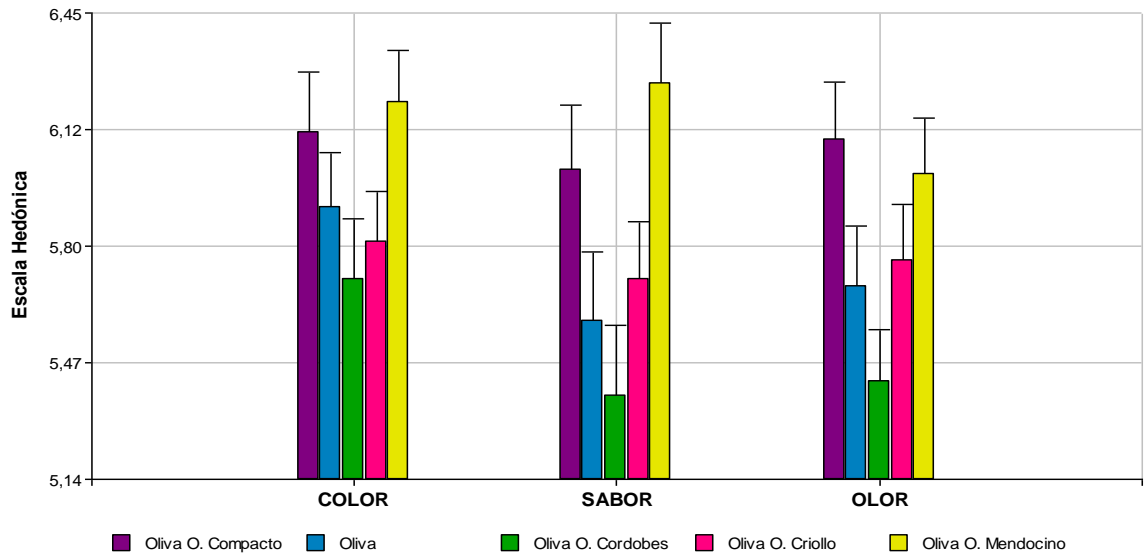
Los resultados de la aceptabilidad de los jueces consumidores de las muestras de aceite de oliva adicionada con aceites esenciales de orégano se presentan en las figuras 4.4. Para los atributos color, sabor y el olor de la prueba de aceptación presentaron un valor promedio 5,37 (ni me gusta, ni me disgusta) a 6,26 (me gusta ligeramente) medidos en una escala hedónica de 9 puntos. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras. La muestra de aceite de oliva con AE Men tuvo el valor más alto de aceptabilidad para el atributo sabor (6,27 en una escala hedónica de 9 puntos), seguida por la muestra con AE Com, no registrándose diferencias significativas entre ambas. Los mismos resultados fueron observados para el atributo olor. El aceite de oliva aromatizado con AE Cor fue que presentó valores de aceptabilidad más bajo en atributos analizados. Sin embargo, esta muestra no mostró diferencias significativas en olor, sabor y color con respecto de la muestra control. Con respecto a la muestra control (sin adición de AE), las muestras de aceite de oliva con AE Men y Com mostraron valores superiores de aceptabilidad para todos atributos evaluados.

Tabla 4.10. Intensidades de los atributos de ricota adicionadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino evaluadas por análisis sensorial descriptivo.

Atributo	Control			Compacto			Cordobés			Criollo			Mendocino		
	Media	EE		Media	EE		Media	EE		Media	EE		Media	EE	
Acido ¹	10,14	± 0,38	b	10,43	± 0,72	a	11,00	± 0,66	a	9,43	± 0,66	b	10,29	± 0,49	b
Amargo ¹	3,57	± 0,98	b	10,71	± 0,91	a	6,29	± 0,97	b	7,57	± 0,91	b	4,86	± 0,91	b
Dulce ¹	18,14	± 0,89	a	17,00	± 0,63	a	17,29	± 0,65	a	15,34	± 0,65	b	16,57	± 0,63	a
Salado ¹	5,00	± 0,00	a	4,86	± 0,38	b	5,00	± 0,00	a	5,14	± 0,38	a	5,00	± 0,00	a
Orégano ¹	0,00	± 0,00	b	40,17	± 1,30	a	40,14	± 1,20	a	38,29	± 1,42	a	38,8'	± 11,88	a
Oxidado ¹	0,00	± 0,00	b	0,57	± 0,42	a	0,43	± 0,42	a	0,43	± 0,43	a	0,43	± 0,43	a
Fermentado ¹	10,31	± 0,45	b	9,71	± 0,76	b	9,86	± 0,38	b	13,86	± 0,48	a	10,57	± 0,45	b
Caseína ¹	50,14	± 0,37	a	44,57	± 1,05	c	45,24	± 1,13	c	42,73	± 1,13	c	47,14	± 1,05	b
Leche ¹	49,71	± 1,23	a	44,29	± 1,23	b	46,00	± 1,23	b	45,29	± 1,23	b	47,71	± 1,23	a
Brillo ¹	15,43	± 0,98	b	16,00	± 2,00	b	17,86	± 3,48	a	16,00	± 0,48	b	14,86	± 1,57	b
Humedad ¹	14,14	± 0,71	b	15,35	± 0,45	a	16,17	± 0,48	a	15,00	± 0,71	b	14,57	± 0,45	b
Color ¹	40,00	± 0,00	b	40,14	± 0,38	b	40,57	± 1,13	a	40,57	± 0,79	a	40,57	± 0,31	a

¹ Letras distintas para cada compuesto indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, $n = 3$, LSD Fisher).

A



B

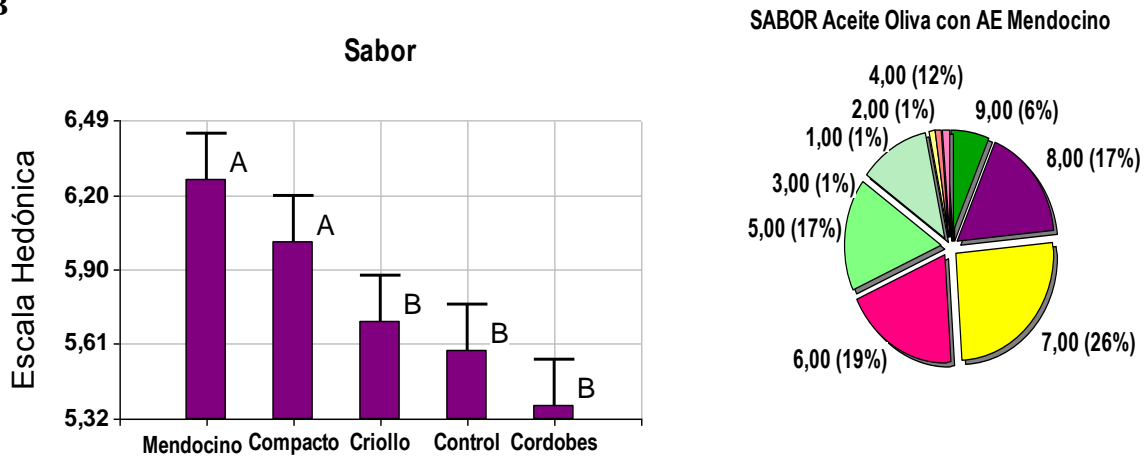
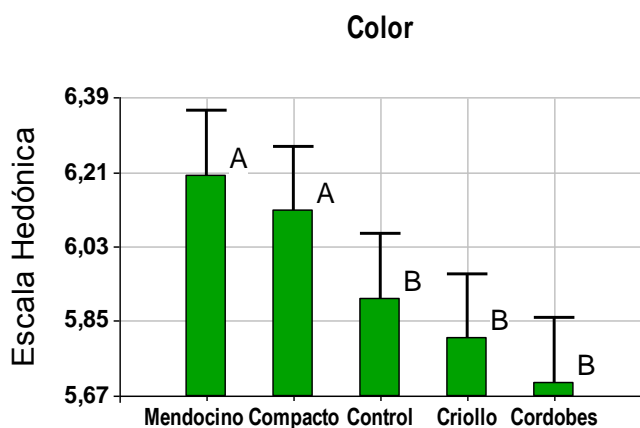
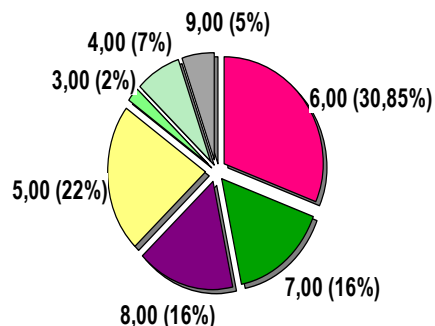


Figura 4.4. (A) Prueba de aceptabilidad de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano para los atributos olor, color y sabor, (B) (C) y (D) Diferencias significativas entre muestras para cada uno de los atributos evaluados y distribución de la escala hedónica (en porcentajes) de la muestra más aceptada en cada atributo (MLM, LSD Fisher, $\alpha = 0,05$, $n = 3$).

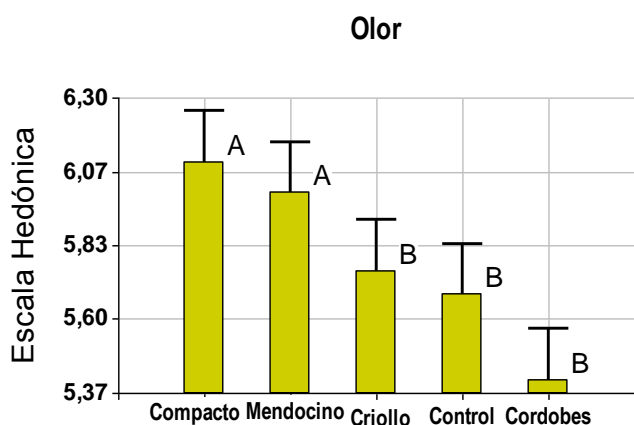
C



COLOR Aceite Oliva con AE Mendocino



D



OLOR COMPACTO

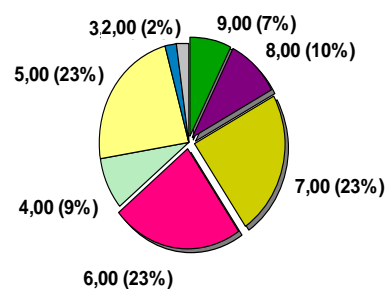


Figura 4.4. (A) Prueba de aceptabilidad de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano para los atributos olor, color y sabor. (B) (C) y (D) Diferencias significativas entre muestras para cada uno de los atributos evaluados y distribución de la escala hedónica (en porcentajes) de la muestra más aceptada en cada atributo (MLM, LSD Fisher, $\alpha = 0,05$, $n = 3$).

Los resultados de las pruebas discriminativas Comparación Pareada y Dúo-Trio de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de orégano se muestran en la Tabla 4.11. En las pruebas de Comparaciones Pareadas, la muestra Control se comparó con las muestras saborizadas con AE Com, Cor, Crio y Men con el objetivo de conocer si la adición de aceites esenciales de orégano era detectada. Los jueces identificaron significativamente las muestras preparados con AE Com, Crio y Cor con un nivel de significación de 0,1%, y la muestra preparada con AE Men con un nivel de significación del 1%. Esto significa que cuando se preguntó si se identificaba las muestras saborizadas con aceite esencial de orégano de la muestra

control, los resultados indicaron que fueron reconocidas las diferencias con altos niveles de significancia.

Tabla 4.11. Nivel de significancia detectado en el análisis de Comparaciones pareadas de las muestras de aceite de oliva con la adición de aceites esenciales de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino.

Orégano	Positivo	Negativo	
Compacto	19	1	SIGNIFICANCIA 0,1%
Cordobés	20		SIGNIFICANCIA 0,1%
Criollo	20		SIGNIFICANCIA 0,1%
Mendocino	17	3	SIGNIFICANCIA 1 %

La prueba discriminativa Dúo-Trio se realizó con el objetivo de detectar diferencias entre las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceites esenciales de orégano correspondiente a las cuatro variedades estudiadas. Los resultados de esta prueba mostraron que los jueces sólo fueron capaces de detectar diferencias ($\alpha = 0,05$) entre dos muestras saborizadas cuando una de las dos muestras era aceite de oliva aromatizado con AE Men. Esto significa que solo se encontraron diferencias significativas en aceite de oliva cuando se compararon: Men-Com, Men-Crio y Men-Cor, con un nivel de significación del 5%. Entre las otras muestras saborizadas con AE Cor, Crio y Com no se detectaron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de orégano tienen distinto perfil aromático, destacándose los atributos: aroma a coníferas, herbáceo, menta y madera en todos ellos.
- El aroma del aceite esencial mendocino es el que presenta mayor aceptabilidad por parte de los consumidores.
- Los aceites esenciales de orégano aumentan en general la intensidad de los atributos picante y amargo del aceite de oliva, presentando en algunas muestras diferencias significativas con el control. Estos atributos son considerados positivos en el producto.
- El aceite de oliva saborizado con aceite esencial de orégano de las variedades Mendocino y Compacto son los que presentan mayor aceptabilidad en cuanto a los atributos color, olor y sabor de acuerdo a lo observado en las pruebas de aceptabilidad realizadas con jueces consumidores, siendo significativamente iguales entre ellas. Mientras que las muestras de aceite de oliva adicionadas con los aceites esenciales de orégano de las variedades Cordobés y criollo presentan la misma aceptabilidad que el aceite de oliva Control.
- Los aceites esenciales de orégano aumentan la intensidad de los atributos amargo y ácido y disminuyen el sabor dulce, leche y caseína en ricota.
- En la prueba discriminativas comparación pareada, los jueces identifican las muestras saborizadas con aceite esencial de orégano de la muestra de aceite de oliva Control.
- El aceite de oliva adicionado con aceite esencial de orégano de la variedad Mendocino es el único que se diferencia sensorialmente del resto de los aceites de oliva saborizadas con los aceites esenciales de las otras variedades de orégano cuando son analizadas en pruebas discriminativas.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, H. 1918. The education of Henry Adams. The modern Library, New York.
- Cairncross, S. E. & Sjoström, L. B. 1950. Flavor profiles-a new approach to flavor problems. Food Technology 4: 308.
- Caul, J. F. 1957. The profile method of flavor analysis. Food Technology 7: 1.
- COI 2007. Análisis sensorial del aceite de oliva. Norma guía para la selección, el entrenamiento y el control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen. Documento COI/T.20/Doc, nº 14/Rev. 2., (IOOC), I. O. O. C. (Eds.). Madrid, España. International Olive Oil Council (IOOC). pp.
- COI 2010. Sensory analysis of olive oil method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. Document COI/T.20/Doc, nº 15/Rev.3. (IOOC), I. O. O. C. (Eds.). Madrid, España. International Olive Oil Council (IOOC). pp.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat versión 2012., in Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gacula, M. C. J. 1997. Descriptive Analysis in Practice. Gaucula & Ass (Eds.). Inc. Trumbull, Connecticut, USA. . Food Nutrition Press. pp.
- Grosso, N. R. & Resurrección, A. V. A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. Journal of Food Science 67: 1530-1537.
- Juliani, H. R., Biurrun, F. N., Koroch, A., De Carli, A. & Zygodlo, J. A. 2007. The Production of Native and Exotic Herbs, Medicinal and Aromatic Plants in Argentina. En: Issues in new crops and new uses. Janick, J. & Whipkey, A. (Eds.). Alexandria, VA. ASHS Press. pp.
- Juliani, H. R. & Simon, J. E. 2008. Chemical Diversity of Lippia multiflora Essential Oils from West Africa. Journal of Essential oil Research 20: 49-55.
- Lawless, H. T. & Heymann, H. 2010. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices. Lawless, H. T. y Heymann, H. (Eds.). New York, USA. Springer. 596 pp.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T. & Civille, G. V. 2010. Sensory Evaluation Techniques. Meilgaard, M. C. y Carr, B. T. (Eds.). Boca Raton, Florida, USA. Taylor & Francis. 416 pp.
- Olmedo, R. H., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. LWT - Food Science and Technology in press: 1-9.

- Plemmons, L. E. & Resurreccion, A. V. A. 1998. A warm-up sample improves reliability of responses in descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies* 13: 359-376.
- Riveros, C. G., Mestrallet, M. G., Gayol, M. F., Quiroga, P. R., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2010. Effect of storage on chemical and sensory profiles of peanut pastes prepared with high-oleic and normal peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2694-2699.
- Rosales, F. G., Risco, M. A. & González-Quijano, R. G. 1984. Selección de catadores mediante el Método de 'clasificación por intensidad'. *Grasas y Aceites* 35: 304-310.
- Stone, H. & Sidel, J. L. 1985. Sensory evaluation practices. Stone, H. y Sidel, J. L. (Eds.). Orlando, Fla. Academic Press Inc. 207 pp.

CAPÍTULO 5

CAMBIOS QUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y SENSORIALES QUE SE PRODUCEN DURANTE EL ALMACENAJE EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS CON EL AGREGADO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva

Aceite de oliva virgen es un producto ampliamente producido y consumido en el mundo. Es muy apreciado por su aroma y sabor, así como también por sus propiedades nutricionales (Moldao-Martins *et al.*, 2004; Grati-Kamoun, 2007). El aceite de oliva tiene una cantidad considerable de antioxidantes naturales tales como tocoferoles, carotenoides, esteroides, y compuestos fenólicos que son importantes en la prevención de muchas enfermedades. Los beneficios para la salud también se deben a su contenido en vitaminas, sobre todo la vitamina E, que es considerada como uno de los antioxidantes naturales más eficaces (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1999).

Los beneficios nutricionales están relacionados con la composición de ácidos grasos, debido al alto contenido de ácido oleico y también a la relación equilibrada entre ácidos grasos saturados y ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos mono insaturados (AGMI), como el ácido oleico ofrecen protección contra las enfermedades cardiovasculares mediante la reducción de la lipoproteína de baja densidad-colesterol (LDL) (colesterol "malo") en el suero de la sangre, mientras que aumenta los niveles de la lipoproteínas de alta densidad (HDL) (el colesterol "bueno") (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1999).

El aceite de oliva virgen debería ser consumido fresco, ya que se obtiene a partir de aceitunas, pero es normalmente almacenado en recipientes de gran tamaño en cual debe soportar largos períodos de almacenaje que suele alcanzar un año hasta que se produce la próxima cosecha, por lo que es susceptible a la oxidación de los lípidos. Los radicales libres procedentes de la oxidación de grasas y aceites son responsables de desarrollar olores y sabores rancios y

disminuir la calidad nutricional (Owen *et al.*, 2000). La percepción del consumidor es un aspecto importante para definir la calidad de producto alimenticio, en particular, los aceites de oliva que son productos muy apreciados por sus propiedades sensoriales. El sabor rancio resultante de la oxidación de lípidos hace que los alimentos sean inaceptable para los consumidores (Nepote *et al.*, 2009). La adición de antioxidantes es una de las maneras técnicamente más simples de reducir la oxidación de grasas, preservando sabor y color, y también impidiendo el deterioro nutricional por pérdida de vitaminas (Karpińska *et al.*, 2001).

En los aceites vegetales, la auto oxidación de lípidos puede ser iniciada por exposición a la luz debido a la generación de radicales libres (O'Brien, 2009). El enranciamiento oxidativo es la reacción química más importante que limita la vida útil de los aceites (Kristott, 2000). Esta reacción implica el desarrollo de diversos sabores y olores que hace a los alimentos inaceptables o reducen su vida útil. En estudios realizados sobre aceite de oliva, se informó un mayor deterioro en muestras que son expuestas a la luz. El contenido de clorofilas y los carotenoides disminuye como consecuencia del efecto de dicha exposición. El color es una propiedad sensorial con una fuerte influencia en la aceptación de los alimentos. Clorofilas y carotenoides son los principales responsables de este atributo en el aceite de oliva. Estos pigmentos también desempeñan un importante papel en la estabilidad a la oxidación debido a su naturaleza antioxidante en oscuridad, pero pro-oxidante en presencia de luz (Criado *et al.*, 2008).

Los aceites de oliva con agregados de diferentes sabores se suelen encontrar en las góndolas de los supermercados. Estos aceites saborizados, por lo general, son preparados mediante la maceración de plantas de aromáticas en el aceite a saborizar. Un aceite de oliva preparado con la adición de aceite esencial de orégano podría no sólo proteger el aceite de oliva de la oxidación de lípidos actuando como un antioxidante natural, sino también preservaría su sabor, aroma y propiedades nutricionales beneficiosas para la salud, e incluso podría aportar una combinación de sabor que podría resultar más agradable para algunos consumidores.

Productos lácteos: Ricota y Queso Cottage

De acuerdo a su textura y consistencia, la ricota y el queso cottage se clasifican como quesos semisólidos por tener un porcentaje de humedad entre el 61-67% (Belitz *et al.*, 2009).

Por otro lado, de acuerdo a su contenido de materia grasa son considerados quesos semi-grasos, ya que contienen entre 10 y 20% de lípidos.

Tabla 5.1 Variedades de quesos sin madurar

Composición química:	Materia grasa <10–70 %; Humedad: 39–44 %
Tipo de queso	Requesón (Ricota), Neuchâtel, Petit Suisse, Demi Sel, Queso Cottage Schichtkäse (capas de diferente contenido de grasa); Rahm-, Doppelrahmfrischkäse, Demi Suisse, Gervais, Carré-frais, queso crema, Mozzarella

Los quesos no madurados, como éstos (Tabla 5.1), tienen un tacto suave, gelatinoso (queso de capa) o consistencia granulosa (como el queso cottage). En la producción de queso fresco, el suero de leche es generalmente separado después de acidificación. El requesón o ricota generalmente se producen en funcionamiento continuo de coaguladores con regulación de temperatura. En la fabricación de queso cottage, después de la separación de suero de leche a través de un filtro de banda, la cuajada que adquiere forma de grano, para posteriormente ser lavada en una cuba de tornillo. Finalmente, se enfría y se disminuye la humedad a través de una banda de secado (Belitz *et al.*, 2009).

La ricota es un derivado lácteo similar al queso fresco, su sabor es suave, granuloso y espeso, algo seco y a veces un poco agrio presentando un color blanco. La ricota se obtiene coagulando la leche entera y luego se retira el suero. El proceso de coagulación se realiza por el agregado de un coagulante, la cuajada, o por el agregado de un ácido como jugo de limón o vinagre. El proceso casero para conseguir la ricota es muy sencillo, se corta la leche y se acomoda en un lienzo para poder colgarlo durante toda la noche hasta que suelte el suero o bien se deja en un colador para que escurra el suero (Nollet y Toldrá, 2010; ANMAT, 2013).

Las propiedades de la ricota dependerán de la leche que se utilizó para su preparación. Su aporte proteico es muy elevado, especialmente en lo referente a la composición de aminoácidos esenciales propios del suero lácteo. Tiene poco contenido graso, siendo ideal para personas que deben realizar dietas bajas en calorías. También es rica en calcio, casi tanto como la leche, y en Vitaminas B1, B2 y ácido fólico. Es uno de los quesos blandos más recomendados para preparar diversos platos o para incluirla en la alimentación diaria.

La ricota entera contiene alrededor de un 14% de materia grasa. Se la puede utilizar en dietas para niños y adolescentes o adultos que no tengan problemas de sobrepeso u obesidad. También es muy recomendable para las personas de la tercera edad, que padecen de problemas de masticación, ya que al ser de una textura blanda les permite, incorporar todos los beneficios de un queso blando, un excelente aporte de calcio, sin tener que estar picando o licuando los alimentos. Si bien en casos de sobrepeso, obesidad o trastornos lipídicos, como colesterol alto o triglicéridos es más recomendable la versión desnatada.

La calidad de los productos alimenticios, inevitablemente, cambia durante el almacenamiento debido a la exposición al calor, enzimas, iones de metales de transición, el oxígeno y la luz, que finalmente, terminan causando la degradación o la formación de compuestos activos que distorsionan el sabor original. Los constituyentes de los alimentos, principalmente lípidos, siempre reaccionan con el oxígeno circundante, lo cual conduce a la rancidez en los alimentos (Huvaere *et al.*, 2011). Las principales reacciones que tienen lugar en el desarrollo de malos sabores son la oxidación lipídica y la lipólisis.

El queso es un concentrado de leche sólida que se compone principalmente de proteínas y grasas. Se consume en todo el mundo y constituye una parte integral de la dieta de la población (Han *et al.*, 2011). El queso procesado puede normalmente ser considerado como un producto estable con una vida útil razonable. Sin embargo, durante un almacenamiento prolongado, los cambios que sufren son notables y hasta pueden ser nocivos para la salud (Kristensen *et al.*, 2001).

Los productos lácteos, como otras emulsiones de agua-aceite, pueden sufrir de rancidez tanto hidrolítica como oxidativa (Shan *et al.*, 2011). La lipólisis en la leche se produce durante el almacenamiento en frío de la leche fresca y puede ser mediada por la lipoproteína lipasa (LPL), que está presente naturalmente en la leche, o por las lipasas microbianas de bacterias psicotróficas. También hay liberación de ácidos grasos volátiles (de C4 a C10) y su posterior conversión a otros ácidos y/o a sus ésteres etílicos (Boroski *et al.*, 2012). La oxidación de los lípidos que dan como resultado la formación de peróxidos, en un primer momento, conducen a la formación de productos secundarios de oxidación, especialmente aldehídos. Otros compuestos originados por oxidación de la grasa de leche son algunas cetonas, alcoholes e hidrocarburos (Huvaere *et al.*, 2011).

Para evitar o retardar el deterioro oxidativo de la grasa de la leche, la adición de compuestos antioxidantes constituye una alternativa para preservar el producto. Los antioxidantes pueden actuar como desactivadores de radicales libres, compuestos reductores, captadores de oxígeno singlete y supresores de metales pro-oxidantes (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). La estabilidad oxidativa de las grasas con el añadido de antioxidantes puede ser determinada durante el almacenamiento en condiciones ambientales normales y dentro de su embalaje. Sin embargo, en general, la oxidación puede tomar un largo tiempo para producirse. Por tal razón, se realizan ensayos de oxidación acelerada para lograr resultados más rápidos. La prueba de horno Schaal, que normalmente se aplica para la determinación de la oxidación de los aceites, es comúnmente utilizada en la industria lechera para evaluar el deterioro oxidativo de un producto lácteo (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

Los ácidos orgánicos son compuestos importantes del sabor, que resultan de productos intermedios y metabolitos de una variedad de procesos bioquímicos como el catabolismo de los hidratos de carbono y la hidrólisis de la grasa de la leche, los cuales se producen por el crecimiento bacteriano o la adición de acidulantes durante la fabricación de queso. Su determinación cuantitativa es importante por razones nutricionales y como un indicador de la actividad bacteriana (Murtaza *et al.*, 2012; Garde *et al.*, 2012).

La creciente conciencia y preocupación por la calidad y la seguridad de los quesos han llevado al desarrollo de mejores métodos de conservación. Existen algunas técnicas de conservación alternativas que están siendo investigadas para su aplicación en productos alimenticios, en las cuales se utilizan ingredientes de origen natural como agentes preservantes. Especies y plantas aromáticas conocidas por proporcionar aroma y sabor a los alimentos, son ampliamente utilizados y si se llegan a utilizar como un aditivo en las normativas se las clasifican como “generalmente reconocido como seguro (GRAS en inglés)” lo cual indica que no necesitan estudios adicionales para que se puedan comercializar. Los extractos de plantas aromáticas, en algunos casos son ricos en compuestos fenólicos, tales como los ácidos fenólicos, flavonoides entre otros. En particular, los aceites esenciales (AE) han despertado el interés como conservantes potenciales de los alimentos y tienen una amplia aceptación por parte de los consumidores por ser considerados sustancias naturales. Los AE son compuestos volátiles, que conforman en general mezclas complejas y que se caracterizan por un olor fuerte. Además de su

uso como agentes de sabor en los alimentos, algunos AE exhiben propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidante (De Oliveira *et al.*, 2012). Estos productos de origen natural pueden extender la vida útil de queso mediante la reducción o la eliminación de la supervivencia de las bacterias patógenas y mejorar la calidad general a través de la inhibición de la rancidez oxidativa (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Los polifenoles de extractos de plantas y los AE se han utilizado en diferentes matrices de alimentos para mejorar la estabilidad oxidativa de los lípidos. Sólo unos pocos estudios han analizado la adición de antioxidantes para minimizar las reacciones oxidativas en los productos lácteos (Giroux *et al.*, 2010; Boroski *et al.*, 2012).

El objetivo principal de este estudio fue incluir aceite esencial de orégano de las 4 variedades producidas en la zona centro y NOA (Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo) a productos alimenticios con alto contenido de lípidos como aceite de oliva extra-virgen y quesos frescos (ricota y queso cottage) con la finalidad de evaluar cambios en: parámetros químicos de oxidación lipídica, intensidades de los atributos sensoriales y composición microbiológica que se producen durante el almacenaje de dichos productos alimenticios.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El aceite de oliva virgen extra fue provisto por Finca di Fieno (Camino Las Rosas, km 3.3, Cruz del Eje, Córdoba, Argentina).

La ricota entera utilizada fue marca “La Serenísima” (Alte. Brown 957, Gral. Rodrigues, Buenos Aires, Argentina)

El queso Cottage utilizado es un producto orgánico (certificado por USDA) marca “Organic Valley” (La Farge, Wisconsin, USA).

Los aceites esenciales de orégano de las 4 variedades (Compacto, Mendocino, Cordobés y Criollo) cultivadas en la Estación Experimental de la Facultad Ciencias Agropecuarias (UNC), Córdoba, Argentina, fueron obtenidos por hidrodestilación tal como se describió en los capítulos anteriores de esta tesis.

MÉTODOS

Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y sensoriales en aceite de oliva virgen saborizado con aceite esencial de orégano.

El aceite de oliva se colocó en botellas de 700 mL y fue adicionado con 0,05% (p/p) de aceite esencial de orégano Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) y Mendocino (Men). El estudio se realizó bajo dos condiciones diferentes de almacenamiento: exposición a la luz (L) y oscuridad (O). Los tratamientos bajo la condición exposición a la luz, se colocó en una habitación de 6 m² debajo de 4 lámparas fluorescentes Lumilux Plus Eco de 58 watts/840 blanco frío (OSRAM Argentina Compañía de Lámparas Eléctricas SA, Buenos Aires, Argentina) con una intensidad de luz de 5200 lúmenes por lámpara.

El aceite de oliva sin adición de aceite esencial de orégano se consideró como una muestra control (C) y se almacenó de forma simultánea con las otras muestras en ambas condiciones (exposición a la luz y oscuridad). Las muestras se mantuvieron a temperatura

ambiente (23 ± 1 ° C) durante 126 días. Las muestras se retiraron del almacenamiento cada 21 días para análisis.

Los tratamientos resultantes fueron diez (10):

- a) tratamientos con exposición a luz (L): Aceite de oliva sin aceite esencial (CL) y aceite de oliva añadido con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto (L-Com), Cordobés (L-Cor), Criollo (L-Crio) y Mendocino (L-Men).
- b) Tratamientos en oscuridad (O): Aceite de oliva sin aceite esencial (CO) y el aceite de oliva añadido con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto (O-Com), Cordobés (O-Cor), Criollo (O-Crio) y Mendocino (O-Men).

A las muestras provenientes del almacenamiento, se le realizaron los siguientes análisis químicos de indicadores relacionados a la oxidación lipídica:

- a)- Índice de peróxidos
- b)- Índice de p-anisidina
- c)- Coeficientes de extinción específica K232 y K268 (dienos y trienos conjugados)
- d)- Acidez libre

Se evaluó el **índice de peróxidos (IP)** siguiendo el método 28.022 de la AOAC (AOAC, 2007). Los peróxidos son los productos mayoritarios de las reacciones de autooxidación y pueden medirse en técnicas basadas en su capacidad para liberar yodo del yoduro de potasio para oxidar los iones ferrosos a férricos. Su concentración generalmente se expresa en miliequivalentes de oxígeno por kg de grasa. Para este análisis, se pesaron 5 g de aceite de cada muestra. Para la reacción se mezcló aceite y cloroformo/ácido acético 2:3 (v/v) con solución saturada de yoduro de potasio y se dejó reposar en oscuridad. El yodo formado se tituló con 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. El IP se expresó como miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite (mEqO_2/kg). El valor final se calculó con la fórmula:

$$\text{IP (mEqO}_2/\text{kg)} = (\text{volumen en mL de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times (0,1\text{N}) \times (1000) / (\text{g aceite}) \text{ (Ec. 5.1).}$$

La **acidez libre (AL)** se determinó por el método de valoración de acuerdo a la AOAC (AOAC, 2007), expresando los resultados como porcentaje de ácido oleico. Se colocaron 10 mL de etanol desnaturalizado (9:1, etanol: metanol) y 10 mL de éter etílico en Erlenmeyer de 50 mL,

se agregaron 0.3 mL de solución de fenolftaleína. Se neutralizó esta mezcla (blanco) con la solución de KOH (0.02 N) hasta obtener un color rosa claro. Finalmente se agregaron 5 g de muestra (aceite de oliva) y se tituló con KOH 0.02 N hasta la aparición de color rosado que debe persistir por lo menos durante 10 segundos. El índice de acidez se expresó como porcentaje de ácidos grasos libres en el aceite valorado, como porcentaje p/p de ácido oleico (PM 282):

$$IA = (V \cdot 282 \cdot N) / (10 \cdot \text{gr muestra seca}) \text{ (Ec. 5.2)}$$

Donde, V = volumen de KOH en mL (mL titulación – mL blanco). N = normalidad del KOH.

Índice de anisidina (IAN) se evaluó siguiendo el método IUPAC (IUPAC, 1987). En presencia de ácido acético, la p-anisidina reacciona con los aldehídos produciendo un color amarillento. La absorbancia molar a 350 nm aumenta cuando el aldehído tiene un doble enlace conjugado con el doble enlace del grupo carbonilo, por lo que el índice de anisidina es sobre todo una valoración de los 2-alquenos. Este método es comúnmente utilizado para medir productos de oxidación de lípidos que se forman en etapas avanzadas de dicho proceso (oxidación secundaria). El procedimiento consistió en pesar $0,5 \pm 0,001$ g de muestra de aceite, el cual fue disuelto con 25 mL de n-hexano en un matraz volumétrico. La absorbancia (Ab) de la solución se midió a 350 nm en un espectrofotómetro (UV-V con arreglo de diodos Hewlett Packard HP 8452 A, USA), usando n-hexano como blanco. El reactivo se preparó con 0,25 g de p-anisidina (SIGMA ® St. Louis, MO, EEUU) cada 100 mL de ácido acético glacial. A 5 mL de la solución aceitosa se la mezcló con 1 mL del reactivo p-anisidina y se midió la absorbancia de esta solución (As) a 350 nm después de exactamente 10 minutos, usando como blanco una mezcla de 5 mL de n-hexano y 1 mL de reactivo de p-anisidina. El índice de p-anisidina se calculó por la fórmula:

$$IA = 25 \times (1,2 As - Ab) / m, \text{ (Ec. 5.3)}$$

En donde “As” es la absorbancia de la solución aceitosa después de la reacción con el reactivo p-anisidina, “Ab” es la absorbancia de la solución aceitosa y “m” es la masa en gramos del aceite.

Coeficientes de extinción específica **K232** y **K268**. Se midieron los coeficientes de extinción específicas a 232 nm (dienos conjugados) y 268 nm (trienos conjugados). Los

resultados se informaron como coeficiente de extinción (E) de la muestra (1%, 1 cm) (COI, 2001). A partir de 0,2 g de cada muestra de aceite se le agregaron 6 mL de n-hexano. La absorbancia de los dienos y trienos conjugados se midió en un espectrofotómetro (UV-V con arreglos de diodos Hewlett Packard HP 8452 A, USA), usando como blanco n-hexano.

Además, se midieron los contenidos de clorofila y carotenos como indicador de un deterioro oxidativo del aceite de oliva. Estos pigmentos son moléculas muy lábiles y que se descomponen muy rápidamente por procesos de oxidación, que se manifiesta como una pérdida de concentración de estos pigmentos (Criado *et al.*, 2008).

Contenidos de clorofilas y carotenos. Para determinar el contenido de estos pigmentos en aceite de oliva se siguieron los procedimientos descritos por (Mosquera *et al.*, 1991). Se pesaron 7,5 g de aceite de oliva y se les agregó 25 mL de hexano. Las fracciones de clorofilas y carotenos se midieron en un espectrofotómetro a 670 nm y 470 nm, respectivamente. La concentración de los pigmentos fue expresada utilizando las siguientes ecuaciones:

$$1 - \text{clorofilas (mg/kg)} = (\text{Abs } 670 \times 106) / (613 \times 100 \times \text{densidad}) \text{ (Ec. 5.4)}$$

$$2 - \text{carotenoides (mg/kg)} = (\text{Abs } 470 \times 106) / (2.000 \times 100 \times \text{densidad}) \text{ (Ec. 5.5)}$$

Además de los cambios que se produjeron en parámetros de calidad química de las muestras de aceite de oliva durante el almacenaje, se evaluaron cambios en intensidades de atributos sensoriales. A tal fin, fue necesario contar con un panel de jueces sensoriales entrenados que realizara un análisis descriptivo de las diferentes muestras de aceite de oliva que se iban retirando del almacenaje.

Análisis sensorial descriptivo. Las muestras se retiraron del almacenaje cada 21 días y fueron evaluadas por análisis sensorial descriptivo utilizando el procedimiento descrito en el Capítulo 4. El sistema de recolección de datos utilizado fue el mencionado en dicho procedimiento.

Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y sensoriales en ricota saborizada con aceite esencial de orégano.

Se utilizó ricota entera “La Serenísima” comprada en un supermercado de la ciudad de Córdoba. Todos los sachet pertenecieron al mismo lote de envasado. Se incorporaron los aceites

esenciales de orégano de las cuatro variedades estudiadas en un concentración del 0,05% (p/p) y fueron mezclados con un mixer de cocina durante 5 minutos para lograr una homogenización y distribución uniforme. Las ricotas fueron fraccionadas nuevamente en bolsas de alta barrera de 300g, selladas herméticamente y almacenadas en heladera a 4 ± 1 °C. Las muestras se analizaron sensorial y químicamente cada 7 días durante 35 días.

Se determinaron los siguientes indicadores químicos: índice de peróxidos, dienos conjugados, índice de p-anisidina y acidez láctica titulable.

Extracción de lípidos para la determinación de peróxidos y dienos conjugados. Se tomaron 20 g de queso y se transfirió a un vaso de precipitados. Se añadió 50 mL cloroformo-metanol (2: 1 v/v). La mezcla se agitó en un shaker durante 30 minutos. Posteriormente cada muestra se filtró a través de un papel Whatman N° 1. El filtrado fue concentrado en evaporador rotatorio. De est manera se obtuvo materia grasa para analizar los indicadores químicos de oxidación lipídica (Kristensen *et al.*, 2001).

Índice de peróxidos (IP). Se realizó según el procedimiento descrito para el aceite de oliva. Se pesaron 5 g de aceite de cada muestra. El valor final se calculó con la fórmula:

$$\text{IP (mEqO}_2\text{/kg)} = (\text{volumen en mL de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times (0,1\text{N}) \times (1000/\text{g aceite}).$$

Dienos conjugados (DC). Se realizaron con el procedimiento descrito para el aceite de oliva. Se disolvieron 0,1 g de lípidos extraídos en 6 mL de n-hexano. Se midieron las absorbancias a 232 nm de las muestras para la determinación de los dienos conjugados. Los resultados se informaron como coeficiente de extinción E (1%, 1 cm) de acuerdo con el procedimiento COI (COI, 2001).

Índice de p-anisidina (IAN). Se determinó de acuerdo al procedimiento descrito para el aceite de oliva, utilizando en este caso la materia grasa extraída de la ricota.

Acidez total titulable o acidez láctica (ATT). Se determinó por titulación con Na(OH) 0,1 N (AOAC, 2007). Las muestras de ricota (10 g) se transfirieron a un matraz Erlenmeyer que contenía 9 mL de H₂O destilada. Se agregaron 3-5 gotas de 0,1% fenolftaleína para utilizarse como indicador de pH. A continuación, la muestra se tituló con Na(OH) 0,1 N hasta que la

solución desarrolló un color rosa consistente. La cantidad de ácido producido durante la fermentación se calculó como sigue:

Porcentaje de ácido láctico (%): $(V) \text{ Na OH} \times 0.009 \times 0.1 \text{ N} \times 100$ (Ec. 5.6)

Donde V es el volumen de Na (OH) requerido para neutralizar la acidez.

Las muestras de ricota que se iban extrayendo del almacenaje, también fueron sometidas a un análisis sensorial descriptivo para poder conocer si se modificaban las intensidades de sus atributos sensoriales. Para ello, fue necesario realizar análisis sensorial descriptivo con la participación de un panel de jueces sensoriales entrenados.

Análisis sensorial descriptivo. La evaluación sensorial de las muestras se realizó según el procedimiento descrito en el Capítulo 4. El sistema de recolección de datos utilizado fue el mencionado en dicho procedimiento.

Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y microbiológicos en queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano.

El queso Cottage entero orgánico marca “Organic Valley” fue comprado en un supermercado local (New Jersey, New York, USA). Se añadieron 0,05% (p/p) de los aceites esenciales de orégano (Com, Cor, Crio y Men) y además en este estudio de almacenaje se preparó un tratamiento con timol (SIGMA ® St. Louis, MO, EEUU) que también fue agregado al 0.05% p/p. Las muestras de queso Cottage fueron mezcladas con una batidora de cocina durante 8 minutos para homogeneizar la distribución del aceite esencial. La muestra control (C) tuvo el mismo tratamiento que las otras muestras pero sin la adición de los aceites esenciales o timol. El queso se transfirió a recipientes de plástico de 50 mL y se almacenó bajo dos condiciones distintas: 23 °C y 40 °C hasta análisis. Las muestras se analizaron cada 10 días durante 30 días.

Los tratamientos resultantes fueron doce (12):

a) Tratamientos almacenados a 23 °C (temperatura ambiente) (A): Queso sin aceite esencial (CA), queso con aceites esenciales de orégano (A-Com, A-Cor, A-Crio y A-Men) y timol (A-Timol).

b) Tratamientos almacenados a 40 °C (en Estufa) (E): queso sin aceite esencial (CE), queso con aceites esenciales de orégano (E-Com, E-Cor, E-Crio, E-Men) y timol (E-timol)

Se determinaron los siguientes indicadores químicos de oxidación en las muestras que se retiraban del almacenaje: Valor Hidroperóxido (VH), dienos conjugados (DC), pH, acidez titulable total (ATT), y los ácidos orgánicos. Además, se analizó el perfil de ácidos grasos cada 10 días durante 40 días.

Hidroperóxidos (HP). Para la medición de hidroperóxidos de los lípidos de las muestras de queso, la preparación se realizó de acuerdo a Dalsgaard *et al.* (2011). 1g de queso cottage se dispersó en 5 mL de agua desmineralizada y se mezcló con un Ultraturrax durante 45 segundos. Los hidroperóxidos se extrajeron de una mezcla de 10 mL de metanol: cloroformo (1:1, v/v). Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 G. A continuación, 1 mL de la fase de cloroformo se transfirió a tubos de ensayo y se mezclaron con 1 mL de solución de tiocianato de hierro (II) de acuerdo con el estándar IDF, 74A:1991 (Dalsgaard *et al.*, 2011) modificado por Østdal *et al.*, (2000). Finalmente, se midió la absorbancia desde 500 nm hasta 700 nm, y la cuantificación se basó en estándares externos utilizando una curva de calibración hecha con las concentraciones de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, y 20,0 g/mL de hierro (III). Las muestras se analizaron por triplicado.

Extracción de lípidos. A partir de una muestra de 20 g de queso, se le añadió cloroformo-metanol (2: 1 v/v; 50 mL). La mezcla se agito en un shaker durante 30 minutos. Posteriormente cada muestra se filtró a través de un papel Whatman N° 1. El filtrado se concentró en un evaporador rotario. Como resultado de este procedimiento se obtuvo materia grasa de las muestras de queso cottage (Kristensen *et al.*, 2001). A partir de esta materia grasa se determinaron los dienos conjugados y se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Los **dienos conjugados (DC)**. Se realizaron siguiendo el procedimiento descrito para el aceite de oliva. Se disolvieron 0,1 g de lípidos extraído en 6 mL de n-hexano. Los dienos conjugados se midieron a 232 nm. Los resultados se informaron como coeficiente de extinción E (1%, 1 cm) de acuerdo con COI (2001).

Ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). Los ésteres metílicos se prepararon a partir de los lípidos extraídos del queso por transmetilación con una solución 30 g L⁻¹ de ácido sulfúrico

en metanol (Grosso *et al.*, 2000). Los EMAG se analizaron en un cromatógrafo Agilent Serie 6890, detector selectivo de masas, Agilent 5973, equipado además con un detector de ionización de llama. Se utilizó una columna capilar Omega-Wax Suppelco (60m x 0.25 mm x 0.25 µm). La temperatura de la columna se incrementó de 100 a 250°C utilizando una rampa de 10°C/min hasta 200°C y luego 5° C/min hasta 250°C. El gas portador fue nitrógeno a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los EMAG se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de muestras auténticas adquiridas de Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EE.UU.) y sus espectros de masa con la librería Wiley 2005. El análisis de ácidos grasos cuantitativo, se realizó usando el ácido heptadecanoico (Sigma Chemical Co.) como estándar interno.

Determinación de pH y de la acidez total titulable o acidez láctica (ATT). Las muestras de queso Cottage se homogeneizaron inicialmente con un Ultrataurux durante 60 segundos en agua (1:9 relación). El pH del queso homogeneizado se leyó usando un medidor de pH digital (Amirdivani y Salihin Baba, 2011).

La **ATT** se determinó por titulación con Na (OH) 0,1 N (AOAC 2007.). Se agregó 9 mL de H₂O destilada a 10 g de queso. Después, se agregaron 3-5 gotas de 0,1% fenolftaleína que se utilizó como indicador de pH. A continuación, la mezcla de la muestra se tituló con Na (OH) 0,1 N hasta el desarrollo de un color rosa consistente. La cantidad de ácido producido durante la fermentación se calculó como sigue (Amirdivani y Salihin Baba, 2011):

$$\text{Porcentaje de ácido láctico (\%)}: (V) \text{ Na OH} \times 0.009 \times 0.1 \text{ N} \times 100 \text{ (Ec. 5.7)}$$

Donde V es el volumen de Na (OH) requerido para neutralizar la acidez.

Determinación ácidos orgánicos (AO). Se determinaron los contenidos de ácidos láctico, acético, cítrico, pirúvico, fórmico y butírico en las muestras de queso mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según lo descrito por Murtaza *et al.* (2012). A cada muestra de queso (7 g) se le añadió 40 mL de fase móvil (acetonitrilo-fosfato de amonio). A esta solución se la agitó durante 1 hora para la extracción de los ácidos orgánicos. Luego se centrifugó a 1050 g durante 15 min. El sobrenadante se filtró dos veces a través de un filtro de 0,45 µm de membrana (Sartorius SM 11606, Goettingen, Alemania). Los ácidos orgánicos obtenidos se analizaron por cromatografía líquida de alta presión utilizando un HPLC Waters 2695. El

detector UV se fijó en 214 nm. Las condiciones de funcionamiento fueron: fase móvil, 0,5% (NH₄) H₂PO₄ (0,038 M) (p/ v) - 0,2% (v/v) acetonitrilo (0,049 M) en agua. Se ajustó el pH a 2,24 con H₃PO₄. El flujo se fijó en 0,5 mL/min y la temperatura de la columna fue 23 °C. Se utilizó una columna de fase inversa Skim-Pack C18 (LC) (Shimadzu Corporation). Se utilizaron estándares de ácidos orgánicos (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para realizar las curvas de calibración de acético, cítrico, fórmico, láctico, propiónico y pirúvico y poder cuantificar cada pico de la muestra.

Recuento de microorganismos mesófilos totales. Se realizó recuento de microorganismos en todas las muestras extraídas del almacenaje cada diez días. A partir de un 1 g de muestra de queso cottage se realizaron diluciones en base 10 en tubos conteniendo 9 mL de agua peptonada. Una vez realizada todas las diluciones, se sembraron en placas conteniendo agar tripticosa soya. Cada dilución se sembró por duplicado. Luego de 24 horas de incubación, se contó cada dilución sembrada junto a su duplicado. Se eligió aquella placa cuyo recuento no superó las 300 colonias ni fue menor a 30, teniendo en cuenta que la placa y su duplicado deben ser lo más homogéneo en la cantidad de colonias. De las diluciones que presentaron números dentro de este rango se utilizó para la formula la placa que correspondía a la más diluida.

$$\text{UFC/g} \times (\text{promedio}) \times \text{Fd} \times \text{Fa}$$

Fd = factor de dilución. Es la inversa de la dilución.

Fa = Factor de alícuota.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron en tres repeticiones. Sobre los resultados obtenidos se calcularon los siguientes estadísticos (Di Rienzo *et al.*, 2012).

1. Determinación de medias y desvíos estándar.
2. Análisis de varianza y test de LSD Fisher, $\alpha = 0.05$
3. Estimación de Modelos Lineales y Mixtos, test DCG o LSD Fisher ($\alpha = 0.05$).
4. Coeficientes de regresión lineal.
5. Coeficientes de Correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de almacenaje: evaluación cambios químicos y sensoriales en aceite de oliva extra-virgen saborizado con aceite esencial de orégano.

Estudio de almacenaje. Evaluación de cambios químicos del aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano.

Los resultados de los análisis químicos, incluyendo K232, K268, contenido de clorofila (mg/kg), contenido de carotenoides (mg/kg), porcentaje de ácido graso libre (AL %), índice de peróxido (IP), e índice de p-anisidina (IAN) que se obtuvieron durante el almacenamiento de las muestras de aceite de oliva extra-virgen con el agregado de aceite esencial de orégano se presentan en la Figura 5.1 y la Tabla 5.2. Todas estas variables químicas mostraron diferencias significativas entre las muestras de aceite de oliva durante los 126 días de almacenaje ($\alpha = 0,05$).

Los valores de K232 (dienos conjugados) se relacionan con la formación de hidroperóxidos y compuestos carboxílicos, mientras que los valores de K268 (trienos conjugados) dependen de los productos secundarios de oxidación formados a partir de los compuestos iniciales detectados a 232 nm (Ancin y Martínez, 1991). Las muestras con la adición de aceite esencial de orégano almacenadas en la oscuridad mostraron menores valores de K232 en los 126 días de almacenamiento (Tabla. 5.12). Los valores más altos para K232 y K268 se encontraron en CL (3,9 y 0,72, respectivamente). Los tratamientos en la oscuridad se asociaron con una menor oxidación en comparación con las muestras expuestas a la luz. O-Com presentó el valor más bajo de K232, durante el almacenaje no presentando diferencias significativas para esta variable a lo largo del almacenaje. Este tratamiento fue seguido por el de O-Crio. L-Crio también exhibió una buena actividad antioxidante, ya que mostró el valor más bajo de K232 (3,41) con respecto a los otros tratamientos mantenidos bajo las mismas condiciones (Tabla 5.2). Pokorny *et al.*, (2011) informaron que el efecto antioxidante de una molécula determinada está relacionada con su participación en los radicales formados durante las reacciones en cadena. La acción inhibidora de un componente antioxidante podría explicarse por su capacidad de bloquear el proceso de reacciones en cadena de radicales. El timol y el carvacrol son moléculas isoméricas que pueden frenar las reacciones de iniciación de la cadena durante la oxidación de los triglicéridos de un aceite vegetal. Además, carvacrol puede participar bloqueando la reacción de

propagación de la cadena, pero el timol, no. Al parecer, timol es un antioxidante más activo y eficaz que el carvacrol (Pokorny *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2013). Los resultados observados en el presente estudio se podrían atribuir a la composición química del AE-Crio que presenta un alto contenido en fenoles con sustitución orto como el carvacrol y el terpinen-4-ol, ambos componentes conocidos por su actividad antioxidante (Muchuweti *et al.*, 2007; Dambolena *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2011). Si comparamos todas los tratamientos durante el almacenaje, la muestra L-Crio presentó diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) con respecto al resto de los tratamientos expuestos a la luz (Fig. 5.1, a)

Con respecto a los trienos conjugados (K268), la muestra control que no tiene el agregado de aceite esencial de orégano en presencia de luz (CL) después de 126 días de almacenaje presentó el valor más alto para este indicador, siendo significativamente distinta al resto de los tratamientos (Fig. 5.1, b).

Las clorofilas y los carotenoides son los principales responsables del color del aceite de oliva virgen, que varía desde amarillo-verde a verde-oro. Estos compuestos juegan un papel muy importante en la estabilidad oxidativa debido a su naturaleza antioxidante en oscuridad y pro-oxidante en presencia de luz (Criado *et al.*, 2008). El color es una propiedad sensorial que tiene una fuerte influencia sobre la aceptabilidad de alimentos. Es por esta razón, que el color contribuye de manera decisiva en las percepciones iniciales de los consumidores sobre la calidad de los alimentos (Cerretani *et al.*, 2009). En el presente estudio, la clorofila y el contenido de carotenoides (mg/kg) mostraron diferencias considerables, no sólo entre los tratamientos con aceite esencial de orégano, sino también con respecto a las condiciones de almacenaje: exposición de luz y oscuridad (Tabla 5.2).

Después de 63 días de almacenamiento, los tratamientos en oscuridad mostraron diferencias respecto a los almacenados bajo luz artificial (Tabla 5.2). A 126 días de almacenamiento, el efecto protector de los aceites esenciales de orégano no se observó para el contenido de clorofila en los tratamientos expuestos a la luz. Sin embargo, los tratamientos de aceite oliva con el agregado de AE de orégano en la oscuridad mostraron los valores más altos para éste parámetro químico de calidad. Los contenidos de clorofila más altos fueron los de las muestras O-Cor y O-Crio (2,91 y 2,88 mg/kg, respectivamente). Ambos AE tuvieron alto contenido en terpenos oxigenados (timol, terpinen-4-ol, cimol). Estos componentes podrían ser

los responsables de la actividad antioxidante en estos AE (Dambolena *et al.*, 2010) y de su efecto protector de la clorofila en las muestras de aceite de oliva aromatizado con dichos AE de orégano. Investigaciones anteriores han demostrado el efecto protector de aceites esenciales de romero, tomillo y limón en aceite de oliva, pero sólo después de 28 y 55 días de almacenamiento (Ayadi *et al.*, 2009). El proceso de degradación de la clorofila y carotenoides presentes en el aceite de oliva es muy complejo. La principal dificultad en la comprensión de los pasos de la degradación, es que estos pigmentos producen diferentes productos finales (Criado *et al.*, 2008). Compuestos carotenoides son más sensibles a la temperatura que la clorofila. La presencia de oxígeno es un factor importante en la degradación de compuestos carotenoides; incluso una concentración baja de oxígeno conduce a la pérdida de este pigmento (Ayadi *et al.*, 2009). Se ha informado que, en paralelo a la presencia de oxígeno, los radicales libres también pueden acelerar la velocidad de degradación de los carotenoides (Criado *et al.*, 2008). En cuanto al contenido de carotenoides, los tratamientos con aceite esencial de orégano almacenados en oscuridad mostraron un mejor comportamiento de acuerdo los resultados observados en este estudio de almacenaje, presentando el contenido más alto de carotenoides las muestras Control, Com y Cor (1,37, 1,35 y 1,31 mg/kg, respectivamente) (Tabla 5.2). Este efecto podría atribuirse a una menor tasa de oxidación en los tratamientos en la oscuridad en comparación con los tratamientos expuestos a la luz. Además, la oxidación de los carotenoides depende de la oxidación simultánea de grasas no saturadas (Ayadi *et al.*, 2009). Las grasas no saturadas en aceite de oliva se oxidan probablemente por reacciones de autooxidación, y los productos de oxidación a partir de entonces oxidan los compuestos carotenoides.

La hidrólisis de los lípidos genera ácidos grasos libres por reacciones químicas o enzimáticas. Este fenómeno es de especial interés en matrices lipídicas que contienen agua, como el aceite de oliva virgen. Los ácidos grasos libres incrementan la susceptibilidad a la degradación oxidativa y también contribuyen a la reducción de la vida útil del producto (Lozano-Sánchez *et al.*, 2010). En este estudio de almacenamiento, los valores de AL fueron inferiores a los límites establecidos por el Reglamento 2568/91 para el aceite de oliva extra-virgen (Tabla 5.2) de la UE. Este indicador de deterioro de lípidos no mostró diferencias significativas entre las muestras durante el almacenaje, a pesar del hecho de que estos valores se incrementaron durante el mismo.

El índice de peróxido es el indicador químico que demostró mayores cambios durante el almacenamiento. Como se observó en los otros indicadores químicos analizados, el efecto de la exposición a la luz en las muestras de aceite de oliva también fue notablemente evidente con respecto a las muestras en oscuridad (Tabla 5.2). Por otra parte, la inclusión de los aceites esenciales de orégano en el aceite de oliva mostró actividad antioxidante. El mayor valor de IP fue para CL (54,54 meqO₂/kg) con respecto a los tratamientos expuestos a luz y para CO (29.16 meqO₂/kg) en los tratamientos almacenados en oscuridad. Entre los tratamientos con AE de orégano con exposición a la luz (L-Com, L-Cor, L-Crio y L-Men) no mostraron diferencias significativas en el valor de IP. Para los tratamientos en la oscuridad, el IP más bajo fue la muestra O-Cor (18,71 meqO₂/kg). Este aceite esencial es el que presentó la mejor actividad antioxidante para el aceite de oliva, ya que también mostró buen comportamiento según los resultados observados en los otros indicadores químicos no solo en IP. El alto contenido de fenoles en el AE de orégano de esta variedad podría explicar esta elevada actividad antioxidante (Dambolena *et al.*, 2010). La estabilidad oxidativa de los aceites de oliva aromatizados con la adición de hierbas secas o partes de plantas de tomillo, romero, lavanda, albahaca, limón, salvia blanca, ajo, menta y geranio fueron estudiados anteriormente (Caponio *et al.*, 2003; Ayadi *et al.*, 2009). En esos estudios, se han observado diferentes patrones de deterioro y diferentes cinéticas oxidativas. El aceite de oliva con sabor a albahaca muestra una menor estabilidad oxidativa, seguido por muestras con sabor de limón y tomillo, siendo el aceite de oliva más estable cuando es aromatizado con romero.

El índice p-anisidina es un indicador de productos secundarios de las reacciones de oxidación de lípidos, incluyendo alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, y cetonas (Ancin y Martínez, 1991; Frankel, 2005). Para p-anisidina, el tratamiento O-Cor exhibió el valor más bajo a pesar de no presentar diferencias significativas con otras muestras. Nuevamente este resultado indica que el AE de esta variedad de orégano tendría un buen efecto preservante del aceite de oliva.

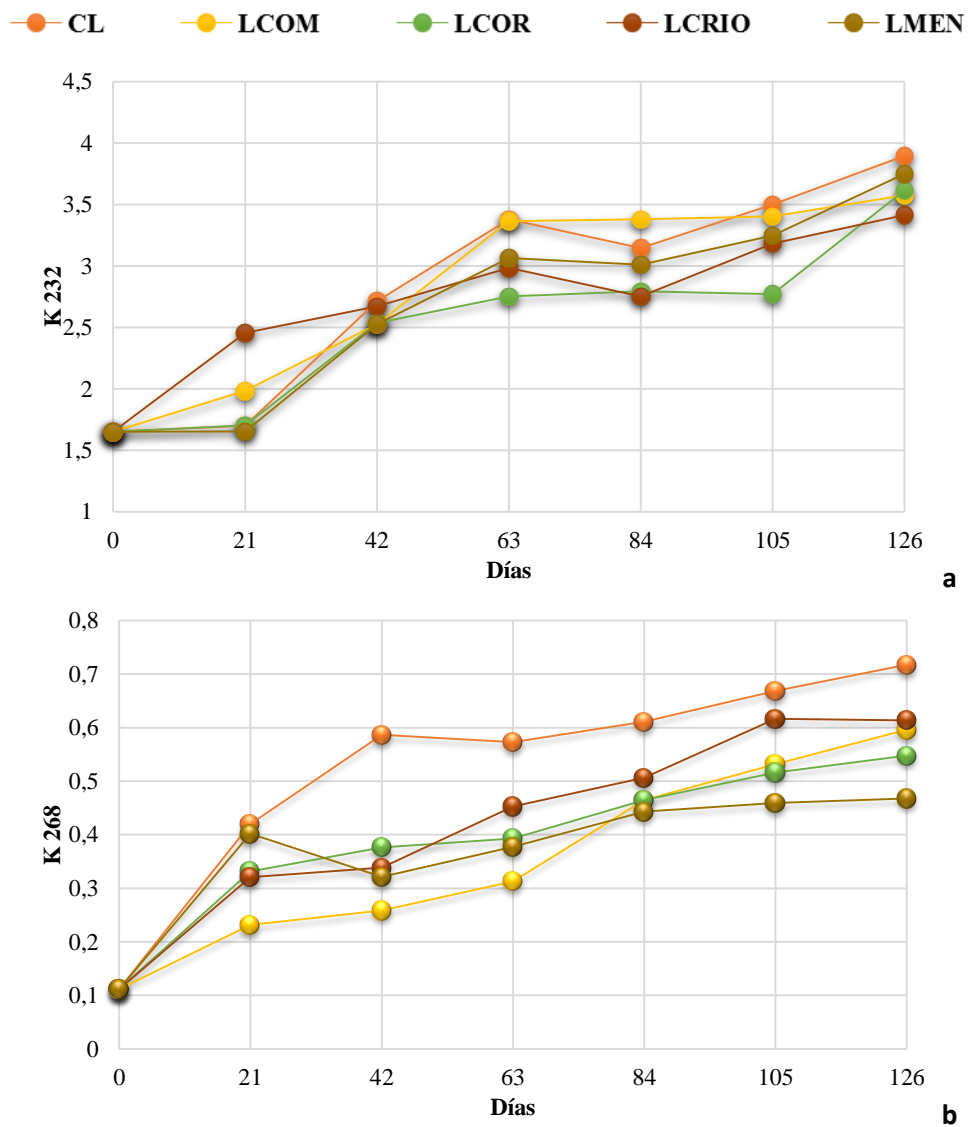


Fig 5.1 Contenidos de (a) K232 (b) K268; (c) clorofilas (mg/kg); (d) índice de peróxidos (meqO₂/kg) y (e) acidez libre (%) para los tratamiento de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de diferentes variedades de orégano expuestos a la luz (CL, LCom, LCor, LCrio y LMen) durante 126 días de almacenaje.

—●— CL —●— LCOM —●— LCOR —●— LCRIO —●— LMEN

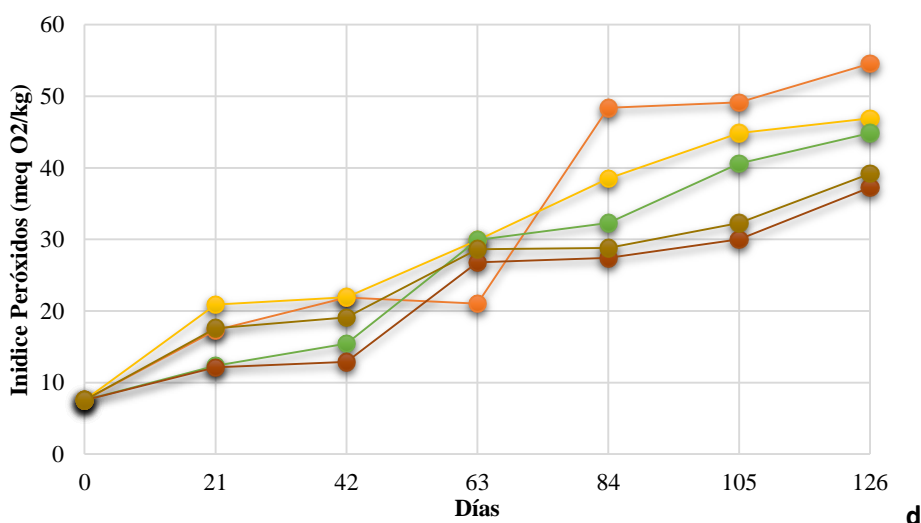
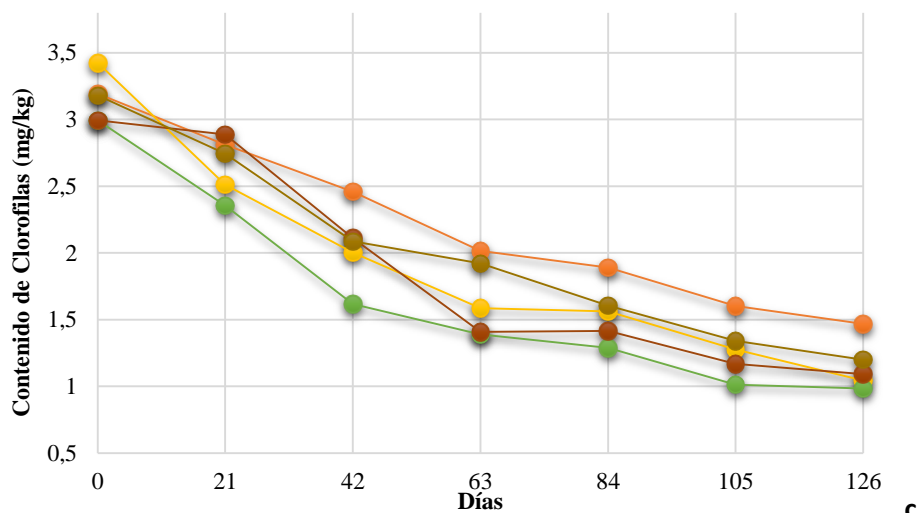


Fig 5.1 (Continuación). Contenidos de (a) K232 (b) K268; (c) clorofilas (mg/kg); (d) índice de peróxidos (meqO₂/kg) y (e) acidez libre (%) para los tratamiento de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de diferentes variedades de orégano expuestos a la luz (CL, LCom, LCor, LCrio y LMen) durante 126 días de almacenaje.

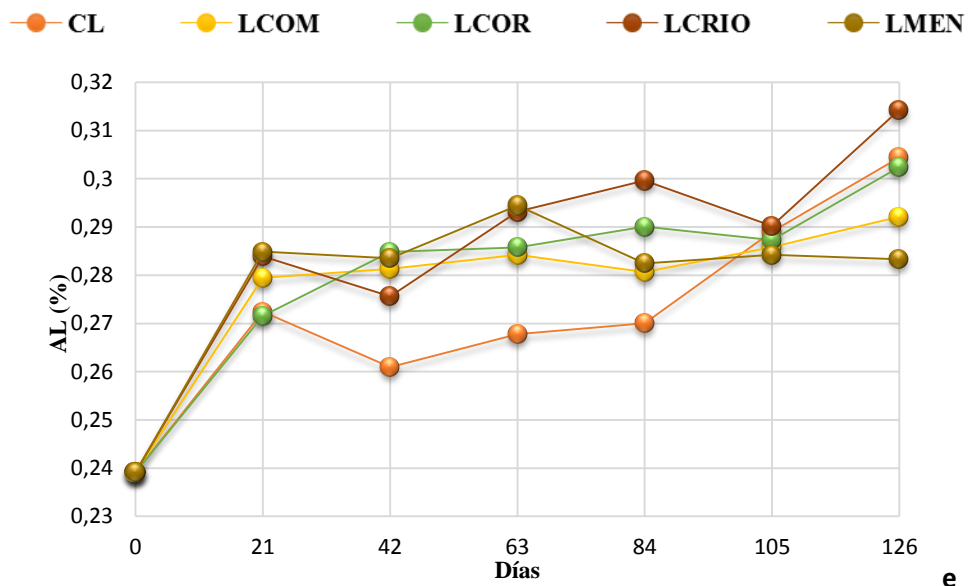


Fig. 5.1 (Continuación). Contenidos de (a) K232 (b) K268; (c) clorofilas (mg/kg); (d) índice de peróxidos (meqO₂/kg) y (e) acidez libre (%) para los tratamiento de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de diferentes variedades de orégano expuestos a la luz (CL, LCom, LCor, LCrio y LMen) durante 126 días de almacenaje.

Tabla 5.2. Valores promedios ($n = 3$) de los indicadores químicos de oxidación medidos en aceite de oliva extra-virgen con el agregado de aceite esencial de orégano analizados en los días 0, 63, 126 de almacenaje.

Día de almacenaje	Aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de orégano ^a									
	L-C ^b	L-Com ^b	L-Cor ^b	L-Crio ^b	L-Men ^b	O-C ^b	O-Com ^b	O-Cor ^b	O-Crio ^b	O-Men ^b
K 232										
Día 0	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁	1,65±0,09 ^a ₁
Día 63	3,38±0,02 ^a ₂	3,37±0,33 ^a ₂	2,75±0,35 ^a ₂	2,98±0,17 ^a ₂	3,07±0,55 ^a ₂	2,37±0,55 ^a ₂	2,62±0,29 ^a ₁	2,73±0,24 ^a ₂	2,81±0,15 ^a ₂	2,11±0,44 ^a ₂
Día 126	3,9±0,39 ^c ₃	3,58±0,12 ^d ₂	3,62±0,21 ^d ₃	3,41±0,26 ^c ₃	3,75±0,24 ^d ₃	3,17±0,24 ^b ₃	3,03±0,04 ^a ₁	3,36±0,19 ^b ₃	3,23±0,19 ^b ₃	3,49±0,13 ^c ₃
K 268										
Día 0	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁	0,11±0,03 ^a ₁
Día 63	0,57±0,16 ^c _{2,3}	0,31±0,07 ^a ₂	0,39±0,04 ^{ab} ₂	0,45±0,09 ^b _{2,3}	0,38±0,04 ^{ab} _{2,3}	0,33±0,02 ^a _{2,3}	0,37±0,08 ^{ab} ₂	0,4±0,06 ^{ab} ₂	0,41±0,04 ^{ab} ₂	0,37±0,02 ^{ab} ₂
Día 126	0,72±0,07 ^d ₃	0,6±0,06 ^c ₃	0,55±0,09 ^b ₃	0,61±0,01 ^c ₃	0,47±0,03 ^{ab} ₃	0,4±0,06 ^a ₃	0,56±0,01 ^b ₃	0,53±0,01 ^{ab} ₃	0,54±0,25 ^{ab} ₃	0,45±0,08 ^{ab} ₂
Contenido de Clorofila (mg/kg)										
Día 0	3,19±0,15 ^{ab} ₁	3,42±0,04 ^b ₁	2,99±0,04 ^a ₁	2,99±0,17 ^a ₁	3,18±0,09 ^{ab} ₁	3,19±0,15 ^{ab} ₁	3,42±0,04 ^b ₁	3,16±0,32 ^{ab} ₁	3,05±0,13 ^a ₁	3,22±0,02 ^{ab} ₁
Día 63	2,02±0,17 ^b ₂	1,59±0,27 ^a ₂	1,39±0,59 ^a ₂	1,41±0,28 ^a ₂	1,92±0,07 ^{ab} ₂	3,08±0,28 ^c _{1,2}	3,08±0,36 ^c ₂	3,13±0,08 ^c ₁	3±0,15 ^c ₁	3,14±0,15 ^c ₁
Día 126	1,47±0,13 ^c ₃	1,04±0,08 ^{ab} ₃	0,98±0,24 ^a ₂	1,09±0,04 ^{ab} ₃	1,2±0,03 ^b ₃	2,87±0,09 ^c ₃	2,71±0,01 ^d ₃	2,91±0,09 ^f ₂	2,88±0,03 ^c ₁	2,82±0,11 ^c ₂
Contenido de Carotenos (mg/kg)										
Día 0	1,44±0,04 ^b ₁	1,4±0,07 ^b ₁	1,24±0,06 ^a ₁	1,4±0,02 ^b ₁	1,5±0,17 ^b ₁	1,42±0,04 ^b ₁	1,44±0,04 ^b ₁	1,37±0,05 ^{ab} ₁	1,4±0,02 ^b ₁	1,5±0,17 ^b ₁
Día 63	1,07±0,06 ^a ₂	1±0,04 ^a ₂	1,06±0,13 ^a ₂	1,07±0,18 ^a ₂	1,09±0,02 ^a ₂	1,4±0,08 ^b ₁	1,41±0,14 ^b ₁	1,3±0,11 ^b ₁	1,37±0,09 ^b ₂	1,39±0,7 ^b _{1,2}
Día 126	0,83±0,12 ^a ₃	0,76±0,06 ^a ₃	0,84±0,04 ^a ₃	0,77±0,05 ^a ₃	0,82±0,01 ^a ₃	1,37±0,08 ^b ₂	1,35±0,12 ^b ₁	1,31±0,09 ^b ₁	1,3±0,08 ^b ₂	1,22±0 ^b ₃
Acidez Libre (%)										
Día 0	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁	0,24±0,01 ^a ₁
Día 63	0,27±0,02 ^a ₂	0,28±0,03 ^a ₂	0,29±0,01 ^a _{2,3}	0,29±0,02 ^a _{1,2}	0,28±0,03 ^a ₂	0,29±0,02 ^a ₂	0,28±0,05 ^a _{1,2}	0,3±0,02 ^a ₂	0,27±0,02 ^a _{1,2}	0,28±0,01 ^a ₂
Día 126	0,3±0,01 ^a ₃	0,29±0,01 ^a ₂	0,3±0,02 ^a ₃	0,31±0,03 ^a ₂	0,31±0,06 ^a ₂	0,28±0,01 ^a ₂	0,29±0,04 ^a ₂	0,31±0,06 ^a ₂	0,29±0,06 ^a ₂	0,3±0,001 ^a ₂
Índice de Peróxido (meqO₂/kg)										
Día 0	7,51±2,66 ^a ₁	7,51±0,98 ^a ₁	7,51±1,87 ^a ₁	7,51±2,05 ^a ₁	7,51±2,1 ^a ₁	7,51±1,13 ^a ₁	7,51±2,23 ^a ₁	7,51±1,25 ^a ₁	7,51±1,44 ^a ₁	7,51±0,99 ^a ₁
Día 63	21±2,66 ^c ₂	20,9±0,98 ^d ₂	29,9±1,87 ^d ₂	26,8±2,05 ^d ₂	28±2,1 ^c ₂	15,5±1,13 ^b ₂	10,7±2,23 ^a ₁	11±1,25 ^a _{1,2}	14,9±1,77 ^a ₂	14,2±0,99 ^b ₂
Día 126	54,54±2,66 ^f ₃	46,93±0,98 ^e ₃	44,85±1,87 ^d ₃	37,23±2,05 ^d ₃	39,19±2,1 ^d ₃	29,16±1,13 ^c ₃	27,3±2,23 ^b ₂	18,71±1,25 ^a ₃	27,53±1,44 ^b ₃	26,31±0,99 ^b ₃

Tabla 5.2 (continuación). Valores promedios ($n = 3$) de los indicadores químicos de oxidación medidos en aceite de oliva extra-virgen con el agregado de aceite esencial de orégano analizados en los días 0, 63, 126 de almacenaje.

Aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de orégano ^a

Día de almacenaje	Índice de anisidina									
	L-C ^b	L-Com ^b	L-Cor ^b	L-Crio ^b	L-Men ^b	O-C ^b	O-Com ^b	O-Cor ^b	O-Crio ^b	O-Men ^b
Día 0	5.91±0 ^a ₁	5.9±0 ^a ₁	5.9±0 ^a ₁	5.9±0 ^a _{1,2}	5.9±0 ^a ₁	5.9±0 ^a ₁	5.9±0 ^a ₁	5.9±0 ^a ₁	6.41±0 ^a ₁	7.67±0 ^b ₁
Día 63	6.01±2.54 ^a ₁	7.16±0.9 ^{ab} ₁	7.9±1.03 ^b ₁	8.58±1.5 ^a ₂	6.75±2.64 ^c ₁	10.5±0.18 ^d ₂	11.1±0 ^{de} ₂	14.4±0 ^f ₂	11.7±0.07 ^e ₂	8.31±0.05 ^{ab} ₁
Día 126	37.03±5.63 ^c ₂	35.33±3.46 ^b ₂	42.49±3.54 ^d ₂	43.65±1.51 ^d ₃	41.22±0.12 ^d ₂	32.58±0.14 ^{ab} ₃	34.63±0.16 ^b ₃	30.79±0.29 ^a ₃	35.13±0.19 ^b ₃	33.75±0.24 ^b ₂

^a Tratamientos: aceite de oliva sin agregado de aceite esencial expuesto a la luz (L-C) y en oscuridad (O-C), aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de diferentes variedades de orégano expuestos a la luz (L-Com, L-Cor, L-Crio y L-Men) y en oscuridad (O-Com, O-Cor, O-Crio y O-Men).

^b Letra diferente en la misma fila significa que hay diferencias significativas para cada variable dependiente analizada entre tratamientos y diferente número en cada columna significa que hay diferencias significativas entre una misma muestras para los períodos analizados ($\alpha = 0,05$)

Las ecuaciones de regresión para las variables dependientes (K232, K268, contenidos de carotenoides y clorofila, AL, IP y IAN) para todos los tratamientos de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano de diferentes variedades se muestran en la Tabla 5.3. El valor de R^2 fue superior a 0,50 en todos los tratamientos para PV, AV, K268, K232 (excepto en D-Com y D-Crio), contenido de clorofila (excepto en CO, OCor y OCrio) y contenido de carotenoides (sólo en los tratamientos expuestos a la luz). El valor más alto de R^2 fue de 0,961 en L-Com en la variable IP. Se encontraron diferencias significativas en la pendiente (β_1) entre las muestras de aceite de oliva para K232, K268, contenidos de clorofila y carotenoides, IP e IAN. AL no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. La pendiente fue inferior en las muestras de aceite de olivas almacenadas en la oscuridad con la adición de aceite esencial de orégano para todas las variables dependientes. O-Cor y O-Crio fueron los tratamientos que tuvieron la β_1 más baja para K232, K268, contenido de clorofilas y carotenoides, IP y AV. Estos resultados indican que los aceites esenciales de orégano Cordobés y Criollo tienen mayor actividad antioxidante y son mejores para la preservación de las propiedades físicas y químicas del aceite de oliva. Esta actividad antioxidante podría explicarse por la composición química de los AE Cordobés y Criollo rico en estructuras químicas con grupos hidroxilos en posiciones orto y para (timol, carvacrol, y 4-terpineol). Kulisic *et al.* (2004) informaron que la fracción de compuestos que contienen oxígeno son los antioxidante más potentes, por lo que sugiere que la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano se debe a los componentes más polares. Los AE de orégano Cordobés y Criollo son los que presentan mayor cantidad de timol (según lo mencionado en el capítulo 2) y de terpinen-4-ol.

El período de inducción para la oxidación del aceite de oliva se define como el tiempo necesario para alcanzar un valor de IP de 70 meqO₂/kg (Nissiotis y Tasioula-Margari, 2002). De acuerdo con el Reglamento Europeo 2568/91, los aceites extra vírgenes deben presentar valores de peróxido por debajo de 20 meqO₂/kg, K268 \leq 0,22 y K232 \leq 2.60. Usando las ecuaciones de regresión, un valor de peróxido de 20 meqO₂/kg de aceite de oliva se debería alcanzar en 34, 31, 42, 44, y 55 días de almacenamiento para CL, LCom, LMen, LCor y LCrio, respectivamente, y en 87, 92, 95, 95, y 126 días de almacenamiento en CO, OCom, OMen, OCrio, y OCor, respectivamente. El aceite esencial de orégano ha demostrado actividad antioxidante en otros productos alimenticios como los maní frito salado-y recubierto prolongando su vida útil (Olmedo *et al.*, 2009; Olmedo *et al.*, 2012).

Tabla 5.3. Ecuaciones de regresión y R² ajustados para las variables dependientes: K232 y K268, contenidos de clorofila y carotenos, acidez libre, índice de peróxidos e índice de anisidina en muestras de aceite de oliva expuestas a la luz y en oscuridad: control (L-C y D-C) con el agregado de aceite esencial de orégano de las variedades Compacto (L-Com y D-Com), Cordobés (L-Cor y D-Cor), Criollo (L-Crio y D-Crio), y Mendocino (L-Men y D-Men) almacenadas durante 126 días a temperatura ambiente.

Coeficientes de regresión	Muestras de aceite de oliva saborizadas con aceites esenciales de orégano									
	L-C	L-Com	L-Cor	L-Crio	L-Men	O-C	O-Com	O-Cor	O-Crio	O-Men
K 232										
β_0	1,74	1,827	1,659	2,003	1,633	1,708	1,686	1,594	1,658	1,455
β_1^a	0,016d	0,016d	0,014b	0,012b	0,017d	0,01a	0,011b	0,015c	0,009a	0,015c
R₂	0,75	0,809	0,815	0,69	0,812	0,56	0,222	0,862	0,338	0,751
K 268										
β_0	0,274	0,117	0,202	0,177	0,229	0,138	0,135	0,155	0,162	0,179
β_1^a	0,04b	0,004b	0,003a	0,004b	0,002a	0,002a	0,004b	0,003a	0,003c	0,002a
R₂	0,67	0,782	0,784	0,711	0,5	0,797	0,801	0,78	0,637	0,652
Contenido de Clorofila (mg/kg)										
β_0	3,079	2,992	2,632	2,922	3	3,087	3,408	3,199	3,066	3,279
β_1^a	-0,014b	-0,017a	-0,015a	-0,017a	-0,016a	-0,002d	-0,005c	-0,001d	-0,001d	-0,004c
R₂	0,913	0,872	0,735	0,861	0,93	0,131	0,702	0,023	0,131	0,683
Contenido de Carotenos (mg/kg)										
β_0	1,483	1,458	1,378	1,46	1,516	1,455	1,445	1,372	1,439	1,481
β_1^a	-0,006a	-0,006a	-0,004b	-0,005b	-0,006a	-0,001c	-0,001c	-0,001c	-0,001c	-0,002c
R₂	0,898	0,911	0,733	0,932	0,878	0,354	0,209	0,171	0,232	0,595
Acidez Libre (%)										
β_0	0,247	0,259	0,256	0,257	0,252	0,265	0,258	0,263	0,261	0,259
β_1^a	3,90E-04a	2,90E-04a	3,90E-04a	4,50E-04a	4,30E-04a	2,20E-04a	2,40E-04a	3,80E-04a	2,40E-04a	3,00E-04a
R₂	0,515	0,321	0,619	0,212	0,412	0,2	0,147	0,287	0,138	0,391
Índice de Peróxido (meqO₂/kg)										
β_0	6,627	10,111	6,268	7,046	10,37	5,596	5,093	6,302	5,21	5,875
β_1^a	0,393e	0,315d	0,315d	0,237c	0,228c	0,165b	0,157b	0,094a	0,161b	0,149b
R₂	0,866	0,961	0,935	0,871	0,869	0,899	0,699	0,806	0,814	0,912

Tabla 5.3 (Continuación). Ecuaciones de regresión y R^2 ajustados para las variables dependientes: K232 y K268, contenidos de clorofila y carotenos, acidez libre, índice de peróxidos e índice de anisidina en muestras de aceite de oliva expuestas a la luz y en oscuridad: control (L-C y D-C) con el agregado de aceite esencial de orégano de las variedades Compacto (L-Com y D-Com), Cordobés (L-Cor y D-Cor), Criollo (L-Crio y D-Crio), y Mendocino (L-Men y D-Men) almacenadas durante 126 días a temperatura ambiente.

Coeficientes de regresión	Muestras de aceite de oliva saborizadas con aceites esenciales de orégano									
	L-C	L-Com	L-Cor	L-Crio	L-Men	O-C	O-Com	O-Cor	O-Crio	O-Men
	Índice de anisidina									
β_0	-1,036	-0,658	-1,809	-2,677	-2,16	1,284	1,142	1,949	0,896	0,496
β_1^a	0,259b	0,26b	0,293c	0,339d	0,3c	0,246a	0,262b	0,251a	0,259b	0,262b
R_2	0,793	0,822	0,812	0,828	0,793	0,847	0,85	0,855	0,901	0,766

^a Letras en la misma columna para cada variable dependiente significa que hay diferencias significativas para cada variable dependiente analizada entre tratamientos.

El biplot obtenido de las dos componentes principales (CP) en el Análisis de Componentes Principales (ACP) se presenta en la Figura 5.2. Las dos primeras componentes principales explicaron el 84,8% de la variabilidad en las muestras durante los 126 días de almacenamiento. La CP 1 representó el 62,9% de la variabilidad, mientras que la CP2 el 21,9%. Las variables DC (K232), IP, y TC (K268) se ubicaron en el lado derecho de la CP1, mientras que acidez (AL), IAN y contenidos de carotenos y clorofilas se ubicaron en el lado izquierdo.

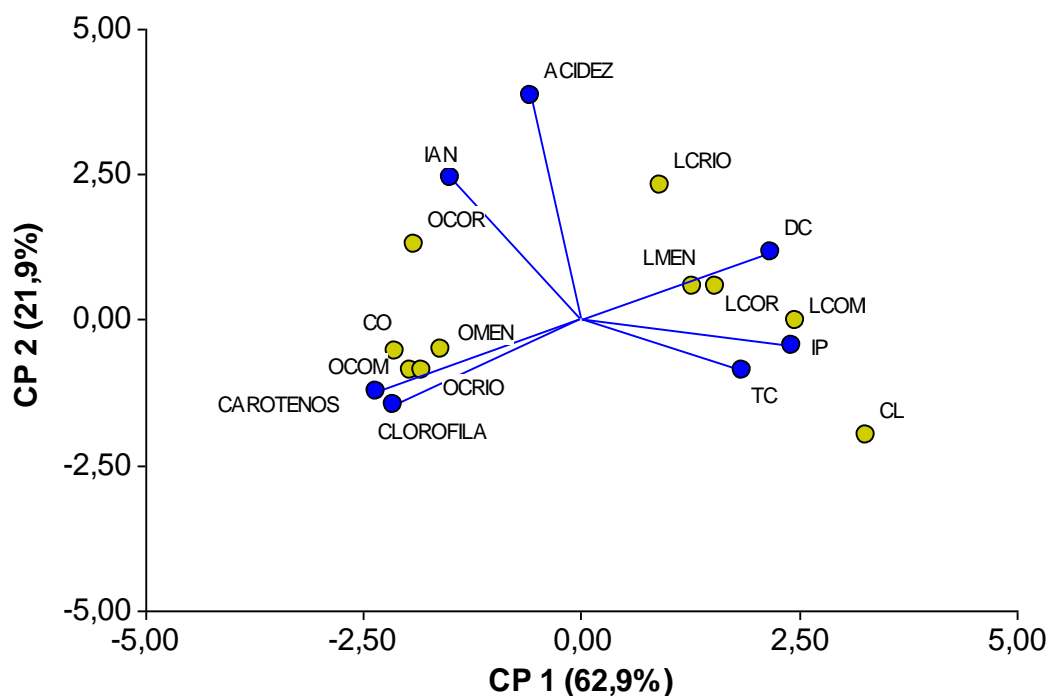


Fig. 5.2 Biplot de la primera y segunda componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP). Variables dependientes analizadas: contenidos de clorofilas, contenido de carotenos, índice de anisidina (IAN), índice de peróxido (IP), dienos conjugados (DC), trienos conjugados (TC) y acidez libre (Acidez). Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente).

Las muestras de aceite de oliva que mostraron valores más altos para las variables DC, TC e IP se colocaron en el lado derecho de la bi espacial (L-Crio, L-Men, L-Cor, L-Com, y LC). Los indicadores químicos de la oxidación de lípidos (K232, K268 y IP) se encontraron positivamente relacionados entre sí (ángulo entre los vectores menor a 90°) y altamente

correlacionados con los tratamientos de aceite de oliva expuestos a la luz. Se observó una fuerte asociación entre el IP con TC (K268). CL y LCom son los tratamientos más cercanos de las variables K232, IP y K268, mientras que LCrio mostró poca asociación con los otros tratamientos de exposición a la luz.

La dispersión de los puntos mostró una gran variabilidad entre las muestras. Los tratamientos de aceite de oliva con los valores más bajos para las variables relacionadas con la oxidación de lípidos se colocaron en la parte izquierda (valores negativos en el CP 1) del biplot. CO, O-Com, O-Crio y O-Men se encontraron altamente asociados con el contenido de carotenoides y clorofilas en contraste con los tratamientos expuestos a la luz y las variables relacionadas con la oxidación de lípidos (K232, IP y K268). Cabe destacar que estos indicadores de oxidación lipídica se presentaron negativamente relacionados con los contenidos de clorofila y carotenos, debido a la ubicación espacial de los vectores (casi 180°).

Los valores de IAN y Acidez no se encontraron correlacionados con ninguna otra variable, y su ubicación en el lado izquierdo del biplot podría atribuirse al escaso incremento de estos indicadores en el tiempo y a la inexistencia de diferencias significativas entre sus muestras.

Los resultados del análisis de conglomerados de los tratamientos de aceite de oliva saborizados con aceites esenciales de orégano de diferentes variedades, teniendo en cuenta las variables dependientes analizadas, se presentan como un dendograma de la Figura 5.3. Se obtuvieron cuatro grupos: Grupo 1 formado sólo por CL; Grupo 2 formado por todos los tratamientos en la oscuridad (CO, O-Com, O-Cor, O-Crio y O-Men); Grupo 3 constituido por los tratamientos con la adición de aceite esencial de orégano expuesto a la luz (L-Cor, L-Men y L-Com), con excepción de L-Crio que conformó el Grupo 4.

Los valores medios de las variables químicas de cada grupo de muestras de aceite de oliva obtenidos del análisis de conglomerados se presentan en la Tabla 5.4. Se detectaron diferencias significativas entre los grupos para la mayoría de las variables. EL Grupo 2 (CO, O-Com, O-Cor, O-Crio y O-Men) obtuvo los valores más bajos de K232 y K268 y los contenidos más elevados de clorofila y carotenoides. Este grupo fue significativamente diferente de los otros grupos. El Grupo 4 (L-Crio) fue significativamente diferente del Grupo 3 teniendo en cuenta las variables anteriormente mencionadas. Por lo tanto, L-Crio mostró una mejor protección para el aceite de oliva contra el deterioro en los tratamientos de exposición a la luz. Además, los Grupos

2 y 4 obtuvieron los valores más bajos para IP y no mostraron diferencias significativas entre ellos, lo que confirma la actividad antioxidante del aceites esencial de orégano en estos grupos. Para los valores de IAN no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

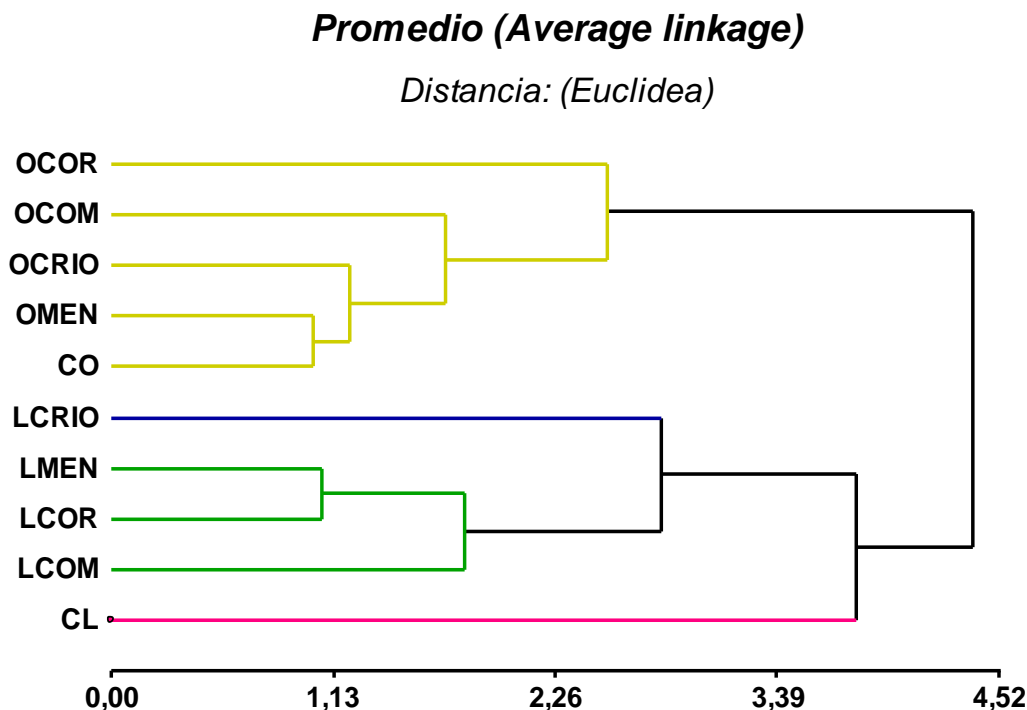


Fig. 5.3. Dendrograma del Análisis de Cluster de las muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de diferentes variedades de orégano. Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente). Variables dependientes: contenidos de clorofilas, contenido de carotenos, índice de anisidina, índice de peróxido, dienos conjugados, trienos conjugados y acidez libre.

Tabla 5.4 Medias y desvíos estándares para grupos de tratamientos de aceite de olive obtenidos del dendrograma considerando las variables químicas.

Grupos de tratamientos	K 232 ^a			K 268 ^a			Contenido de Clorofilas (mg/kg) ^a			Contenido de carotenos (mg/kg) ^a			Acidez libre(%) ^a			Índice peróxidos (meqO ₂ /kg) ^a			Índice Anisidina ^a		
	Media	n	E.E.	Media	n	E.E.	Media	n	E.E.	Media	n	E.E.	Media	n	E.E.	Media	n	E.E.	Media	n	E.E.
Grupo 1	2,77	21	0,16 b	0,52	21	0,04 b	2,24	21	0,1 b	1,12	21	0,04 a	0,27	21	0,01 a	31,4	21	2,44 b	15,31	21	2,8 a
Grupo 2	2,34	84	0,08 a	0,33	84	0,02 a	3,03	84	0,1 c	1,38	84	0,02 c	0,28	84	2,90E-03 ab	15,2	84	1,26 a	17,3	84	1,41 a
Grupo 3	2,7	63	0,09 b	0,37	63	0,02 a	1,86	63	0,1 a	1,12	63	0,02 a	0,28	63	3,40E-03 ab	27,2	63	1,43 b	16,37	63	1,62 a
Grupo 4	2,63	42	0,12 b	0,38	42	0,03 a	2,51	42	0,1 b	1,22	42	0,03 b	0,29	42	4,10E-03 b	17,1	42	1,73 a	18,22	42	1,98 a

^a Letra distinta en cada columna indica que hay diferencias significativas entre los grupos para las variables analizadas ($\alpha = 0.05$)

Estudio de almacenaje. Análisis Sensorial del aceite de oliva con el agregado de aceites esenciales de orégano.

Los resultados de la evaluación sensorial de las muestras de aceite de oliva adicionadas con aceite esencial de diferentes variedades de orégano almacenadas durante 126 días se presentan en la Tabla 5.5. Los jueces evaluaron la intensidad de cuatro atributos positivos (frutado, picante, amargo y sabor orégano) y uno negativo (rancio) en muestras que fueron extraídas del almacenaje cada 21 días. En la Tabla 5.5 solo se muestran las medias de las intensidades de los atributos positivos y negativos analizados durante el almacenaje para los días 0, 63 y 126. Con respecto a atributos positivos, el sabor frutado presentó cambios durante el almacenaje para todos los tratamientos presentando mayor intensidad al comienzo de almacenamiento, y posteriormente fue disminuyendo al avanzar el tiempo de almacenamiento. Diferencias significativas se observaron entre las muestras. O-Cor tuvo la mayor intensidad para este atributo después de 126 días de almacenaje.

Con respecto al picante (P), la intensidad de este atributo también disminuyó en todos los tratamientos durante el almacenaje. Diferencias significativas se observaron entre los tratamientos. Las muestras expuestas a luz mostraron una mayor disminución de la intensidad de este atributo que las almacenadas en la oscuridad. Los tratamientos con AE de orégano (en condiciones de luz y oscuridad) excepto aquellos con AE Men tuvieron mayores valores de intensidad para picante respecto de las muestras Control expuestas a la luz y en oscuridad, respectivamente. También se encontraron diferencias significativas para este atributo entre las muestras control luego de 12 días de almacenaje.

Las intensidades del atributo amargo también disminuyeron en todas las muestras durante el almacenamiento. O-Cor fue el tratamiento que mejor mantuvo la intensidad de este atributo positivo después de 126 días de almacenaje. En general, los resultados mostraron un comportamiento similar al atributo picante.

El sabor orégano, que solo fue evaluado en las muestras con la adición de dicho aceite esencial, presentó una disminución significativa de la intensidad en todas las muestras. La intensidad más alta para el sabor orégano al comienzo del almacenaje fue para las muestras con el agregado de AE Cordobés. Este mismo tratamiento (O-Cor) conservó la intensidad más alta en todo el almacenamiento presentando diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos.

Con respecto al atributo negativo rancio, todos los tratamientos con AE de orégano tuvieron diferencias significativas respecto a CL, que presentó el valor más alto de rancio después de 126 días de almacenaje. Los tratamientos con orégano expuestos a la luz no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero los tratamientos con AE de orégano en oscuridad mostraron diferencias significativas. O-Com obtuvo la más baja intensidad de sabor rancio al final del almacenamiento.

En la Figura 5.4 se observan las diferencias significativas entre las muestras de aceite de oliva con agregado de aceite esencial de orégano expuesto a la luz y en oscuridad obtenidas mediante el análisis de Modelos Generales, Lineales y Mixtos (MGLM) para cada atributo analizado durante todo el experimento. Los tratamientos con aceite esencial de orégano en oscuridad, especialmente Cor y Crio, son los que presentaron mayor magnitud de atributos positivos para amargo, picante y sabor orégano, siendo significativamente diferente al resto. Los tratamientos expuestos a la luz son los que presentaron mayor intensidad para el atributo rancio.

Los atributos sensoriales positivos como el amargo y el picante están relacionados con la presencia de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva extra-virgen. Los componentes fenólicos disminuyen cuando los aceites de oliva sufren un proceso de oxidación (Inarejos-García *et al.*, 2010). Estudios preliminares confirmaron que la adición de AE Com en aceite de oliva ayuda conservar componentes menores del aceite de oliva como son las clorofilas y los carotenoides y disminuyen los procesos de oxidación de los lípidos (Asensio *et al.*, 2011). La conservación de los atributos positivos, especialmente amargo y picante, en muestras de aceite de oliva con adición de AE de orégano podrían ser explicadas por la actividad antioxidante de dicho AE que disminuye el deterioro oxidativo de compuestos fenólicos. En este estudio, O-Cor podría ser considerado como el tratamiento que mejor conserva los atributos positivos en aceite de oliva extra-virgen.

Tabla 5.5. Atributos positivos y negativos analizados en aceite de oliva saborizados con aceite esencial de orégano evaluados durante 126 días de almacenaje.

Tratamientos	Control-L	Com-L ^b	Cor-L ^b	Crio-L ^b	Men-L ^b	Control-O ^b	Com-O ^b	Cor-O ^b	Crio-O ^b	Men-O ^b
Frutado										
Día 0	5,8±0,11 ^b ₁	5,5±0,13 ^{ab} ₁	5,55±0,14 ^{ab} ₁	5,13±0,26 ^a ₁	5,53±0,13 ^{ab} ₁	5,8±0,1 ^b ₁	5,5±0,16 ^{ab} ₁	5,55±0,14 ^{ab} ₁	5,35±0,13 ^a ₁	5,55±0,13 ^{ab} ₁
Día 63	4,52±0,34 ^a ₂	4,57±0,21 ^a ₂	4,63±0,24 ^a ₂	4,13±0,38 ^a ₂	4,3±0,31 ^a ₂	4,55±0,14 ^a ₂	4,23±0,15 ^a ₁	4,84±0,36 ^a ₂	4,53±0,42 ^a ₂	4,62±0,18 ^a ₂
Día 126	3,62±0,27 ^a ₃	4,03±0,25 ^b ₃	3,77±0,2 ^b ₃	3,65±0,39 ^a ₃	3,48±0,15 ^a ₃	3,73±0,42 ^a ₃	4,23±0,19 ^b ₂	4,52±0,13 ^c ₃	3,78±0,19 ^b ₃	4,1±0,32 ^b ₂
Picante										
Día 0	2,98±0,13 ^{bc} ₁	3,72±0,2 ^{bc} ₁	4,3±0,38 ^a ₁	5,35±0,15 ^c ₁	5,03±0,27 ^{bc} ₁	5±0,13 ^{bc} ₁	5±0,2 ^{bc} ₁	4,6±0,27 ^{ab} ₁	5,36±0,27 ^c ₁	5,23±0,21 ^{bc} ₁
Día 63	2,98±0,14 ^a ₂	3,72±0,35 ^{ab} ₂	3,7±0,35 ^{ab} ₂	3,57±0,38 ^{ab} ₂	3,73±0,23 ^{ab} ₂	3,45±0,2 ^{ab} ₁	3,4±0,35 ^{ab} ₂	3,72±0,37 ^{ab} ₁₂	4,03±0,44 ^b ₂	3,63±0,3 ^{ab} ₂
Día 126	1,77±0,27 ^a ₃	2,73±0,07 ^b ₃	2,4±0,35 ^b ₃	2,93±0,45 ^b ₃	2,15±0,08 ^{ab} ₃	3±0,41 ^c ₂	3,13±0,36 ^d ₃	3,12±0,49 ^d ₂	3,12±0,33 ^d ₃	3,04±0,29 ^c ₃
Amargo										
Día 0	3,3±0,16 ^a ₁	3,67±0,2 ^a ₁	3,85±0,08 ^{ab} ₁	3,62±0,29 ^a ₁	3,28±0,16 ^a ₁	3,3±0,16 ^a ₁	3,37±0,23 ^a ₁	4,35±0,35 ^b ₁	3,62±0,36 ^a ₁	3,34±0,19 ^a ₁
Día 63	2,67±0,17 ^a ₁₂	3,05±0,31 ^a ₁₂	3,13±0,72 ^a ₁₂	2,83±0,32 ^a ₂	2,63±0,15 ^a ₁	2,67±0,17 ^a ₂	3,05±0,31 ^a ₁₂	3,2±0,21 ^a ₁	2,88±0,31 ^a ₁	2,63±0,2 ^a ₁₂
Día 126	2±0,29 ^a ₂	2,62±0,2 ^c ₂	2,53±0,16 ^c ₂	2,62±0,14 ^c ₃	2,32±0,17 ^b ₂	2,32±0,07 ^b ₃	2,63±0,3 ^c ₂	3,12±0,46 ^d ₂	2,83±0,28 ^c ₂	2,23±0,33 ^b ₂
Sabor Orégano										
Día 0	0±0 ^a ₁	5,63±0,29 ^{cd} ₁	6,15±0,27 ^d ₁	4,88±0,32 ^{bc} ₁	4,38±0,5 ^b ₁	0±0 ^a ₁	5,63±0,29 ^{cd} ₁	6,15±0,27 ^d ₁	4,9±0,32 ^{bc} ₁	4,65±0,42 ^b ₁
Día 63	0±0 ^a _{sd}	3,63±0,15 ^d ₂	2,65±0,07 ^b ₁	2,55±0,14 ^b ₂	3,54±0,26 ^d ₁	0±0 ^a ₂	4,15±1,85 ^c ₁	4,24±0,18 ^c ₂	3,23±0,7 ^c ₂	3,32±1,23 ^c ₂
Día 126	0±0 ^c _{sd}	2,12±0,16 ^b ₃	2,12±0,22 ^b ₂	2,35±0,4 ^b ₂	1,93±0,34 ^b ₂	0±0 ^a ₃	2,35±0,61 ^c ₂	3,1±0,62 ^d ₃	2,5±0,54 ^c ₃	2±0,26 ^b ₃
Rancio										
Día 0	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁	0±0 ^a ₁
Día 63	0,35±0,22 ^c ₂	0,07±0,07 ^b ₁	0,4±0,14 ^c ₁₂	0,45±0,19 ^d ₁₂	0,3±0,14 ^c ₂	0,33±0,18 ^c ₂	0,02±0,02 ^a ₁₂	0±0 ^a ₁	0,07±0,07 ^b ₁₂	0,05±0,05 ^{ab} ₁
Día 126	0,88±0,08 ^c ₃	0,78±0,32 ^b ₂	0,85±0,28 ^b ₂	0,66±0,27 ^b ₂	0,78±0,1 ^b ₃	0,58±0,14 ^b ₃	0,25±0,16 ^a ₂	0,64±0,29 ^{ab} ₂	0,35±0,19 ^b ₂	0,68±0,24 ^b ₂

^a Tratamientos de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano: Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) and Mendocino (Men). Aceite de oliva sin aceite esencial (Control). L = exposición a la luz, D = oscuridad.

^b Letras diferentes en la columna para cada variable dependiente significa que hay diferencias significativas para cada variable dependiente analizada entre tratamientos y números diferentes en cada fila significa que hay diferencias significativas entre muestras para los períodos analizados ($\alpha = 0,05$)

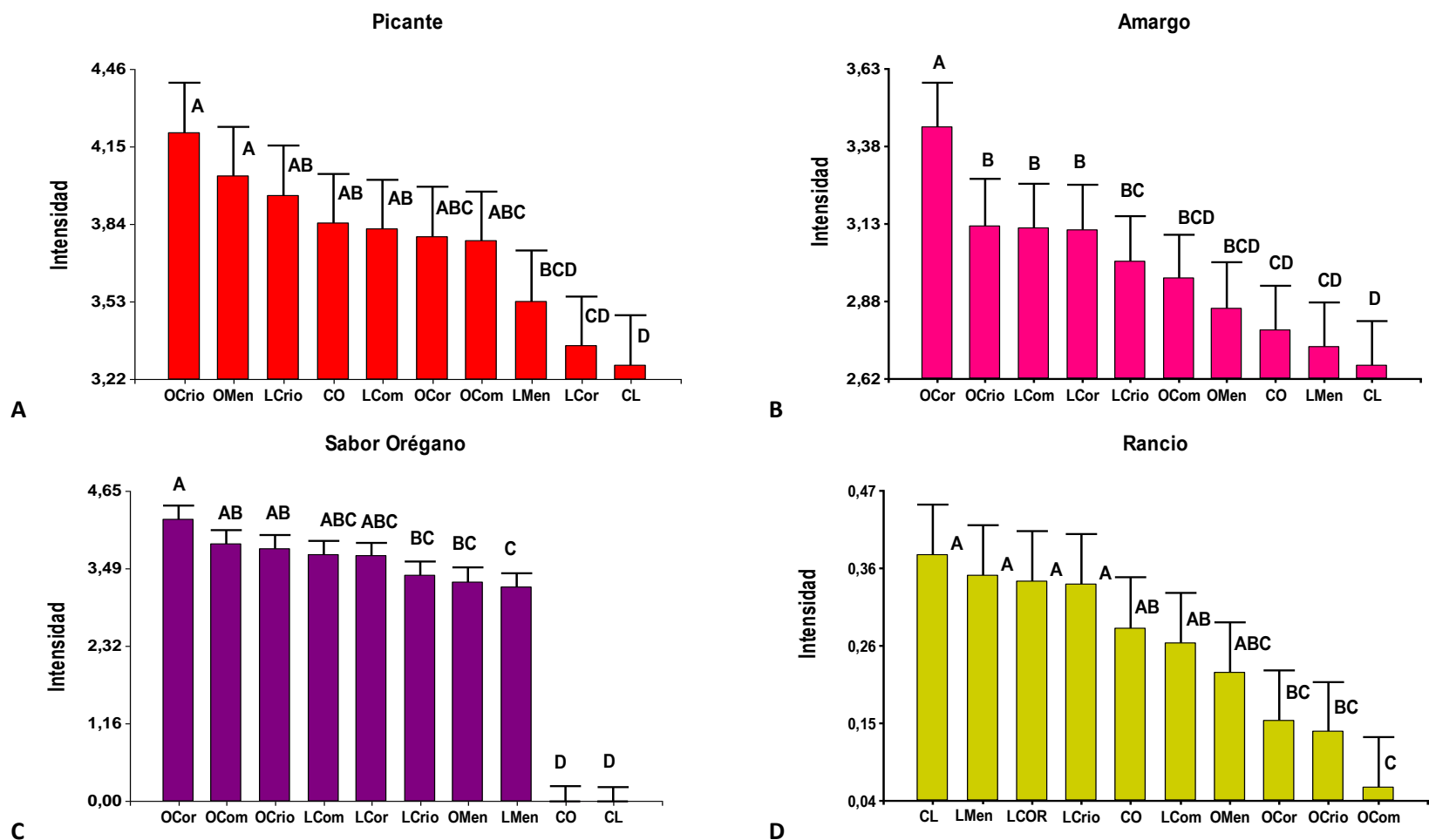


Fig. 5.4. Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test LSD Fisher) a partir de Modelos Generalizados, Lineales y Mixtos para los siguientes atributos sensoriales: A) Picante; B) Amargo; C) Sabor Orégano y D) Rancio. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano de diferentes variedades: Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) y Mendocino (Men). Tratamientos: aceite de oliva sin aceite esencial con exposición a la luz (CL) y en oscuridad (CO), aceite de oliva con aceites esenciales de orégano expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen).

Tabla 5.6. Ecuaciones de regresión y R^2 ajustados para los atributos sensoriales frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio en muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano durante 126 días de almacenaje.

Tratamiento	Control-L ^b	Com-L ^b	Cor-L ^b	Crio-L ^b	Men-L ^b	Control-O ^b	Com-O ^b	Cor-O ^b	Crio-O ^b	Men-O ^b
Frutado										
β_0	5,681	5,628	5,269	4,964	5,427	5,566	5,076	5,515	5,369	5,695
β_1^b	-0,018 a	-0,016 ab	-0,011 c	-0,008 d	-0,014 b	-0,010 c	-0,012 bc	-0,014 b	-0,017 a	-0,015 b
R2	0,68	0,56	0,39	0,15	0,59	0,4	0,33	0,59	0,66	0,55
Picante										
β_0	4,651	4,931	5,003	4,792	4,266	4,618	5,024	5,485	5,018	5,089
β_1^b	-0,022 a	-0,017 b	-0,019 b	-0,016 b	-0,015 b	-0,013 c	-0,017 b	-0,020 ab	-0,023 a	-0,018 b
R2	0,72	0,58	0,642	0,44	0,36	0,33	0,46	0,58	0,68	0,58
Amargo										
β_0	3,402	3,244	3,627	3,408	3,701	4,027	3,587	3,459	3,156	3,376
β_1^b	-0,012 a	-0,007 c	-0,008 bc	-0,007 c	-0,009 b	-0,010 b	-0,009 b	-0,006 d	-0,007 c	-0,009 b
R2	0,38	0,38	0,21	0,25	0,27	0,28	0,34	0,21	0,29	0,3
Sabor orégano										
β_0	0	0	5,264	5,475	5,634	5,872	4,74	5,085	4,744	4,795
β_1^b	0 d	0 d	-0,026 b	-0,026 b	-0,032 a	-0,026 b	-0,021 c	-0,023 b	-0,025 b	-0,025 b
R2	0	0	0,77	0,49	0,78	0,67	0,64	0,59	0,54	0,66
Rancio										
β_0	-0,124	-0,039	-0,141	-0,048	-0,114	-0,128	-0,008	-0,056	-0,095	-0,119
β_1^b	0,0081 d	0,0061 bc	0,0062 bc	0,0017 a	0,0071 c	0,0045 b	0,0057 b	0,003 ab	0,0072 c	0,0071 c
R2	0,53	0,37	0,39	0,21	0,4	0,25	0,26	0,24	0,49	0,38

^a Tratamientos de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de oréganos: Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) y Mendocino (Men). Aceite de oliva sin aceite esencial (Control). L = exposición a la luz y D = oscuridad.

^b Letras diferentes en la fila para cada tratamiento significa que hay diferencias significativas en la pendiente (β_1) de la ecuación de regresión ($\alpha = 0,05$)

Las ecuaciones de regresión para las variables dependientes (frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio) de los tratamientos de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano se muestran en la Tabla 5.6. Las pendientes (β_1) para frutado, picante, amargo, y sabor orégano fueron negativas debido a que estos atributos sensoriales disminuyeron su intensidad durante el almacenamiento. Se encontraron diferencias significativas entre las pendientes para dichos atributos. En general, las pendientes, positivas y negativas, de mayor valor para todas las variables dependientes evaluadas fueron observadas en la muestra control expuesta a la luz lo que indica un mayor valor de cambio de su calidad sensorial durante el almacenaje. Mientras que las pendientes más bajas fueron detectadas en los tratamientos de aceite de oliva con la adición de aceite esencial de orégano en oscuridad. El mayor valor R^2 se encontró en el tratamiento L-Com y fue de 0,77 para el atributo sabor orégano. Se detectaron valores de R^2 inferior a 0,50 para el atributo frutado en los tratamientos L-Cor, L-Crio, CO y O-Com, para el atributo picante en los tratamientos L-Crio, L-Men, CO y O-Cor y para el atributo amargo en todos los tratamientos. Estos valores bajos en R^2 se deben probablemente a que la intensidad de estos atributos no disminuyó demasiado durante el almacenaje, lo cual indica que hay un efecto protector de los AE de orégano en el aceite de oliva contra el deterioro oxidativo de los lípidos preservando mejor estos atributos positivo durante el almacenaje.

Estas ecuaciones de regresión se pueden utilizar para estimar el efecto del tiempo de almacenaje sobre estas variables sensoriales en cada uno de los tratamientos. Por ejemplo, si el aceite de oliva extra-virgen fuese almacenado durante 150 días expuesto a la luz, aplicando las ecuaciones de regresión se obtendrían los siguientes valores de intensidad de los atributos positivos frutado, picante y amargo: 2,98, 1,35, y 1,6 puntos en una escala de 10 puntos, respectivamente. Si el mismo aceite de oliva extra-virgen es almacenado durante 150 días en la oscuridad con la adición de AE Cordobés (O-Cor), la intensidad de los mismos atributos sería 4,06, 2,66 y 2,57 puntos, respectivamente. En esta predicción de la variación de intensidades de atributos sensoriales positivos del aceite de oliva durante un prolongado almacenaje, se evidencia la mejor conservación del producto dado el efecto protector por la adición de aceite esencial de orégano en combinación de mantener el producto en oscuridad.

El biplot obtenido del análisis de componentes principales (ACP) del estudio de almacenaje del aceite de oliva con la adición de aceite esencial de orégano evaluando cambios de intensidades de atributos sensoriales se muestra en la figura 5.5. Las primeras dos componentes principales explicaron el 72,3% de la variabilidad de las muestras de aceite de oliva

durante el almacenaje. En general, los atributos positivos se mostraron altamente relacionados con los tratamientos con el agregado de AE de orégano y condición de almacenaje en oscuridad, mientras que el atributo negativo, rancio, se encontró positivamente relacionado a luz y al agregado de AE de orégano. La exposición a la luz es un importante factor de deterioro del aceite de oliva. A esta condición se le puede atribuir la degradación de clorofilas y carotenoides y la activación del proceso de autooxidación de los lípidos (Ayadi *et al.*, 2009). Ha sido reportado y demostrado anteriormente que durante la exposición a la luz los pigmentos disminuyen mientras que los indicadores de oxidación lipídica (IP; K232 e IAN) se incrementan (Asensio *et al.*, 2011).

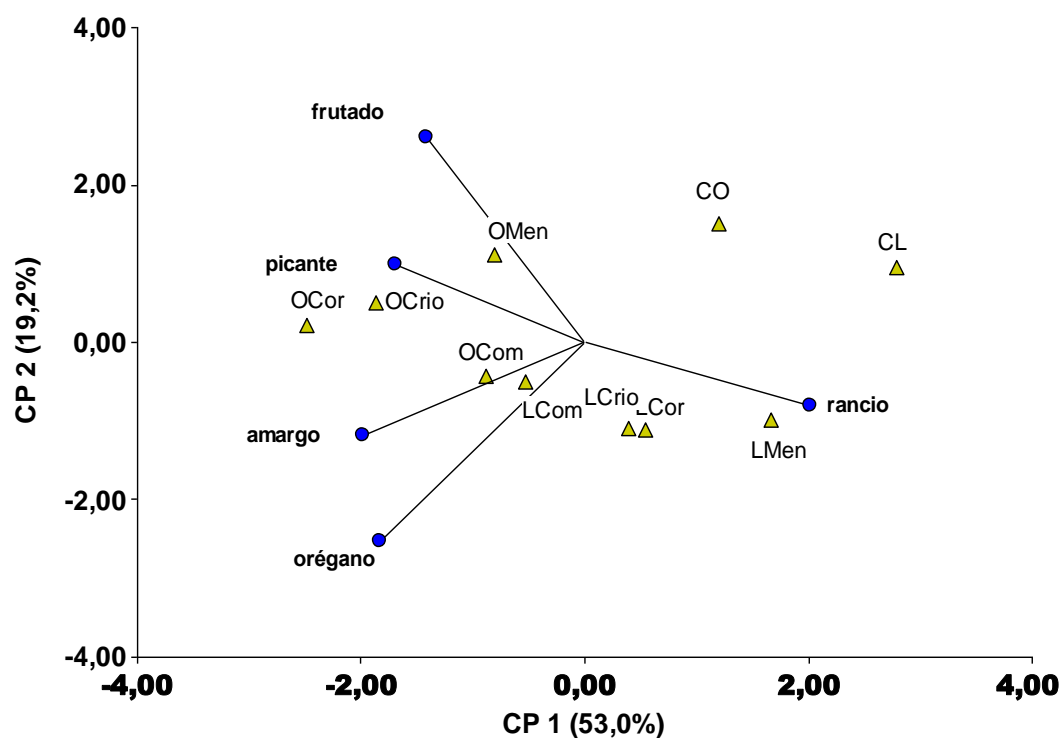


Fig. 5.5. Biplot de la primera y segunda componente del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano. Variables dependientes: atributos frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio. Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente).

Las muestras control (CL y CO) no se presentaron relacionadas positivamente con ningún atributo positivo, probablemente debido a la alta disminución de estos durante el almacenaje. Se observó una fuerte asociación entre las muestras O-Com y L-Com con los atributos sabor orégano y amargo. O-Crio, O-Men, y O-Cor estuvieron altamente relacionados con los sabores frutado y picante. La dispersión de los puntos del biplot indica gran variabilidad entre las muestras. Sin embargo, algunos grupos pueden ser identificados. Las variables, frutado, picante, amargo y sabor orégano se ubicaron en el lado izquierdo de la Figura, junto con las muestras que presentaron los valores más altos de intensidad para esos atributos. Todas estas muestras fueron almacenadas en oscuridad y tuvieron la adición de AE de orégano, a excepción de L-Com que también se ubicó en el lado izquierdo. Las muestras control (L y O) y los tratamientos expuestos a la luz se ubicaron en el lado derecho del biplot, junto con el atributo negativo rancio. La relación debida a la ubicación de los atributos positivos (picante, amargo, frutado y sabor orégano) junto con los tratamientos almacenados en oscuridad (O-Com, O-Cor, O-Crio y O-Men) indica actividad antioxidante de estos aceites esenciales actuando como agentes perseverantes de la calidad sensorial del aceite de oliva. La muestra O-Cor fue la que se ubicó más opuesta a los tratamientos expuestos a luz y al atributo negativo rancio, lo que señala un mejor efecto protector de este AE en el aceite de oliva.

Los resultados del análisis de conglomerados de las muestras de aceite de oliva saborizadas con aceite esencial de orégano considerando las variaciones de los atributos sensoriales durante el almacenaje se presentan en la figura 5.6. Se formaron cuatro grupos. El Grupo 1 se formó por las muestras de aceite de oliva con el agregado de AE de orégano expuestos a la luz; el Grupo 2 por las muestras con AE Com, Crio y Men almacenados en oscuridad; el Grupo 3 por las muestras control (CL y CO); y el Grupo 4 solamente por el tratamiento O-Cor. Este resultado indica que las muestras control (L y O) experimentaron cambios similares durante el almacenaje. Algo similar sucedió en el grupo obtenido con los tratamientos expuestos en la luz (Grupo 1). El tratamiento O-Cor se ubicó solo en un grupo debido, probablemente, a su comportamiento diferencial durante el almacenaje. Este resultado concuerda con el análisis de ACP en el que la muestra O-Cor también se encontró más distante del resto y fue la más opuesta al sabor rancio.

Las medias de las variables sensoriales analizadas de cada grupo del análisis de conglomerado se presentan en la tabla 5.7. Diferencias significativas fueron encontradas entre los grupos para todas las variables. La intensidad del atributo frutado fue más baja en los Grupos

1 y 3. Los Grupos 2 y 4 tuvieron los valores más altos de intensidad para los atributos positivos y el más bajo para el negativo. En los atributos picante y amargo las intensidades más bajas fueron para los Grupos 1 y 3, así como también la más alta para el atributo rancio. O-Cor (Grupo 4) mantuvo el valor más alto del atributo sabor a orégano durante el almacenaje y tuvo la intensidad más alta para los atributos positivos. Una vez más esto indica una mayor actividad antioxidante del AE Cordobés en aceite de oliva comparado con el resto de los aceites esenciales de orégano aquí estudiados.

Los resultados de la ACP sugieren que los tratamientos en la oscuridad y con la adición de orégano están relacionados con los atributos positivos de aceite de oliva extra-virgen. Por otra parte, el resultado de este estudio mostró que la adición de AE de orégano especialmente de la variedad Cordobés, preserva mejor la calidad sensorial del aceite de oliva prolongando la vida útil de este producto.

La adición de aceites esenciales, especialmente los obtenidos de orégano, para la conservación de los alimentos con alto contenido de lípidos constituye una alternativa de productos naturales como agentes antioxidantes para conservar alimentos con alto contenido graso que puede ser utilizada en la industria de los alimentos. Este estudio también proporciona ecuaciones de regresión para estimar la vida útil de aceite oliva con el agregado de aceite esencial de orégano utilizando las intensidades de los atributos sensoriales del análisis descriptivo para dicha predicción.

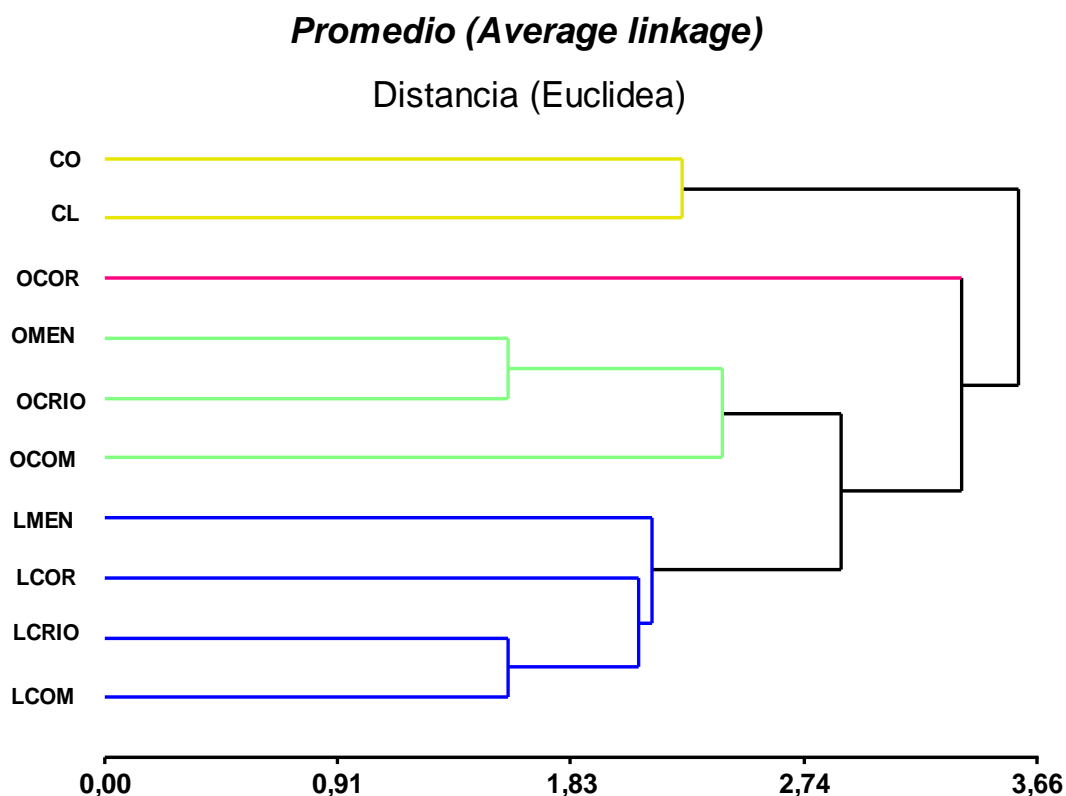


Fig 5.6. Tratamientos: aceite de oliva control expuesto a la luz (CL) y en oscuridad (CO), y con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino expuestos a la luz (LCom, LCor, LCrio, y LMen, respectivamente) y en oscuridad (OCom, OCor, OCrio, y OMen, respectivamente). Variables dependientes: atributos frutado, picante, amargo, sabor orégano y rancio.

Tabla 5.7 Medias y desvíos estándares para los grupos obtenidos del dendograma de las muestras de aceite de oliva con el agregado de aceite esencial de orégano considerando las variaciones de las intensidades de los atributos sensoriales durante el almacenaje.

Grupos de tratamientos	Frutado	Picante	Amargo	Sabor orégano	Rancio					
Grupo 1	4,44	a	3,67	a	2,99	b	3,49	b	0,33	b
Grupo 2	4,66	b	4,0	b	2,95	b	3,64	b	0,14	a
Grupo 3	4,6	a	3,57	a	2,72	a	0	a	0,33	b
Grupo 4	4,94	c	3,79	ab	3,44	c	4,22	c	0,16	a

^a Letra diferentes en cada columna indica que hay diferencias significativas entre los grupos para las variables analizadas ($\alpha = 0,05$)

Estudio de almacenaje. Cambios químicos y sensoriales en ricota saborizada con aceite esencial de orégano.

Cambios químicos de ricota con el agregado de aceite esencial de orégano.

Los indicadores químicos que fueron analizados en muestras de ricota adicionadas con aceite esencial de orégano durante el almacenaje de 35 días a 4 °C fueron la acidez láctica, índice de peróxidos (IP), índice de anisidina (IAN) y dienos conjugados (DC). En la Figura 5.7 se muestran los resultados obtenidos para el índice de peróxido y la acidez láctica que fueron los indicadores que variaron significativamente durante el almacenaje.

Los dienos conjugados y los valores de peróxidos son indicadores de etapas iniciales de los procesos de oxidación de los lípidos. En este estudio de almacenaje, el contenido de dienos conjugados desarrolló un comportamiento similar al índice de peróxido. Se observó una tendencia creciente en el contenido de DC en función del tiempo de almacenaje en todas las muestras. Al final del almacenaje, la muestra control presentó un valor mayor ($13,88 \pm 1,06$) con respecto a los otros tratamientos con el agregado de aceite esencial de orégano mostrando los valores más bajos el tratamiento con AE Criollo ($11,49 \pm 1,16$) seguido por el tratamiento con AE Men ($11,90 \pm 0,77$). A pesar de registrarse valores inferiores en muestras con aceite esencial de orégano, estos resultados no son estadísticamente significativos pero marcan una tendencia que probablemente en un almacenamiento de mayor tiempo hubiera mostrado resultados con diferencias significativas. Otro estudio donde trabajaron con muestras de queso árabe sandesh adicionados con extractos naturales, observaron resultados similares (Bandyopadhyay *et al.*, 2008) con un aumento inicial en la capacidad de absorción ultravioleta y posteriormente no aumentaron significativamente con el aumento del tiempo de almacenamiento. Las diferencias en la absorbancia en muestras adicionadas con antioxidantes naturales no fueron de gran magnitud.

Para el indicador IAN, los resultados arrojados durante el almacenaje de las muestras de ricotas no registraron diferencias entre tratamientos para los períodos de tiempos analizados. Este indicador presentó valores muy bajos para todas las muestra durante el almacenaje. Estos resultados se corresponden con el hecho de que el IAN mide la aparición de compuestos de deterioro lipídico en etapas avanzadas de los procesos de oxidación y esto indica bajo grado de oxidación secundaria de los lípidos de la ricota en este corto período de almacenamiento.

El IP, fue el indicador químico que mostró mayores incrementos a lo largo del almacenaje de las muestras de ricota. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,001$) a partir del día 14 de almacenaje. El mayor valor IP después de 35 días fue para el tratamiento Control (6,47 meqO₂/kg), significativamente diferente al resto. Seguido por el tratamiento con AE Compacto (4,62 meqO₂/kg). Los tratamientos con AE Cordobés, Criollo y Mendocino registraron los menores valores para este indicador, siendo el con AE Criollo el menor (3,84 meqO₂/kg). Este efecto protector sobre este alimento es similar al observado para aceite de oliva extra-virgen almacenado en oscuridad, donde los menores valores de IP fueron registrados en los tratamientos con AE Criollo y Cordobés. Bandyopadhyay *et al.* (2008) informa que en un estudio de almacenaje de queso sandesh adicionado con distintos extractos de especias a 60 °C, el valor peróxido se incrementó significativamente para todas las muestras a partir del día 0 de almacenaje. La capacidad de los antioxidantes en la prevención de la formación de peróxidos en queso sandesh disminuye en el orden siguiente de acuerdo a lo reportado por estos autores: TBHQ > menta > menta y jengibre > remolacha y menta > remolacha y jengibre > BHA y BHT combinados y remolacha. Esto indica que para quesos el efecto protector de las especias es considerablemente mejor respecto a los antioxidantes sintéticos BHA y BHT. En otro estudio de queso crema con la incorporación de aceites esenciales de orégano y romero como antioxidantes naturales, se informó que las muestras no mostraron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre ellas antes del día 7 en términos de IP y IAN. Desde los días 7 al 35, todos los tratamientos fueron significativamente diferentes en ambos indicadores químicos. La muestra control tuvo IP más alto, mientras la muestras con AE orégano tuvo los valores más bajos (Olmedo *et al.*, 2013). Estos resultados indican que las muestras de queso preparadas con la incorporación de AE orégano tienen una mayor resistencia a la oxidación lipídica durante su almacenaje.

La acidez láctica o acidez total titulable es un indicador de deterioro fermentativo y del grado de proteólisis (AOAC, 2007; Rodríguez-Alonso *et al.*, 2011). En este caso la acidez láctica en las muestras de ricota presentó incrementos significativos ($p < 0,001$) a lo largo del almacenaje en todos los tratamientos. Sin embargo, las muestras con el agregado de AE Criollo y AE Mendocino tuvieron los valores significativos más altos para este indicador al final del almacenaje. Las muestras con AE Cordobés y Compacto registraron valores inferiores, pero estadísticamente similares a la muestra control. Estos resultados indican que la adición de aceite esencial de orégano a la ricota no protege del deterioro de este indicador de calidad.

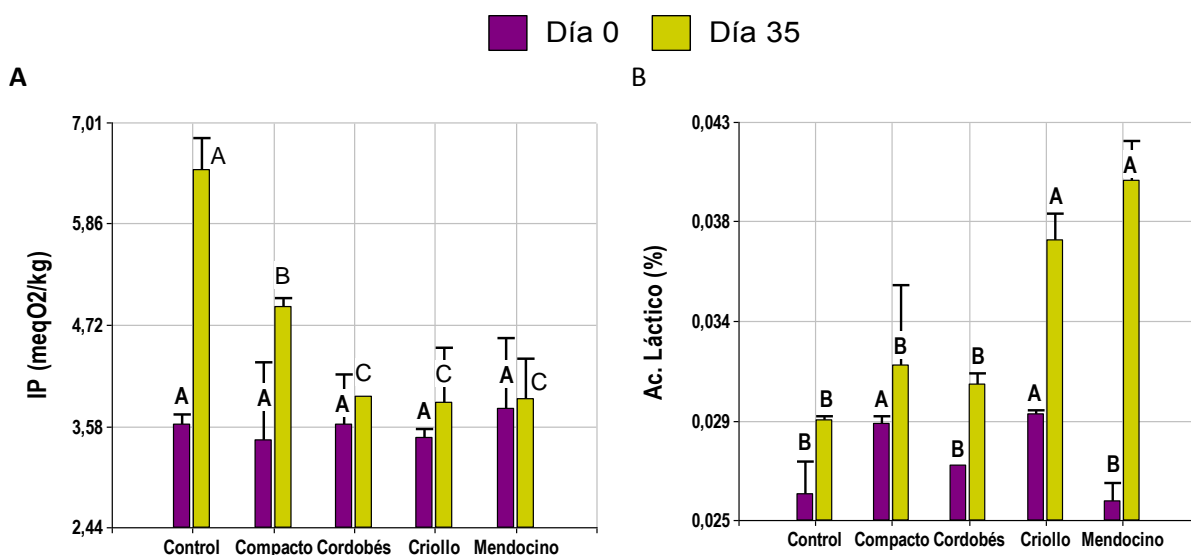


Fig. 5.7. (A) Índice de peróxidos (meqO₂/kg) y (B) contenido de ácido láctico (%) para las muestras de ricota saborizada con aceite esencial de orégano para los días 0 y 35 de almacenaje. Tratamientos: ricota sin agregados (Control), ricota con el agregado de aceite esencial de orégano Compacto (Compacto), Cordobés (Cordobés), Criollo (Criollo) y Mendocino (Mendocino). Letras distintas para un mismo periodo entre tratamientos indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, estimado por MLGM, test DCG).

Cambios sensoriales de Ricota con el agregado de aceite esencial de orégano.

Las muestras de ricotas saborizadas con el agregado de aceite esencial de orégano de las diferentes variedades de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) presentaron cambios en las intensidades de sus atributos sensoriales durante los 35 días del almacenaje. Los jueces sensoriales evaluaron la intensidad de los atributos dulce, salado, amargo, ácido, fermentado, sabor a leche, sabor a caseína, oxidado, desprendimiento de humedad, brillo y color. Se presentan en la Figura 5.8 los atributos que presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en su intensidad a lo largo del almacenaje y entre los diferentes tratamientos. De los cuatro gustos básicos evaluados, dulce, salado, amargo y ácido, solamente se registraron variaciones significativas en el ácido y el dulce.

Park y Drake (2005) observaron que los atributos sabor suero de leche, dulce, agrio y salado de queso crema de cabra disminuyeron durante el almacenaje de un mes a 4 °C. Almacenamiento prolongado a 4 °C tiende a aumentar la actividad proteolítica y los valores de lipólisis, y los valores de grado de acidez (Park y Drake, 2005). En los resultados de este estudio de tesis, el sabor ácido de la ricota se incrementó en todos los tratamientos a lo largo del

almacenaje. El menor valor de ácido detectado al final del almacenaje fue para la muestra con AE Cordobés (15,17 puntos de la escala sensorial), seguido por la muestra control y la con AE Compacto. Este resultado concuerda con el indicador químico acidez láctica, donde los menores valores de acidez lo registraron estas tres muestras no habiendo diferencias estadísticas significativas entre ellas al final del almacenaje. Por otro lado el mayor valor de ácido fue para la muestra con AE Mendocino (20,50). Contrariamente con el indicador de calidad ácido que se incrementó, el sabor dulce disminuyó significativamente en todos los tratamientos. Al comienzo del almacenaje, las muestras con mayor intensidad de este atributo fueron Control, AE Compacto y AE Cordobés (17; 18,14 y 17,29 puntos de la escala, respectivamente). Al final del almacenaje estas muestras siguieron siendo las que mayor intensidad presentaron para este atributo, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, se observó que las muestras de ricota con el agregado de AE Criollo y Mendocino registraron los menores valores de dulce (15,67 puntos), siendo significativamente distintas al resto de las muestras de ricota.

Los resultados observados en los atributos ácido y dulce pueden relacionarse con el incremento en el fermentado y con la disminución de los sabores caseína y leche. Esto es probablemente debido a la fermentación de la lactosa mediada por organismos heterofermentativos, la aparición de ácidos orgánicos como el acético y la hidrólisis peptídica (Ong y Shah, 2009; Murtaza *et al.*, 2010). Los sabores ácido y fermentado están estrechamente relacionados debido a que ambos atributos sensoriales están asociados con la fermentación (Olmedo *et al.*, 2013). El atributo fermentado se incrementó significativamente en todas las muestras durante el almacenaje. Los tratamientos que más intensidad presentaron para este atributo fueron las AE Compacto, Criollo y Mendocino (19,17; 18,57 y 19,83 puntos de la escala, respectivamente). La muestra con menor intensidad de caseína fue AE Mendocino. Esta muestra disminuyó su sabor caseína de 47,17 a 24 puntos en la escala de 0-100. El mismo comportamiento se observó para el atributo sabor a leche.

El sabor oxidado es producido por los compuestos volátiles originados por la oxidación de los lípidos. Las muestras con mayor intensidad de este atributo al final del almacenaje fueron las saborizadas con AE Criollo y Mendocino. Cabe destacarse que si bien este atributo se incrementó significativamente con el almacenaje, la magnitud de su incrementó solo fue considerable en estas dos muestras.

Los atributos de apariencia brillo y desprendimientos de humedad pueden encontrarse relacionados. Un mayor incremento de humedad en la superficie de un alimento supone mayor cantidad de luz reflejada y por lo tanto mayor brillo. En general, todas las muestras desprendieron humedad, por lo que aumentaron la intensidad de su brillo. Particularmente la muestra con AE Compacto mostró un incremento considerable de la intensidad del atributo desprendimiento de humedad que fue casi al doble de su magnitud durante el almacenaje variando de 15 a 28,4 puntos de la escala. Mientras que en la muestra con AE Cordobés casi no se modificó variando de 16,17 en día 0 y 17 en día 35 del almacenaje. El brillo lógicamente se comportó de manera similar. La muestra Compacto fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos al final del almacenaje con una intensidad de brillo de 17,81 puntos.

En este estudio no se evidenciaron mayores efectos preservantes de la calidad sensorial de las muestras de ricotas con la adición de aceite esencial de orégano.

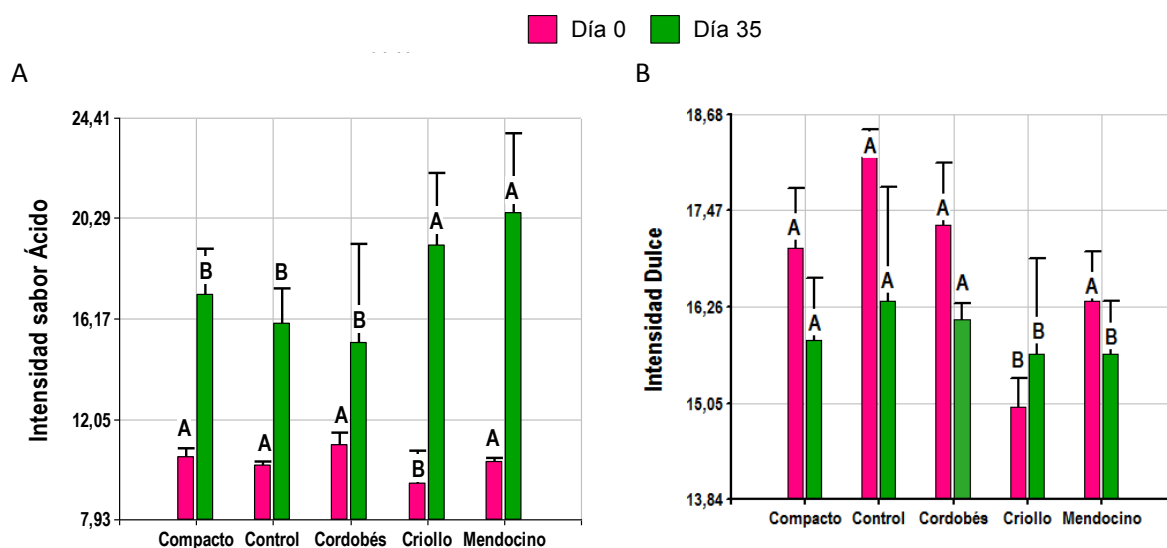


Fig. 5.8. Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test DCG) a partir de MGLM para las muestras de ricotas adicionadas con aceite esencial de orégano durante el almacenaje de 35 días a 4 °C evaluando los siguientes atributos sensoriales: (A) ácido, (B) dulce, (C) fermentado, (D) caseína, (E) leche, (F) oxidado, (G) sabor orégano, (H) brillo, (I) humedad y (J) color. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para 0 y 35 días de almacenaje.

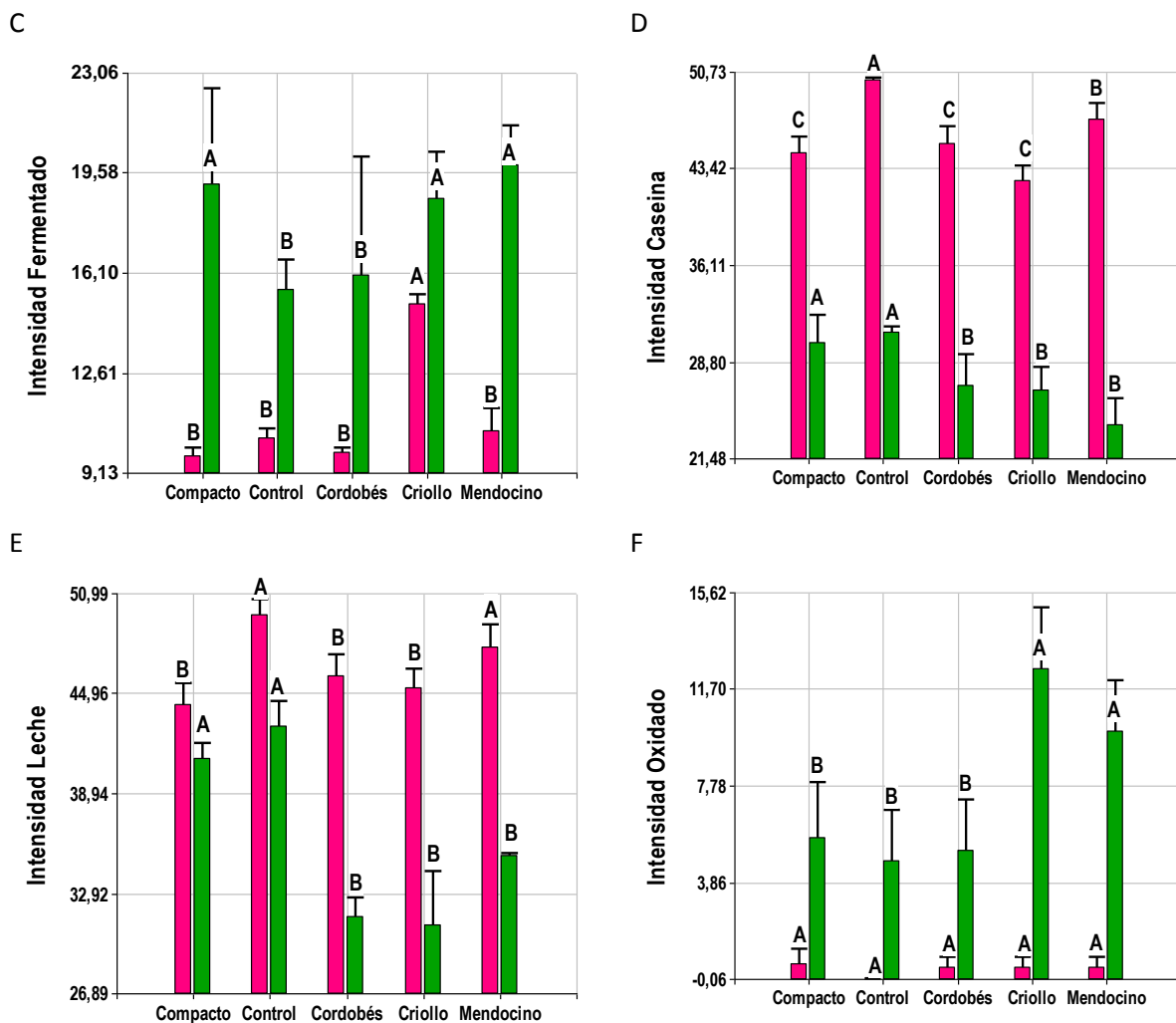


Fig. 5.8 (Continuación). Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test DCG) a partir de MGLM para las muestras de ricotas adicionadas con aceite esencial de oregano durante el almacenaje de 35 días a 4 °C evaluando los siguientes atributos sensoriales: (A) ácido, (B) dulce, (C) fermentado, (D) caseína, (E) leche, (F) oxidado, (G) sabor orégano, (H) brillo, (I) humedad y (J) color. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para 0 y 35 días de almacenaje.

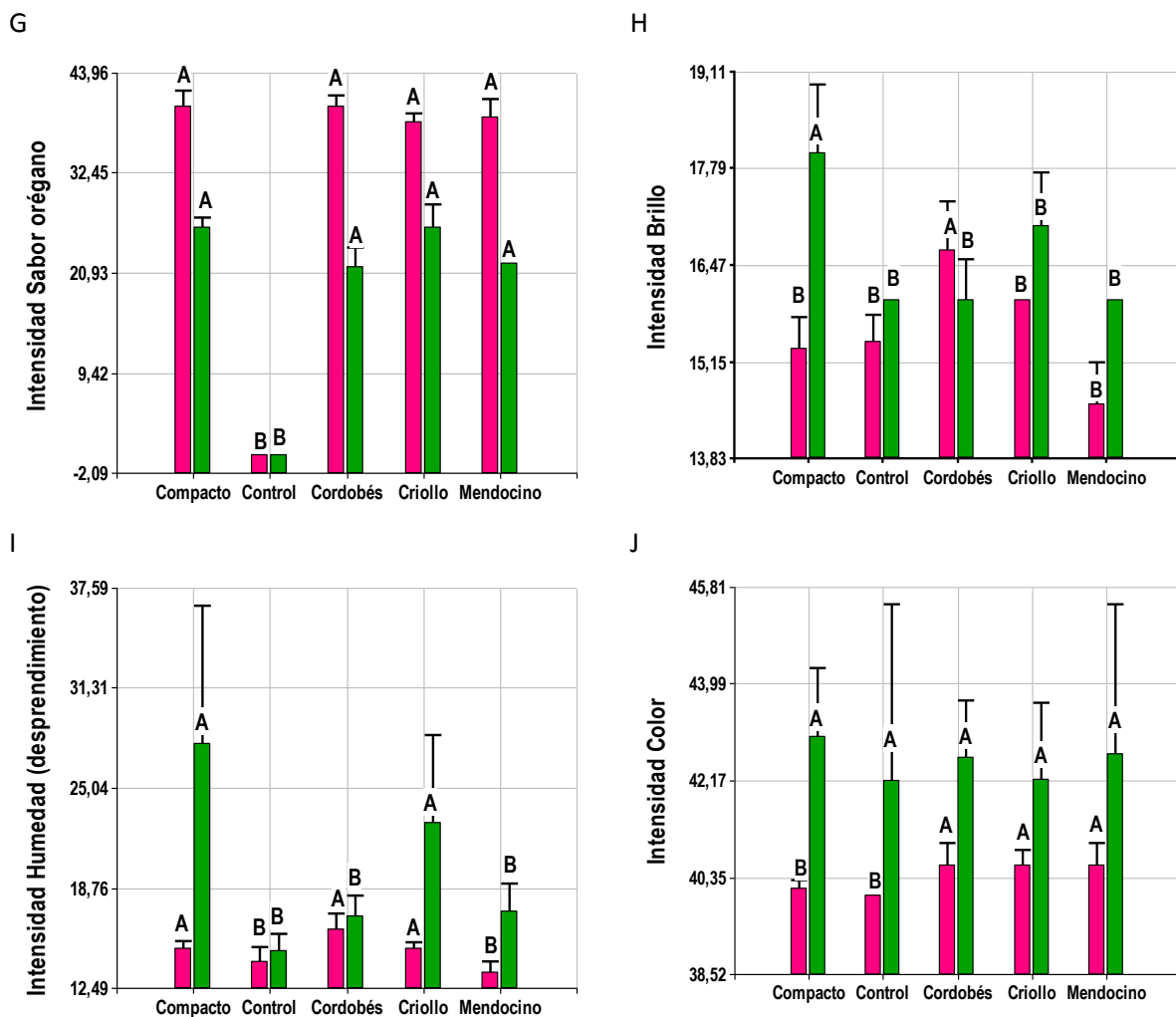


Fig. 5.8 (Continuación). Estimación de diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$; Test DCG) a partir de MGLM para las muestras de ricotas adicionadas con aceite esencial de orégano durante el almacenaje de 35 días a 4 °C evaluando los siguientes atributos sensoriales: (A) ácido, (B) dulce, (C) fermentado, (D) caseína, (E) leche, (F) oxidado, (G) sabor orégano, (H) brillo, (I) humedad y (J) color. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para 0 y 35 días de almacenaje.

En la Tabla 5.8 se muestran los resultados del análisis de correlación de las variables sensoriales del estudio de almacenaje de la ricota adicionada con aceite esencial de orégano. Se puede observar una matriz donde los elementos de la diagonal principal tiene valor = 1. Por debajo de esta diagonal se presentan los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre dos variables (una ubicada en una fila y la otra en una columna) y por encima de esta diagonal se encuentran las probabilidades asociadas a esta correlación obtenidas a través de prueba de la hipótesis nula del modelo. Así podemos decir que dos variables se encuentran correlacionadas cuando tienen un coeficiente de correlación asociado a una probabilidad menor a 0,05.

Los resultados de correlación arrojaron que el atributo sabor ácido se encontró negativamente relacionados con los atributos sabor a caseína y leche ($r = -0,41$ y $-0,42$, respectivamente) y positivamente con el sabor fermentado ($r = 0,64$). El desprendimiento de humedad se encontró también positivamente relacionado con el sabor fermentado ($r = 0,48$). A su vez, el contenido de ácido láctico también se mostró positivamente relacionado con los atributos ácido ($r = 0,33$) y fermentado ($r = 0,30$) y negativamente con el sabor a caseína ($r = 0,35$). De este análisis se puede evidenciar como todos los atributos sensoriales negativos indicadores de deterioro de la calidad de la ricota (fermentado, ácido, desprendimiento de humedad, brillo y acidez láctica) se encuentran relacionados entre sí. También los indicadores químicos con atributos sensoriales negativos como el contenido de ácido láctico y el sabor a leche que se mostraron negativamente relacionados ($r = -0,54$). Ong y Shah (2009) informaron que la hidrólisis de las proteínas durante la maduración de quesos cheddar estaba altamente correlacionada con incrementos en el sabor amargo, mientras que la diferencia en la cepa fermentativa usada para hacer queso prebiótico estaba relacionada tanto con el aumento en el sabor amargo como así también con sabor ácido. Por otra parte, la caseína y el sabor a leche se encuentran relacionadas positivamente ($r = 0,43$). Por último los indicadores químicos, índice de peróxidos y ácido láctico, se relacionan positivamente, ambos son parámetros que indican deterioro del producto.

Tabla 5.8. Matriz de correlación obtenida del análisis de correlación de Pearson para los atributos sensoriales parámetros químicos evaluados en el estudio de muestras de ricotas con el agregado de aceite esencial de orégano.

	Acido ²	Amargo	Brillo	Humedad	Fermentado	Caseína	Color	Orégano	Leche	Oxidado	IP	Ac. Láctico
Acido ¹	1	3,30E-03	0,16	1,00E-04	0	1,40E-07	3,30E-04	0,41	5,50E-08	2,00E-05	0,04	2,20E-04
Amargo	0,23	1	4,00E-08	5,90E-09	0,05	0,01	0,04	6,90E-05	0,01	0,58	0,13	0,1
Brillo	0,11	0,42	1	0	0,04	1,10E-04	0,63	4,30E-03	0,28	0,77	0,09	0,72
Humedad	0,31	0,45	0,54	1	8,10E-10	4,10E-04	0,18	0,06	0,01	0,76	0,83	0,3
Fermentado	0,64	0,16	0,16	0,48	1	2,30E-05	0,21	0,69	1,80E-04	1,10E-03	0,22	7,40E-04
Caseína	-0,42	-0,2	-0,32	-0,3	-0,35	1	0,2	0,82	8,10E-08	1,40E-04	4,90E-03	2,10E-04
Color	0,29	0,17	0,04	0,11	0,1	-0,11	1	0,73	6,70E-04	0,11	0,65	0,01
Orégano	-0,07	0,32	0,23	0,16	-0,03	-0,02	0,03	1	0,36	0,21	0,01	0,75
Leche	-0,41	-0,22	-0,09	-0,23	-0,29	0,43	-0,27	-0,07	1	4,20E-07	0,11	1,20E-10
Oxidado	0,34	0,05	-0,02	0,03	0,26	-0,32	0,13	-0,11	-0,4	1	0,11	3,50E-06
IP	0,2	0,14	0,16	0,02	0,12	-0,28	0,04	-0,26	-0,15	0,16	1	0,79
Ac. Láctico	0,33	0,15	0,03	0,1	0,3	-0,35	0,25	0,03	-0,54	0,42	-0,03	1

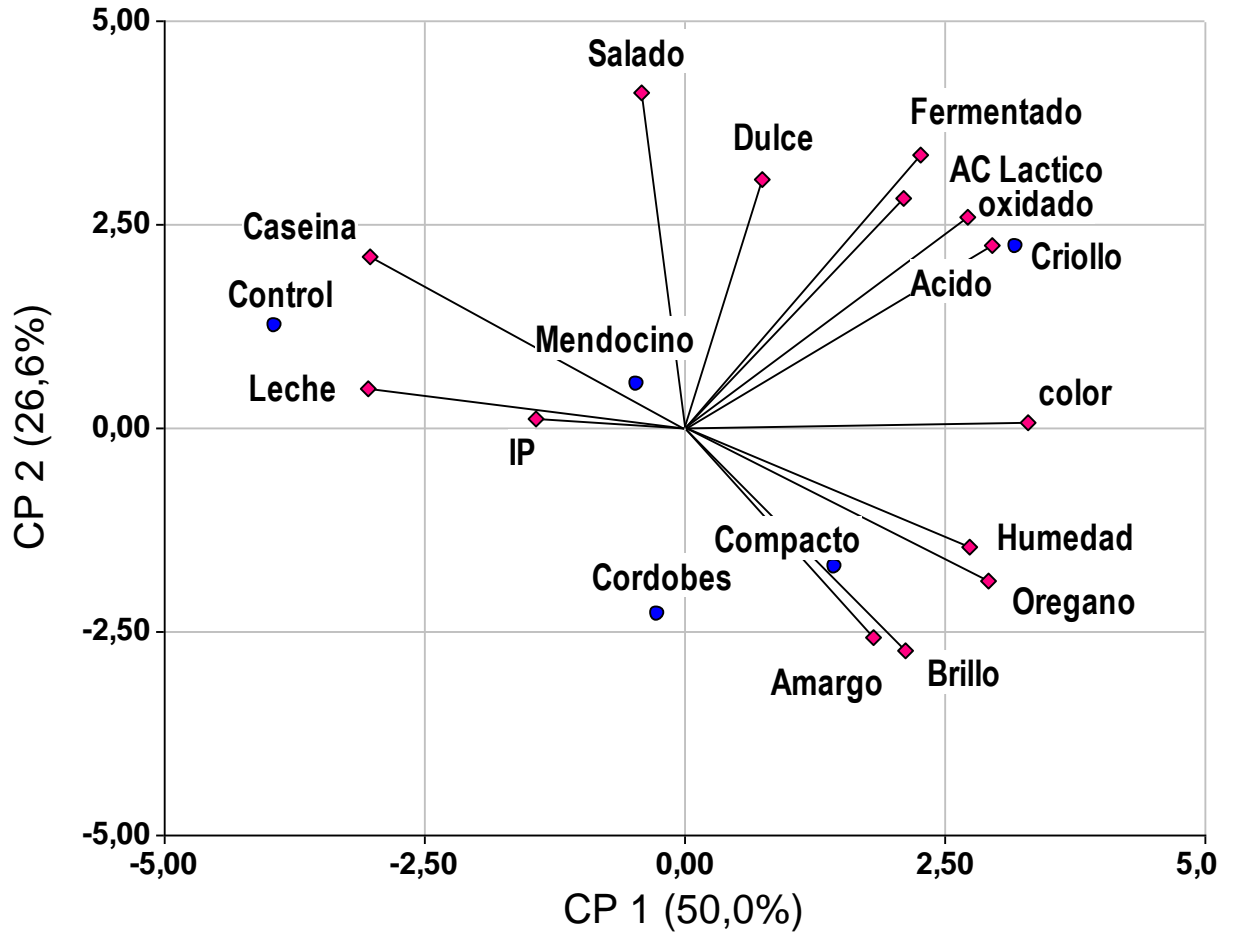


Fig. 5.9. Biplot de la primera y la segunda componentes del análisis de componentes principales. Variables dependientes: índice de peróxido (IP), contenido de ácido láctico (AC Láctico) y tributos sensoriales analizados durante 35 días de almacenaje de ricota a 4 °C. Tratamientos: ricota control (Control) y ricota con el agregado de aceite esencial de oréganos Compacto, Cordobés , Criollo y Mendocino.

En la Figura 5.9 se muestran los resultados del análisis de componentes principales realizado a partir de las variables sensoriales y químicas analizadas en muestras de ricotas adicionadas con aceite esencial de orégano durante el estudio de almacenaje realizado durante 35 días a 4 °C. Las dos primeras componentes principales explicaron el 76,6% de la variabilidad de los datos del experimento. Se identificaron tres grupos de variables altamente asociadas entre ellas. El primer grupo se encuentra ubicado en el cuadrante inferior derecho, el segundo en el cuadrante superior derecho y el tercero en el cuadrante superior izquierdo. Las variables de estos dentro de estos grupos se mostraron altamente relacionadas, así los atributos sensoriales

desprendimiento de humedad y brillo; amargo y sabor a orégano se presentaron asociados. Por otro lado, los atributos sensoriales fermentado, ácido láctico, oxidado y ácido también se encontraron relacionados.

Las muestras de ricota con la adición de aceite esencial de orégano Compacto y Cordobés se presentaron positivamente relacionadas con los atributos ubicados en el cuadrante inferior derecho y negativamente relacionadas con los atributos ubicados en el cuadrante superior izquierdo. Así, estas muestras presentaron altos valores de intensidad en los atributos desprendimiento de humedad, sabor a orégano, brillo y amargo, y bajos valores de los atributos caseína y leche y de IP. La muestra Control se comportó de manera opuesta. Los tratamientos que se ubicaron a 90 °C de las variables correspondientes a los atributos ácido, oxidado, láctico y fermentado no se correlacionaron con el Control. La ricota saborizada con AE Criollo estuvo altamente relacionada con estas variables negativas y fue la muestra que tuvo un comportamiento no favorable para la estabilidad del producto en este experimento.

Estudio de almacenaje. Evaluación de cambios químicos y microbiológicos en queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano.

Cambios químicos en queso cottage orgánico con el agregado de aceite esencial de orégano y timol.

El estudio de almacenaje consistió en realizar un análisis químico de muestras de queso Cottage con el agregado de aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino durante 30 días de almacenaje a 23 °C y 40 °C. Las variables analizadas fueron los hidroperóxidos (HP), acidez total titulable o láctica (ATT), pH y dienos conjugados (DC). Además se estudió como se modificó el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa y el de los ácidos orgánicos como acético, cítrico, fórmico, láctico, pirúvico y propiónico por cromatografía líquida.

En la Figura 5.10A se muestra el efecto de la incorporación de aceite esencial de orégano en queso orgánico Cottage sobre los valores de hidroperóxidos (HP) durante 30 días de almacenamiento a 40 °C. La acumulación de hidroperóxidos dependió de la duración del tiempo de almacenaje ($p < 0,001$) y de la incorporación del aceite esencial de orégano como antioxidante ($p < 0,013$). En general, el valor hidroperóxido aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento. Incluso, la media de cada muestra observada para HP fue diferente a la de la muestra Control durante los tres períodos evaluados. Para los días de almacenaje 10 y 20, sólo se detectaron diferencias significativas entre el control y el resto de los tratamientos ($p < 0,0082$). En el día 30 de almacenaje, todas las muestras de queso orgánico Cottage difirieron significativamente ($p < 0,0136$) en su contenido de HP. El valor más alto en HP se observó en la muestra control ($3,93 \mu\text{eqO}_2/\text{kg}$) y el valor más bajo se detectó en la muestra con la adición de timol ($2,46 \mu\text{eqO}_2/\text{kg}$), seguido de la muestra con AE Criollo ($2,66 \mu\text{eqO}_2/\text{kg}$). Por otra parte, también se observó que las muestras añadidas con los AE Cordobés, Criollo y Mendocino, y el monoterpeno timol no difirieron significativamente entre sí a los 30 días de almacenamiento. La disminución de peroxidación lipídica considerando la adición de AE de orégano como antioxidantes mostró el siguiente orden: control < AE Compacto < AE Cordobés < Criollo Mendocino < timol. De acuerdo con este orden, es evidente que timol actuó como el compuesto antioxidante más fuerte. Como se ha mencionado previamente, la posición y el grado de hidroxilación de compuestos fenólicos en las moléculas que componen un aceite esencial es de

primordial importancia en su actividad antioxidante (Baratta *et al.*, 2000). Bandyopadhyay *et al.* (2008) informaron que los extractos naturales de menta, jengibre y remolacha y sus combinaciones tienen actividad antioxidante más potente que los antioxidantes sintéticos BHA y BHT cuando fueron aplicados a un queso sandesh. Además, observaron que hay reacciones de oxidación suficientes para provocar diferencias significativas en los valores de peróxido entre el control y el producto sandesh con la adición de antioxidantes. Este efecto remarca la importancia del uso de antioxidantes en el control de la oxidación de lípidos en los productos lácteos y esto se revaloriza adicionalmente si esos antioxidantes son naturales. En otro estudio observaron que muestras de queso que contienen extractos de té verde, no presentan la formación de hidroperóxidos (Huvaere *et al.*, 2011), aunque hay que considerar que trabajaron con un método de muy alto límite de detección (0,05 mg/g). La prevalencia de los lípidos en compuestos lácteos, incluso en derivados bajos en grasa, resalta la importancia de la investigación sobre sus productos de oxidación y cómo prevenirlos, en este sentido la aplicación de aceite esencial de orégano como antioxidantes naturales constituyen una alternativa viable.

Con respecto a los dienos conjugados, se observó que la detección espectrofotométrica de todas las muestras de queso Cottage orgánico saborizado con aceite esencial de orégano y con timol mostraron diferencias significativas (Figura 5.10B). Hasta el día 20 de almacenaje, no se detectaron diferencias significativas entre las muestra. Solo se detectaron diferencias a partir de los 30 días de almacenamiento ($p < 0.001$). Las muestras con timol y AE Cordobés presentaron valores de dienos conjugados inferiores (15,94 y 15,53) y la muestra control el máximo valor (17,54). Las diferencias en la capacidad de absorción entre las muestras de queso Cottage no fueron de gran magnitud. En varios estudios de productos lácteos, se ha reportado pocas diferencias entre tratamientos con el agregado de antioxidantes dado que la leche por sí misma tiene buena capacidad antioxidante (Chen *et al.*, 2003; Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

El descenso de pH en productos lácteos durante el almacenamiento se atribuye a la producción de diferentes tipos de ácidos orgánicos (Ayyash y Shah, 2010; Ayyash y Shah, 2011). Los valores iniciales de pH en las muestras de queso cottage estuvieron entre 4,35 y 4,44. Diferencias significativas entre la muestras control y el resto de los tratamientos, se observaron durante el almacenaje día 0 ($p < 0,15$), día 10 ($p < 0,0025$) y día 20 ($p < 0,0108$). En los días de almacenaje 10 y 20, los tratamientos con AE Cor y timol presentaron el mayor valor de pH en

ambos períodos. Al día 30 de almacenaje, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras. En este período de almacenaje el pH osciló desde 3,64 hasta 3,73. Los cambios de pH se pueden atribuir no sólo a la proteólisis y asociarse a la formación de aminas y amonio durante la maduración, sino también a la actividad metabólica de contaminación microbiológica que puede generar algunos tipos de ácidos orgánicos como producto de la fermentación de azúcares (Garabal *et al.*, 2010; Garde *et al.*, 2012).

La acidez total titulable (ATT) o acidez láctica de las muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano y timol al comienzo del almacenamiento (día 0) presentó un valor medio de 0,04 g de ácido láctico/kg de queso. Después de 30 días de almacenamiento, los valores de acidez láctica que se detectaron fueron mayores, y presentaron diferencias significativas entre las muestras de queso saborizado ($p < 0,05$). La muestra control presentó el valor más alto (0,297 %), mientras que la muestra de queso cottage con el agregado de AE Compacto y Cordobés (0,25 y 0,248 %, respectivamente) mostraron los valores más bajos ($p < 0,05$). El aumento de la ATT, al ser un indicador del grado de proteólisis, podría explicar los cambios en los valores de pH en el queso (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2011). No se observaron diferencias entre el control y las muestras saborizadas con orégano y timol con respecto a los parámetros pH y acidez láctica, lo que hace suponer que el agregado de AE de orégano no ejerce efecto protector en este sentido.

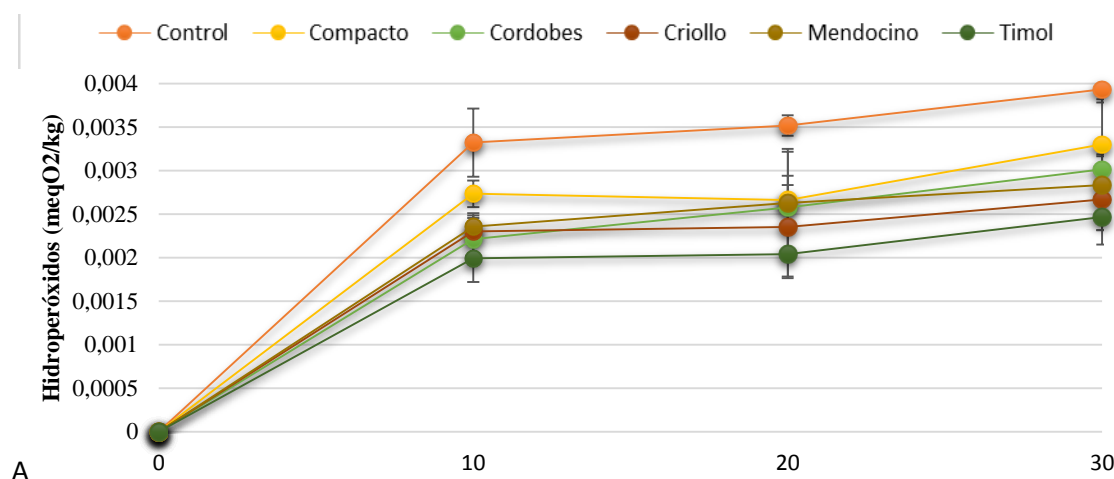


Fig 5.10. Contenidos de (A) hidropéroxidos, (B) dienos conjugados y (C) ácido láctico como acidez total titulable en muestras de queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol almacenadas durante 30 días a 40°C.

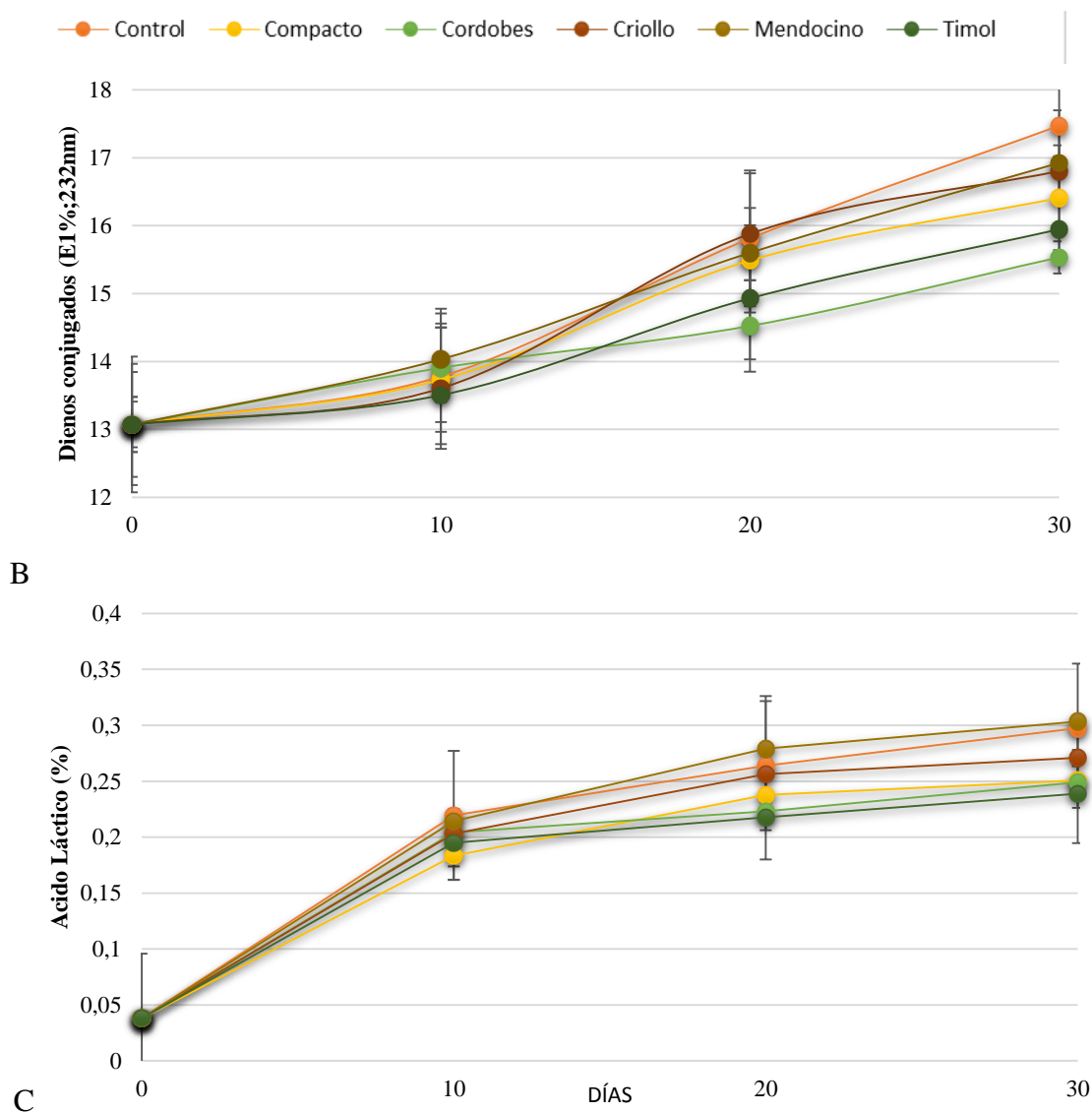


Fig. 5.10 (continuación) Contenidos de (A) hidroperóxidos, (B) dienos conjugados y (C) ácido láctico como acidez total titulable en muestras de queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol almacenadas durante 30 días a 40°C.

Los tratamientos de queso Cottage que fueron almacenados a 23°C no mostraron diferencias significativas en cuanto a hidroperóxidos ($p < 0,453$), dienos conjugado ($p < 0,396$), pH ($p < 0,6537$). El contenido de hidroperóxidos al día 30 de almacenaje osciló entre 0,0196 $\mu\text{eqO}_2/\text{kg}$ para la muestras control y 0,0081 $\mu\text{eqO}_2/\text{kg}$ para la muestra con AE Criollo. El pH se varió entre 3,91 (AE Mendocino) y 3,66 (AE Criollo). Mientras que la acidez láctica, presentó diferencias significativas al final del almacenaje (día 30). La única muestra que fue

estadísticamente distinta fue la que contenía timol (0,21 %). El mayor valor encontrado para este parámetro de calidad fue en la muestra control 0,25 % de acidez láctica.

El perfil de ácidos grasos en las diferentes muestras de queso Cottage adicionadas con aceites esenciales de orégano y timol experimentaron cambios significativos a lo largo de 40 días de almacenaje a 40 °C (Tabla 5.9 y Figura 5.11). Es conocido que los lípidos reaccionan con el oxígeno que los rodea y causan rancidez en los alimentos. Durante la oxidación, pueden ocurrir numerosas reacciones químicas, incluidas: la descomposición de tri-acil-glicéridos (TAGs) en diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol; la polimerización de TAGs en grasas no saponificables; y la formación de compuestos volátiles que incluyen aldehídos, alcoholes, cetonas, y carbohidratos (Warner, 2002). Con el objetivo de retardar o prevenir el deterioro oxidativo, el aceite esencial de orégano fue aplicado en este estudio como captadores de radicales libres, para reducir compuestos captadores del oxígeno singlete y supresores de metales pro oxidantes. Al comienzo del almacenamiento (día 0), los siguientes ácidos grasos fueron identificados en el estudio cromatográfico:

- Ac. Caproico (0,06 g/100 g)
- Ac. Caprílico (0,13 g/100 g)
- Ac. Cáprico (1,10 g/100 g)
- Ac. Laúrico (6,42 g/100 g)
- Ac. Lauroleico (1,09 g/100 g)
- Ac. Mirísitico (6,65 g/100 g)
- Ac. Miristoleico (1 g/100 g)
- Ac. Pentadecanoico (1,05 g/100 g)
- Ac. Palmítico (26,7 g/100 g)
- Ac. Palmitoleico (1,59 g/100 g)
- Ac. Hexadecadienoico (0,97 g/100 g)
- Ac. Heptadecanoico (0,77 g/100 g)
- Ac. Esteárico (15,6 g/100 g)
- Ac. Oleico (29,29 g/100 g)
- Ac. Eláidico (1,05 g/100 g)

- Ac. Linoleico (2,13 g/100 g)
- Ac. Linoeláidico (1,08 g/100 g)
- Ac. Linolénico (1,27 g/100 g)
- Ac. Arachidónico (1,96 g/100 g).

Los ácidos grasos mayoritarios en el queso Cottage fueron los ácidos oleico (29,85 g/100 g), palmítico (27,22 g/100 g) y esteárico (15,9 g/100 g). Al avanzar el tiempo de almacenaje, los porcentajes relativos de ácidos grasos saturados como los ácidos láurico, mirístico y esteárico se incrementaron. Simultáneamente los ácidos grasos insaturados como los ácidos lauroleico, miristoleico, hexadecadienoico, eláidico, octadecadienoico y linolénico decrecieron (Tabla 5.9). En el día 40 de almacenaje, los ácidos láurico y esteárico se incrementaron hasta 11 y 16,27 g/100 g en la muestra control, respectivamente, y hasta 11,45 y 16,39 g/100 g en la muestra AE Mendocino, respectivamente. El tratamiento con AE Cordobés, mostró un menor incremento en estos dos ácidos grasos mostrando valores de 8,02 y 15,57 g/100 g para los ácidos láurico y esteárico, respectivamente.

Se encontraron en casi todos los ácidos grasos insaturados diferencias significativas entre las muestras de queso Cottage después de 40 días de almacenaje. Las concentraciones de ácido oleico se modificaron al final del almacenaje, pero no presentaron diferencias significativas entre las muestras. Durante el almacenaje de alimentos con alto contenido de lípidos, el proceso de oxidación y desaparición de las dobles ligaduras es notable en ácidos grasos insaturados como los ácidos linolénico, linoleico y oleico (Kim *et al.*, 2013). Las regresiones lineales de los ácidos grasos insaturados mostraron valores de R^2 mayores a 0,55 para todas las muestras de queso Cottage, lo cual sugiere que sufrieron cambios marcados durante el almacenaje y que los puntos de la regresión se ajustan bastante bien a la ecuación.

Los productos lácteos son la mayor fuente de dietaria de ácido linoleico conjugado (ALC), conocido por sus beneficios para la salud, el isómero cis-9, tras 11 constituye aproximadamente el 80-90% del ALC en la materia grasa de la leche (Parodi, 1999). El procesamiento de la leche a queso parece no tener efecto alguno en la concentración final de ALC (Prandini *et al.*, 2007; Prandini *et al.*, 2011). En este estudio de almacenaje de 40 días a 40 °C, la concentración de ALC en las muestras de queso Cottage decreció significativamente. En la muestra control el contenido de ALC decreció de 2,31 a 1,59 g/100 g al final del almacenaje,

mientras que el tratamiento adicionado con AE Cordobés, decreció hasta 1,89 g/100 g. Por otra parte, el ácido linolénico disminuyó de 1,27 a 0,57 g/100g en la muestra control y a 1,23 g/100g en el tratamiento con AE Compacto. Las tasas de oxidación de oxígeno triplete en ácidos oleico, linoleico y linolénico fueron reportadas en la siguiente relación: 1:27:77 (Min y Boff, 2002). En general, la muestra control presento mayores pendientes negativas que el resto de las muestras, al comparar entre ácidos grasos poliinsaturados, lo que indica un mayor grado de oxidación y deterioro y al mismo tiempo se evidencia un efecto protector del aceite esencial de orégano y el timol sobre los lípidos del queso orgánico Cottage.

Tabla 5.9. Valores medios del perfil de ácidos grasos (día 0 y día 40 del almacenaje), ecuaciones de regresión y R² ajustados de muestras de queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol del estudio de almacenaje realizado durante 40 días a 40°C.

Ac. Graso	Muestra	Día 0	Día 40	Ec. de regresión		
				β0	β1	R ²
12:0 ¹	Control	6.54±0.79	11 ±0.17 b	5.75	0.155	0.6769
	Compacto		10.9 ±0.09 b	4.46	0.1959	0.6354
	Cordobés		8.02 ±0.27 a	6.04	0.0465	0.8671
	Criollo		8.9 ±0.02 a	7.23	0.0422	0.9587
	Mendocino		11.45 ±0.26 b	4.89	0.1709	0.9151
	Timol		8.13 ±0.44 a	6.55	0.0425	0.8676
12:1 ¹	Control	1.11 ±0.106	0.88 ±0.1 ab	1.26	-0.0106	0.8307
	Compacto		0.84 ±0.01 a	1.01	-0.0052	0.7848
	Cordobés		0.97 ±0.08 b	1.18	-0.0055	0.9838
	Criollo		0.93 ±0.07 ab	1.19	-0.0058	0.8601
	Mendocino		0.86 ±0.01 ab	1.14	-0.0068	0.545
	Timol		0.93 ± 0.04 ab	1.39	-0.011	0.9675
14:1 ¹	Control	0.97 ±0.068	0.86 ±0.04 b	1.43	-0.0148	0.5518
	Compacto		0.62 ±0.02 a	0.94	-0.0082	0.9856
	Cordobés		0.85 ±0.01 b	0.98	-0.0033	0.9955
	Criollo		0.81 ±0.08 b	1.02	-0.0054	0.9367
	Mendocino		0.77 ±0.07 b	1.05	-0.0068	0.9922
	Timol		0.99 ±0.04 c	1.08	-0.0049	0.7872
16:2 ¹	Control	0.98 ±0.016	0.80 ±0.18 ab	1.07	-0.0069	0.9571
	Compacto		0.91 ±0.07 c	1.06	-0.0037	0.5065
	Cordobés		0.89 ±0.05 bc	1.02	-0.0035	0.9449
	Criollo		0.85 ±0.02 bc	1.03	-0.0046	0.994
	Mendocino		0.77 ±0.02 a	1.04	-0.0063	0.9276
	Timol		0.88 ±0.08 bc	1.01	-0.0033	0.987
17:0 ¹	Control	0.78 ±0.03	0.94 ±0.02 b	0.69	0.0063	0.9746
	Compacto		0.93 ±0.02 b	0.77	0.0043	0.7991
	Cordobés		0.81 ±0.03 a	0.75	0.0017	0.8148
	Criollo		1.02 ±0.12 b	0.75	0.0054	0.6757
	Mendocino		1.01 ±0.04 b	0.77	0.006	0.9093
	Timol		1.03 ±0.05 b	0.75	0.0078	0.7881

¹ Letras distintas en la misma fila para cada ácido grasos significa que hay diferencias significativas entre tratamientos en el período analizado ($\alpha = 0,05$).

Tabla 5.9 (Continuación). Valores medios del perfil de ácidos grasos (día 0 y día 40 del almacenaje), ecuaciones de regresión y R² ajustados de muestras de queso Cottage saborizado con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol del estudio de almacenaje realizado durante 40 días a 40°C.

Ac. Graso	Muestra	Día 0	Día 40	Ec. de regresión		
				β0	β1	R ²
18:0¹	Control		16.27 ±0.5 ab	15.19	0.0311	0.2836
	Compacto		16.17 ±0.01 ab	16.23	-0.0076	0.0617
	Cordobés	15.9±0.37	15.57 ±0.35 a	15.67	-0.0039	0.0141
	Criollo		16.16 ±0.42 ab	15.43	0.0155	0.2582
	Mendocino		16.39 ±0.21 b	14.54	0.0278	0.0322
	Timol		15.69 ±0.13 ab	15.35	0.0068	0.0949
18:1n9¹	Control		27.44 ±0.51 a	30.11	-0.0597	0.9175
	Compacto		28.79 ±0.55 a	29.53	-0.0161	0.8025
	Cordobés	28.86 ±0.66	28.8 ±0.97 a	30.45	-0.0347	0.5844
	Criollo		28.86 ±0.67 a	30.34	-0.05	0.6381
	Mendocino		26.62 ±0.56 a	32.06	-0.133	0.9286
	Timol		26.44 ±1.1 a	29.9	-0.0745	0.738
18:1n11¹	Control		0.92 ±0.1 a	1.11	-0.0046	0.8622
	Compacto		1.02 ±0.01 b	1.10	-0.0021	0.7639
	Cordobés	1.07 ±0.05	0.99 ±0.03 ab	1.09	-0.0028	0.7482
	Criollo		0.92 ±0.06 a	1.10	-0.0045	0.9759
	Mendocino		0.97 ±0.07 ab	1.10	-0.0031	0.7659
	Timol		0.95 ±0.01 ab	1.08	-0.0036	0.7505
18:2 T¹	Control		2.11± 0.64 ab	3.49	-0.0349	0.9692
	Compacto		2.7± 0.01 b	3.30	-0.0123	0.6734
	Cordobés	3.22 ±0.25	2.18± 0.37 ab	3.29	-0.0414	0.9457
	Criollo		1.86± 0.72 a	4.16	-0.061	0.6543
	Mendocino		1.92± 0.07 ab	3.28	-0.0368	0.9283
	Timol		2.09± 0.87 ab	3.37	-0.0295	0.8518

¹ Letras distintas en la misma fila para cada ácido grasos significa que hay diferencias significativas entre tratamientos en el período analizado ($\alpha = 0,05$).

Tabla 5.9 (Continuación). Valores medios del perfil de ácidos grasos (día 0 y día 40 del almacenaje), ecuaciones de regresión y R² ajustados de muestras de queso Cottage saborizado con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol del estudio de almacenaje realizado durante 40 días a 40°C.

Linolenico¹	Control		0.57 ± 0.05 a	1.32	-0.0196	0.983
	Compacto		1.23 ± 0.03 c	1.51	-0.0042	0.8852
	Cordobés	1.3 ± 0.14	1.16 ± 0.16 c	1.37	-0.0057	0.9246
	Criollo		0.96 ± 0.05 b	1.42	-0.016	0.6348
	Mendocino		0.99 ± 0.01 b	1.61	-0.0155	0.9988
	Timol		0.99 ± 0.16 b	1.24	-0.0047	0.4655
	Control			1.88b		
Compacto		1.66a				
S/I¹	Cordobés	1.53	1.62a			
	Criollo		1.67a			
	Mendocino		1,94			
	Control		1,77			

¹ Letras distintas en la misma fila para cada ácido grasos significa que hay diferencias significativas entre tratamientos en el período analizado ($\alpha = 0,05$).

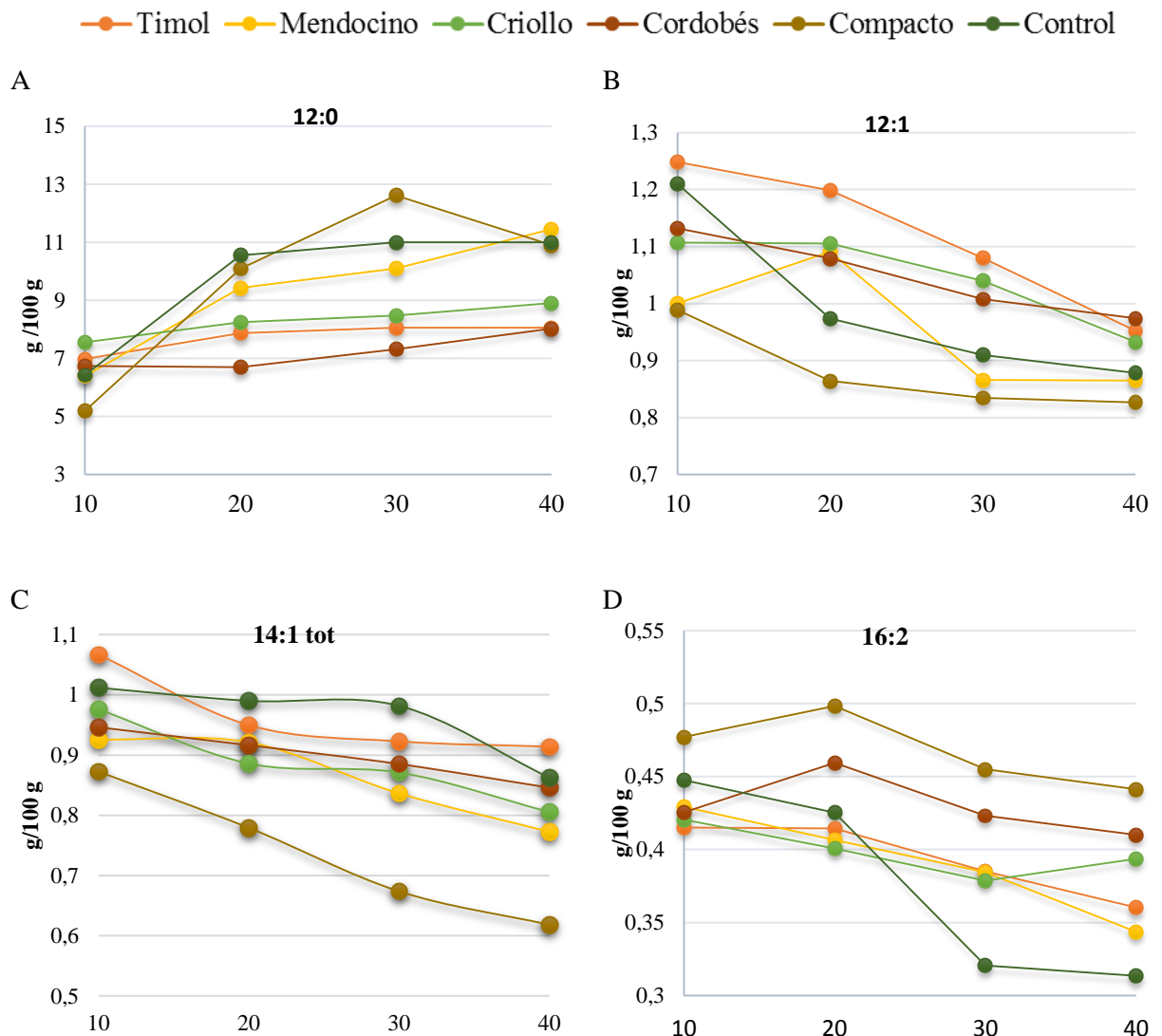


Fig. 5.11. Variación en el perfil de ácidos grasos (A) 12:0, (B)12:1, (C)14:1, (D)16:2, (E)17:0, (F) ac. Oleico, (G) ac. Eláidico, (H) ac. Linoleico; (I) ac. Linoeláidico y (J) ac. Linolénico en las muestras de queso Cottage saborizadas con aceites esenciales de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (40 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno.

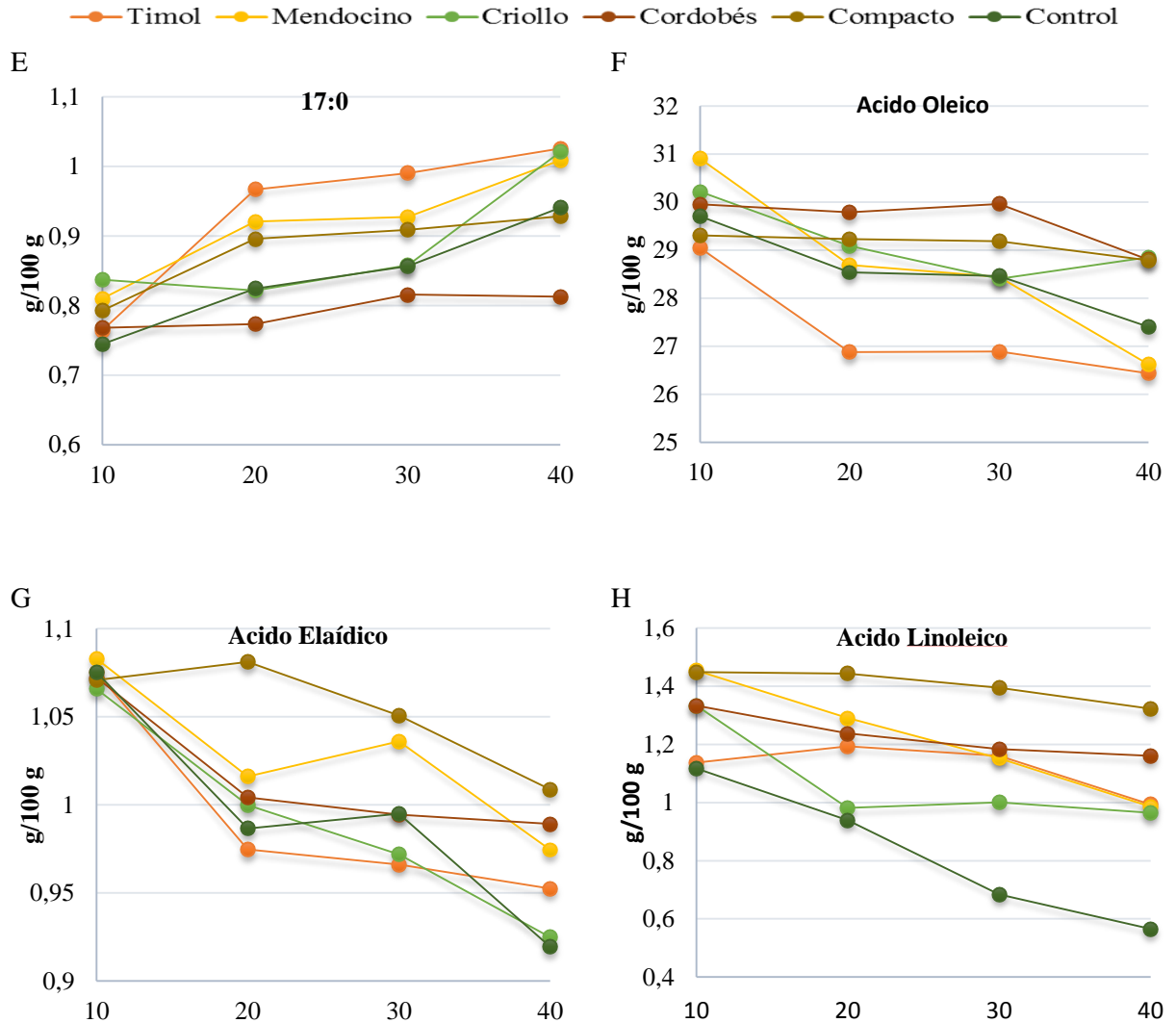


Fig. 5.11 (Continuación) Variación en el perfil de ácidos grasos (A) 12:0, (B) 12:1, (C) 14:1, (D) 16:2, (E) 17:0, (F) ac. Oleico, (G) ac. Elaídico, (H) ac. Linoleico; (I) ac. Linoelaídico y (J) ac. Linolénico en las muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (40 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno.

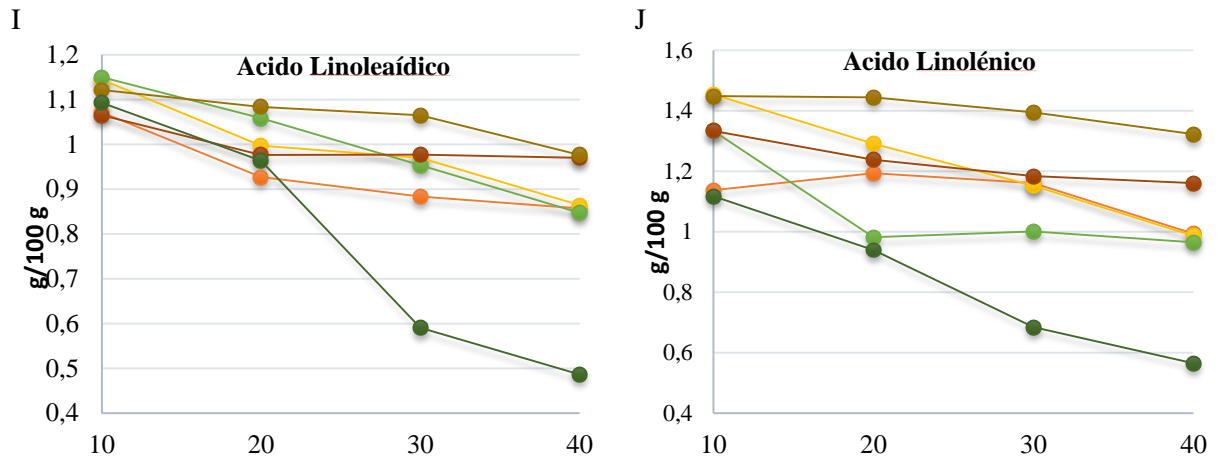


Fig. 5.11 (Continuación) Variación en el perfil de ácidos grasos (A) 12:0, (B) 12:1, (C)14:1, (D)16:2, (E)17:0, (F) ac. Oleico, (G) ac. Elaídico, (H) ac. Linoleico; (I) ac. Linoelaídico y (J) ac. Linolénico en las muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (40 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno.

Los ácidos grasos insaturados se descomponen de manera más rápida que los mono-insaturados y saturados, por lo que el contenido de estos últimos parece incrementarse en términos de porcentaje relativo. Debido a esto, sería posible utilizar la relación de ácidos grasos saturados/insaturados como parámetro del grado de oxidación de los lípidos (Kim *et al.*, 2013). Cambios en las cantidades de ácidos grasos (AG) saturados (S) e insaturados (I) en el queso cottage adicionados con aceite esencial de orégano y timol se muestran en la Figura 5.12. El contenido de AG insaturados decreció significativamente ($p < 0,05$) debido a la oxidación durante el almacenaje. Mientras tanto, el contenido de AG saturados se incrementó de manera significativa ($p < 0,05$). La relación S/I aumentó durante el almacenamiento para todas las muestras. El tratamiento de queso orgánico con AE Men mostró el valor más alto para esta relación después de 40 días de almacenaje a 40 °C (1,94), seguida por la muestra control (1,88). Mientras que las muestras de queso Cottage con AE Compacto, Cordobés y Criollo presentaron valores menores para relación S/I (1,66, 1,62 y 1,67 respectivamente). Los cambios diferenciales en la relación S/I podrían deberse a al tipo de aceite esencial utilizado y a la composición de ácidos grasos. La tasa de oxidación es más rápida en muestras con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Por ejemplo, se reportó que la relación saturados/insaturados se incrementa continuamente con el tiempo de acuerdo a lo observado en un estudio de oxidación acelerada de granos de soja y grasa animal almacenados a 180°C (Kim *et al.*, 2013).

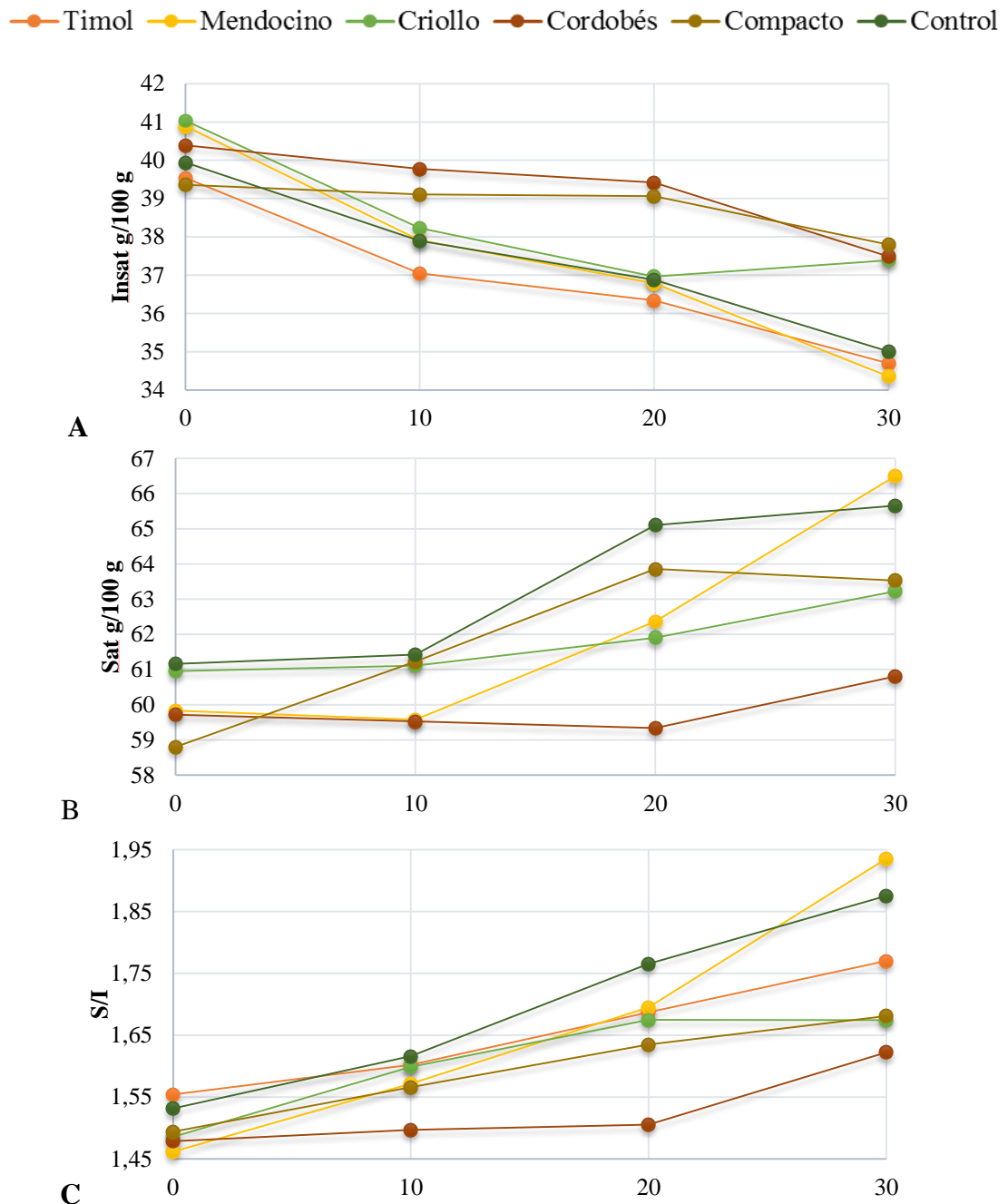


Fig. 5.12. Variación en el contenido de ácidos grasos (a) insaturados y (b) saturados y (c) en la relación saturados/insaturados (S/I) en las muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (40 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno.

Los ácidos orgánicos contribuyen al sabor y al aroma de la mayoría de las variedades de queso. Los ácidos orgánicos (AO) de cadena corta, solubles en agua, pueden aparecer en el queso como el resultado de la hidrólisis grasa de la leche durante la lipólisis (ácidos acético y butírico),

el metabolismo normal bovino/ovino (ácidos cítrico, orótico, y úrico) o el metabolismo bacteriano (ácidos láctico, acético, pirúvico, propiónico, fórmico y butírico). Por lo tanto, la determinación cuantitativa de los ácidos orgánicos puede servir para monitorear el crecimiento bacteriano y el metabolismo celular, y además el perfil de estos ácidos es útil en la identificación de la etapa de maduración del queso (Garde *et al.*, 2012). El paso inicial en la maduración del queso es la conversión de la lactosa a lactato, que es llevado a cabo por bacterias ácido lácticas (BAL). Otros AO puede aparecer en el queso como productos de la hidrólisis de grasa de la leche mediada por enzimas a causa del crecimiento y el metabolismo de los microorganismos (Garabal *et al.*, 2010).

Las concentraciones de ácidos orgánicos en las muestras de queso Cottage con el agregado de aceite esencial de orégano y timol almacenadas durante 40 días a 40 °C se muestran en la Figura 5.13. Después de 30 días de almacenamiento, se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos orgánicos para cada período. En general, el contenido de ácidos orgánicos aumentó con el tiempo de almacenamiento. Los ácidos láctico, acético y fórmico presentaron las concentraciones más altas (mg/kg) para todas las muestras al final del almacenaje. El ácido láctico (Figura 5.13A), producto mayoritario de la fermentación de la lactosa, alcanzó niveles de hasta 55,45 (muestra control) y 43,6 (AE Cordobés). Este último tratamiento (AE Cordobés) también mostró diferencias significativas con los otros tratamientos. La concentración de ácido láctico fue considerablemente mayor que otros ácidos porque este ácido orgánico es el más abundante en todos los quesos (Mato Rodriguez *et al.*, 2011; Murtaza *et al.*, 2012).

Los ácidos cítrico y pirúvico son metabolitos intermediarios que muestran cambios irregulares durante la maduración del queso. Las concentraciones de ácido cítrico pueden ser afectadas por Ca, P y el contenido de lactosa durante la maduración del producto lácteo. El ácido cítrico también puede formarse por la fermentación de glucosa con la ayuda de ciertos hongos. Por otra parte, el citrato puede ser utilizado como un sustrato por *Lactococos starters* para producir ácidos pirúvico y acético (Upreti *et al.*, 2006). En el presente estudio, se observó un incremento en las cantidades de ácido cítrico (Figura 5.13B) a partir de los 10 días de almacenamiento. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de queso Cottage para este ácido orgánico al final del almacenaje.

El piruvato puede ser producido por BAL mesofílicas a través de la vía glucolítica, y puede actuar como sustrato de varias reacciones metabólicas con la formación de ácido fórmico, etanol, y compuestos con grupos carbonilo, tales como di-acetilo y acetilo. Por otro lado, estas bacterias puede fijar el CO₂ utilizando la enzima piruvato carboxilasa y convertir el piruvato a oxalacetato, que posteriormente puede usarse como sustrato para formar citrato a través de la acción de la citrato sintasa (Upreti *et al.*, 2006). En las muestras de queso Cottage, las concentraciones de ácido pirúvico variaron muy poco, entre 7,41 y 7,46 mg/kg, durante el almacenaje (Fig 5.13C). Se observaron cambios en el contenido de este ácido orgánico para cada muestra. El contenido de ácido pirúvico aumentó en algunas muestras durante su almacenamiento (Compacto, Criollo), pero en otras presentaron una ligera disminución al final del almacenaje (Control, Cordobés, Mendocino y timol). Resultados similares para concentraciones de ácido pirúvico a los reportados en este trabajo fueron informados por Mato-Rodríguez (2011). Esta molécula es un intermediario en el metabolismo de los azúcares y actúa como sustrato para diferentes reacciones metabólicas. Por esta razón, el ácido pirúvico es continuamente sintetizado y consumido.

Altos contenidos de ácido fórmico (Fig. 5.13C) pueden atribuirse al metabolismo del piruvato (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2011). El contenido de ácido fórmico en las muestras de queso Cottage, aumentó significativamente a través de almacenamiento, al mismo tiempo que el ácido pirúvico alcanzaba los valores más altos al final del almacenaje. La muestra de control presentó la concentración más alta (5,64 mg/kg) mientras que la muestra con la adición de timol mostró el valor más bajo (4,33 mg/kg).

Cantidades perceptibles de ácido acético pueden dar al queso un sabor ligeramente desagradable (Garabal *et al.*, 2010). El ácido acético puede ser producido por los lactobacilos no-starters a partir de lactosa o de aminoácidos. Debe tenerse en consideración que los α -cetoácidos y los aminoácidos son sustratos para la producción de ácidos monocarboxílicos, a pesar de que el fundamento para su producción en medios complejos como el queso no es entendido completamente (Garde *et al.*, 2012). En las muestras de queso Cottage, se detectaron diferencias significativas después de 10 días de almacenamiento (Figura 5.13e), presentando el mayor valor la muestra control (10,27 mg/kg). Al día 30 de almacenaje, esta misma muestra mostró la concentración más alta de ácido acético (10,89 mg/kg). Este resultado indica una mayor presencia de organismos con metabolismo hetero-fermentativo en el producto. Las

muestras de queso con AE Compacto, Cordobés y Criollo presentaron los valores más bajos de ácido acético (9,50, 8,84 y 9,44 mg/kg, respectivamente) después de 30 días de almacenamiento, lo que sugiere un efecto protector sobre este parámetro de calidad negativo para quesos.

Incrementos en el contenido de ácidos butírico y propiónico incrementan durante la maduración de quesos elaborados con de leche vaca (Nhuch *et al.*, 2008). En quesos envasados al vacío, las concentraciones de ácidos butírico, propiónico y fórmico son más bajas lo que podría sugerir una reducción en la formación inicial de ácido butírico que podrían estar relacionados con una disminución en el grado de la lipólisis (Dermiki *et al.*, 2008; Garde *et al.*, 2012). La formación de propionato en la muestra de queso Cottage durante el almacenaje se muestra en la Figura 5.13F. Al final del almacenamiento (40 días), el contenido de ácido propiónico fue mayor en todas muestras. Las muestras AE Compacto y Cordobés tuvieron menor concentración de este ácido orgánico (1,23 y 1,24 mg/kg, respectivamente). Mientras que la muestra AE Mendocino presentó la mayor concentración de este ácido orgánico al final del almacenamiento (1,54 mg/kg) lo cual indica que el AE de esta variedad de orégano no tiene efecto conservante sobre el queso Cottage.

La producción de ácidos orgánicos es el resultado de diversos procesos microbiológicos, bioquímicos y metabólicos, incluyendo la glucólisis, la lipólisis y la proteólisis durante la fabricación y maduración de quesos. Las concentraciones de ácidos orgánicos aumentan con el progreso de la maduración (Ong y Shah, 2009), puesto que el queso, siendo un producto bioquímicamente dinámico, que va sufriendo cambios significativos, como consecuencia de numerosos procesos metabólicos. La temperatura elevada acelera el proceso de maduración y, por consiguiente, la producción de todos los ácidos orgánicos aumenta (Murtaza *et al.*, 2010). La temperatura es uno de los principales factores que afecta el crecimiento de las bacterias en el queso durante la fabricación y la maduración. Al aumentar la temperatura, aumenta la actividad microbiana y las reacciones bioquímicas (Azarnia *et al.*, 2006). La adición de sal disminuye la actividad microbiana y enzimática y en última instancia, afecta a los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración (Farkye, 2004; Mcsweeney, 2007). Los resultados de este estudio mostraron que la adición de aceite esencial de orégano, especialmente los obtenidos de las variedades Cordobés y Compacto, disminuyen significativamente la producción de ácidos orgánicos en el queso orgánico cottage durante el almacenamiento. Esta reducción en la producción de ácidos orgánicos, probablemente sea una consecuencia de la disminución de

actividades microbianas y enzimáticas que son afectadas por los aceites esenciales de estas variedades de orégano.

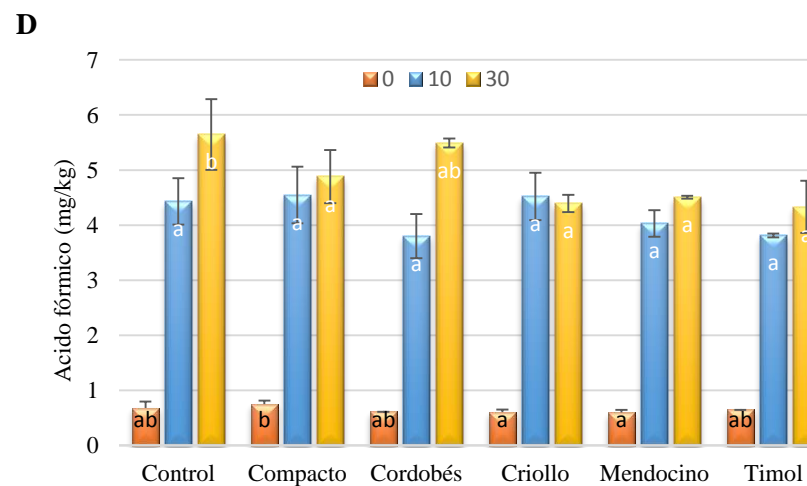
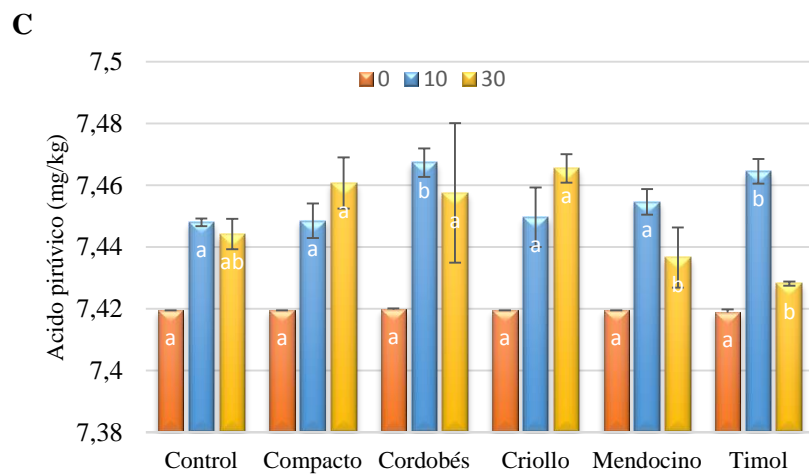
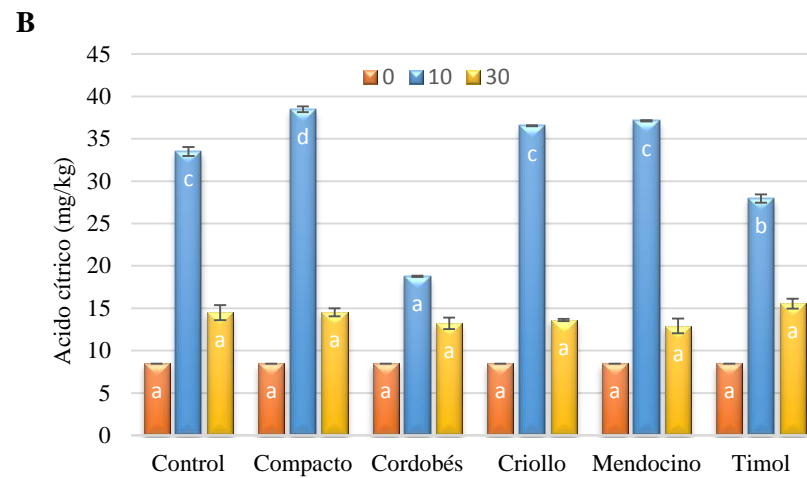
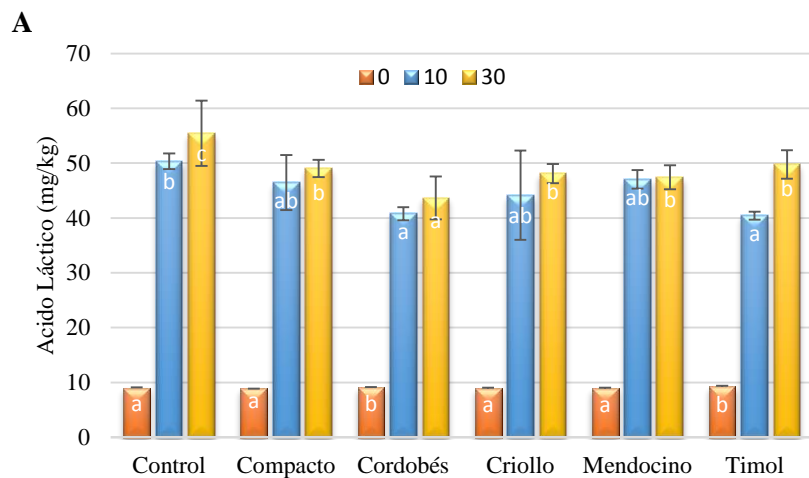


Fig. 5.13. Variación de los contenidos de ácidos orgánicos (A) láctico, (B) cítrico, (C) pirúvico, (D) fórmico, (E) acético y (F) propiónico en muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (30 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno.

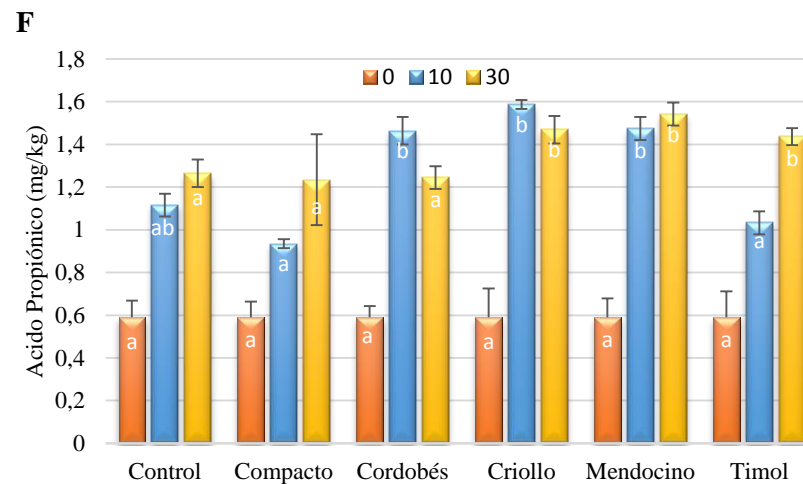
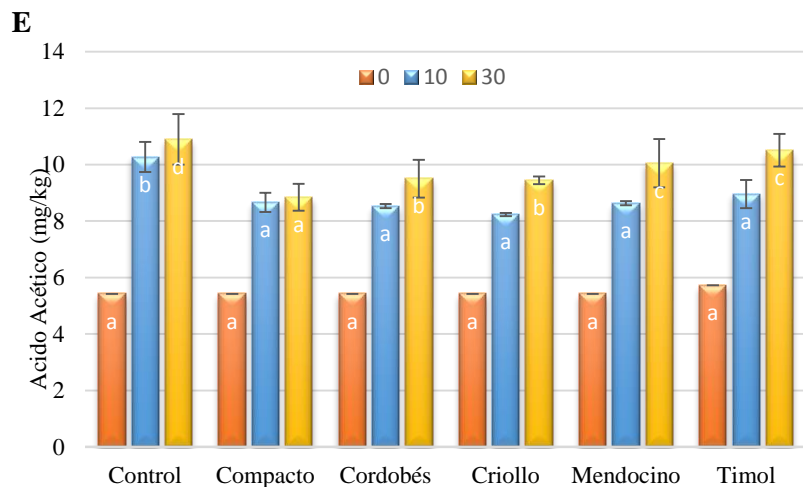


Fig. 5.13 (Continuación). Variación de los contenidos de ácidos orgánicos (A) láctico, (B) cítrico, (C) pirúvico, (D) fórmico, (E) acético y (F) propiónico en muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (30 días a 40 °C). Control corresponde a la muestra de queso Cottage sin aditivo alguno.

Los mismos tratamientos de queso orgánico Cottage, también fueron almacenados a 23°C durante 30 días para evaluar cómo se modificaban algunos parámetros de calidad a esta temperatura. Las concentraciones de ácidos orgánicos de las muestras de queso Cottage almacenadas a 23°C se muestran en la Figura 5.14. Después de 30 días de almacenamiento, se encontraron diferencias significativas en el contenido de los ácidos orgánicos para cada período. En general, el contenido de AO aumentó con el tiempo de almacenamiento, a menor tasa que para las muestras almacenadas a 40°C. El máximo valor de ácido láctico fue de 49,5 (mg/kg) para la muestras control (10 mg/kg menos que para la misma muestra a 40 °C). Al final del almacenaje, las muestras con menor contenido de ácido láctico fueron Cordobés y timol siendo estadísticamente diferentes al resto.

Con respecto al ácido acético, al final del almacenaje no se registraron diferencias estadísticamente significativas para este ácido orgánico entre los tratamientos. Sin embargo, la muestras con AE Criollo presentó la menor concentración de este ácido orgánico (6,71 mg/kg), mientras que la misma muestra almacenada a 40 °C tuvo 9,44 (mg/kg), esto significa un valor de 1,40 veces mayor contenido.

Los ácidos cítrico y pirúvico que son intermediarios metabólicos, mostraron cambios irregulares en el almacenaje del queso Cottage. A pesar de ello, estos cambios, fueron menos acentuados en los tratamientos almacenados a 23 °C que los sucedidos a 40°C. El menor contenido de ácido cítrico se observó en la muestras con timol (8,87 mg/kg) que junto a valores detectados en las muestras con el agregado de AE Criollo y Mendocino fueron estadísticamente diferentes al resto. Al igual que para el ácido pirúvico, el contenido fue de 1,39 en el tratamiento con AE Men y de 1,75 en el tratamiento con timol.

El ácido fórmico al ser producto del metabolismo del piruvato, su comportamiento en el almacenaje es bastante irregular. Sin embargo, al final del mismo se observaron diferencias significativas entre las muestras. Los tratamientos con timol y AE Compacto presentaron el menor valor para este ácido orgánico mostrando valores de 4,39 y 4,33 mg/kg, respectivamente.

Los contenidos de ácidos orgánicos en las muestras de queso orgánico Cottage almacenadas a 23 °C no se incrementaron en la misma magnitud que las muestras correspondientes almacenadas a 40 °C, lo que evidencia la importancia del efecto de la temperatura en el deterioro del queso Cottage. Si bien puede notarse en las muestras de queso

Cottage almacenadas a 23 °C un efecto protector de los aceites esenciales de algunas variedades de orégano y de la muestra con timol en comparación con la muestra control, estos no son tan evidentes como los observados a 40 °C.

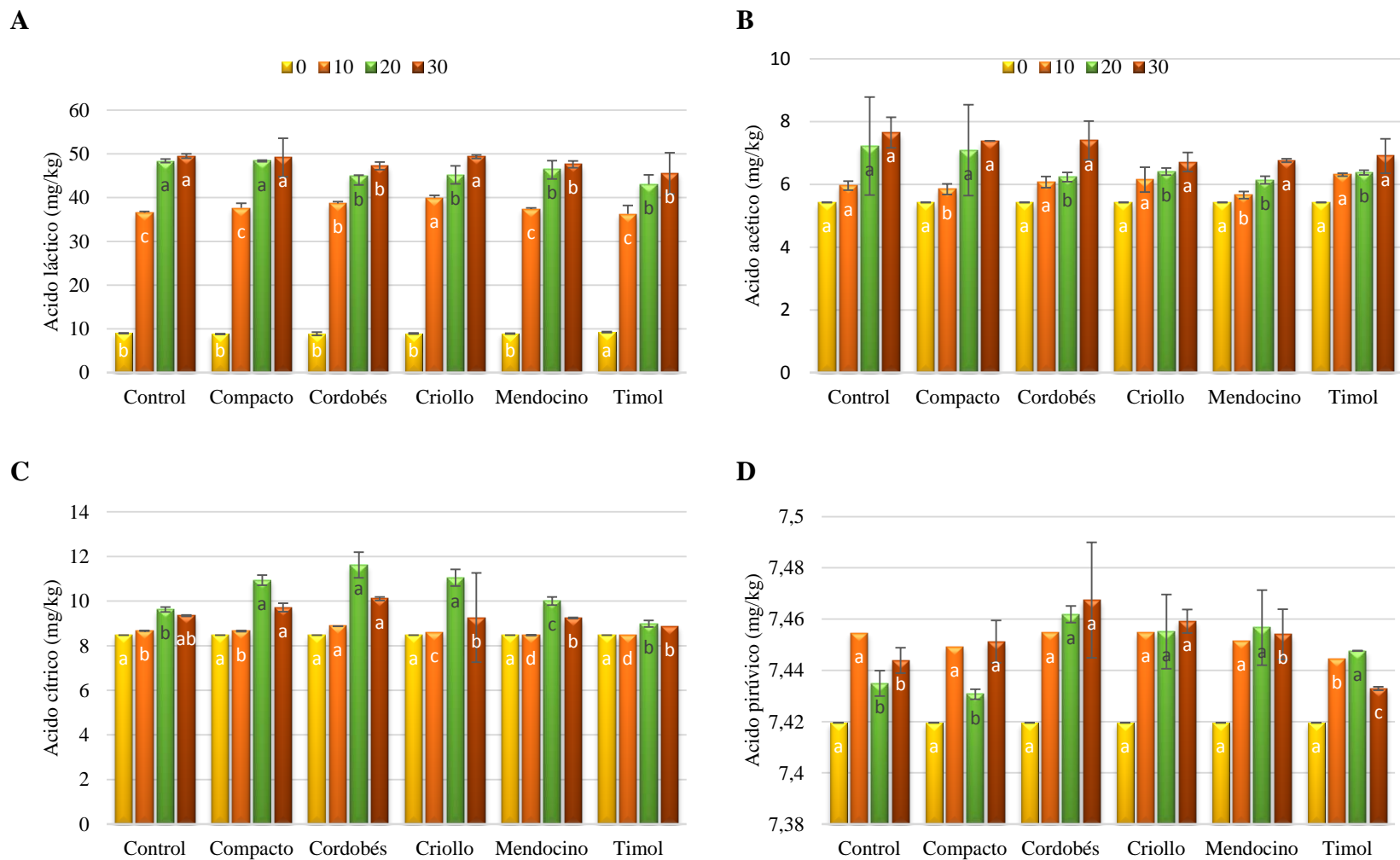
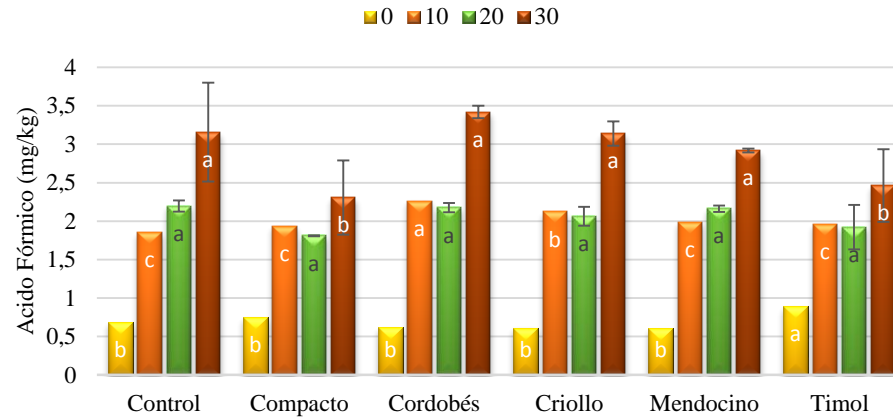


Fig. 5.14 Variación de los contenidos de ácidos orgánicos (A) láctico, (B) acético, (C) cítrico, (D) pirúvico y (E) fórmico en muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (30 días a 23 °C).



E

Fig. 5.14 Variación de los contenidos de ácidos orgánicos (A) láctico, (B) acético, (C) cítrico, (D) pirúvico y (E) fórmico en muestras de queso Cottage saborizadas con aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino y con timol durante almacenaje (30 días a 23 °C).

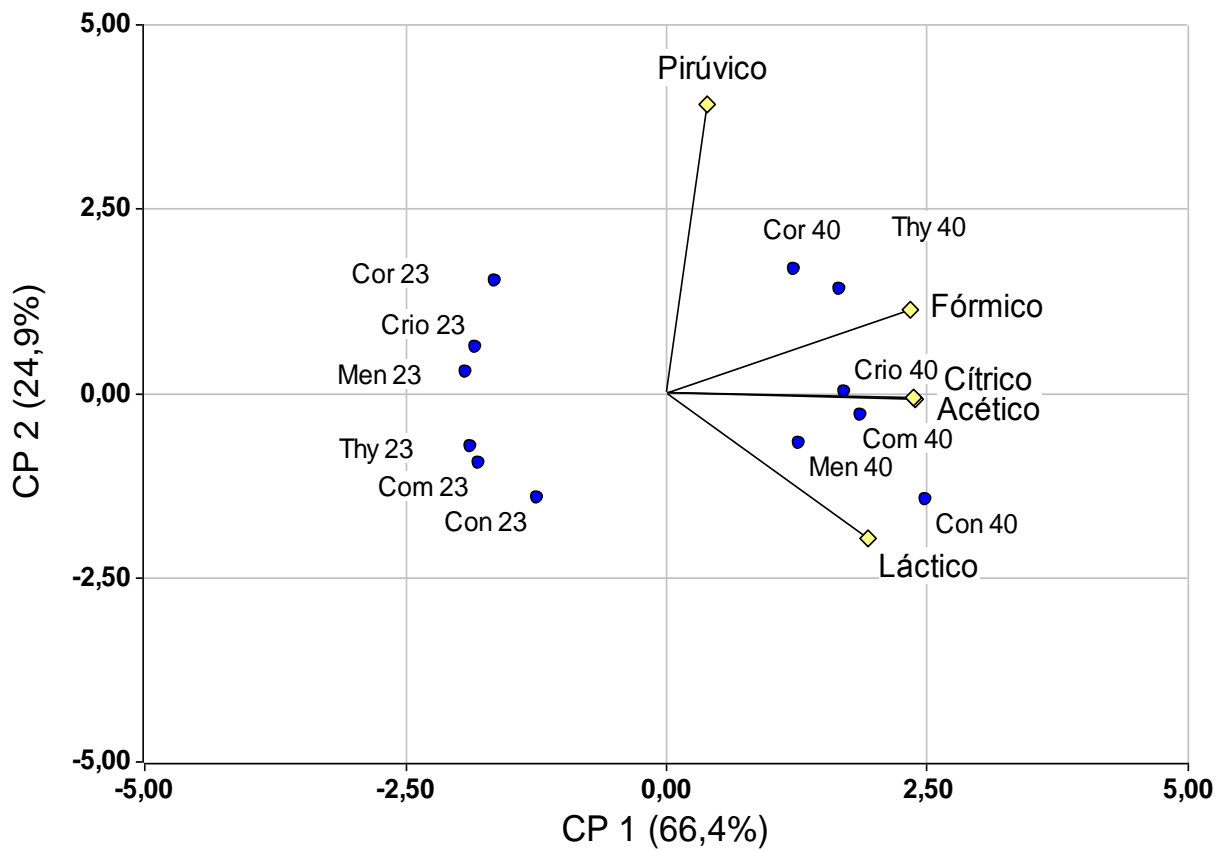


Fig. 5.15 Biplot de la primera y la segunda componentes del análisis de componentes principales (ACP). Variables dependientes: contenido de ácidos orgánicos acético, cítrico, fórmico, láctico y pirúvico. Tratamientos: muestras control de queso Cottage sin agregado de aceite esencial (Con), con el agregado de aceite esencial de orégano de las variedades Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio), y Mendocino (Men) y timol (thy) almacenados durante 30 días bajo dos temperaturas diferentes (23 °C y 40 °C).

El biplot obtenido de la primera y segunda componentes (CP) en el Análisis de Componentes Principales (ACP) del estudio de almacenaje de queso orgánico Cottage con el agregado de aceite esencial de orégano y timol se presenta en la Figura 5.15. Las dos primeras componentes principales explicaron el 91,3% de la variabilidad de las muestras durante 30 días de almacenaje bajo dos condiciones diferentes (23 °C y 40 °C). La CP 1 explicó el 66,4% de la variabilidad, mientras que la CP 2 el 24,9%. Los ácidos orgánicos analizados durante el almacenaje (ácidos acético, cítrico, fórmico, láctico y pirúvico), que son indicadores de deterioro del producto, se ubicaron del lado derecho del biplot. Los ácidos pirúvico y fórmico, con respecto a la CP 2, se ubicaron por encima de la misma mientras que el resto por debajo.

La dispersión de los puntos evidenció una gran variabilidad entre las muestras de queso Cottage almacenadas a 40 °C. Estas se ubicaron al lado derecho del biplot, probablemente porque presentaron los valores más elevados de éstos ácidos orgánicos, mientras que las muestras almacenadas a 23 °C se encontraron al lado opuesto, no pudiendo establecerse relación entre ellas.

Los indicadores de deterioro, es decir los ácidos orgánicos (ácidos láctico, cítrico, acético y fórmico), se encontraron positivamente asociados entre sí (ángulo entre los vectores menor a 90°) y altamente correlacionados con los tratamientos AE Com, Crio, Men y Con (este último altamente relacionado al ácido láctico) almacenados a 40 °C. Los tratamientos Thy y Cor, ambas almacenadas 40 °C, se ubicaron en el cuadrante derecho superior del biplot y estuvieron asociados a los intermediarios metabólicos como los ácidos pirúvico y fórmico, encontrándose menos relacionados con los demás ácidos orgánicos, lo que indica un posible efecto protector de estos dos tratamientos a 40 °C.

Las muestras ubicadas del lado derecho del biplot, mostraron baja asociación con las variables (ácidos orgánicos), especialmente los tratamientos AE Cor y Crio, ambas almacenadas a 23 °C, que se encontraron negativamente relacionados con contenido de ácido láctico, debido a la ubicación espacial (casi 180°).

El efecto conservante de la adición de aceite esencial de orégano a queso orgánico Cottage es más evidente a 40 °C que a 23°. En esta última condición, la menor temperatura mejora la conservación del alimento y no hace visible el deterioro del producto en ese corto período de almacenaje.

Cambios microbiológicos en queso cottage orgánico con el agregado de aceites esenciales de orégano y timol.

Las muestras de queso Cottage con el agregado aceite esencial de orégano y timol almacenadas durante 30 días en dos condiciones de temperatura (23 °C y 40°C) fueron también sometidas a análisis microbiológico realizando el recuento de microorganismos aerobios mesófilos.

En la Figura 5.16 se encuentran los resultados obtenidos del recuento de mesófilos totales en las muestras de queso Cottage. La carga inicial de microorganismos aerobios totales de las muestras analizadas en ambas temperaturas fue la misma. El recuento de aerobios totales se incrementó significativamente durante todo el almacenaje en las muestras almacenadas a 23 °C, mientras que en las muestras almacenadas a 40 °C el incrementó fue aún mayor en el período de 0 a 10 días, para posteriormente caer drásticamente. En éstas muestras almacenadas a 40°C, después de 30 días de almacenaje no se registraron diferencias significativas entre ellas en el recuento de mesófilos totales (Figura 5.17). Lombardo (2008) observó que en hamburguesas de soja al acabo de 15 días de almacenaje a 4 °C no sufren un efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano hacia los microorganismos, pero sin embargo, las muestras con el agregado de aceite esencial presentaron un recuento de 2 logaritmos menos que las muestras sin aceite esencial.

Cabe destacar que a partir de los 10 días de almacenaje, la muestra de queso Cottage control almacenada a 23 °C presentó los valores más altos de recuento (Fig. 5.16) y las muestras con el agregado de aceites esenciales y timol valores inferiores. Esto sugiere un efecto protector de los aceites esenciales en contra del crecimiento de los microorganismos. Las muestras de queso con AE Cordobés y timol almacenadas a 23 °C tuvieron el menor recuento de microorganismos presentando valores de $6,58 \times 10^3$ y $5,83 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente, después de 30 días de almacenaje, siendo estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos a esta misma temperatura ($p < 0,0001$).

Para alcanzar una vida útil adecuada, los productos alimenticios requieren carga microbiana inicial reducida (controlada o inhibida durante el proceso de elaboración). Para obtener el perfil de un agente sanitizante es importante optimizar el tiempo de contacto entre un determinado agente, en este caso el aceite esencial, y el microorganismo patógeno de los alimentos (Nychas *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2005; Oussalah *et al.*, 2006).

A partir de estos resultados, se puede observar que la carga de microorganismos aerobios mesófilos viables totales de las muestra control que no tuvo el agregado de aceite esencial de orégano ni timol almacenada a 23 °C, incrementó desde $1,76 \times 10^3$ a $1,39 \times 10^5$. El Código Alimentario Argentino especifica para producto lácteos un límite de 1×10^5 como calidad aceptable provisionalmente (ANMAT, 2013). El resto de las muestras de queso Cottage con el agregado de aceite esencial de orégano y timol serían aceptadas siguiendo éste criterio ya que registraron valores inferiores a lo requerido por el Código Alimentario Argentino.

Para que los aceites esenciales sean aplicables a la tecnología de conservación de alimentos, se debe considerar la naturaleza de la flora contaminante patógena que puede tener el alimento, el pH, el rol que cumplen los compuestos fenólicos de los aceites esenciales, la acción inhibitoria y selectiva del O₂ y el CO₂, la temperatura utilizada para la conservación del alimento y el rol de la descomposición del mismo (Tassou *et al.*, 1995; Nevas *et al.*, 2004). La disminución en la eficacia de los antimicrobianos derivados de plantas en la transición del caldo al alimento no tiene precedentes y acentúa el peligro en la extrapolación del valor práctico de estas observaciones a partir de estudios en medio líquido, donde las condiciones de crecimiento son ideales y optimizan el efecto antimicrobiano ocurrido (Nychas *et al.*, 2003). Por otro lado hay que tener en cuenta que la naturaleza hidrofóbica y la viscosidad de los aceites esenciales puede reducir la capacidad de dilución o causar distribución heterogénea. Así como largos períodos de preparación pueden resultar en la evaporación o descomposición de algunos de sus componentes activos de los aceites esenciales (Kalembe y Kunicka, 2003).

La actividad inhibitoria de determinados componentes fenólicos puede ser afectada por una alta cantidad de proteínas en el alimento, como probablemente, puede haber sucedido en el experimento de queso cottage. Por otra parte, debido a la hidrofobicidad de los aceites esenciales que los hace más solubles en alimentos lipídicos, entonces, de la cantidad inicial agregada al queso, solamente una parte queda libre para exhibir el efecto antibacteriano.

Si bien este experimento se realizó a temperaturas superiores que las que el producto se almacena normalmente (4 °C), el objetivo fue que los procesos de deterioro químico y microbiológico se realizaran de manera acelerada y poder evaluar cambios y detectar el efecto protector del agregado de aceite esencial de orégano en queso orgánico Cottage. En función de

los resultados observados efectivamente la adición de aceite esencial de orégano tiene un efecto conservante desde el punto microbiológico.

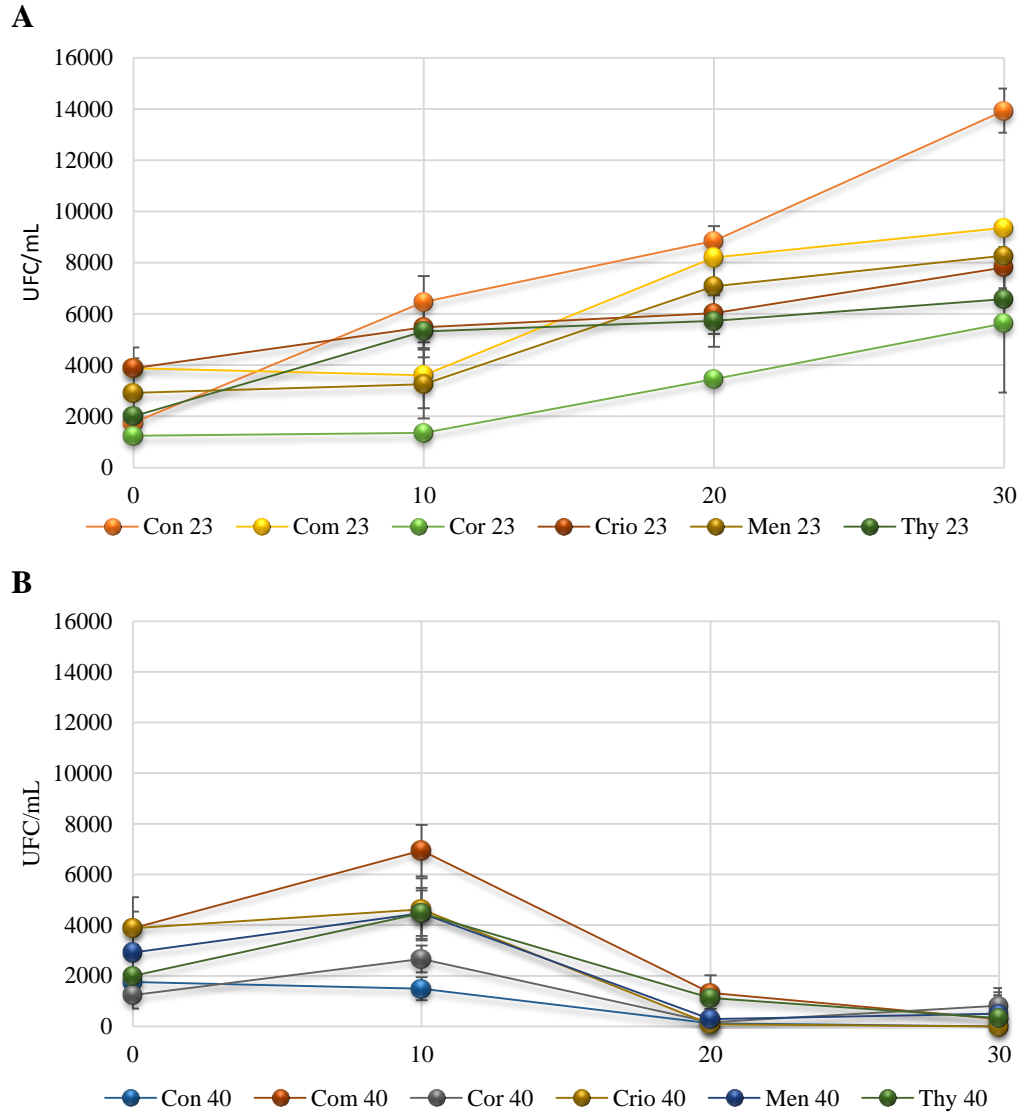


Fig. 5.16. Variación en el recuento de microorganismos mesófilos totales en muestras de queso Cottage con el agregado de aceites esenciales de orégano de la variedades Compacto (Com), Cordobés (Cor), Criollo (Crio) y Mendocino (Men) y timol (Thy) almacenadas 30 días (A) 23 °C y (B) 40 °C. Con = Control, muestra sin agregado.

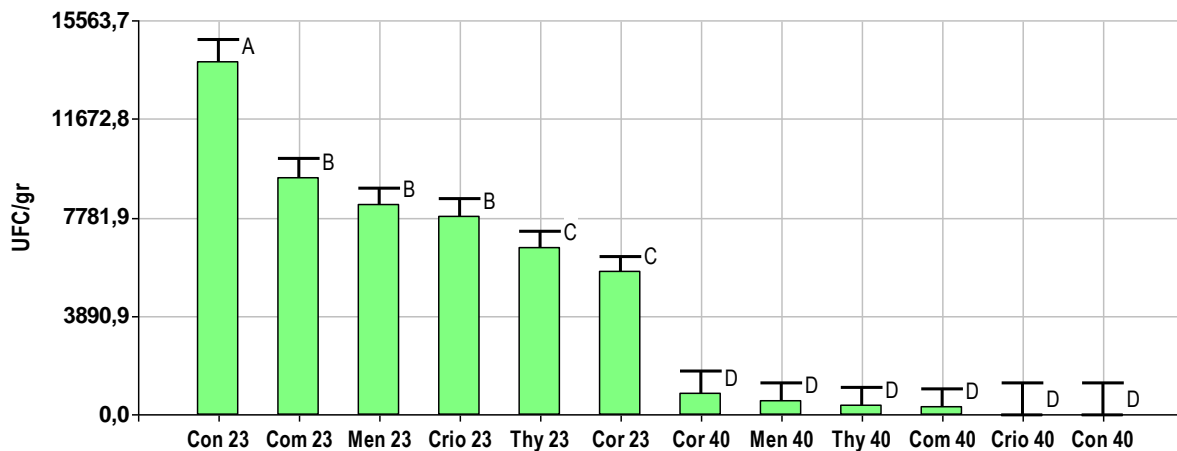


Fig. 5.17. Diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$) para muestras de queso Cottage adicionadas con aceite esencial de orégano y timol (Con = Control, Com = AE Compacto, Crio = AE Criollo, Cor = AE Cordobés, Men = AE Mendocino y Thy = timol) almacenadas durante 30 días a dos temperaturas diferentes (23 °C y 40 °C).

CONCLUSIONES

- El aceite esencial de orégano tiene actividad antioxidante y capacidad para conservar las propiedades sensoriales del aceite de oliva, especialmente cuando el producto se conserva en oscuridad.
- El aceite esencial de orégano Cordobés es el que mayor propiedad antioxidante tiene sobre el aceite de oliva especialmente cuando el producto se conserva en oscuridad.
- El aceite esencial de orégano Criollo, también presenta buena actividad antioxidante cuando el producto es expuesto a luz.
- El aceite esencial de orégano se asocia positivamente con el contenido de pigmentos (Carotenos y Clorofilas) cuando el producto se conserva en oscuridad.
- El aceite esencial de orégano, especialmente de la variedad Cordobés, preserva mejor la intensidad de los atributos positivos, es decir la calidad sensorial, del aceite de oliva extra-virgen prolongando la vida útil de este producto.
- El aceite esencial de orégano Cordobés preserva a la ricota del deterioro oxidativo y mantiene más bajo los niveles de acidez láctica.
- Los aceites esenciales de orégano de las variedades Cordobés y Compacto se relacionan positivamente con las intensidades de los atributos orégano y amargo, lo que indica que estos aceites esenciales ejercen un efecto perseverante de estos sabores positivos. Pero no se asocian con indicadores de deterioro sensorial como son las intensidades de los atributos ácido, fermentado y oxidado.
- El aceite esencial de orégano, especialmente de las variedades Compacto, Cordobés y Criollo muestran un efecto perseverante de los ácidos poliinsaturados de los lípidos de queso Cottage orgánico ya que las muestras estudiadas presentaron pendientes en las ecuaciones de regresión del estudio de almacenaje.
- La adición de aceites esenciales de orégano, especialmente Cordobés y Compacto, en el queso orgánico Cottage disminuye significativamente la producción de ácidos orgánicos durante el almacenaje.
- Asociada a la reducción en la producción de ácidos orgánicos, también se observa una disminución de actividades microbianas que también es afectada por la adición de aceite

esencial de orégano. El queso orgánico Cottage adicionado con aceite esencial de orégano Cordobés presenta menor recuento de microorganismos mesófilos totales.

BIBLIOGRAFÍA

- Amirdivani, S. & Salihin Baba, A. 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT - Food Science and Technology* 44: 1458-1464.
- Ancin, M. C. & Martínez, M. T. 1991. Estudio de la degradación de los aceites de oliva sometidos a fritura I Determinación estadística del parámetro que mejor cuantifica esta degradación. *Grasas y Aceites* 42: 22-31.
- ANMAT. 2013. Alimentos Lácteos. En: Código Alimentario Argentino. ANMAT (Eds.). Buenos Aires. ANMAT. pp.
- AOAC. 2007. Official Methods of Analysis of the AOAC. AOAC (Eds.). Gaithersburg, Md. AOAC International.. pp.
- Asensio, C. M., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science* 76: 445-S450.
- Ayadi, M. A., Grati-Kamun, N. & Attia, H. 2009. Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food Chemistry and Toxicology* 47: 2613-2619.
- Ayyash, M. M. & Shah, N. P. 2010. Effect of partial substitution of NaCl with KCl on Halloumi cheese during storage: Chemical composition, lactic bacterial count, and organic acids production. *Journal of Food Science* 75: 525–529.
- Ayyash, M. M. & Shah, N. P. 2011. The effect of substitution of NaCl with KCl on chemical composition and functional properties of low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 94 3761–3768.
- Azarnia, S., Robert, N. & Lee, B. 2006. Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. . *Critical Rev of Biotechnology* 26: 121–143.
- Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R. & Raychaudhuri, U. 2008. Antioxidant activity of natural plant sources in dairy dessert (Sandesh) under thermal treatment. . *LWT - Food Science and Technology* 41: 816–825.
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. & Ruberto, G. 2000. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 235-244.
- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. 2009. Food Chemistry. Belitz, H. D., Grosch, W. y Schieberle, P. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 1070 pp. pp.

- Boroski, M., Giroux, H. J., Sabik, H., Petit, H. V., Visentainer, J. V., Matumoto-Pintro, P. T. & Britten, M. 2012. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. *LWT - Food Science and Technology* 47: 167-174.
- Caponio, F., Pasqualone, A. & Gomes, T. 2003. Changes in fatty acid composition of vegetables oils in model doughs submitted to conventional or microwave heating. *International Journal of food Science and Technology* 38: 481-486.
- Cerretani, L., Rocculi, P., Bendini, A., Romani, S. & Bacci, A. 2009. Oil clarifying process and apparatus for implementing the process in Application, W. P., World Patent Application Kind Code.
- COI. 2001. Método de análisis prueba espectrofotométrica en el ultravioleta. Document COI/T 20/ Doc nº 19/Rev 1. (IOOC), I. O. O. C. (Eds.). Madrid, España. International Olive Oil Council (IOOC) pp.
- Criado, M. N., Romero, M. P., Casanovas, M. & Motilva, M. J. 2008. Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry* 110: 873-880.
- Chen, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton, L. & Akesson, B. 2003. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal* 13: 927-935.
- Dalsgaard, T. K., Sørensen, J., Bakman, M., Vognsen, L., Nebel, C., Albrechtsen, R. & Nielsen, J. H. 2011. Light-induced protein and lipid oxidation in cheese: whey as antioxidant. *Dairy Science and Technology* 91: 171-183.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. & Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1115-1120.
- De Oliveira, T. L. C., Malfitano de Carvalho, S., de Araújo Soares, R., Andrade, M. A., Cardoso, M. G., des Ramos, E. & Hilsdorf Piccolia, R. 2012. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *LWT - Food Science and Technology* 45: 204-212.
- Dermiki, M. A., Ntzimani, A., Badeka, I. N., Savvaidis, I. & Kontominas, M. G. 2008. Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese 'Myzithra Kalathaki' using modified atmosphere packaging. *LWT - Food Science and Technology* 41: 284-294.

- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat versión 2012., in Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Farkye, N. Y. 2004. Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology* 57: 91-98.
- Frankel, E. N. 2005. Lipid Oxidation. Frankel, E. N. (Eds.). Bridgewater. The Oily Press. 489 pp.
- Garabal, J. I., Rodríguez-Alonso, P., Franco, D. & Centeno, J. A. 2010. Chemical and biochemical study of industrially produced San Simón da Costa smoked semi-hard cow's milk cheeses: Effects of storage under vacuum and different modified atmospheres. *Journal Dairy Science* 93: 1868–1881.
- Garde, S., Ávila, M., Gaya, P., Arias, R. & Nuñez, M. 2012. Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal* 28: 87-91.
- Giroux, H. J., Houde, J. & Britten, M. 2010. Use of heated milk protein-sugar blends as antioxidant in dairy beverages enriched with linseed oil. *LWT - Food Science and Technology* 43: 1373-1378.
- Grati-Kamoun, N. 2007. 'Etude de la diversité génétique de l'olivier cultivé en Tunisie: approche pomologique, chimique et moléculaire, in, Sfax, Tunisia, Universidad de Sfax.
- Grosso, N. R., Nepote, V. & Guzmán, C. A. 2000. Chemical composition of some wild peanut species (*Arachis* L.) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 806-809.
- Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fustier, P., Salmieri, S. & Lacroix, M. 2011. Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. *Food Research International* 44: 494-497.
- Huvaere, K., Nielsen, J. H., Bakman, M., Hammersh, M., Skibsted, L. H., Sørensen, J., Vogensen, L. & Dalsgaard, T. K. 2011. Antioxidant Properties of Green Tea Extract Protect Reduced Fat Soft Cheese against Oxidation Induced by Light Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 8718–8723.
- Inarejos-García, A. M., Santacatterina, M., Salvador, M. D., Fregapane, D. & Gómez-Alonso, S. 2010. PDO virgin olive oil quality-minor components and organoleptic evaluation. *Food Research International* 43: 2138–2146.
- IUPAC. 1987. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Paquot, C., Hautfenne, A.S. (Eds.). Oxford, UK. . Method Number 2.504. pp.

- Kalemba, D. & Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry* 10: 813-829.
- Karpińska, M., Borowski, J. & Danowska-Oziewicz, M. 2001. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry* 72: 5-9.
- Kim, T. S., Yeo, Y. D., Kim, J. Y., Kim, M. J. & Lee, J. H. 2013. Determination of the degree of oxidation in highly-oxidised lipids using profile changes of fatty acids. *Food Chemistry* 138 1792–1799.
- Kristensen, D., Hansen, E., Arndal, A., Appelgren Trinderup, R. & Skibsted, L. H. 2001. Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *International Dairy Journal* 11: 837-843.
- Kristott, J. 2000. The stability and shelf life of food. En: *Fats and Oils*. Kilcast, D. & Subramaniam, P. (Eds.). Boca Raton, Florida. CRS Press. pp. 279–309
- Kulisic, T., Radoni, A., Katalinic, V. & Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 85: 640-663.
- Lombardo, D. M. 2008. Conservación de productos alimenticios a través del uso de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas. Tesis de Maestría. UNRC, departamento de Microbiología, Río Cuarto, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A. & Fernandez-Gutiérrez, M. A. 2010. Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science and Technology* 21: 201-211.
- Mato Rodriguez, L., Ritvanen, T., Joutsjoki, V., Rekonen, J. & Alatosava, T. 2011. The role of copper in the manufacture of Finnish Emmental cheese. *Journal of Dairy Science* 94: 4831–4842.
- Mcsweeney, P. L. H. 2007. *Cheese Problems Solved*. Mcsweeney, P. L. H. (Ed.). Cambridge, England. Woodhead Publishing Limited. pp.
- Min, D. B. & Boff, J. M. 2002. *Food Lipids (Chemistry, Nutrition and Biotechnology)*. En: *Food lipids*. Akoh, C. y Min, D. B. (Eds.). New York. Marcel Dekker. pp. 335–364
- Moldao-Martins, M., Beirao-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. & Beirao-da-Costa, M. 2004. Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha x piperita* and *Thymus mastichina* L. *Food Quality and Preference* 15: 447-452.

- Moreira, M. R., Ponce, A. G., del Valle, C. E. & Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology* 38: 565-570.
- Mosquera, M. M. L., Rejano, N. L., Gandul, R. B., Sánchez, G. A. & Garrido, F. J. 1991. Color pigment correlation in virgin olive oil. *JAOCS- Journal American Oil Chemists Society* 68: 333-336.
- Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C. H., Chidewe, C., Ndhlala, A. R. & Benhura, M. A. N. 2007. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology* 2: 414-420.
- Murtaza, M. A., Rehman, S. U., Anjum, F. M., Huma, N., Tarar, O. M. & Mueen-ud-din, G. 2012. Organic acid contents of buffalo milk cheddar cheese as influenced by accelerated ripening and sodium salt. *Journal of Food Biochemistry* 36: 99-106.
- Nepote, V., Olmedo, R. H., Mestrallet, M. G. & Grosso, N. R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science* 74: S1-S8.
- Nevas, M., Korhonen, A. R., Lindström, M., Turkki, P. & Korkeala, H. 2004. Research note: Antibacterial efficiency of finfish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection* 67: 199-202.
- Nhuch, E. L., Prieto, B., Franco, I., Bernardo, A. & Carballo, J. 2008. Biochemical changes during the ripening of homemade "San Simón da Costa" raw milk cheese. . *International Dairy Technology* 61: 80-89.
- Nissiotis, M. & Tasioula-Margari, M. 2002. Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry* 77: 371-376.
- Nollet, M. L. L. & Toldrá, F. 2010. *Dairy Food Analysis*. Nollet, M. L. L. y Toldrá, F. (Eds.). Boca Ratón, FL. CRS Press. 920 pp.
- Nychas, G. J. E., Tassou, C. C. & Skandamis, P. N. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Roller, P. (Eds.). Woodhead Publishers. pp. 176-200
- O'Brien, R. D. 2009. *Fats and oils, formulating and processing for applications*. O'Brien, R. D. (Ed.). Boca Raton, FL. CRS Press. 744 pp.
- Olmedo, R. H., Asensio, C., Nepote, V., Mestrallet, M. G. & Grosso, N. R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2128-2136.

- Olmedo, R. H., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2012. Sensory and chemical stability in coated peanuts with the addition of essential oils and synthetic antioxidants. *Grasas y Aceites* 63: 5-13.
- Olmedo, R. H., Nepote, V. & Grosso, N. R. 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology* in press: 1-9.
- Ong, L. & Shah, N. P. 2009. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses. *Journal of Food Science* 74: 182-191.
- Østdal, H., Andersen, H. J. & Nielsen, J. H. 2000. Antioxidative activity of urate in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5588–5592.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. & Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18: 414-420.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer Prevention* 361: 1235-1247.
- Park, Y. W. & Drake, M. A. 2005. Effect of 3 months frozen-storage on organic acid contents and sensory properties, and their correlations in soft goat milk cheese. *Small Ruminant Research* 58: 291–298.
- Parodi, P. W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science* 82: 1339–1349.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. H. 2011. *Antioxidant in Food: Practical Application*. Pokorny, J. (Ed.). Boca Raton, Florida, USA. CRS Press. pp.
- Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N. & Piva, G. 2007. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 472–479.
- Prandini, A., Sigolo, S. & Piva, G. 2011. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 55–61.
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. & Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 2648-2655.

- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A. & Nepote, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 642-649.
- Rodríguez-Alonso, P., Centeno, J. A. & Garabal, J. I. 2011. Biochemical study of industrially produced Arzúa-Ulloa semi-soft cows' milk cheese: Effects of storage under vacuum and modified atmospheres with high-nitrogen contents. *International Dairy Journal* 21: 261-271.
- Ruiz-Gutierrez, V., Perez-Espinosa, A., Vazquez, C. M. & Santa-Mar, A. C. 1999. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *British Journal of Nutrition* 83: 233-241.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. & Corke, H. 2011. Potential application of spice and herbs extracts as natural preservatives in cheese. *Journal of Medicinal Food* 14: 284-290.
- Tassou, C. C., Drosinos, E. H. & Nychas, G. J. E. 1995. Effect of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteridis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. *Journal of Applied Microbiology* 78: 593-600.
- Upreti, P., McKay, L. L. & Metzger, L. E. 2006. Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: Changes in residual sugars and water-soluble organic acids during ripening. *Journal of Dairy Science* 89: 429-443.
- Warner, K. 2002. Chemistry of frying oils. En: *Food lipids*. Akoh, C. & Min, D. B. (Eds.). New York. Marcel Dekker. pp. 205-222

CONCLUSIONES GENERALES

- EL aceite esencial de orégano de las variedades Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino presentan diferencias en las propiedades físico-químicas y antioxidantes. Las especies Criollo y Cordobés presentaron mayor concentración de timol en su composición química (17,14% y 18,58, respectivamente) seguidos por el AE Compacto. El mayor contenido de terpinen-4-ol, lo presentó el AE de orégano criollo (9,52%). Este aceite esencial es el que tiene mayor actividad antioxidante medida por los métodos ABTS, FRAP y ORAC, seguida, en la mayoría de los test, por el de la variedad Cordobés. La diferencia en la actividad antioxidante e índice de refracción entre los aceites esenciales de las variedades de orégano está asociada a su composición química.
- Los aceites esenciales de las variedades de orégano Mendocino, Compacto, Cordobés y Criollo poseen una fuerte actividad biocida y pueden ser utilizados como agentes controladores de patógenos en alimentos. El microorganismo *B. cereus* es el más sensible y *P. aeruginosa* el más resistente a la actividad antimicrobiana, medida por técnica de difusión en disco, de los aceites esenciales de orégano. El aceite esencial de orégano Criollo presenta mayor efecto antimicrobiano, con valores bajos de CIM medidos por la técnica de microdilución en caldo. Además este aceite esencial tiene capacidad bactericida (CBM) contra *E. coli* y *B. cereus*.
- Todos los aceites esenciales de orégano presentan actividad antimicrobiana, ya sea ésta bacteriostática o bactericida, por lo tanto su aplicación junto a microorganismos starters lácticos como *L. helveticus* y *S. termophilus* utilizados, en la fabricación de quesos, es probable que no sea posible debido a que inhiben el crecimiento de estas cepas a concentraciones iguales o menores de las que son necesarias para detener el crecimiento de los patógenos de alimentos. La incorporación de los aceites esenciales de orégano como antimicrobianos se deberá hacer después de producido el coágulo durante la preparación de queso.
- Con respecto a los contaminantes fúngicos, el aceite esencial de orégano de la variedad Mendocino presenta la menor CIM para inhibir el crecimiento de *P. discolor*. Todos los aceites esenciales de orégano tienen similar actividad contra *Saccharomyces serviciae*, inclusive es mejor que el antibiótico euconazole.

- El perfil sensorial de los aceites esenciales de orégano muestra los siguientes atributos de aroma: coníferas, herbáceo, menta y madera. El más aceptado por parte de los consumidores fue el aroma del aceite esencial Mendocino.
- Los aceites esenciales de orégano intensifican la intensidad de los atributos positivos picante y amargo cuando son incorporados al aceite de oliva. Los aceites esenciales de orégano de las variedades Mendocino y Compacto mejoran la aceptabilidad sensorial del aceite de oliva. En pruebas discriminativas, el aceite de oliva adicionado con aceite esencial de orégano de la variedad Mendocino es el único que se diferencia sensorialmente con respecto a muestras de aceites de oliva saborizadas con los aceites esenciales de las otras variedades de orégano. El aceite esencial de orégano de la variedad Mendocino es el más aceptable sensorialmente pero es el menos activo biológicamente. Esto se relaciona con la composición química ya que contiene menor concentración de compuestos fenólicos como timol y 4-terpineol, que son los de mayor actividad pero, aparentemente, los menos favorables desde el punto sensorial para un aceite de orégano que se quiere incorporar a un producto alimenticio.
- Los aceites esenciales de orégano aumentan la intensidad de los atributos negativos amargo y ácido y disminuyen la intensidad de atributos positivos como los sabores dulce, leche y caseína en queso ricota.
- Queso orgánico Cottage con el agregado de aceites esenciales de orégano presenta pendientes menos negativas en las ecuaciones de regresión del estudio de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Por lo tanto los aceites esenciales de orégano ejercen un efecto protector contra la oxidación de la grasa del queso Cottage.
- Los aceites esenciales de orégano, especialmente los de las variedades Cordobés y Compactas, disminuyen la producción de ácidos orgánicos, parámetros de calidad negativos, durante el almacenamiento de queso orgánico Cottage. Esta reducción en la producción de ácidos orgánicos sucede como consecuencia de la disminución de la actividad microbiana que se ve también afectada por la adición de los aceites esenciales de orégano.
- El aceite esencial de orégano de la variedad Cordobés tiene mayor actividad antimicrobiana en queso Cottage dado que muestra el menor recuento de mesófilos totales durante el almacenaje.

El presente estudio aporta conocimientos sobre el efecto perseverante que tiene la utilización de aceites esenciales de orégano cuando son incorporados a productos alimenticios con alto contenido de lípidos como son el aceite de oliva y quesos. Los aceites esenciales de orégano preservan a los alimentos del deterioro oxidativo, microbiológico y conservan sus propiedades sensoriales prolongando la vida útil de tales productos. Los aceites esenciales de las variedades de orégano Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino tienen distinta actividad y esto depende de la composición de cada esencia. Los aceites esenciales correspondientes a las variedades Criollo y Cordobés presentan mayor contenido en compuestos fenólicos como timol y 4-terpineol y son los que mayor actividad antioxidante y antimicrobiana presentan, sin embargo son los menos favorecidos sensorialmente cuando se incluyen en los alimentos. Por lo tanto, es muy importante para decidir que variedad de orégano usar para un determinado alimento conocer la composición química del aceite esencial y hacer un balance entre el efecto que puede tener sobre aceptabilidad del alimento y el efecto antioxidante y biocida que ejercerá.

Los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas alimenticias, como los de orégano, pueden ser utilizados como conservantes, antioxidantes y antimicrobianos naturales, de alimentos al ser estos considerados como compuestos seguros (GRAS). Además pueden ser producidos sin perder su condición de productos orgánicos, siempre y cuando se preparen a partir de plantas de orégano producidas de manera orgánica. Por lo tanto los aceites esenciales de oréganos constituyen una alternativa como agentes conservantes naturales y hasta orgánicos que pueden ser utilizados por la industria de los alimentos para prolongar la vida útil de productos a los cuales sea necesario preservar los parámetros de calidad química, nutricional y sensorial.

Fomentar el uso de los aceites esenciales de orégano promoverá el consumo de esta planta aromática, lo cual estimulará a un aumento del área de producción, a un mayor desarrollo industrial asociado a sus derivados y finalmente redundará en un mayor desarrollo regional.

Este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas:

- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science* 76: 445-450.
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2012. Sensory Attribute Preservation in Extra Virgin Olive Oil with Addition of Oregano Essential Oil as Natural Antioxidant. *Journal of Food Science* 77: 294-230.
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2013. Consumers' acceptance and quality stability of olive oil flavoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 2417-2428.

Se realizó con los siguientes proyectos de investigación:

- 2010-2011. Director del Proyecto: Conservación de la calidad de alimentos con alto contenido graso con especial referencia al maní. Aplicación de microfilms y adición de conservantes naturales. Subsidiado por SECYT-UNC. Res. 214/10 (Fecha de resol: 27/09/2010) y Resol 26/11 (fecha de Resol. 21/03/2011). Monto: \$17.125.
- 2010-2012. Director de Proyecto: "Estudio de vida útil de productos de maní elaborados con variedades de maní Runner normal y alto oleico". Fundación Maní Argentino. Resol Decanal 344/10 (10/05/2010). Monto \$20.000.
- 2010-2013. Director del Proyecto: Aplicación de Polifenoles del Tegumento de Maní como Conservante de Alimentos: Evaluación de sus Propiedades Antioxidantes y Antimicrobianas. Subsidiado por CONICET (PIP N° 11220090100114 Res. 1337/10, fecha de resol: 01/06/2010). Monto: \$ 300.000.
- 2011. Miembro del Grupo Responsable. Equipamiento adquirido: Rancimat - Aparato para la determinación automática de la estabilidad a la oxidación de grasas y aceites. Programa de Modernización Tecnológica - Equipamiento mayor (R.R. 1536/2011) – Universidad Nacional de Córdoba. Monto: \$122.000.
- 2012-2013. Director del Proyecto: Conservación de la calidad de alimentos con alto contenido graso con especial referencia al maní. Utilización de productos naturales como antioxidantes y antimicrobianos. Subsidiado por SECYT-UNC. Res. 162/12 (Fecha de resol: 06/08/2012) y Resol. 124/13 (fecha: 24/04/2013). Monto: \$21.000.