



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGÍSTER EN ALIMENTOS

**Prolongación de vida útil del queso fresco utilizando aceite esencial de orégano
(*Origanum vulgare* L).**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Vivanco Carpio, Erik Ricardo

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph. D

LOJA - ECUADOR

2020



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2020

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D

Benito Eduardo Valarezo Valdez.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN.

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Prolongación de vida útil del queso fresco utilizando aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L)”. Realizado por Vivanco Carpio Erik Ricardo; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, junio del 2020

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Vivanco Carpio, Erik Ricardo** declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Prolongación de vida útil del queso fresco utilizando aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)”, de la Titulación de Magíster en Alimentos, siendo Valarezo Valdez, Benito Eduardo director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.

Autor: Vivanco Carpio, Erik Ricardo

Cédula; 0705419158

DEDICATORIA

A mis amados padres Jorge Vivanco y Maritza Carpio, quienes siempre me han aconsejado y me han apoyado en cada meta trazada a lo largo de mi vida, son mi mayor ejemplo a seguir, por su esfuerzo y dedicación para con nosotros.

A mis hermanos que pese a nuestras diferencias han sido mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

Y a cada una de las personas que influyeron de una u otra forma para que pueda estar hoy donde estoy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios por darme salud, fortaleza y sabiduría para poder cumplir mis metas y objetivos propuestos en mi vida.

Jorge y Maritza mis padres, por confiar en mí, por alentarme en los momentos que más necesitaba de alguien, por brindarme su apoyo y cariño y por ser el pilar fundamental para que hoy sea un excelente profesional.

A mis hermanos Daniel, Ronald, Jorge, gracias por su apoyo.

Agradezco de manera especial a mi Director de Tesis, PhD. Eduardo Valarezo por su tiempo, dedicación, consejos, apoyo brindado para la realización de esta investigación y por la confianza depositada en mí.

A los docentes y compañeros de la maestría en alimentos para que de una u otra forma pueda culminar mis estudios de postgrado.

Erik R. Vivanco

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TIRULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICES DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO	
1.1. Queso fresco.....	6
1.2 Aceites esenciales.....	6
1.2.1 Métodos de Extracción.....	7
1.2.2 Caracterización.....	8
1.2.3 Cromatografía de gases.....	8
1.2.4. Propiedades.....	8
1.2.5. Actividad biológica.....	8
1.2.6 El género <i>Origanum</i>	9
1.2.6.1 Especie <i>Origanum vulgare</i> (Orégano).....	9
1.2.7 Taxonomía de la especia vegetal <i>Origanum Vulgare</i>	10
1.2.8 Composición química.....	10
1.2.8.1 Propiedades.....	10
1.2.8.2 Usos y Aplicaciones del Orégano.....	10
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	
2. Metodología.....	12
2.1 Aceite esencial de orégano.....	12
2.1.1. Obtención del aceite esencial de orégano.....	12

2.1.1.1 Determinación del rendimiento.....	13
2.1.2 Determinación de las Propiedades Físicas del aceite esencial.....	
2.1.2.1 Densidad relativa.....	13
2.1.2.2 Índice de refracción.....	14
2.1.2.3. Actividad Óptica.....	14
2.1.3. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	15
2.1.3.1. Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama.....	15
2.2 Elaboración de las muestras de queso fresco.....	16
2.2.1 Elaboración de las muestras de queso fresco con aceite esencial.....	17
2.2.2 Pruebas químicas de las muestras de queso fresco.....	17
2.2.2.1. Determinación de acidez Titulable.....	17
2.2.2.2. Determinación de pH.....	17
2.2.3 Análisis sensorial de las muestras de queso fresco.....	18
2.2.4 Estudio de Vida Útil del queso fresco.....	19
2.2.5 Pruebas microbiológicas aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	19
2.2.5.1 Pruebas de difusión de disco.....	19
2.2.5.2 PREPARACION DEL INOCULO.....	19
2.2.5.3 Siembra de la muestra.....	20
2.2.6 Pruebas microbiológicas en queso fresco con aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	20
2.2.6.1 Recuento de <i>E. coli/Coliformes</i> y aerobios mesófilos.....	20
2.2.6.2 Preparación de la muestra para la siembra de bacterias.....	21
2.1.9.1 2.2.6.3 Siembra en placas Petrifilm para <i>E. coli/Coliformes</i>	21
2.3 Diseño experimental.....	22
2.3.1 Mediciones experimentales.....	22
2.3.2 Análisis estadístico y pruebas de significancia.....	22
CAPITULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Aceite esencial de orégano.....	24
3.1.2 Rendimiento del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	24
3.2. Propiedades físicas.....	25

3.2.1. Densidad relativa.....	25
3.2.2. Índice de refracción.....	25
3.2.3. Rotación óptica.....	26
3.3. Composición química del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	27
3.3.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.....	27
3.4. Elaboración del queso fresco.....	28
3.4.1 Muestras de queso fresco con aceite esencial.....	29
3.4.2 Vida útil del queso fresco.....	29
3.4.3 Determinación fisicoquímica del queso fresco con aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	33
3.5 Análisis sensorial del queso fresco con adición de aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	34
3.6 Estudio microbiológico del queso fresco con adición de aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	37
3.6.1 Actividad antimicrobiana en el aceite esencial de orégano. Prueba de difusión por disco.....	39
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42

INDICE DE ANEXOS

Anexo I. Proceso de elaboración del queso fresco artesanal con aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	44
Anexo II. Hoja de evaluación sensorial.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especie <i>Origanum vulgare</i>	9
Figura 2. Esquema de la metodología aplicada análisis físico químico del AE.....	12
Figura 3. Determinación Densidad Relativa del AE de <i>O. vulgare</i>	14
Figura 4. Determinación Índice de refracción del AE de <i>O. vulgare</i>	14
Figura 5. Determinación Actividad Óptica del AE de <i>O. vulgare</i>	15
Figura 6. Determinación composición química del AE de <i>O. vulgare</i>	15
Figura 7. Esquema de la metodología aplicada a la elaboración del queso fresco.....	16
Figura 8. Determinación de pH en el queso fresco con AE de <i>O. vulgare</i>	17
Figura 9. Evaluación sensorial del queso fresco con AE de <i>O. vulgare</i>	18
Figura 10. Siembra microbiológica (<i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>) con AE.....	20
Figura 11. Siembra microbiológica en placas petrifilm.....	21
Figura 12. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>O. vulgare</i> obtenido de la columna DB5-MS.....	27
Figura 13. Muestras de queso fresco sin pasteurizar con AE de <i>O. vulgare</i>	29
Figura 14. Muestra BL00 día 1 almacenamiento en ambiente.....	30
Figura 15. Muestra BL00 día 3 almacenamiento en ambiente.....	30
Figura 16. Muestra AO1 día 1 almacenada al ambiente.....	31
Figura 17. Muestra AO1 día 6 almacenada al ambiente.....	31
Figura 18. Muestra AO1 día 1 almacenamiento en refrigeración.....	32
Figura 19. Muestra AO1 día 10 almacenamiento en refrigeración.....	32
Figura 20. Evaluación sensorial del color del queso fresco muestra BL00 (3476).....	35
Figura 21. Evaluación sensorial del olor del queso fresco muestra BL00 (3476).....	35
Figura 22. Evaluación sensorial del color del queso fresco muestra AO08 (4576).....	36
Figura 23. Evaluación sensorial del olor del queso fresco muestra AO08 (4576).....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Taxonomía de la especie vegetal <i>O. vulgare</i>	10
Tabla 2.	Escala hedónica, evaluación sensorial.....	18
Tabla 3.	Rendimiento (%).....	24
Tabla 4.	Densidad relativa del aceite esencial de <i>O. vulgare</i>	25
Tabla 5.	Índice de refracción del aceite esencial de <i>O. vulgare</i>	26
Tabla 6.	Rotación Óptica del aceite esencial de la especie <i>O. vulgare</i>	26
Tabla 7.	Determinación de composición química del aceite esencial de <i>O. vulgare</i>	28
Tabla 8.	Muestras de queso fresco.....	29
Tabla 9.	Acidez Titulable y pH en el queso fresco con AE.....	33
Tabla 10.	Análisis sensorial del queso fresco con adición de aceite esencial de <i>O. vulgare</i>	34
Tabla 11.	Análisis de <i>Coliformes</i> en queso fresco con adición de AE de <i>O. vulgare</i>	37
Tabla 12.	Análisis de <i>E.coli</i> en queso fresco con adición de AE de <i>O. vulgare</i>	38
Tabla 13.	Análisis de Aerobios en queso fresco con adición de AE de <i>O. vulgare</i>	38

RESUMEN

En el presente estudio se utilizó el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) para prolongación de vida útil del queso fresco. El aceite esencial fue extraído por arrastre de vapor. Utilizando cromatografía de gases se identificaron 38 compuestos que representan el 99.20% de la composición total, los compuestos mayoritarios fueron: Thymol (21,41%), γ -Terpineno (17,57%) y (Z)- β Ocimene (15,66%). Las propiedades físicas del AE densidad (0,9157 g/cm³), índice de refracción (1,4817) y actividad óptica (+18.34°) se determinaron mediante las normas AFNOR. Se probó el AE en placas Petri contra Coliformes (+), *Escherichia coli* (+) y *Staphylococcus aureus* (-) para conocer el efecto antimicrobiano que el AE posee. El queso fue elaborado de manera artesanal conforme a la norma NTE INEN 1528:2012, con concentraciones crecientes (0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 y 3 mL/Kg) de aceite esencial. Los quesos fueron almacenados en temperatura ambiente (27 °C) y en refrigeración (4 °C) para su estudio de vida útil por 1, 8 y 12 días. El queso fue analizado sensorial por 28 jueces semientrenados, utilizando una escala hedónica y los atributos de color y olor.

Palabras clave: Aceite esencial, Cromatografía, Hedónica

ABSTRACT

In the present study, the essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) was used to prolong the shelf life of fresh cheese. The essential oil was extracted by steam entrainment. Using gas chromatography, 38 compounds representing 99.20% of the total composition were identified. The main compounds were: Thymol (21.41%), γ -Terpineno (17.57%) and (Z) - β Ocimene (15, 66%). The physical properties of the AE density (0.9157 g / cm³), refractive index (1.4817) and optical activity (+ 18.34 °) were determined using the AFNOR standards. AE was tested in Petri dishes against Coliforms (+), *Escherichia coli* (+) and *Staphylococcus aureus* (-) to know the antimicrobial effect that AE has. The cheese was made by hand in accordance with the NTE INEN 1528: 2012 standard, with increasing concentrations (0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 and 3 mL / Kg) of essential oil. The cheeses were stored at room temperature (27 OC) and refrigerated (4 OC) for their shelf life study for 1, 8 and 12 days. The cheese was sensory analyzed by 28 semi-trained judges, using a hedonic scale and the attributes of color and smell.

KEY WORDS: Essential oil, Chromatography, Hedonic

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la prolongación de vida útil del queso fresco con aceite esencial de *Origanum vulgare* L. de la provincia de Loja. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación y en el capítulo 3 se expone y analiza los resultados. Esta investigación contribuye al desarrollo de nuevos métodos y tecnologías aplicadas en el sector alimenticio y a establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios del aceite esencial y su importancia a nivel industrial. Con este estudio se aumenta el conocimiento sobre la existencia de los aceites esenciales como el orégano, sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: farmacéutica, cosmética y alimenticia.

El objetivo general de desarrollar el estudio de queso fresco con aceites esenciales provenientes de especies vegetales, fue para prolongar el tiempo de vida útil del producto terminado y además determinar los componentes químicos del queso con aceite esencial de orégano y propiedades físicas para el aceite esencial, así como también determinar la prolongación de vida útil del producto terminado y los objetivos específicos, también considerados como componentes del proyecto: Extracción del aceite esencial de *Origanum vulgare* y cálculo del rendimiento real; determinar las propiedades físicas y composición química las cuales nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial; Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para conocer el efecto positivo que ejerce en el queso fresco sobre microorganismos patógenos como *E. coli*, *Coliformes* y *Staphylococcus aureus* y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre *Origanum vulgare*.

Para este estudio se inició con la recolección del material vegetal, al cual luego de un tratamiento post cosecha se le extrajo el aceite esencial mediante arrastre con vapor, al aceite obtenido se le determinó la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la composición química utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/MS y acoplada un detector de ionización de llama CG/FID, La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo usando una concentración de 5×10^5 cfu/mL para bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) y bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), con la finalidad de determinar el efecto antimicrobiano que el aceite esencial de *O. vulgare* tiene. Conociendo la reducción microbiológica del aceite

esencial antes ya mencionado, se procedió a elaborar el queso fresco sin pasteurizar con el aceite esencial, en la provincia de El Oro, cantón Piñas, parroquia Saracay, para poder realizar el estudio microbiológico del producto terminado.

CAPÍTULO I
1. MARCO TEÓRICO

1.1. Queso fresco

El queso fresco de producción artesanal ha constituido, durante décadas, una de las bases de la alimentación de la población ecuatoriana. En el Ecuador, el 35% de la leche generada es destinada a la industria quesera artesanal. Dicha actividad de manufactura se realiza en áreas rurales, donde las condiciones higiénicas sanitarias han carecido del seguimiento y control requeridos para asegurar la obtención de productos de calidad e inocuidad comercial. La composición química y el grado de hidratación de este tipo de productos, son factores que van a propiciar el desarrollo de patógenos de importancia sanitaria por su impacto en la salud del consumidor (Arguello, y otros, 2016).

La preferencia del consumidor por el queso fresco es cada vez mayor, debido a sus características de sabor y textura. Este producto es manufacturado en su mayoría por pequeños agricultores y por grandes industrias lácteas en el país. El sabor se debe principalmente a la presencia de las bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, y *Enterococcus spp.*), las cuales contribuyen también a la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Merchán Castellanos, y otros, 2018).

Este alimento tiene una densidad nutricional elevada. En el país el consumo de queso contribuye a la ingesta del 9 % de la proteína total, 11 % del fósforo y el 27 % del calcio y es una buena fuente de proteínas de elevado valor biológico, la proteína láctea tiene todos los aminoácidos esenciales y se destaca por el elevado contenido en aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina). En el proceso de elaboración de los quesos se produce hidrólisis de las caseínas, lo que, además de contribuir a la adquisición de características organolépticas particulares, hace que aumente la digestibilidad de la proteína sin alterarse su valor nutritivo (Cangas Morán, y otros, 2019).

1.2. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AE) son líquidos volátiles, en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general, no son oleosos al tacto. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados, por ejemplo, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico y se les cataloga como terpenos, siendo los más abundantes los

monoterpenos (C10) y los sesquiterpenos (C15). Son ingredientes básicos en la industria de los alimentos, química y farmacéutica (Rojas, 1988).

Este tipo de aceites esenciales son una alternativa para el control de bacterias, debido a que son mezclas de sustancias químicas presentes en la composición química de las plantas, dándole así su carácter fuertemente aromático; son biodegradables, amigables con el ambiente y poseen bajos o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente, poseen características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral. Este tipo de aceites pueden ser extraídos por diferentes métodos, pero la técnica más utilizada es el de destilación por arrastre de vapor de agua, donde la muestra vegetal se coloca en un recipiente (tipo autoclave cerrado) y es sometida a una corriente de vapor de agua, así la esencia es arrastrada y posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Las plantas aromáticas son importantes para la obtención de aceites esenciales como es el caso del *Origanum vulgare* (Rueda Puente, y otros, 2018).

Los aceites esenciales se pueden obtener a partir de flores, pétalos, hojas, tallos, frutos, raíces y cortezas. La concentración de aceites en estas partes de la planta, depende de la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales (Hart , 2008).

1.2.1 Métodos de Extracción.

Una de las técnicas que más se utiliza para extraer aceites esenciales es la destilación por arrastre de vapor. Esta técnica es mucho más utilizada especialmente a nivel industrial debido a su alto porcentaje de rendimiento, la pureza del aceite obtenido y puesto que no requiere tecnología sofisticada (Martínez., 2001).

Esta técnica es aplicada para separar sustancias orgánicas presentes en plantas aromáticas cuyas moléculas son volátiles, donde se utiliza una presión de vapor baja y punto de ebullición alto, la destilación por arrastre con vapor consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, esto ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial, los vapores que son emitidos o expulsados en la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, dando dos productos inmiscibles que son agua y aceite, donde finalmente se separa en un dispositivo decantador (Bandoni, 2000).

1.2.2 Caracterización.

La caracterización o composición química de los aceites esenciales se ve interactuada directamente con la utilización de la cromatografía de gases, el cual se utiliza para obtener el perfil cromatográfico y poder cuantificar los principales componentes del aceite esencial, es decir los compuestos que se encuentran en mayor proporción o aquellos que, a pesar de no ser mayoritarios, tienen una especial trascendencia para la evaluación de la calidad de los mismos (Bandoni, 2002).

1.2.3. Cromatografía de gases.

Esta técnica es muy utilizada para separar los componentes de interés en una muestra vaporizada, ya que éstos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna. La muestra que se va a analizar se lleva a la fase gaseosa y se inyecta en una de las cabezas de la columna cromatográfica. La elusión de los componentes se realiza mediante el flujo de una fase gaseosa móvil que, a diferencia de la de otros métodos cromatográfico, es inerte y no interactúa con las moléculas de las especies de la muestra; sólo las transporta a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la de gas-líquido y la de gas-sólido. La primera, es la que tiene más aplicaciones en todos los campos de la ciencia y se le conoce comúnmente como cromatografía de gases. La cromatografía de gas-sólido tiene menos aplicaciones debido a que muchas moléculas reactivas o polares poseen tiempos de retención muy largos y las colas de los picos de elución no son aceptables (Skoog, 2001).

1.2.4. Propiedades.

Los aceites esenciales, además de poseer propiedades antibacterianas, han mostrado también propiedades antivíricas, antifúngicas, herbicidas e insecticidas (Blázquez., 2014).

Diversos estudios han demostrado que los componentes de los aceites esenciales poseen capacidades anticancerígenas; se conoce que los isoprenoides presentes en estos aceites esenciales, modifican ciertas células previniendo el cáncer (Thormar, 2011).

1.2.5. Actividad biológica.

Desde hace más de tres décadas se ha descrito a los antimicrobianos de origen natural, como agentes de gran capacidad biodegradable, con efectos secundarios mínimos, en comparación a los antimicrobianos comúnmente comercializados. Actualmente se sabe que los aceites

esenciales derivados de las plantas y especias tienen efectos antimicrobianos, se ha identificado que estos efectos están relacionados con los componentes químicos presentes, la mayoría de los estudios han encontrado que los aceites esenciales son efectivos contra numerosas bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-), mohos, levaduras, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos los posibles responsables de las propiedades aromáticas, antioxidantes y antimicrobianas (Segura, 2018).

1.2.6. El género *Origanum*.

El nombre "orégano" comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a "especioso". Las hojas secas del *Origanum vulgare*, nativo de Europa y del *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común. El género *Origanum* pertenece a la familia *Lamiaceae*, mientras que el *Lippia graveolens*, a la familia *Verbenaceae* (Pierce, 1999).

En base a criterios morfológicos, el género *Origanum* se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos (Skuola, 1999).

1.2.6.1. Especie *Origanum vulgare* (Orégano).

Origanum vulgare L. (Figura 1) es una planta perenne, perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Originario de la región del Mediterráneo, también cultivado en Europa, Asia y Taiwan y en América del Sur. El orégano presenta dentro de sus componentes principales, más de 34 compuestos activos, de los cuales los fenoles como carvacrol, timol, α -terpeno y p-cimeno pueden alcanzar entre 80,2 y 98 % de la composición del aceite esencial (Albado, 2001; Castro, 1995).



Figura 1. Especie *Origanum Vulgare*
Fuente (Chávez L., 2008),
Elaborado por: Chávez, (2008)

1.2.7. Taxonomía de la especie vegetal *Origanum Vulgare*.

En la tabla 1 se describe la taxonomía de la especie vegetal *O. vulgare*.

Tabla 1. Taxonomía de la especie vegetal *O. vulgare*

TAXONOMÍA	
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Subfamilia	<i>Nepetoideae</i>
Género	<i>Origanum</i>
Especie	<i>Origanum vulgare</i>

Fuente: El autor
Elaborado por: El autor

1.2.8. Composición química.

El aceite esencial de orégano presenta dentro de sus componentes estructurales, compuestos mayoritarios como el Thymol, γ -Terpinene, Terpinolene, (Z)- β Ocimene (Bastos et al., 2011).

1.2.8.1. Propiedades.

Chávez (2008) argumenta que el orégano posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas, y sobre todo se caracteriza por la potente acción de sus principios activos carvacrol y timol que le otorgan a esta planta un gran poder antibacteriano frente a microorganismos gram-positivos y gram-negativos.

Miralles (2011), revela que una de las especias que tiene efecto antimicrobiano es el orégano, por ese motivo inhibe el crecimiento de numerosas bacterias patógenas en alimentos.

1.2.8.2. Usos y Aplicaciones del Orégano.

El aceite de orégano es uno de los agentes anti-fungicos más poderosos, es muy utilizado debido enteramente a que no es tóxico. De hecho, el aceite esencial de orégano es capaz de destruir hongos que han sido mutados en el laboratorio como resistentes y formas resistentes de hongos que resultan de la terapia antibiótica. El aceite de orégano es un poderoso calmante del dolor, es también un poderoso antioxidante. Además, el aceite mejora la digestión estimulando el flujo de bilis (Fan, 2008).

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

Esta investigación se llevó a cabo en el Departamento de Química y Ciencias Exactas, en la sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja: Los principales procesos realizados fueron el estudio del aceite esencial (figura 2); elaboración del queso fresco (figura 3); y el análisis de la vida útil del queso, incluida sus propiedades físicas (objetivas y subjetivas) y químicas.

2.1. Aceite esencial de Orégano

La figura 2 muestra el proceso de obtención y análisis del aceite esencial de orégano.

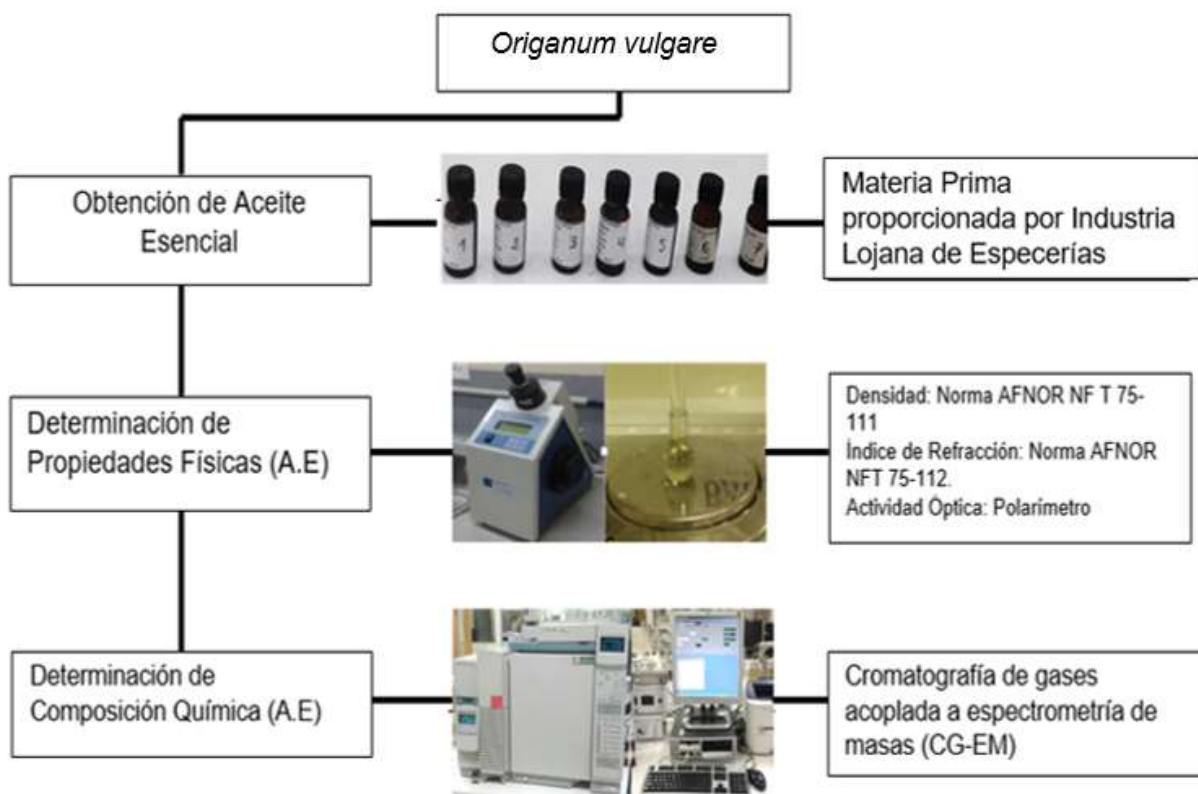


Figura 2. Esquema de la metodología aplicada análisis físico químico del AE

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El autor.

2.1.1. Obtención del aceite esencial de orégano.

Las muestras de materia prima para la obtención del aceite esencial de orégano fueron proporcionadas por la Industria Lojana de Especerías (ILE), empresa dedicada al procesamiento, comercialización y elaboración de productos en general como; condimentos en varias presentaciones en líneas de: polvos, pastas, salsas, granos, hierbas aromáticas, aceites y mantecas.

La extracción del AE se realizó en un destilador que cuenta con un tanque de acero inoxidable, el procedimiento fue colocar agua debajo de la materia vegetal, esta se posó sobre una placa perforada que permitía el paso del vapor. Se procedió a colocar la tapa con un sello de agua en el borde del tanque y se ubicaron distintas mangueras en su lugar correspondiente, es decir de entrada y de salida para el refrigerante; el tanque se expuso a una fuente de calor que estaba ubicada debajo de este, con la finalidad de que el calor que ésta fuente genere, forme vapor y pueda circular a través de la materia vegetal y cuando salga se pueda enfriar en el condensador y así pasar al estado líquido, el líquido obtenido se recolecta en un florentino y se realiza la separación del agua y el aceite debido a sus densidades.

El aceite esencial se recolectó en un vaso de precipitación para tener claro el volumen, luego se etiquetaron recipientes de color ámbar para poder almacenar el aceite, para cada muestra se etiquetó con el nombre de la especie vegetal, número de recolección junto con la fecha de recolección. Finalmente, las muestras se llevaron a refrigeración con una temperatura aproximada de -4°C, esto para mantener el aceite en las mejores condiciones.

2.1.1.1. Determinación del rendimiento.

Para determinar el rendimiento (%R) de cada una de las destilaciones, se relacionó la cantidad de materia vegetal usada P(g), con el volumen del aceite esencial obtenido V(mL). La ecuación para el cálculo del rendimiento es la siguiente:

$$\%R = \frac{V (ml)}{P (g)} * 100$$

2.1.2. Determinación de las Propiedades Físicas del aceite esencial.

Las propiedades físicas que se determinaron fueron índice de refracción, densidad relativa, actividad óptica.

2.1.2.1. Densidad relativa.

La determinación de la densidad relativa del aceite esencial de *Origanum vulgare* se realizó según la norma AFNOR NF T75-111(ISO 279:1998), para la realización de este análisis se utilizó un picnómetro de 2 mL, y una balanza analítica (Figura 3). Primero se procede a pesar el picnómetro vacío, luego lo pesamos con agua destilada y finalmente se lo pesa con el aceite esencial. De los valores obtenidos se calculó la media y la desviación estándar.



Figura 3. Determinación Densidad Relativa del AE de *O. vulgare*.
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

2.1.2.2. Índice de refracción.

La determinación del índice de refracción se realizó según la norma ANFOR NF 75-112(ISO 280:1998), para ello se empleó un refractómetro ABBE (Figura 5), marca BOECO GERMANY, que es un dispositivo electrónico que mide la velocidad de propagación de la luz en la muestra de aceite esencial.



Figura 4. Determinación Índice de refracción del AE de *O. vulgare*.
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

2.1.2.3. Actividad Óptica.

En base a la norma ISO 592, se determinó la actividad óptica, donde nos muestra la capacidad que tienen los aceites esenciales para desviar la luz polarizada. Para lo cual se usó un polarímetro Digital modelo Mrc- Automatic Polarimeter P810 (Figura 6) y una celda de 10 cm de longitud. Este procedimiento se realizó por triplicado en la muestra de aceite esencial, obteniendo un valor promedio y una desviación estandar.



Figura 5. Determinación Actividad Óptica del AE de *O. vulgare*.

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor

2.1.3. Determinación de la Composición Química del aceite esencial.

La determinación de la composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare* se determinó tanto cualitativamente como cuantitativamente, para ello se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y al detector de ionización de llama (CG/FID).

2.1.3.1 Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama.

La determinación de la composición química presente en el aceite esencial de *Origanum vulgare* se realizó mediante un cromatógrafo de gases de serie Agilent 6890N (Figura 6) acoplado a un espectrómetro de masa Agilent serie 5973 inert; que posee un sistema de datos (Software MSD-Chemstation D.01.00 SP1), este cuenta con un inyector automático serie 7683 y un detector de ionización de llama (FID), provisto de un generador de hidrogeno. Para la determinación de la composición química se utilizó la columna apolar HP-5ms.



Figura 6. Determinación composición química del AE de *O. vulgare*.

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor

2.2. Elaboración de las muestras de queso fresco

El proceso de obtención del queso fresco sin pasteurizar se muestra en la figura 7. Las imágenes de este proceso se pueden observar en el anexo 1. La elaboración del queso se lo realizó en la parte alta de la provincia de El Oro, cantón Piñas, parroquia Saracay. Inicialmente se recibió la materia prima, a la misma que se procedió a realizarle pruebas físicas (densidad 1,028 – 1,032 g/mL; temperatura 22°C) y pruebas químicas (Mastitis negativa), pH y acidez titulable. Después de la recepción de la materia prima se procedió a introducir el cuajo líquido en la leche (20 mL/150 L), luego de que se añadió el reactivo láctico, las propiedades físicas de la leche empezaron a cambiar a los 75 minutos, después se procedió al desuerado, eliminando todo el suero láctico residual del producto semi elaborado, para poder ser mezclado con la sal (500 g/25 kg cuajada) y finalmente llegar a la etapa del prensado y posteriormente al envasado y almacenado (4 °C).

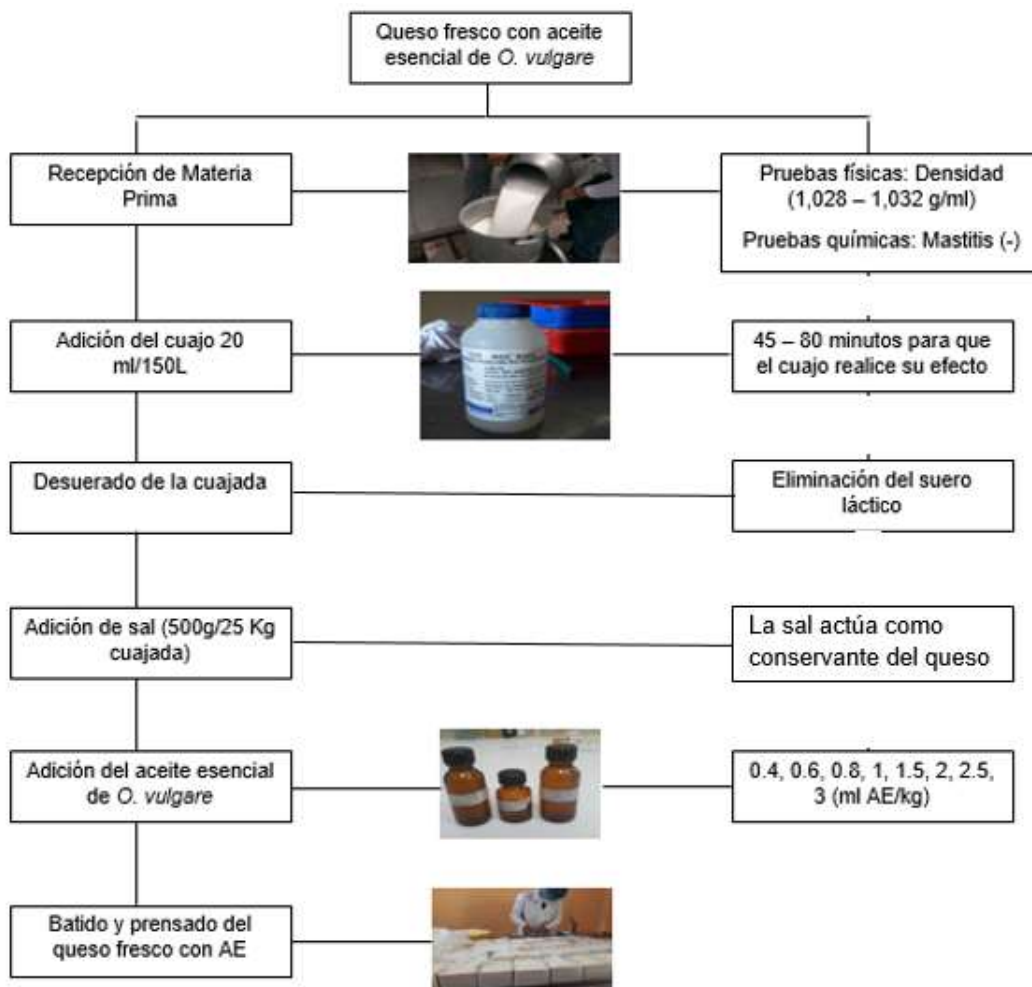


Figura 7. Esquema de la metodología aplicada a la elaboración del queso fresco

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El autor.

2.2.1. Elaboración de las muestras de queso fresco con aceite esencial.

Para la obtención del queso fresco con AE de *O. vulgare* se empleó el mismo proceso de elaboración del queso fresco, con la diferencia de que en la etapa después de batido o mezclado de la cuajada con la sal, se procede a adicionar el AE con una pipeta de 1 mL, en las concentraciones 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 (mL AE/kg queso fresco), procediendo a repetir la etapa de mezclado en la batidora industrial elaborada artesanalmente, para luego prensar y posteriormente envasar y almacenar el queso fresco con AE a 4 °C.

2.2.2. Pruebas químicas de las muestras de queso fresco

2.2.2.1. Determinación de acidez titulable

La determinación se realizó de igual manera según refiere a la NTE INEN 750:2013 (NTE INEN-ISO, 2013), se realizó una titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio 0,1 N y fenolftaleína como indicador, hasta obtener una coloración rosada persistente durante 30 segundos, momento que indicó el punto final de la titulación, todo este procedimiento se lo realizó por triplicado para cada muestra de queso con adición parcial de aceite esencial de orégano.

2.2.2.2. Determinación de pH

La determinación del potencial hidrógeno de la muestra de queso fresco con adición de aceite esencial de orégano se la realizó por triplicado en base a la NTE INEN 1087:1984 (NTE INEN, 2013), el cual se tomó 1 gramo de muestra y se disolvió en 10 mL de agua destilada con la ayuda de un agitador, donde luego se introdujo el electrodo hasta verificar el pH de la muestra (Figura 8).



Figura 8. Determinación de pH en el queso fresco con AE de *O. vulgare*
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

2.2.2. Análisis sensorial de las muestras de queso fresco

Para el análisis sensorial del queso fresco con adición parcial de aceite esencial de *O. vulgare*, se planteó una prueba sensorial del tipo afectiva con una escala hedónica, donde se eligió 28 evaluadores semi entrenados (Figura 9), los cuales optaron en base a su preferencia entre ambas muestras debidamente codificadas AO08 (4576), BL00 (3476), tal y como lo muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Escala hedónica, evaluación sensorial

Muestra:	Color	Olor
Me gusta muchísimo		
Me gusta mucho		
Me gusta moderadamente		
Me gusta poco		
No me gusta ni me disgusta		
Me disgusta poco		
Me disgusta moderadamente		
Me disgusta mucho		
Me disgusta muchísimo		

Fuente: Investigación Experimental UTPL
Elaborado por: El Autor

Para este análisis se utilizó el queso fresco AO08 (Queso con 0,8 % de AE de *O. vulgare*), debido a que era la muestra que mejor comportamiento reportaba en el estudio de vida útil.



Figura 9. Evaluación sensorial del queso fresco con AE de *O. vulgare*
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

2.2.4. Estudio de Vida Útil del queso fresco.

Para el estudio de vida útil del producto terminado, se elaboró el queso fresco sin pasteurizar con una concentración de 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 (mL aceite esencial/kg de queso fresco) y sin AE de *O. vulgare*, donde se almacenó en temperaturas controladas de refrigeración (4 °C) y ambiente (27 °C), para ir conociendo el comportamiento del producto conforme van avanzando los días de estudio.

2.2.5. Pruebas microbiológicas aceite esencial de *Origanum vulgare*.

2.2.5.1. Pruebas de difusión de disco

Para la determinación de la sensibilidad se utilizó el medio de Muller-Hinton, el cual se preparó de la siguiente manera:

- Preparar el medio de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.
- Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos.
- Mantener la temperatura en baño maría de 48-50 °C.
- Distribuir el medio aproximadamente de 20 a 25 mL en cajas de Petrí estériles.

2.2.5.2. PREPARACION DEL INOCULO

- Seleccionar 4 a 5 colonias del microorganismo en estudio (*S. aureus* y *E. coli*), preferencialmente de un cultivo puro.
- Transferir las colonias, simplemente tocando la parte superior de cada una con asa bacteriológica a un tubo que contenga de 3-5 cc. de caldo estéril de Mueller-Hinton.
- Incubar a 35°C. de 2 a 8 horas hasta que se produzca un crecimiento moderado.

- Diluir el cultivo con solución salina estéril o caldo estéril hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland lo cual corresponde aproximadamente a 100 microorganismos viables por mL.
- Medir la turbidez de la dilución.

2.2.5.3. SIEMBRA DE LA MUESTRA

- Sumergir un aplicador de algodón estéril, dentro de la suspensión del microorganismo en estudio.
- Colocar el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo.
- Sembrar el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con el aplicador. Hacer esta siembra en tres direcciones.
- Permitir que la superficie del medio sembrado se seque durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada.
- Realizar 5 discos de 0,8 mm dejando entre disco y disco un espacio uniforme.
- Colocar 0,4 uL del extracto de aceite esencial en los 3 discos que se encuentran cerca de los bordes y en los dos discos centrales se coloca un blanco positivo (DMS) y un blanco negativo.
- Incubar las cajas inmediatamente o en los próximos 30 minutos a 35°C por 24h
- Medir el diámetro de la zona incluyendo los 0,8 mm del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa, Figura 10.



Figura 10. Siembra microbiológica (*S. aureus* y *E. coli*) con AE.
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

2.2.6. Pruebas microbiológicas en queso fresco con aceite esencial de *Origanum vulgare*.

2.2.6.1. Recuento de *E. coli*/Coliformes y aerobios mesófilos.

El análisis microbiológico de la bacteria *E. coli*/Coliformes se realizó utilizando placas petrifilm para ambos microorganismos con agar nutritivo, durante los días 1, 8 y 12 después de su producción, los mismos que se analizaron por triplicado en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UTPL, Figura 11.



Figura 11. Siembra microbiológica en placas petrifilm.

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor

2.2.6.2. Preparación de la muestra para la siembra de bacterias.

Se tomó 10 g de queso y se colocó en un frasco que contiene 90 mL de agua peptonada al 0.01% previamente esterilizada y se mezcló correctamente. Obteniéndose la primera dilución 10^{-1} . Se transfirió con pipeta 1 mL de la solución a un tubo de ensayo estéril que contiene 9 mL de agua peptonada y se homogenizó, resultando así la dilución 10^{-2} . Siguiendo el mismo procedimiento se realiza diluciones hasta 10^{-5} .

2.2.6.3. Siembra en placas Petrifilm para *E. coli*/Coliformes.

Para la siembra de *E. coli*/Coliformes se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se colocó la placa Petrifilm previamente identificada sobre una superficie plana.
- 2) Se levantó la película superior y con una pipeta colocada perpendicularmente a la placa, se vertió 1 mL de la última dilución en el centro del círculo de la película inferior, que contiene el medio deshidratado.
- 3) Se deslizó la película superior sobre la inferior, tratando de no formar burbujas.
- 4) Inmediatamente después, con ayuda de una lámina difusora se distribuyó el inóculo sobre el área del medio del cultivo, sólo hasta que la muestra alcance los bordes del círculo.
- 5) Se dejó la placa en reposo por lo menos 1 min para permitir la solidificación del agente gelificante.
- 6) Se incubó las placas Petrifilm con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se incubó a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
- 7) Se procedió a la lectura de las placas
- 8) Se efectuó los cálculos correspondientes y se expresó los resultados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL), los mismos que se los transformó en Log_{10} UFC/g, y se realizó la media y desviación estándar de los resultados obtenidos.

2.3. Diseño experimental

En la presente investigación se evaluó cuatro niveles distintos de concentración en el queso fresco con aceite esencial de *Origanum vulgare*, 0.4, 0.6, 0.8 mL/kg (aceite esencial/kg queso fresco), frente a un testigo que fue el blanco (0 mL/kg), con tres repeticiones consecutivas, las unidades experimentales se distribuyeron bajo un diseño experimental de ANOVA de un factor, para cada uno de sus parámetros a evaluar.

2.3.1. Mediciones experimentales

Las variables experimentales que se evaluaron en el queso fresco fueron: físico-químicos (acidez, pH), características organolépticas (color y olor) y recuento microbiológico (*Coliformes*).

2.3.2. Análisis estadístico y pruebas de significancia

Los resultados obtenidos se tabularon en el programa SPSS, los mismos que fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

- Prueba de normalidad Shapiro Wilk, para conocer si los datos de las muestras cumplen con la distribución normal (Significancia = ≥ 0.05).
- Prueba de Anova de un factor, para conocer si existe diferencia significativa o similitud entre cada una de las muestras.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aceite esencial de Orégano

Utilizando arrastre por vapor fue posible extraer aceite esencial a partir de material vegetal de orégano. El aceite esencial fue un líquido viscoso de color subjetivo amarillo pálido. Las cantidades de materia prima utilizadas estuvieron entre los 2 y los 5 kilogramos y las cantidades obtenidas de aceite fueron las suficientes para las pruebas (Tabla 3).

3.1.2. Rendimiento del aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Una vez extraído el aceite esencial de *O. vulgare*, se codificaron las muestras de AE para poder ser analizadas posteriormente en los parámetros pertinentes, tal y como lo demuestra la tabla 3, donde se aprecian los valores correspondientes al rendimiento (%) obtenido de cada una de las destilaciones, además se incluye la media y la desviación estándar de las tres muestras. El rendimiento promedio fue de $0,43 \pm 0,04$ % y la muestra con mayor rendimiento fue OS2 (0,47 %).

Tabla 3. Rendimiento en aceite esencial de *O. vulgare*

Muestras	Peso (kg)	Volumen (mL)	Rendimiento (%)	\bar{X}	Σ
OS1	2,035	18	0,38		
OS2	4,060	36	0,47	0,43	0,04
OS3	5,020	38	0,43		

OS1:Oregano Seco1, OS2: Orégano Seco2, OS3:Oregano Seco3, \bar{X} :Promedio de las destilaciones, σ :Desviación estándar.

Fuente: Investigación Experimental UTPL
Elaborado por: El Autor

El rendimiento de los aceites esenciales se ve influenciado notablemente por el método de extracción al que es sometida la materia prima, uno de los más comunes y mejor aplicados en la industria es el de arrastre de vapor, el cual consiste en un método transcendental desde el punto de vista económico y rentabilidad del proceso de extracción (Basurto Luzuriaga, y otros, 2019).

Moure (2001), argumenta que el rendimiento de la extracción del aceite esencial de *O. vulgare* se ve relacionado directamente con los métodos de cultivo y las condiciones geográficas: clima, altitud, tipo de suelo, luz natural, temperatura; método de obtención del aceite, época de cosecha y edad de las plantas. Lo cual, dependiendo de todos estos factores, el rendimiento de la extracción del aceite variaría considerablemente.

3.2. Propiedades Físicas

Las propiedades físicas que se determinaron al aceite esencial de *O. vulgare* fueron: densidad relativa, índice de refracción y actividad óptica.

3.2.1. Densidad relativa.

La Tabla 4 muestra el resultado de la densidad relativa obtenidos de las muestras destiladas, la media y su desviación estándar.

Tabla 4. Densidad relativa del aceite esencial de *O. vulgare*

Muestras	Densidad relativa (g/cm ³)	\bar{X}	Σ
OS1	0,9131		
OS2	0,9218	0,9157	0,0052
OS3	0,9123		

OS1:Oregano Seco1, OS2:Oregano Seco2, OS3:Oregano Seco3, \bar{X} :Promedio de las destilaciones, Σ :Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor

La mayor parte de los aceites esenciales están compuestos fundamentalmente por terpenos y sus derivados, dándoles una densidad menor a la del agua (1g/cm³). Este parámetro fácil de determinar nos permite identificar un aceite esencial auténtico de un sintético (Ortuño, 2006).

El promedio obtenido de la densidad relativa en la presente investigación del aceite esencial de Orégano fue de 0.9157 g/cm³. Según Mendoza (2008) reporta valores similares de 0.925 g/cm³ de densidad para la misma especie aceites esenciales obtenidos mediante el método de hidrodestilación, los cuales se asemejan a los valores obtenidos en la tabla antes mencionada.

3.2.2. Índice de refracción.

La Tabla 5 muestra el resultado obtenido del índice de refracción de cada una de las muestras destiladas, la media y su desviación estándar.

El índice de refracción es utilizado para identificar y determinar el grado de pureza de un compuesto. Esta propiedad sirve para controlar el grado de pureza y la calidad debido a que cada tipo de aceite esencial posee un índice de refracción característico (Bandoni, 2000).

Tabla 5. Índice de refracción del aceite esencial de *O. vulgare*

Muestras	Índice de refracción	\bar{X}	Σ
OS1	1,4813		
OS2	1,4822	1,4817	0,0005
OS3	1,4816		

OS1: Oregano Seco1, OS2: Oregano Seco2, OS3: Oregano Seco3, \bar{X} :Promedio de las destilaciones, Σ :Desviación estándar

Fuente: Investigación Experimental UTPL
Elaborado por: El autor

La importancia de este parámetro para cada aceite esencial se debe a que su valor cambia si se diluye o mezcla con otras sustancias; y por lo tanto; esto es considerado como una medida de calidad y un parámetro que ayuda a controlar la adulteración (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales de *Origanum vulgare* presentan índices de refracción mayores a 1,47 debido a que poseen en su composición química cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos, según lo argumentado por (Granados, 2012).

3.2.3. Rotación Óptica.

La Tabla 6 muestra el resultado obtenido de la actividad óptica de cada una de las muestras destiladas, la media y su desviación estándar.

Tabla 6. Rotación óptica del aceite esencial de la especie *O. vulgare*

Muestras	Actividad Óptica	\bar{X}	Σ
OS1	+18,31		
OS2	+18,35	+ 18,34	0,04
OS3	+18,38		

OS1: Oregano Seco1, OS2:Oregano Seco2, OS3:Oregano Seco3, \bar{X} : Promedio de las destilaciones, Σ :Desviación estándar.-

Fuente: Investigación Experimental UTPL
Elaborado por: El autor

La determinación del índice de refracción óptica es de vital importancia, puesto que se usa como referencia de pureza de las sustancias que se encuentran presentes en la muestra, ya que está exclusivamente en función de su composición química, por lo cual, el aceite esencial analizado se considera totalmente puro (Gennaro, 2003).

El aceite esencial de *Oregano vulgare* obtuvo un ángulo de rotación de la luz polarizada de +18,34, es decir que tiene el mismo sentido de rotación que las manecillas del reloj, por tal motivo

se puede establecer que la mayoría de compuestos que lo conforman, son sustancias dextrorrotatorias.

3.3. Composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare*.

3.3.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

El perfil cromatográfico del aceite esencial de *Origanum vulgare* fue obtenido de la columna no polar DB5-MS (Figura 12).

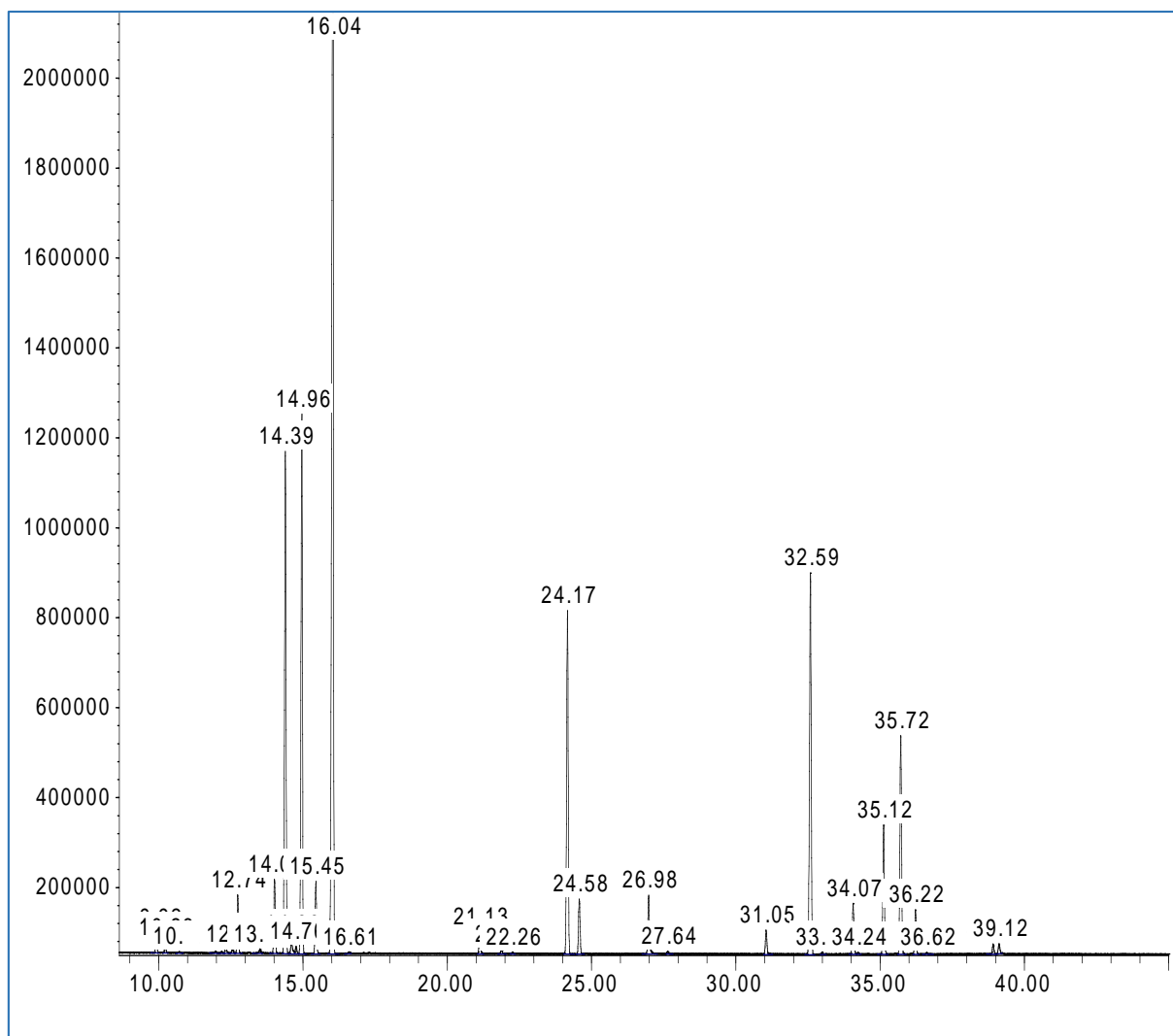


Figura 12. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *O. vulgare* obtenido de la columna DB5-MS

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor

Como se puede observar en la figura 12, los cromatogramas obtenidos indican cada uno de los compuestos mayoritarios que conforman el aceite esencial de *Origanum vulgare*, la figura relaciona el tiempo de retención (eje horizontal) y el área de pico o cantidad de compuesto (eje

vertical), es decir los picos más alto son los compuestos con mayor cantidad presentes en el aceite esencial, donde se los puede visualizar cada uno de los compuestos en la tabla 7.

Tabla 7. Determinación de composición química del aceite esencial de *O. vulgare*.

IR calculado	IR Leído	COMPUESTO	%	Type
933	924	α Thujene	0,53	AMH
939	932	α PINENE	0,33	AMH
974	969	SABINENE	2,85	AMH
978	974	β PINENE	0,16	AMH
983	974	Pinene < β >	0,20	AMH
991	988	Myrcene	0,95	ARM
1006	1002	Phellandrene < α >	0,42	AMH
1017	1014	Terpinene < α >	1,62	ARH
1024	1020	Cymene < ρ >	2,40	AMH
1030	1025	Phellandrene < β >	2,03	AMH
1031	1026	Cineole <1,8>	0,15	MOH
1036	1032	Ocimene <(Z)β>	15,66	AMH
1047	1044	Ocimene <(E) β >	0,14	AMH
1058	1054	Terpinene <Y>	17,57	AMH
1071	1065	Sabinene hydrate <cis->	1,45	OTH
1085	1086	Terpinolene	13,84	AMH
1105	1098	Sabinene hydrate <trans->	3,36	AMH
1110	1110	Octen-3-yl acetate <1->	0,08	OTH
1125	1118	Meth-2-en-1-ol <cisp>	0,45	OTH
1140	1134	Thujanol <iso3->	0,08	OTH
1143	1136	Meth-2-en-1-ol <trans>	0,84	OTH
1149	1140	Verbenol <trans>	0,05	AMH
1173	1165	Borneol	0,28	ARM
1182	1174	Terpinen-4-ol	4,20	AMH
1196	1186	Terpineol < α >	3,26	AMH
1210	1207	Piperitol <trans>	0,40	AMH
1230	1232	Thymol, methyl ether	1,46	OTH
1239	1241	Carvacrol, methyl ether	2,57	OTH
1296	1289	Thymol	21,41	AMH
1299	1054	Terpinene <Y>	0,06	AMH
			Aliphatic monoterpene hydrocarbons (AMH)	88,87
			Aromatic monoterpene hydrocarbons(ARM)	2.85
			Monoterpene alcohols (MOH)	0.15
			Monoterpene ketones (MKE)	0
			Aliphatic sesquiterpene hydrocarbons (ASH)	0
			Aromatic sesquiterpene hydrocarbons(ARS)	0
			Sesquiterpene alcohols (SOH)	0
			Other compounds (OTH)	7,33
			Total identified	99,20

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El Autor.

3.4. Elaboración del queso fresco

Utilizando el procedimiento descrito en la sección 2.2 se logró elaborar queso fresco sin pasteurizar. El queso presentó una consistencia característica cremosa y semidura, fue de color blanco y con olor característico. Quesos aun en su molde pueden ser vistos en la figura 13. La muestra de queso sin aceite esencial se denominó BL00 (Tabla 8).



Figura 13. Muestras de queso fresco sin pasteurizar con AE de *O. vulgare*
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

3.4.1 Muestras de queso fresco con aceite esencial.

En la tabla 8 se detallan las 8 muestras de queso elaboradas, una sin aceite esencial y las otras 7 con diferentes porcentajes de aceite de orégano. Todas las muestras tuvieron la misma apariencia, consistencia y color, solo diferenciándose por la intensidad del olor.

Tabla 8. Muestras de queso fresco.

BL00	Queso con 0 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO02	Queso con 0,2 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO04	Queso con 0,4 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO06	Queso con 0,6 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO08	Queso con 0,8 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO1	Queso con 1,0 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO2	Queso con 2,0 % de AE de <i>O. vulgare</i>
AO3	Queso con 3,0 % de AE de <i>O. vulgare</i>

Fuente: Investigación Experimental UTPL
Elaborado por: El Autor

3.4.2 Vida útil del queso fresco.

Para determinar la vida útil las muestras de queso, estas fueron almacenadas a temperatura ambiente, 27 °C en Machala provincia de El Oro, y en refrigeración 4 °C. También se utilizó un blanco como muestra comparativa.

Sugestivamente la muestra AO06 (0,6 % AE) almacenada al ambiente duro (vida útil) 4 días, en este tiempo esta muestra perdió sus propiedades, el color se tornó amarillento y su consistencia cremosa, también aparecieron manchas de moho. La muestra BL00 (blanco) tuvo una vida útil de 3 días al ambiente, al igual que la muestra AO04 (0,4 % AE). En la figura 14 se puede observar la muestra BL00 al día 1.



Figura 14. Muestra BL00 día 1 almacenamiento en ambiente.

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor

En la figura 15 se puede observar la muestra BL00 a los 3 días de almacenamiento en ambiente, la cual ha cambiado sus propiedades (aspecto), considerándola que no es apta para el consumo (moho en la superficie).



Figura 15. Muestra BL00 día 3 almacenamiento en ambiente.

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor

Las muestras AO08, AO1, AO2 fueron puestas a temperatura en ambiente con el objetivo de evaluar la prolongación de vida útil que este posee, y a la vez conocer el efecto del AE que tiene sobre el alimento (queso fresco), figura 16.

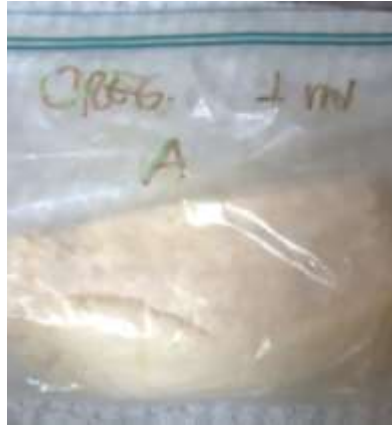


Figura 16. Muestra AO1 día 1 almacenada al ambiente.
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

Al ambiente la muestra AO08 cambio sus propiedades a los 5 días. La muestras AO1 y AO2 duraron hasta el día 6. En la figura 17 se observa la muestra AO1 a los 6 días, a este tiempo esta muestra perdió sus propiedades en consideración del color y olor, tomando un color amarillento, olor ácido y pequeñas manchas de color blanco (moho).



Figura 17. Muestra AO1 día 6 almacenada al ambiente.
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor

De igual manera las muestras BL00 y AO04, AO06, AO08, almacenadas en temperaturas de refrigeración (4 °C) envasado en fundas ziploc, presentaron una mejor estudio de vida útil, debido a que el medio en refrigeración ayuda con la conservación de las muestras, tal y como lo reporta la muestras BL00 (6 días), AO04 (7 días), AO06 (8 días) y AO08 (9 días), esto se debe a que los productos lácteos y sus derivado tienen que ser almacenados en estas temperaturas, con la importancia de evitar la proliferación de microorganismos patógenos para el producto y para la salud. Por tal virtud, el queso fresco en refrigeración, presentó una mayor vida útil, conforme a

todas sus concentraciones antes ya mencionadas, a diferencia de las muestras en ambiente (Figura 18)



Figura 18. Muestra AO1 día 1 Almacenamiento en refrigeración.
Fuente: Investigación Experimental.
Elaborado por: El Autor.

En refrigeración la muestra AO1 y AO2 cambiaron sus propiedades físicas a los 10 días. Estas muestras duraron estos días debido al aumento de concentración de AE que se le agregó al queso fresco, el cual al llegar al último día de vida útil, se presentaron pequeñas manchas blancas (moho), Figura 19.



Figura 19. Muestra AO1 día 10 almacenamiento en refrigeración.
Fuente: Investigación Experimental.
Elaborado por: El Autor

3.4.3. Determinación fisicoquímica del queso fresco con aceite esencial de *Origanum vulgare*.

El pH y la acidez titulable del queso fresco son uno de los parámetros más importantes a controlar, debido a que son alimentos procesados característicos del Ecuador, en el cual influye notablemente la cálida fisicoquímica del producto. Se planteó estos parámetros para verificar si el AE de *O. vulgare* influye notablemente en la composición química del producto. En la tabla 9 se puede observar la acidez y el pH a los días 1, 8 y 12. Con el paso de los días la acidez disminuye y el pH se mantiene. La NTE INEN 10:2012 reporta los valores de acidez (0,13 - 0,18 % ácido láctico) en la materia prima principal del queso (leche), pero Torrealba, y otros, 2018, reportan valores similares en queso fresco, el cual indica que no existe mucha diferencia entre los resultados que muestra la tabla 9.

Tabla 9. Acidez Titulable y pH en el queso fresco con AE

DIAS	MUESTRAS	ACIDEZ	pH
1	BL00	5,67±0,58	6,38±0,02
	AO04	30,00±0,00	6,30±0,02
	AO06	29,00±0,00	6,22±0,01
	AO08	19,50±0,71	6,33±0,01
8	BL00	0,27±0,06	6,54±0,04
	AO04	2,33±0,58	6,50±0,02
	AO06	2,67±0,58	6,51±0,02
	AT08	2,00±0,00	6,49±0,01
12	BL00	0,25±0,05	6,55±0,03
	AO04	2,43±0,51	6,62±0,02
	AO06	1,87±0,48	6,58±0,02
	AO08	0,65±0,06	6,63±0,01

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor

Los resultados del análisis estadístico de ANOVA de un factor con un nivel de significancia 0.05 obtenidos, determinaron que existe diferencia significativa (sig.= <0.05) para los parámetros de acidez y pH del queso fresco con AE de orégano que fueron evaluados en diferentes días y con concentraciones distintas. Por tal razón, se realizó una prueba post Hoc y se observó que en el test de Tukey entre las concentraciones de 0 y 0,4 sí existe una pequeña similitud entre los datos, a diferencia del resto de subgrupos.

3.5. Análisis sensorial del queso fresco con adición de aceite esencial de *Origanum vulgare*

El análisis sensorial se lo realizó a los 9 días después de su estudio de vida útil con la muestra AO08, que fue la muestra que presentó una vida útil más prolongada, y con la muestra BL00 conservadas en refrigeración, para éste análisis sensorial se planteó una escala hedónica tal y como se puede apreciar en la tabla 10, el análisis se realizó con 28 jueces semi entrenados. Para el análisis se procedió a codificar las muestras a ser evaluadas como 4576 la muestra AO08 y como 3476 la muestra BL00.

Tabla 10. Análisis sensorial en el queso fresco con adición de AE de *O. vulgare*

PARÁMETRO	COLOR		OLOR	
	4576	3476	4576	3476
Me gusta muchísimo	0	1	0	0
Me gusta mucho	5	8	4	4
Me gusta moderadamente	11	7	7	3
Me gusta poco	7	4	7	7
No me gusta ni me disgusta	4	4	2	7
Me disgusta poco	1	2	1	4
Me disgusta moderadamente	0	1	4	2
Me disgusta mucho	0	1	2	2
Me disgusta muchísimo	0	0	0	0

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor.

En ambas muestras se evidencia el número de panelistas que evaluaron las muestras, y se puede observar que el mayor número de panelistas que eligieron las muestras en base a su preferencia fueron: 11 catadores les gusta moderadamente (39%) en el color, y 8 (28%) en el olor, en base a la muestra 4576 (AO08). Muestras que 8 catadores les gusta mucho (28%) en el color y 7 les gusta moderadamente (25%) en el olor, en referencia a la muestra 3476. Se planteo estos dos tipos de parámetros (Color-Olor), debido a que el queso fresco fue elaborado sin pasteurizar, por tal razón los panelistas no podían ser expuestos algún tipo de problema microbiológico. Estos resultados fueron sometidos a un análisis estadístico con una prueba de ANOVA bifactorial, dando como resultado una diferencia significativa ($\text{sig} < 0.05$) en ambas muestras y cada parametro, conforme lo estableció la prueba post hoc.

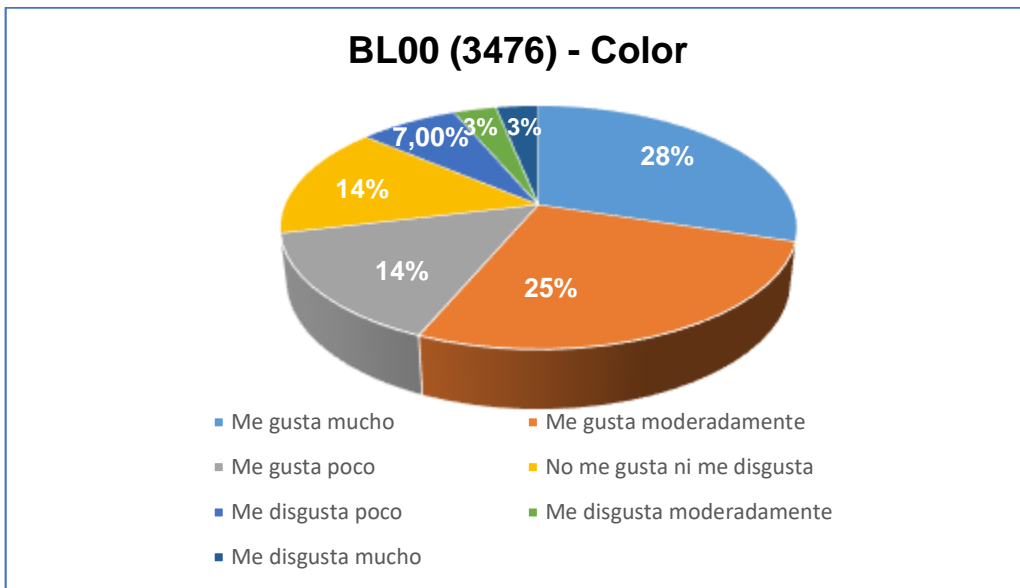


Figura 20. Evaluación sensorial del color del queso fresco muestra BL00 (3476).

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor.

Como se puede apreciar en la figura 20, la evaluación sensorial realizada a los jueces semi entrenados, un 28 % reportó que le gusta mucho, otros 25 % les gusta moderadamente, 14 % les gusta poco, y otros 14 % no les gusta ni les disgusta, para la muestra BL00 (3476).

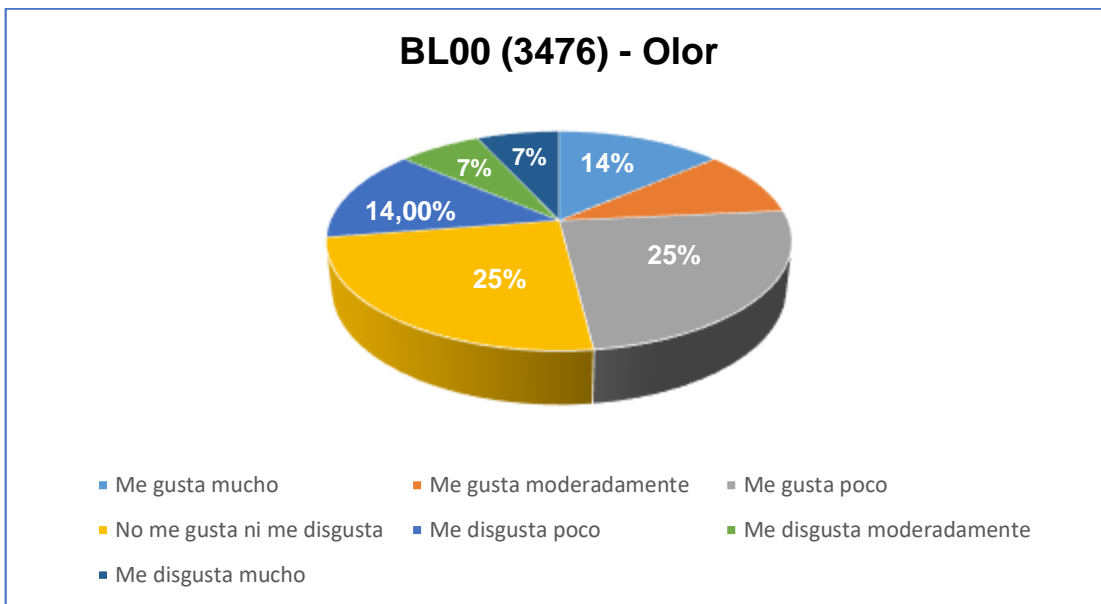


Figura 21. Evaluación sensorial del olor del queso fresco muestra BL00 (3476).

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor.

Mientras que para el olor en la misma muestra BL00 (3476), se observa en la figura 21, que del 100 % de los jueces semi entrenados, un 25 % les gusta poco y otros 25 % no les gusta ni les disgusta, dejando así a un 14 % que les gusta mucho, y otros 14 % que les disgusta poco.



Figura 22. Evaluación sensorial del color del queso fresco muestra AO08 (4576).
Fuente: Investigación Experimental
Elaborado por: El Autor.

La figura 22 detalla que del 100 % de los jueces semi entrenados, sólo un 39 % deciden que les gusta moderadamente, otro 25 % les gusta poco y un 17 % les gusta mucho, dejando así a un 14 % que no les gusta ni les disgusta la muestra AO08 (4576).

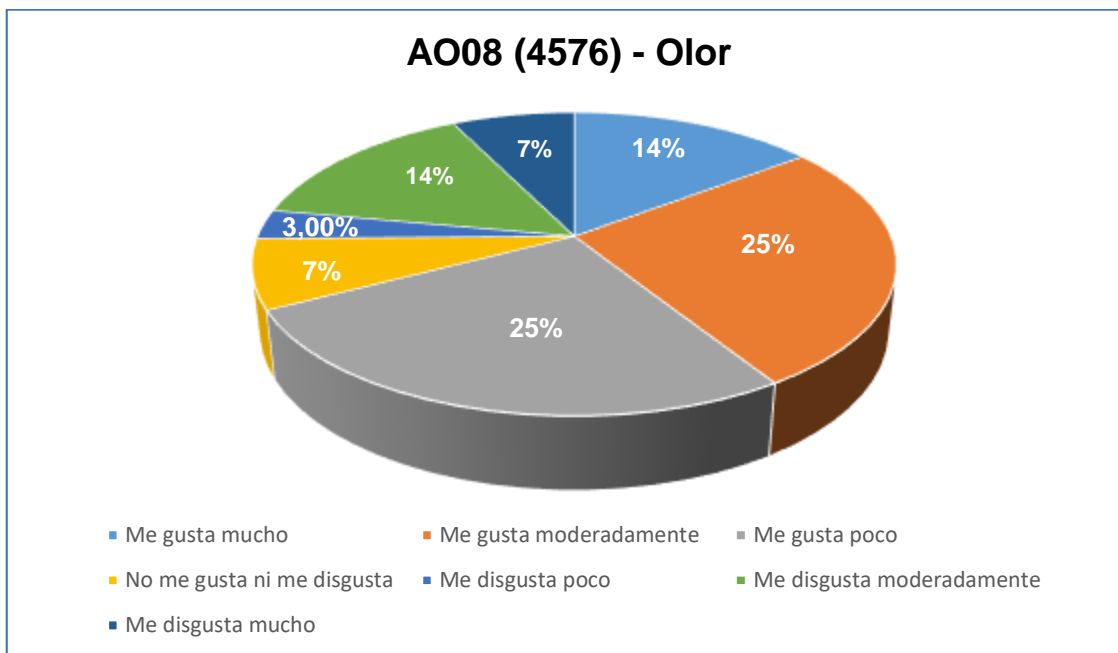


Figura 23. Evaluación sensorial del olor del queso fresco muestra AO08 (4576).

Fuente: Investigación Experimental

Elaborado por: El Autor.

Para el mismo atributo, la muestra AO08 (4576), los jueces semi entrenados detallan que solo un 25 % les gusta moderadamente otros 25 % les gusta poco, mientras que un 14 % les gusta mucho, tal y como se lo puede apreciar en la figura 23.

3.6. Estudio microbiológico del queso fresco con adición de aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Para el estudio microbiológico se realizó la siembra microbiológica con una dilución de 10^{-4} uL con concentraciones de 0.4, 0.6, 0.8 mL aceite esencial/kg queso fresco, los resultados se los puede observar en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de Coliformes en queso fresco con adición de AE de *O. vulgare*

MUESTRAS	DÍA	DÍA	DÍA	REDUCCIÓN	REDUCCIÓN
	1	8	12	DÍA 1 AL 8	DÍA 1 AL 12
	log10 UFC/G				
BL00	MNPC(-)	4,82	2,77	4,82	2,05
AO04	5,21	2,83	1,65	2,38	3,56
AO06	5,20	4,36	1,33	0,84	3,87
AO08	5,22	4,82	1,63	0,40	3,59

MNPC: Muy numeroso para contar

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor

La muestra AO08 reportó un valor de reducción de 3,59 del día 1 al 12 en el estudio microbiológico, pero cabe mencionas que la muestra BL00 al inicio reportó MNPC (muy numeroso para contar), pero fue disminuyendo conforme iban transcurriendo los días en almacenamiento es decir del día 1 (MNPC) al día 12 (2,52). Para conocer si existe diferencia significativa entre las muestras, los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico con una prueba de ANOVA bifactorial, obteniendo una diferencia significativa <0.05 en todas muestras, tal y como lo demostró la prueba post hoc.

Tabla 12. Análisis de *E.coli* en queso fresco con adición de AE de *O. vulgare*.

MUESTRAS	DÍA	DÍA	REDUCCIÓN
	1	8	DÍA 1 AL 8
log10 UFC/G			
BL00	1,0	0,89	0,11
AO2	0,79	0,63	0,16

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor

En la tabla 12, se aprecia el análisis microbiológico para *E. coli*, el cual reportó que para la concentración de la muestra AO2, una reducción de 0,16 del día 1 al 8; se realizó el análisis microbiológico hasta el día 8, para conocer de manera inmediata la reducción logarítmica que presenta la muestra con esta concentración, a diferencia de la muestra BL00 que reportó una reducción de 0,11 en los días de estudio. Se aumentó la concentración de AE de *O. vulgare*, con la finalidad de conocer si la concentración de aceite esencial influye notablemente en el estudio de vida útil, inhibiendo a los microorganismos patógenos como el *E.coli*, los cuales, según la NTE INEN 1528:2012 determina un límite máximo permisible de 10.

Tabla 13. Análisis de Aerobios en queso fresco con adición de AE de *O. vulgare*.

MUESTRAS	DÍA	DÍA	REDUCCIÓN
	1	8	DÍA 1 AL 8
log10 UFC/G			
BL00	2,17	1,47	0,70
AO2	1,60	0,48	1,12

Fuente: Investigación Experimental UTPL

Elaborado por: El autor

La tabla 13, reporta una reducción logarítmica de 1,12 entre los días 1 y 8, para la muestra AO2, un valor considerablemente alto (1,12) en la reducción de la carga microbiana del día 1 al 8, a

diferencia de la muestra BL00 (0,70); esto se debe a que el AE de *O. vulgare* actúa como agente antimicrobiológico, inhibiendo el desarrollo de éste tipo de microorganismos presentes en las muestras de queso fresco, según lo reportan otros autores ya mencionados (Figura 20).

Los resultados obtenidos en la siembra microbiológica para las muestras ya antes mencionadas en cada una de las tablas, reportaron valores bajos a las concentraciones de AE bajo, la carga microbiológica tanto para *Coliformes*, *Aerobios* y *E.coli*, fueron elevadas en cada una de las muestras de queso fresco sin pasteurizar. Por tal virtud se decidió aumentar la concentración de AE de *O. vulgare*. Asensio, 2013 argumenta que el aceite esencial de orégano es un buen agente antimicrobiano, el cual tienen una gran actividad sobre las bacterias gram negativas, tanto contra *E. coli*, *Coliformes*, *Aerobios*, siempre y cuando se trabaje con concentraciones más altas, para determinar el efecto que éste tiene sobre el queso fresco.

De igual manera, una de las razones muy importantes en como el efecto del AE no actuaba en la forma o manera como se esperaba, se debía a que la materia prima principal “leche”, reduce su capacidad inhibidora, de modo que la efectividad disminuye con respecto al medio de cultivo, tal y como lo define Larrosa Moreno, 2015. La presencia de grasa reduce la efectividad antimicrobiana, antifúngica y por eso recomienda que los análisis se lo realicen con leche desnatada, dando un mejor resultado a diferencia de la leche entera.

3.6.1. Actividad antimicrobiana en el aceite esencial de orégano. Prueba de difusión por disco.

Como se pudo observar anteriormente en la figura 10; para la prueba de difusión, se obtuvo un halo de inhibición muy reducido de menos de 1 mm para el aceite de orégano y 1,5mm para el blanco positivo (Cloro). Pudiendo observar que existe efecto antimicrobiano negativo del aceite esencial de orégano contra la bacteria *E.coli* con una concentración de 0,4 uL. Mientras que para *S. aureus*, no hubo halo de inhibición, dando como resultado negativo al efecto antimicrobiano en las concentraciones aplicadas; se podría aumentar la concentración para conocer si el efecto depende de las concentraciones de aceite esencial.

CONCLUSIONES

- ❖ Dentro de los parámetros analizados en el aceite esencial de *Origanum vulgare* se obtuvieron valores similares en base a bibliografía establecida sobre la misma especie, los cuales fueron; para el rendimiento 0,43, la densidad relativa fue de 0,9157 g/cm³, el índice de refracción fue de 1,4817 y la rotación óptica fue de +18,34.
- ❖ Dentro del perfil cromatográfico, se pudieron identificar 35 compuestos, de los cuales 32 compuestos están presentes en ambas columnas. En la columna no polar DB5-MS, se identificaron 30 compuestos correspondiente al 85,71 %, mientras que en la columna polar HP-INNOWAX MS se identificaron 32 compuestos correspondiente al 91,42 %.
- ❖ Los compuestos mayoritarios en el aceite de orégano fueron el Thymol 21,41%, γ -Terpinene 17,57%, Terpinolene 13,84%, (Z)- β Ocimene 15,66%.
- ❖ Para el análisis de vida útil, las muestras de queso fresco con aceite esencial tuvieron una duración de: BL00 - 3 días, AO04 - 3 días, AO06 - 4 días, AO08 - 5 días, AO1 - 6 días y AO2 - 6 días, almacenadas respectivamente en temperatura ambiente de 27 °C.
- ❖ Las muestras almacenadas en refrigeración de 4 °C, tuvieron una prolongación de vida útil de: BL00 - 6 días, AO04 - 7 días, AO06 - 8 días, AO08 - 9 días, AO1 - 10 días y AO2 - 10 días respectivamente.
- ❖ El aceite esencial de *O. vulgare* presentó poca actividad antimicrobiana frente a *Coliformes* y *E. coli*. Debido a que la grasa que posee la leche, inhibe la capacidad de acción que éste posee ante los microorganismos.

RECOMENDACIONES

- ❖ Para la extracción del aceite esencial, sería de preferencia y de aprovechamiento utilizar el orégano totalmente seco, debido a que el fresco o húmedo, contiene en su composición agua, lo que genera una pérdida o rendimiento bajo.
- ❖ Se recomienda identificar la actividad biológica del aceite esencial, porque puede ser un agente inhibitorio de otros microorganismos peligrosos para sector alimenticio.
- ❖ Sería muy interesante hacer una prueba con un queso fresco, el cual haya sido elaborado con leche descremada, debido a que la grasa que esta posee, inhibe la acción antimicrobiana que el aceite esencial de *O. vulgare* tiene, tal y como lo definen en ciertas investigaciones.
- ❖ Es recomendable eliminar todo el suero que el queso fresco emane en el producto terminado, puesto que este, ayuda al desarrollo de mohos y levaduras, interrumpiendo así el poder de acción del aceite esencial de *O. vulgare*.

BIBLIOGRAFÍA

- Albado P.E, S. F. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered*, 12:16-9.
- Arguello, P., Lucero, O., Castillo, G., Escobar, S., Albuja, A., Gallegos, J., & Carrascal, A. (2016). CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS QUESOS ARTESANALES ELABORADOS EN ZONAS RURALES DE RIOBAMBA (ECUADOR). *PERSPECTIVA*, 10. Obtenido de file:///C:/Users/erviv/Downloads/376-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1339-1-10-20170220.pdf
- Asensio, C. M. (10 de Octubre de 2013). *Repositorio Digital Universidad Nacional de Córdoba*. Obtenido de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1692/Asensio%20-%20Utilizaci%C3%B3n%20de%20aceites%20esenciales%20de%20variedades%20de%20or%C3%A9gano%20como%20conservante....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bakkali, F. A. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bandoni, A. (2000). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. La Plata Argentina,: CYTED, Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Bandoni, A. (2002). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Buenos Aires, Argentina.
- Bastos M., D. L. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino.Cub. Ciudad de la Habana. *Revista Cubana Plant Med. Vol 16. No 3*.
- Blázquez, M. (2014). Role of natural essential oils in sustainable agriculture and food preservation. . *Journal of Scientific Research & Reports*, , 3(14), 1843-186.
- Chávez L., D. F. (2008). *Efecto sinérgico del aceite esencial de Origanum vulgare a la Gentamicina en cultivos de Escherichia coli*. Peru, Lima: Felsocem. Vol 13, n° 2 pp 46.
- Fan, W. y. (2008). The use of tea polyphenol dip to extend the shelf life silves corp during storage in ice. *Food chemistry*., Vol. 6, Pp 108, 148- 153, Pp 108, 148- 153.
- Gennaro, A. (2003). *Remington: Farmacia (20 edición., Vol. 1)*. Editorial Médica Panamericana.
- Granados, C. Y. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Mintostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: . *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.*, 10(1):12-23. .
- Hart. KJ, Y.-R. D. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Newbold Anim. Feed Sci. Tech*, 147: 8-35.
- Larrosa Moreno, F. (03 de Marzo de 2015). *Repositorio Digital Universidad Miguel Hernández de Elche*. Obtenido de Escuela Politécnica Superior de Orihuela: <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/5383/1/TFM%20Larrosa%20Moreno%2C%20Francisco%20Jos%C3%A9.pdf>

- Miralles. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario Chacras de Coria.Mendoza. Arg. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, vol.43. p 3-4.
- Ortuño, F. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana Ediciones.
- Pierce, A. (1999). The American Pharmaceutical Association. A Stonesong Press Book. *Practical guide to natural medicines.*, 728.
- Segura, R. S. (2018). “*Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Origanum vulgare L. “Orégano peruano” frente a Staphylococcus aureus*”. Lima-Perú: Universidad Norbert Wiener. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Skoog. (2001). *Química Analítica. 7ª. Edición*. México: Editorial McGraw-Hill. 687-696 P.
- Skuola M, G. P. (1999). A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochem.* , 52: 649-657.
- Thormar, H. (2011). Lipids and esencial oil (as antimicrobial agentes. *University of Iceland. Faculty of Life and Environmental Sciences*.
- Torrealba, J., Rodríguez, J., & Morales, J. (2018). EVALUACIÓN DEL EMPLEO DE DOS AGENTES ÁCIDOS EN LA ELABORACIÓN DE UN QUESO DE PASTA COCIDA. *MANGIFERA*, 10. Obtenido de file:///C:/Users/erviv/Downloads/422-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1602-1-10-20180508.pdf
- Vásquez A., V., Salhuana G., J. G., Jiménez D., L. A., & Abanto Ríos, L. M. (2018). Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos frescos en Cajamarca. *Scielo*, 11. doi:<http://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>

ANEXOS

ANEXO 1. Proceso de elaboración del queso fresco artesanal con aceite esencial de *O. vulgare*.

 A group of people outdoors are receiving raw milk. One person is pouring milk from a metal can into a large white plastic bucket. A horse is visible in the background.	 A person in a white lab coat and blue hairnet is filtering milk through a white cloth into a large metal pot.
<p>Recepción de materia prima</p>	<p>Filtrado</p>
 A large metal pot on a stand contains yellowish milk. A person is adding a substance from a small container into the pot.	 A person is cutting a blue rectangular mold into a large metal pot filled with curdled milk.
<p>Adición de cuajo</p>	<p>Cortado</p>
 A person is draining curdled milk into a blue bucket from a large metal pot.	 A person is salting curdled milk in a metal pot. A blue bucket and other equipment are visible in the background.
<p>Desuerado</p>	<p>Salado</p>



Mezclado



Moldeado



Empacado



Almacenamiento

ANEXO 2. Hoja de evaluación sensorial

EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESO FRESCO DE MESA

NOMBRE: _____

FECHA: _____

A continuación, se presentan dos muestras de queso fresco que están codificadas. Indique su nivel de agrado en las características que se solicitan.

MUESTRA: 4576	COLOR	OLOR
Me gusta muchísimo		
Me gusta mucho		
Me gusta moderadamente		
Me gusta poco		
No me gusta ni me disgusta		
Me disgusta poco		
Me disgusta moderadamente		
Me disgusta mucho		
Me disgusta muchísimo		

MUESTRA: 3476	COLOR	OLOR
Me gusta muchísimo		
Me gusta mucho		
Me gusta moderadamente		
Me gusta poco		
No me gusta ni me disgusta		
Me disgusta poco		
Me disgusta moderadamente		
Me disgusta mucho		
Me disgusta muchísimo		

¿Cuál de las DOS muestras le gustó más el **COLOR**? _____

¿Cuál de las DOS muestras le gustó más el **OLOR**? _____

¿Por qué? _____

¿Por qué? _____

OBSERVACIONES: _____

OBSERVACIONES: _____

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

