



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

Centro de Postgrados

**MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA, MENCIÓN SISTEMAS
AGROINDUSTRIALES**

**PROYECTO DE INNOVACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MAGISTER EN AGROINDUSTRIA**

Evaluación del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en la
conservación de queso fresco

Autor: Ramiro Germán Jaramillo Bayas

Director: Dr. Dagoberto Acosta Iglesias PhD.

Co- Director: Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez PhD.

Puyo – Ecuador

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Ramiro German Jaramillo Bayas declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: “Evaluación del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en la conservación de queso fresco.”, de la Maestría en Agroindustria, Mención Sistemas Agroindustriales, siendo Dagoberto Acosta Iglesias director del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Estatal Amazónica y a sus representantes legales de posibles reclamos y acciones legales. Además, certifico que las ideas, doctrinas y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

f).....

Autor: Ramiro Germán Jaramillo Bayas

Cédula: 0602281198

CERTIFICADO DE APROBACIÓN Y SUSTENTACIÓN DEL TRIBUNAL

El Tribunal de sustentación aprueba el proyecto de: “Evaluación del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en la conservación de queso fresco.”

Dr. Mateo Radice

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Yasiel Arteaga

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Dunia Chávez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Agradezco:

Inmensamente a Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida con bendición y amor con el que guía mi cami

A mí querida familia por la confianza, orientación y el apoyo incondicional y vital que tuvieron durante mis años de estudio.

A mi director de Tesis, Dr. Dagoberto Acosta PhD. y a mi co-director el Dr. Luis Bravo PhD. por brindarme su ayuda, confianza y destreza en la dirección de mi trabajo, al igual que su tiempo y dedicación que tuvo para la elaboración del mismo.

A la Universidad Estatal Amazónica, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y culminar mis estudios.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por la apertura para el proceso de Investigación en sus laboratorios y equipos

Ramiro Jaramillo B.

DEDICATORIA

Éste trabajo está dedicado a mis maestros que formaron parte de mi vida estudiantil, y que aportaron con sus conocimientos, a mis amigos quienes me apoyaron desde el inicio de este largo camino, mi familia principalmente mi Esposa e Hijos quienes con su apoyo me empujaron siempre hacia adelante en mis momentos de flaqueza, y a todos aquellos quienes formaron parte de este sueño para poder cumplir una etapa de mi vida.

RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

En el Ecuador por cultura se consume el queso de vaca fresco, pero este a su vez es un caldo de cultivo ideal para bacterias que pueden poner en riesgo la salud del consumidor, por lo que resulta necesario encontrar la forma de evitar su descomposición, de ahí la importancia del estudio del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. por su propiedad antioxidante y antibacteriana que permite utilizarlo como anti oxidante natural para el queso fresco. Para lo cual se preparó queso fresco de vaca al cual se le adicionó diferentes dosis de ~~de dosis~~ de aceite esencial *R. officinalis* las cuales fueron según el tratamiento, dosis A1: 0,05% de aceite esencial de *R. officinalis*; dosis A2: 0.10% de aceite esencial de *R. officinalis* ; dosis A3: 0,15% de aceite esencial de *R. officinalis* Además, se elaboró un tratamiento de queso fresco sin aceite de *R. officinalis*, el cual fue el testigo (T), y se realizaron los análisis de presencia de *Escherichia coli* , coliformes totales y *Staphylococcus aureus*, además de las prueba de actividad anti oxidante (FRAP). De los ensayos realizados se pudo evidenciar que en las tres dosis, el aceite esencial tiene un efecto ligeramente inhibidor de bacterias en especial *S. aureus* a los ocho días de evaluación, además, se comprobó que existe una relación marcada entre dosis de aceite esencial y tiempo en el conteo de bacterias. Por último, se demostró que existe una baja actividad antioxidante con respecto al testigo, siendo el tratamiento A3 con dosis de aceite esenciales de *R. officinalis* de 0,15% la que mejor resultado tuvo a lo largo del ensayo.

Palabras Clave: Aceite esencial - *R. officinalis* - Queso fresco – Microbiológico – Antioxidante.

ABSTRACT AND KEYWORDS

In Ecuador, by culture, fresh cow's cheese is consumed, but this in turn is an ideal breeding ground for bacteria that can put the health of the consumer at risk, so it is necessary to find a way to avoid its decomposition. there the importance of the study of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. for its antioxidant and antibacterial property that allows to use it as a natural antioxidant for fresh cheese. For which fresh cow's cheese was prepared to which different dose doses of essential oil *R. officinalis* were added, which were according to the treatment dose A1: 0.05% of essential oil of *R. officinalis*; A2 dose: 0.10% essential oil of *R. officinalis*; A3 dose: 0.15% essential oil of *R. officinalis*. In addition, a fresh cheese treatment without oil of *R. officinalis* was elaborated. It was the control (T), performing the analysis of the presence of *Escherichia coli*, total coliforms and *Staphylococcus aureus*, in addition to the anti-oxidant activity test (FRAP) in which it was possible to demonstrate that in the three doses has a slightly inhibitory effect of bacteria, especially *S. aureus*, after eight days of evaluation, it was also found that there is a relationship. Finally, it was demonstrated that there is a low antioxidant activity with respect to the control, with A3 treatment with oil doses of *R. officinalis* 0,15%, which had the best result.

KEYWORDS: Essential oil - *R. officinalis* - Fresh cheese - Microbiological – anti oxidative

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema Científico	3
1.2. Hipótesis de la investigación	3
1.3. Objetivos	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1.1. <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	4
2.1.2. Aceites Esenciales (AEs)	7
2.1.3. Queso fresco	8
2.1.4. Antimicrobianos de origen vegetal	11
2.1.5. Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural.	13
2.1.6. Antioxidantes	13
2.1.7. El ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant power)	14
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	15
3.1.1. Localización	15
3.1.2. Tipo de Investigación	15
3.1.3. Métodos de investigación	15
3.1.3.1. Extracción de aceite de <i>Rosmarinus officinalis L</i>	15
3.1.3.2. Elaboración de queso fresco de vaca	16
3.1.3.3. Pruebas microbiológicas	19
3.1.3.4. Ensayo FRAP	20
3.1.4. Recursos humanos y materiales	20
3.1.4.1. Recursos Humanos	20
3.1.4.2. Recursos Materiales	21
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición Nutricional del Queso Fresco	9
Tabla 2 Formulación para el queso fresco	17
Tabla 3 Diseño estructural del ensayo	18
Tabla 4 Resultados de análisis FRAP en los diferentes tratamientos.....	25
Tabla 5 Análisis de varianza poder antioxidante FRAP evaluación 1 día	26
Tabla 6 Prueba de Tukey evaluación antioxidante: primer día	26
Tabla 7 Análisis de varianza poder antioxidante (FRAP) evaluación ocho días	27
Tabla 8 Prueba de Tukey para la evaluación de actividad antioxidante por ocho días	28
Tabla 9 Análisis de varianza poder antioxidante FRAP evaluación 16 días	29
Tabla 10 Prueba de Tukey evaluación antioxidante 16 días.....	29
Tabla 11 Resultados de análisis microbiológicos en los diferentes tratamientos	32
Tabla 12 Análisis de varianza de coliformes totales presentes evaluación 1 día.....	33
Tabla 13 Prueba de Tukey evaluación coliformes totales 1 día.....	34
Tabla 14 Análisis de varianza de coliformes totales presentes evaluación 8 días	34
Tabla 15 Prueba de Tukey evaluación coliformes totales 8 días	35
Tabla 16 Análisis de varianza de coliformes totales presentes evaluación 16 días	36
Tabla 17 Prueba de Tukey evaluación coliformes totales 16 días	36
Tabla 18 Análisis de varianza de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes evaluación 1 día.....	37
Tabla 19 Prueba de Tukey, evaluación <i>Staphylococcus aureus</i> 1 día	37
Tabla 20 Análisis de varianza de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes evaluación 8 días.....	38
Tabla 21 Prueba de Tukey evaluación <i>Staphylococcus aureus</i> 8 días.....	38
Tabla 22 Análisis de varianza de <i>Staphylococcus aureus</i> presentes evaluación 16 días.....	39
Tabla 23 Prueba de Tukey evaluación <i>Staphylococcus aureus</i> 16 días.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Evaluación poder antioxidante: primer día	27
Figura 2. Evaluación poder antioxidante a los ocho días.	28
Figura 3. Evaluación poder antioxidante a los dieciséis días.	30

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La calidad, la seguridad, la soberanía alimentaria y la protección del ambiente, tienen su principio en la Agroecología, llevando cada vez más a la utilización de alimentos sin conservantes sintéticos ya que la contaminación microbiológica es en la actualidad un riesgo para la salud, debido a la resistencia de algunos gérmenes a los antibióticos convencionales y a los conservantes sintéticos desgastados en la industria alimentaria, que en cuantiosos informes son refutados como responsables de ser cancerígenos y teratogénicos por su toxicidad residual. Por esta razón, ha aumentado la orientación al aprovechamiento de conservantes naturales, que han alcanzado a constituir una solución promisoriosa como fuente de sustancias con actividad antimicrobiana (Santos, 2000).

El queso fresco es muy tradicional en el Ecuador y enormemente consumido en todas sus regiones por la gran facilidad de encontrarlo en tiendas de abasto y mercados, pero por su alta cantidad de humedad lo hace tener una vida limitada en anaquel, a su vez, la presencia de ácidos grasos que entran en contacto con la luminosidad del entorno y el oxígeno hacen que sea un medio idóneo para el desarrollo de microorganismos además de que rápidamente se pierdan las características propias del alimento volviéndose desagradable al olfato y al gusto a los pocos días de su elaboración (Gutiérrez y Morales, 2015).

Entre los productos sintéticos utilizadas para el control de grasas y aceites, están los antioxidantes que cuando están presentes en los productos procesados en concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho producto. Los antioxidantes sintéticos se están restringiendo puesto que se ha comprobado a través de estudios toxicológicos que, en animales, causan conflictos a la sanidad; de modo que su aplicación está sujeto a las normas oficiales de cada país, además de la Agencia del Gobierno de los Estados Unidos encargada de la administración de alimentos y medicamentos con sus siglas en inglés FDA. Una de las líneas actuales de investigación es conseguir antioxidantes naturales que permitan disminuir el consumo de productos fabricados y garanticen la nulidad de problemas sanitarios (Rodríguez, 2015).

El uso de los aceites esenciales ha tomado un papel importante en la conservación de alimentos, porque muchas veces la mezcla de componentes terpénicos, presentan algún tipo de actividad

frente a bacterias comunes. Por tal motivo, resulta necesario encontrar compuestos que tengan efectos antioxidantes para evitar el constante consumo de conservantes químicos que, a pesar de todos los estudios realizados están latentes los posibles perjuicios que pueden ocasionar a la salud de los consumidores y al no ser utilizados en cambio limita la eficiencia y el tiempo de vida útil de los alimentos; por lo cual es necesario el estudio de aceites esenciales que con alguna capacidad antioxidante y con un uso correcto, ayudarían al incremento de la vida útil de los alimentos, manteniendo su calidad nutritiva y mejorando su vida en percha. Solo el descubrimiento y desarrollo continuo de nuevos productos y nuevas aplicaciones de los aceites esenciales ayudará a mantener una producción estable y un consumidor sano (Look, 1999).

Se debe tener presente que *Rosmarinus officinalis* L, es una planta rica en metabolitos activos como ácidos fenólicos, flavonoides, aceites esenciales, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. En las investigaciones de Morales (2014) explotar la riqueza natural en relación a la producción de especias de origen vegetal impulsando al procesamiento de materias primas en la extracción de anti oxidantes desde el aceite esencial, permitiría crear un valor añadido al *R. officinalis*, y por lo tanto su aprovechamiento industrial, además, ayudaría a disminuir la importación de aditivos alimentarios y generaría una participación activa de la gente en el fortalecimiento de la soberanía alimentaria por medio de la rehabilitación de los cultivos ancestrales andinos en la actualidad explotados. Así se favorecen las familias campesinas de las comunidades de Ecuador que cultivan romero solamente como planta medicinal y la industria que necesita aditivos alimentarios que controlen la oxidación de grasas y que estén permitidos por los organismos pertinentes; además, del cliente final, que consigue productos con antioxidantes naturales que no representen un compromiso para su salud. El fin de este estudio radica en elaborar el queso fresco con la adición en diferentes dosis del aceite esencial de *R. officinalis*, con el propósito de prolongar su período de vida útil puesto que está comprobado que el aceite de romero tiene una propiedad anti oxidante que ayudaría a que el queso fresco mantenga sus propiedades organolépticas a lo largo de muchísimo más tiempo (Harris, 2003).

1.1. Problema Científico

¿Poseerá el queso fresco de vaca con el aceite esencial de *R. officinalis* mayor resistencia a la contaminación microbiana y a la oxidación?

1.2. Hipótesis de la investigación

El queso fresco de vaca con el aceite esencial de *R. officinalis* mantendrá mayor cantidad de compuestos antioxidantes y menor presencia de bacterias que un queso fresco sin el aceite esencial.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la conservación de queso fresco de vaca con aceite esencial de *R. officinalis*,

1.3.2. Objetivos específicos

- 1) Analizar la actividad antioxidante del queso fresco con la adición de aceite esencial de *R. officinalis*, en diferentes dosis (0,05; 0,10; 0,15 %) en función del tiempo.
- 2) Evaluar las características microbiológicas del queso fresco con el aceite esencial de *R. officinalis*, en refrigeración durante 16 días.
- 3) Determinar la mejor dosis de aceite esencial de *R. officinalis*, que ayude a conservar de mejor manera el queso fresco de vaca.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. *Rosmarinus officinalis L.*

Generalidades

El *R. officinalis* es una planta aromática popular y usada desde la antigüedad como condimento y con objetivos medicinales. Es una clase divulgada extensamente en Europa (España, Italia); se puede corroborar las bondades en la culinaria y medicina. En el Ecuador ha encontrado su habitud en los valles interandinos de las zonas del sur de nuestra Provincia. Se pudo comprobar que esta clase forma parte del que llevar a cabo familiar en el jardín de casa, bajo diferentes maneras de cultivo. Esta clase nació en los países de la cuenca del mediterráneo, sur de Europa y norte de África, donde crece en zonas costeras y pedregosas de clima húmedo, (Fernández, 2008).

Según (Villiera, 2002) menciona que “la planta de romero ha tenido un peso importante a lo largo de la historia de la humanidad debido a las propiedades que se le han atribuido en diversas culturas”.

“Un ejemplo es en los restos hallados en la primera dinastía faraónica, donde se solían colocar ramilletes de romero en las tumbas con la finalidad de perfumar el viaje hacia el país de los muertos” (De Rivera y Obón 1995).

Por lo que, griegos y romanos creían que el romero era la planta de la regeneración, creían que el romero simbolizaba el amor y la muerte, apareciendo desde entonces esta planta en bodas y funerales, como símbolo manifiesto de amor duradero y que ese vínculo jamás se rompería (Erkan N, *et, al* 2008).

Hoy se emplea como planta digestiva y su utilización es por vía externa, como rubefaciente. Sin embargo, hay estudios que demuestran otras propiedades terapéuticas que pueden resultar interesantes.

Descripción botánica

La planta de *R. officinalis* fue identificada por Lineo en 1753, la clasificación taxonómica de las muestras de romero utilizadas, realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, es la siguiente:

División:	<i>Angiospermae</i>
Clase:	<i>Dicotyledonea</i>
Sub Clase:	<i>Sympetaleae</i>
Orden:	<i>Tubiflorae</i>
Familia:	<i>Lamiaceae</i>
Género:	<i>Rosmarinus</i>
Especie:	<i>Officinalis</i>
Nombre común:	“Romero”

(Sánchez, 1980) Tradicionalmente se ha creído que la palabra *Rosmarinus* deriva de dos vocablos griegos rhus, arbusto y myrinos, aromático, los cuales concuerdan perfectamente con las características de la planta (Morales, 2014), por lo que se desprende que el origen de la palabra *officinalis*, hace referencia a su aplicación como planta medicinal (Font Quer, 1999).

Principales compuestos del *R. Officinalis*.

En la planta se han identificado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. (Caribe & Campos, 1991).

De manera general las principales moléculas que se han identificado en el romero son las siguientes:

Carnosol, el ácido carnósico, el ácido rosmarínico, además se registra también la presencia en menor cuantía de terpenoides como el ácido oleánico, ácido oleanólico, ácido acetiloleanólico, ácido ursólico y ácido acetilursólico (triterpenos), rosmaridienol, 7-metoxirosmarol, α y β -amirenomas, además la presencia de Flavonoides: apigenina, diosmetina, diosmina, hispidulina, luteolina, cirsimarina, nepritina, sinensetina, cupafolina. También la presencia de ácidos

fenólicos como el cafeico, clorogénico, labiático, neoclorogénico y alcoholes triterpénicos (α y β -amirina, betulósido). (Martinello y Pramparo, 2005)

Actividad biológica del aceite esencial de *R. Officinalis*.

En algunos estudios in vitro se ha demostrado que el ácido carnósico podría ser el componente antioxidante más activo, con una actividad tres veces superior al carnosol y siete veces superior que otros componentes sintéticos como el hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado (Cuvelier *et al.*, 1996). Otros estudios in vitro indican que uno de los compuestos más importante para la actividad antioxidante sería el ácido rosmarínico (Thorsen *et al.*, 2003).

Según (Pérez *et al.*, 2010), han publicado que “los ácidos rosmarínico, carnósico y carnosol, serían los responsables de la actividad antioxidante de los extractos de hojas de romero”. Sin embargo, otra investigación afirma que “la mayor actividad biológica se alcanza al estudiar el extracto total de la planta, que podría tener un efecto de sinergismo entre todos componentes que forman los extractos de romero (Erkan *et al.*, 2008).

Actividad antioxidante del aceite esencial de *R. Officinalis*.

Los antioxidantes son una formulación de elementos o sistemas que retrasan la auto oxidación inhibiendo la formación de radicales libres o interrumpiendo la propagación del radical libre por uno o numerosos mecanismos, se han realizado distintos estudios de la actividad antioxidante del romero, algunos de estos han afirmado que esta planta podría tener potencial como un antioxidante proveniente de la naturaleza (Cuvelier *et al.*, 1996).

Los compuestos antioxidantes naturales son una opción dado que sus propiedades fenólicas y otros elementos activos que tienen la posibilidad de impedir eficazmente la iniciación o propagación de las reacciones de oxidación. Los subproductos del romero tienen características antioxidantes más fuertes que algunos antioxidantes sintéticos como el butil hidroxitolueno y El butilhidroxianisol (Kumar *et al.*, 2015).

(Erkan *et al.*, 2008) evaluaron la actividad antioxidante de 3 compuestos puros del romero (ácido carnósico, ácido rosmarínico y sesamol), aceite esencial de *R. Officinalis* y aceite esencial de semilla negra, obteniendo como resultado que el aceite esencial de *R. Officinalis* presenta mayor

actividad antioxidante que los compuestos puros y que el aceite de semilla negra, este resultado es atribuido al alto contenido fenólico del romero.

(Lin-Chen *et al.*, 2006) en sus investigaciones realizaron un estudio sobre la actividad antioxidante de 23 plantas comestibles sometidas a digestión, uno de los materiales a analizar fue el aceite esencial de *R. Officinalis*. Los resultados obtenidos reflejan que el mencionado vegetal puede ser considerado como un bastión muy accesible de sustancias con antioxidantes de origen natural, con lo cual se prevendría posibles daños causados por el estrés oxidativo tales como daños cardiovasculares y diabetes mellitus.

2.1.2. Aceites Esenciales (AEs)

Generalidades

Los aceites esenciales son compuestos líquidos de alta viscosidad obtenida de diferentes partes de los vegetales, primordialmente de las partes suculentas, son mezclas complicadas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además, son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Estos compuestos son fundamentalmente derivados de plantas, son populares por su actividad antimicrobiana contra un extenso rango de bacterias y hongos. Son mezclas de elementos volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya estructura interviene una parte de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos, adjuntado con otros compuestos la mayoría de las veces oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que emiten a los aceites el perfume que los caracteriza. Estas fracciones líquidas volátiles, por lo general destilables por arrastre con vapor de agua, tienen dentro las sustancias causantes del aroma de las plantas y cobran importancia en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de comestibles (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (García, *et al.*, 2010). Por lo que Rodríguez, Alcaraz y Meléndez, (2012) definen a los aceites esenciales es la mezcla de diferentes moléculas como hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles y se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas. La mayoría de aceites esenciales tienen una característica agradable al olfato, pero en una menor cantidad existen aceites esenciales con características astringentes como el ajo y la cebolla que no generan gusto, pero tienen altas propiedades a desarrollar.

Extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son extraídos de material vegetal por varias metodologías, pero entre los principales tenemos extracción, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enflorado y con fluidos supercríticos (Rodríguez, *et al.*, 2012).

Extracción por arrastre de vapor

Los aceites esenciales que derivan de las plantas aromáticas se obtienen típicamente por arrastre de vapor, es un proceso simple, clásico y relativamente barato en el cual los aceites esenciales son extraídos de la planta por una corriente del vapor de agua y entonces ambas fases se separan fácilmente por la diferencia de densidades (Look de Ugaz, 1999).

El método de extracción por arrastre de vapor por excelencia lo constituye "La destilación". Este consiste en poner la parte vegetal a utilizar en un recipiente, mientras es calentada agua debajo del mismo. El vapor circula a través del recipiente, junto con el aceite esencial, que se torna en estado gaseoso. En la tapa o cuello de cisne se recolecta el vapor y es enviado hacia una espiral refrigerada con agua corriente. El vapor es condensado y la mezcla de agua y aceites se separa naturalmente por decantación. (Lok de Ugaz, 1999). Los principales métodos extractivos empleados a escala industrial para las esencias más comunes, se basa en arrastre del aceite esencial contenido en la planta con vapor de agua (Martínez y Naranjo, 2004).

Para extraer el aceite esencial por arrastre de vapor, se debe contar con un equipo destilador de básico si se trata de una determinación experimental en laboratorio y de mayor tamaño si es una tarea a nivel industrial, los destiladores constan de las siguientes partes: una fuente de calor que genera vapor, un recipiente para alojar la hierba, un colector del aceite esencial separado y un refrigerante para los vapores. (Martínez y Naranjo, 2004).

2.1.3. Queso fresco

Definición

La normativa del Codex estándar numero 283 (1978) y el Servicio Ecuatoriano de Normalización con sus siglas INEN emiten la Norma INEN, 2829 (2013), definen al queso como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la contenido de la proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la

leche, obtenido mediante coagulación total o parcial de la proteína de la leche; pero para Madrid (2003) nos dice que “El queso es una conserva que se obtiene por la solidificación de la leche y por la acidificación y deshidratación de la cuajada”, además es un alimento rico en nutrientes como lo describe la tabla 1.

Tabla 1 Composición Nutricional del Queso Fresco

Valor nutritivo

	Porcentaje (%)
Agua	45-65
Grasa	17-26
Proteína	15-25
Carbohidratos	2-3,5
Sales minerales	2-4,5

Fuente: Curso de industrias lácteas, Madrid, (1999).

El queso fresco blanco es un producto que se cree que tiene como origen Latinoamérica, normalmente, el proceso combina calor y ácido. El queso blanco posee la cualidad de freírse sin derretirse, lo que lo hace ideal para consumirlo solo, también se cómo queso gratinado o mezclado con otros productos como tomate, especias y chiles (Fox, 1987).

Los quesos frescos se expenden libremente y se encuentran en las mesas de los consumidores sin haber pasado por el proceso de maduración por tal motivo estos quesos poseen un elevado contenido de agua libre, entre 50% y 80%, que causa una limitada vida útil por su rápida descomposición. Además, debido a la falta de maduración, es importante realizar tratamientos térmicos a la materia prima para evitar el desarrollo de gérmenes que pueden ocasionar daños a la salud del consumidor (Meyer, 2007).

Varios estudios sobre las bacterias en quesos muestran la contaminación de los mismos durante la manipulación en el procesamiento e incluso durante el almacenamiento del producto y se requieren temperaturas elevadas para lograr una adecuada pasterización. Además, el gran contenido de humedad y el pH (aproximadamente 5,2) del queso blanco puede favorecer el crecimiento o la sobrevivencia de los microorganismos (Glass, Prasad, Schlynter, Uljas y Farkye, 1995).

Proceso de elaboración de quesos

El proceso de elaboración de queso fresco es sencillo, pero Jhonson y Law (2011), afirman que implica fenómenos físicos y químicos muy complejos, estos fenómenos inician a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche, por la acción enzimática (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido (comúnmente el ácido láctico). Su elaboración ha variado, de acuerdo a los nuevos tipos de quesos, pero los principios básicos son los mismos que hace 2000 años (Santos, 2000).

Recepción de la materia prima: En este paso se verifica la calidad de la leche que va a servir para la elaboración del queso, la leche cruda ha de cumplir ciertos requisitos en cuanto a calidad, disposición y aptitud para la fermentación y será sometida entre otras a las siguientes prácticas:

- Filtración (eliminación de impurezas).
- Eliminación de gases.
- Termización (opcional, para reducir el número de microorganismos).
- Enfriamiento a 4 °C (para inhibir el crecimiento microbiano).
- Almacenamiento (a baja temperatura, para conservar su calidad).
- Pasteurización: Según Santos (2000), la pasteurización es un proceso térmico que consiste en elevar la temperatura, su efecto es para eliminar los microorganismos patógenos presentes en la leche, pero sobre todo aquellos que mueren a 56 °C sin alterar las propiedades físicas y químicas de ésta (Galván, 2005).
- Enfriamiento de la leche: Galván (2005), indica que la temperatura de la leche debe estar entre los 32 y 38 °C. Con esta temperatura y la adición de cultivos, se puede obtener la maduración y posteriormente la coagulación de la leche. Durante la pasteurización y el enfriamiento, la leche sea agitada constantemente para eliminar los gases que generan mal olor (Pelayo, 2010).
- Adición del cuajo: Alcanzados los 38 °C, se agrega 10 ml de cuajo líquido por cada 100 litros de leche a lo largo de todo el recipiente. Se remueve la leche durante un tiempo hasta que se disuelva el cuajo y luego se deja en reposo para que se produzca el cuajado, lo cual toma de 20 a 30 minutos a una temperatura de 38-39 °C (Apango, 2005).
- Corte: En la cuajada se realizan cortes pequeños horizontales y vertical de esta forma facilitar la salida de la mayor cantidad de suero posible, para mejorar la salida del suero debe batirse

la cuajada durante 10 minutos y al finalizar este tiempo se deja reposar la masa durante 5 minutos. La acidez en este punto debe estar entre 11 y 12 °Dornic (Pelayo, 2010).

- Desuerado: En este paso se separa el suero dejándolo escurrir a través de un colador puesto en el desagüe del tanque o marmita donde se realizó el cuajado. Se debe separar entre el 70 y el 80% del suero. El suero se recoge en un recipiente y por lo general se destina para alimentación de cerdos (Santos, 2000).
- Moldeo: Este proceso proporciona la forma al queso, ayuda a que los granos de la cuajada se compacten, estos pueden ser de distintas formas. Los moldes, que pueden ser de acero inoxidable o de plástico PVC, cuadrados o redondos, se cubren con un lienzo y se llenan con la cuajada. Para luego hacer una pequeña presión al queso para compactarlo mejor. Este queso no se prensa, solamente se voltean los moldes tres veces a intervalos de 15 minutos, luego se deja reposar por 3 horas y luego se sacan los moldes y se guarda el queso en refrigeración, (Cenzano, 1992).
- Salado: Según Santos (2000), se adicionan de 400 a 500 gramos de sal fina por cada 100 litros de agua y se revuelve bien con una la cantidad de sal varía según el gusto y puede aplicarse en un rango de 0,75 a 2% del peso del queso.
- Prensado: Este proceso ayuda a que se produzca la expulsión final del suero y así el queso tenga una determinada textura, y se da la forma final al queso (Santos, 2000).
- Pesado: Se hace para llevar registros de rendimientos, es decir los kilogramos obtenidos por litro de leche que entraron al proceso y preparar las unidades para la venta, (Cenzano, 1992).
- Empaque: El empaque, se hace con material que no permita el paso de humedad. (Santos, 2000).
- Almacenado: Se debe almacenar en refrigeración, para impedir el crecimiento de microorganismos El almacenamiento no debe ser mayor de 5 -7 días, (Apango, 2005).

2.1.4. Antimicrobianos de origen vegetal

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas (Hernández, 2003).

El aceite esencial obtenido de las hojas del *R. officinalis* es considerado como un antimicrobiano natural que puede ser utilizado en la producción de nuevos agentes con actividad antimicrobiana

para la industria farmacéutica y alimentaria (Mouchid y Bourjilat, 2005). Su actividad contra algunas cepas patógenas. Se han realizado estudios in vitro con aceite esencial de *R. Officinalis* en los que se ha evaluado su actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. (Rota, Carramiñana, Burillo y Herrera (2004), además se evaluaron la actividad de *R. officinalis* contra *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes serovar*, y *Staphylococcus aureus*. Gutiérrez *et al.* (2008), Además usaron el aceite esencial de *R. officinalis* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Klancnik *et al.* (2009) evaluó su actividad contra bacterias Gram positivas (*Bacillus aureus* y *Staphylococcus spp*) y Gram negativas (*Campylobacter jejuni* y *Salmonella spp*). Lee, Gwon, Kim y Moon (2009) probaron el aceite esencial de *R. Officinalis* contra *S. typhimurium*, *Enterobacter sakazakii*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

En el estudio de Moreira *et al.* (2005) Se identificó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* contra varias cepas de *E. coli*, (Bozin, Mimica, Samojlik y Jovin, 2007) encontraron que el aceite esencial de *R. officinalis* presenta una importante actividad antibacteriana contra cepas de *E. coli*, *S. typhi*, *S. enteritidis* y *S. sonnei*, además de poseer una notable actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, y *Trichophyton rubrum*. Estudios previos informan que el extracto de hoja de *R. officinalis* presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans* y *B. cereus*; y también actividad antifúngica contra *Penicillium roqueforti* y *Botrytis cinerea* (Mouchid y Bourjilat, 2005).

Por otra parte, la mayoría de los estudios de actividad antimicrobiana del extracto etanólico y del aceite esencial de *R. Officinalis*, han utilizado modelos donde se compara su actividad contra la de los antibióticos convencionales lo cual afirma los investigadores Bozin y Mimica (2007). Este modelo no es extrapolable a aplicaciones de conservación de alimentos. Por esa razón es de especial importancia adelantar investigaciones que permitan valorar la actividad antimicrobiana específica del romero, comparándola con la de los conservantes aceptados por la legislación vigente en alimentos, y así, participar en la búsqueda de nuevos conservantes de alimentos de origen natural.

2.1.5. Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural.

Conner (1993), sugirió que la actividad antimicrobiana de los compuestos vegetales se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos los involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto activo cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular.

Según Nychas *et al.* (2001), en su estudio menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser de dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática, así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación.

2.1.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son definidos por la FDA. Como sustancias que pueden ser aplicadas a los alimentos con el objeto de preservarlos, ya que retrasan el deterioro, rancidez y cambios de coloración debido a la oxidación. Los antioxidantes pueden actuar en los alimentos por diferentes mecanismos: atrapar a radicales libres que inducen reacciones de iniciación de oxidación, (Gutiérrez y Morales 2004) inactivar iones metálicos, quitar las especies reactivas de oxígeno como radicales libres, romper la cadena de reacciones de iniciación y reducir los peróxidos para prevenir la formación de radicales libres (Eskin y Robinson, 2001).

Modo de acción de los antioxidantes.

Conner (1993), Los antioxidantes están presentes en varios productos alimentarios. Con el fin de precautelar la calidad de los alimentos ya que estos están expuestos a la luz, el aire, la temperatura y principalmente el tiempo factores que pueden descomponer y hacer que un alimento pierda sus características organolépticas propias, los antioxidantes ejercen un papel primordial garantizando que los comestibles contengan su gusto y su color, y logren consumirse a lo largo del tiempo. Su uso resulta fundamental para evadir la oxidación de las grasas y los productos que las tienen dentro, cuando los antioxidantes se agregan a la grasa o aceite, se retrasa el comienzo de las últimas etapas de la auto oxidación, cuando la ranciedad el avance de olores y sabores

repugnantes se hace visible, Otra funcionalidad importante es que algunas vitaminas y algunos aminoácidos se destruyen con simplicidad gracias a la exposición al aire, y los antioxidantes se usa para protegerlos.

Las primeras investigaciones sobre la actividad antioxidante de productos vegetales se dieron en la década de 1950, cuando Chipault *et al.* (1952) hicieron un estudio sobre 72 plantas, poniendo a prueba su capacidad antioxidante; el romero y salvia demostraron ser las plantas con mayor contenido de antioxidantes, además de ser más efectivas.

Se ha observado que la actividad antioxidante de aceite esencial de *R. Officinalis*, se debe particularmente a los ácidos caféico y rosmarínico, estos últimos poseen una doble función: como antioxidante y estimulante de la producción de prostaglandina E2 e inhibidor de la producción de leucotrienos B4 en leucocitos polimorfonucleares en el humano (Martínez, García, Ortega y Castro 2010).

2.1.7. El ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant power)

El ensayo FRAP por sus siglas en inglés (Ferric Reducing/Antioxidant. Power) también llamado poder de reducción antioxidante del ion férrico (Ferric ion reducing antioxidant power), es un ensayo de capacidad antioxidante que utiliza Trolox como estándar. El ensayo FRAP a menudo se utiliza para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, bebidas y suplementos alimenticios que contienen polifenoles (Cuvelier, 1994).

Es una prueba simple para determinar el poder antioxidante total, esta prueba es clave para evaluar los efectos de eliminación de radicales libres de *Diplazium esculentum* (Retz) Sw. Ensayo FRAP depende del complejo de tripiridiltriazina [Fe (III) -TPTZ] férrico a la tripiridiltriazina ferrosa [Fe (II) -TPTZ] por un reductor a bajo pH. Fe (II) -TPTZ tiene un color azul intenso y se puede monitorear a 593 nm. (Klancnik, Guzej, Kolar, Abramovic, Moz, 2009)

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. Localización

La presente investigación se realizó en la provincia de Chimborazo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), en los laboratorios de la Facultad de Salud Pública, escuela de Gastronomía en donde se realizó la fabricación de queso fresco, además, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias, escuela de Bioquímica en donde se ejecutaron las diferentes pruebas microbiológicas y de capacidad antioxidante.

3.1.2. Tipo de Investigación

La presente investigación con el título de “Evaluación del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en la conservación de queso fresco” es de tipo experimental en condiciones controladas, descriptiva y analítica.

3.1.3. Métodos de investigación

3.1.3.1. Extracción de aceite de *Rosmarinus officinalis* L

El material vegetal fue obtenido en los jardines del Ministerio de Agricultura y Ganadería MAG seleccionando hojas de *R. officinalis* en buen estado, se preparó del material vegetal las cuales fueron lavadas con agua potable y puestas a secar a temperatura ambiente por 48 horas, después de esto para la extracción del aceite esencial de *R. officinalis* se realizó en los laboratorios de la escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH. Para lo cual se tomó una cantidad de 950 g. de hojas *R. officinalis*, se extrajo el aceite esencial utilizando hidrodestilación clásica en un aparato de Clevenger modificado, en un proceso que duro alrededor de tres horas, se logró recoger aproximadamente 6,81 g. de aceite esencial el cual se almacenó en un recipiente de vidrio ámbar estéril protegido de la presencia de luz y a temperatura por debajo de 0 ° C.

3.1.3.2. Elaboración de queso fresco de vaca

El proceso de elaboración de queso fresco se realizó en la mañana utilizando leche obtenida del centro de acopio de la asociación de productores ASOPORCAB, ubicada en el cantón Penipe, parroquia la Candelaria, se recibió la leche a 4 °C, a la cual se le realizaron las diferentes pruebas básicas de calidad de leche cruda como: pH, estabilidad proteica, densidad relativa y antibióticos. Evidenciando que cumplía con los estándares de la norma INEN 09 (2012), se transportó inmediatamente en un bidón de acero inoxidable a los laboratorios de la Escuela de Gastronomía en donde se procedió a elaborar el queso fresco según los siguientes procedimientos:

- Filtración para la eliminación de impurezas
- Homogenización
- Pasteurización lenta o por sus siglas en inglés LTLT (Low temperature, long time) la cual conlleva elevar la temperatura alrededor de 61 a 64 °C por un tiempo aproximado de 30 minutos para eliminar posibles microorganismos patógenos, sin afectar las propiedades físicas y químicas de la leche cruda
- Se procedió a la adición de cloruro de calcio en una cantidad de 8 g por los 40 litros de leche utilizados
- La adición de Cuajo líquido comercial en cantidades recomendadas por el fabricante según la ficha técnica del producto, esto se lo realizó cuando la leche ha bajado su temperatura a 38 °C, removiéndolo lentamente para homogenizar.
- El corte se realizó dividiendo la cuajada a lo largo y ancho para ayudar a salir el suero, además se removió la cuajada por un tiempo de diez minutos, en ese momento se dividió en cuatro recipientes la cuajada los cuales recibieron las diferentes dosis, que se detallan a continuación: dosis A1: 0,05% de aceite esencial de *R. officinalis*; dosis A2: 0,10% de aceite esencial de *R. officinalis*; dosis A3: 0,15% de aceite esencial de *R. officinalis*, además, se elaboró queso fresco sin aceite de *R. officinalis* el cual será el testigo (T).
- El proceso de dar forma al queso se lo realizó en moldes pequeños de PVC redondos de 100 g, que permitió de cada tratamiento sacar muestras para su análisis individual; se obtuvieron un total de nueve quesos por tratamiento, incluido las repeticiones, con un total de 36 quesos de 100 g, incluido el control. Los moldes fueron cubiertos con un fino lienzo estéril y llenados de cuajada para luego realizar una pequeña presión al queso con lo que se esperaba una mejor compactación. En el presente ensayo no se prensó el queso, solo se realizaron

volteos cada 15 minutos por tres ocasiones, se dejó reposar por un tiempo de tres horas para su estabilización.

- En el proceso de salado se adicionó 250 g de cloruro de sodio (sal común) en 500 litros de agua, revolviéndolo para homogenizar la disolución; el queso se sumergió por alrededor de tres horas, la formulación total del queso fresco se puede evidenciar en la tabla 2, para mejor comprensión.
- Por último, se realizó un prensado adicional que sirvió para eliminar restos de suero, se concluyó con el empaquetado al vacío y se señaló cada tratamiento y repetición tal como se evidencia en la tabla 3, lo cual permitió evitar posibles confusiones.
- El queso fresco se conservó en refrigeración a una temperatura que oscilaba entre 4 y 6 °C.

Tabla 2 Formulación para el queso fresco

Formulación	0 %	0,05 %	0,10 %	0,15%
Leche (L)	10	10	10	10
Cuajo	0,66mL/100L	0,66mL/100L	0,66mL/100L	0,66mL/100L
Sal (%)	1,5	1,5	1,5	1,5
Calcio (g/L)	2g /100L	2g /100L	2g /100L	2g /100L
Aceite de romero (%)	0	0,05	0,10	0,15

Fuente: Ramiro Jaramillo

Tabla 3 Diseño estructural del ensayo

Variable dependiente	Variable independiente 1	Código	Numero de Repeticiones	Variable independiente 2	Código	Código x tratamiento
Queso fresco	Testigo	T	R1	1 DÍA	B1	TR1B1
				8 DÍAS	B2	TR1B2
				16 DÍAS	B3	TR1B3
			R2	1 DÍA	B1	TR2B1
				8 DÍAS	B2	TR2B2
				16 DÍAS	B3	TR2B3
			R3	1 DÍA	B1	TR3B1
				8 DÍAS	B2	TR3B2
				16 DÍAS	B3	TR3B3
	Dosis de romero 0,05%	A1	R1	1 DÍA	B1	A1R1B1
				8 DÍAS	B2	A1R1B2
				16 DÍAS	B3	A1R1B3
			R2	1 DÍA	B1	A1R2B1
				8 DÍAS	B2	A1R2B2
				16 DÍAS	B3	A1R2B3
			R3	1 DÍA	B1	A1R3B1
				8 DÍAS	B2	A1R3B2
				16 DÍAS	B3	A1R3B3
	Dosis de romero 0,10%	A2	R1	1 DÍA	B1	A2R1B1
				8 DÍAS	B2	A2R1B2
				16 DÍAS	B3	A2R1B3
			R2	1 DÍA	B1	A2R2B1
				8 DÍAS	B2	A2R2B2
				16 DÍAS	B3	A2R2B3
			R3	1 DÍA	B1	A2R3B1
				8 DÍAS	B2	A2R3B2
				16 DÍAS	B3	A2R3B3
Dosis de romero 0,15%	A3	R1	1 DÍA	B1	A3R1B1	
			8 DÍAS	B2	A3R1B2	
			16 DÍAS	B3	A3R1B3	
		R2	1 DÍA	B1	A3R2B1	
			8 DÍAS	B2	A3R2B2	
			16 DÍAS	B3	A3R2B3	
		R3	1 DÍA	B1	A3R3B1	
			8 DÍAS	B2	A3R3B2	
			16 DÍAS	B4	A3R3B4	

Fuente: Ramiro Jaramillo

3.1.3.3. Pruebas microbiológicas.

Según el diseño estructural del ensayo se tomaron muestras de queso fresco el primer día de elaboración, a los 8 días y a los 16 días, para realizar análisis microbiológicos al queso fresco. Los análisis fueron realizados en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. Cada unidad experimental de 100 gramos de queso fresco se trituró, cuarteó y se tomó una muestra de 10 g que se mezcló con 90 ml de agua peptonada al 0,1 %, esto se realizó en cajas Petri previamente esterilizadas en una autoclave. A partir de las mencionadas muestras se prepararon diluciones y se sembraron a profundidad en Agar Baird Parker y se incubó por 24 horas a 35° C, luego se procedió a realizar el conteo de *Staphylococcus aureus* según procedimientos de la APHA (Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Para determinar el número de *S. aureus* presentes en 1,0 g de queso fresco se consideró el número total de colonias sospechosas y se caracterizó en el agar Baird Parker y el número de colonias que resultaron positivas en las pruebas bioquímicas efectuadas.

Para la presencia de *E. coli* y *Coliformes* se utilizaron las placas 3M™ Petrifilm™ para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

- Se etiquetaron la placa y se ubicaron la placa en un lugar liso y a nivel.
- En condiciones asépticas y guardando las debidas precauciones se levantó la lámina semitransparente superior y se colocó 1 ml de la disolución con la muestra a analizar sobre el centro de la cuadrícula, se cerró la placa trasparente y se presionó suavemente para la distribución sobre el inóculo del área.
- Por un minuto se esperó para que se solidifique el gel.
- Se procedió a la incubación a una temperatura constante de 37 grados Celsius por 24 a 48 horas.
- Trascurrido el tiempo se procedió a realizar el conteo tal como indican las guías de interpretación de las placas 3M™ Petrifilm (2003).
- Se consideraron coliformes aquellas colonias de color rojo y de color azul-violeta que estaban acompañadas de presencia de burbujas de gas, contando como *E. coli* las de color azul-violeta.
- Las colonias se contaron dentro de las 4 horas siguientes a la finalización del periodo de incubación. Se seleccionaron las placas en las cuales se desarrollaron entre 30/300 colonias para los medios no selectivos y entre 15/150 para los medios selectivos. Los

recuentos obtenidos se expresaron como unidades formadoras de colonias (ufc) por g de masa o superficie, respectivamente.

3.1.3.4. Ensayo FRAP

Esta prueba se realizó para medir la capacidad antioxidante del queso fresco con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. para lo cual se pusieron a reaccionar 25 µl de muestra diluida (100 µL de emulsión / 1mL) en etanol al 96 %, 375 µl de agua destilada y 3 ml del reactivo de FRAP. La mezcla de reacción se incubó luego a 37 ° C por un tiempo de 10 min en ausencia de luz y se registró la absorbancia a 595 nm, usando un espectrofotómetro, contra disolución de blanco para el cual se utilizó 400 µl de agua destilada y 3 ml reactivo de FRAP. La curva patrón se preparó a partir de concentraciones conocidas de Trolox. Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron como µg equivalentes Trolox por ml de emulsión.

3.1.3.5. Tratamiento de Datos

Para el estudio se realizaron tres tratamientos más un testigo, de cada tratamiento incluido el testigo se ejecutaron tres repeticiones de cada prueba realizada, los datos obtenidos fueron modelados bajo el análisis de la varianza ANOVA por sus siglas en idioma inglés, “analysis of variance”, además, para probar todas las diferencias entre medias de los tratamientos se realizó la prueba de Tukey, todo esto en el software de análisis estadístico Infostat.

3.1.4. Recursos humanos y materiales

3.1.4.1. Recursos Humanos

- Maestrante Ing. Ramiro Jaramillo Bayas en el desarrollo del proyecto de titulación.
- Personal de laboratorio de la escuela de Gastronomía y de la escuela de Bioquímica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para la producción de queso fresco y los análisis Microbiológicos y de capacidad oxidativa del queso fresco de vaca con aceite esencial de *R. officinalis*.

3.1.4.2. Recursos Materiales

a. Materiales

- Leche Cruda.
- Equipo de protección personal: mandil, cofia, cubre bocas, guantes, botas.
- Material vegetal hojas de *R. officinalis*
- Mesas de Acero Inoxidable.
- Termómetro.
- Coolers
- Gavetas Plásticas.
- Lira.
- Paleta.
- Moldes para queso.
- Perchas.
- Cernidores.
- Mallas de Plásticos.
- Lienzo Blanco de tela.
- Escobas.
- Cepillos, vileda.
- Jabón germicida y desinfectante.
- Fundas de Polietile
- Basureros.
- Equipo de protección para el personal.
- Vaso de precipitación.
- Pipeta 5 y 10ml.
- Algodón.
- Placas pretrifilm.
- Cápsulas de porcelana.
- Pinza de cápsula.
- Probeta.

- Soporte y pinzas.
- Papel de aluminio.
- Papel filtro.
- Balón de digestión Kjeldhal.
- Vaso de precipitación de 50 ml
- Bureta de 25 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Soporte y pinza de bureta.
- Vasos desechables.
- Platos desechables.
- Cuchillos.
- Palillos.
- Papel desechable.
- Vasos de precipitación
- Frascos de color ámbar de 10 ml
- Matraces de 250 ml
- Matraces de 125ml
- Pera de Decantación.
- Refrigerante de bolas de vidrio
- Matraces cónicos de 50 y 100ml
- Buretas de 25 ml
- Embudo pequeño.
- Pipetas.
- Varillas.
- Gotero.
- Tubos de ensayo.
- Pinza sujetadora.
- Soporte universal.
- Tapón de goma.
- Termómetro digital 0 – 100° C

b. Equipos

- Marmita.
- Prensa.
- Tina de acero inoxidable.
- Balanza.
- Incubadora.
- Estufa de aire caliente y al vacío.
- pH metro.
- Crisol.
- Desecador.
- Reverberos.
- Moli
- Equipo de DeanStarck.
- Mufla.
- Sorbona o campana de gases.
- Equipo de Soxhlet.
- Digestor y destilador de Microkjeldhal.
- Sorbona.
- Espectrofotómetro.
- Extractor adecuado para la generación de vapor de 5 L de capacidad.
- Separador de vidrio adaptado para flujo continuo de extracción aceite esencial.
- Refractómetro ABBE AR12.
- Balanza de precisión Sensibilidad 0,001 g.

c. Reactivos

- Disolución Buffer de pH 7.
- Metanol 95%
- Hidróxido de Sodio.
- Agua destilada.
- Fenolftaleína.
- Alcohol.

- Cloro.
- Cuajo comercial.
- Hidróxido de potasio (KOH) 0.5 N
- Tiosulfato de sodio (0,1 y 0,01 N)
- Disolución saturada de yoduro de potasio (KI)
- Ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N
- Solución de ácido acético-cloroformo (60:40)
- Fenolftaleína 1%
- Almidón.
- Agua destilada.
- El reactivo FRAP.
- Disolución TROLOX.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del poder antioxidante

El estrés oxidativo surge en los compuestos biológicamente activos después de estar expuestos al agua, luz y temperaturas en tiempos variables por lo cual el queso fresco es un producto con alta tasa de estrés oxidativo ya que genera con facilidad radicales libres. La actividad antioxidante por el método FRAP, dependiendo de la dosis de aceite esencial de *R. officinalis* se puede evidenciar en la tabla 4.

Tabla 4 Resultados de análisis FRAP en los diferentes tratamientos

Código x tratamiento	Código x tratamiento	$\mu\text{m Eq-Trolox/mL}$
Testigo	TR1B1	231
	TR1B2	186
	TR1B3	164
	TR2B1	242
	TR2B2	204
	TR2B3	184
	TR3B1	239
	TR3B2	187
	TR3B3	161
Dosis de romero 0,05%	A1R1B1	236
	A1R1B2	204
	A1R1B3	176
	A1R2B1	248
	A1R2B2	221
	A1R2B3	206
	A1R3B1	229
	A1R3B2	198
	A1R3B3	186
Dosis de romero 0,10%	A2R1B1	316
	A2R1B2	296
	A2R1B3	276
	A2R2B1	328
	A2R2B2	304
	A2R2B3	291
	A2R3B1	291
	A2R3B2	271
	A2R3B3	269
Dosis de romero 0,15%	A3R1B1	377
	A3R1B2	353
	A3R1B3	335
	A3R2B1	394
	A3R2B2	378
	A3R2B3	346
	A3R3B1	351
	A3R3B2	330
	A3R3B4	318

Fuente: Ramiro Jaramillo

Los resultados obtenidos de la prueba FRAP fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA comenzado con los resultados del primer día de elaboración del queso fresco tal como lo muestra la tabla 5 obtenida al ingresar los datos obtenidos en programa de análisis estadístico INFOSTAT.

Tabla 5 Análisis de varianza poder antioxidante FRAP evaluación 1 día

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	p_valor
Modelo	39113,67	3	13037,89	54,9	<0,0001
Tratamientos	39113,67	3	13037,89	54,9	<0,0001
Error	1900	8	237,5		
Total	41013,67	11			
Coefficiente de variación:	5,31				

Fuente: Ramiro Jaramillo

El análisis de varianza arroja que tiene un valor de $p=0,001$, lo que indica que existen diferencia estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos y realizando la prueba estadística para comprobar la diferencia de las medias, entre tratamientos, el método usado fue la prueba de Tukey donde se demuestra que entre los tratamientos con dosis de *R. officinalis* de 0,10 y 0,15 % los cuales tienen diferencias significativas entre ellos tal como lo podemos apreciar en la tabla 6, en el que se ve rangos múltiples donde sobresale la dosis de 0.15% con un rango de C, además que su nivel de poder anti oxidantes esta muy por encima a los del testigo y al tratamiento con la dosis de 0,05% de *R. officinalis*.

Tabla 6 Prueba de Tukey evaluación antioxidante: primer día

Código	Medias	n	E.E.	Significancias
Testigo	237,33	3	8,9	A
Dosis de romero 0,05%	237,67	3	8,9	A
Dosis de romero 0,10%	311,67	3	8,9	B
Dosis de romero 0,15%	374	3	8,9	C

Fuente: Ramiro Jaramillo

Con esto se puede definir que al primer día de elaborado el queso fresco la dosis que mejor resultado de poder antioxidante según el análisis FRAP es el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* al 0,15%, tal como lo podemos apreciar en el grafico1 en el que la media del

tratamiento es de 374,0 $\mu\text{m Eq-Trolox/ml}$ con un rango de C, lo cual conllevó a pensar que el aceite esencial de *R. officinalis* tiene un alto poder antioxidante a mayor dosis desde el primer día que tomó contacto con el queso fresco.

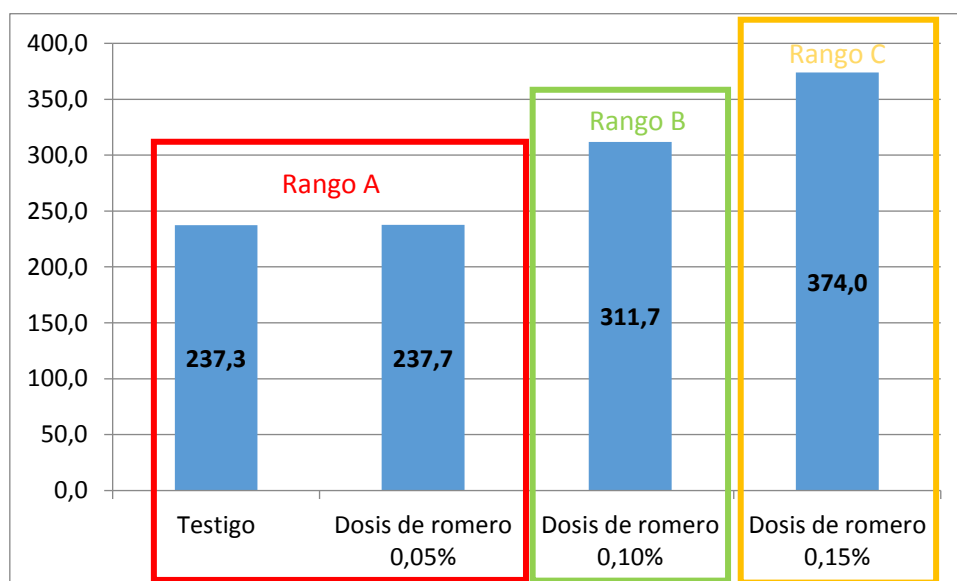


FIGURA 1 EVALUACIÓN PODER ANTIOXIDANTE: PRIMER DÍA

La prueba de análisis antioxidante FRAP se realizó también después de ocho días de elaboración del queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* los datos según el análisis de varianza a los ocho días se mantiene la tendencia con un valor de $p < 0,0001$ como se observa en la tabla 7 en la que se ve que existen diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 7 Análisis de varianza poder antioxidante (FRAP) evaluación ocho días

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	p_valor
Modelo	51021,33	3	17007,11	60,88	<0,0001
Tratamientos	51021,33	3	17007,11	60,88	<0,0001
Error	2234,67	8	279,33		
Total	53256	11			
Coficiente de variación:	6,4				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Además, la prueba de Tukey realizada con los resultados del análisis FRAP a los ocho días, indicada en la tabla 8 se puede observar que la diferencia se marca más entre los rangos múltiples de los tratamientos con dosis de *R. officinalis* de 0,10 y 0,15 %, obteniendo entre estos dos tratamiento diferencias significativas.

Tabla 8 Prueba de Tukey para la evaluación de actividad antioxidante por ocho días

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Testigo	192,33	3	9,65	A
Dosis de romero 0,05%	207,67	3	9,65	A
Dosis de romero 0,10%	290,33	3	9,65	B
Dosis de romero 0,15%	353,67	3	9,65	C

Fuente: Ramiro Jaramillo

Entre los tratamientos con mayor dosis de aceite esencial de *R. officinalis* existen diferencias significativas, es decir, se puede observar que los resultados de las pruebas FRAP que la dosis de *R. officinalis* al 0,15 % es la que registró un mayor contenido fenoles antioxidantes con un rango de C con una media de 353,67 μm Eq-Trolox/ml, evidenciándose esto de mejor forma en la Figura 2, permitiendo con ello alargar la vida útil y evitando una oxidación como como no lo hace el testigo y el tratamiento con aceite esencial de *R. officinalis* con dosis menor.

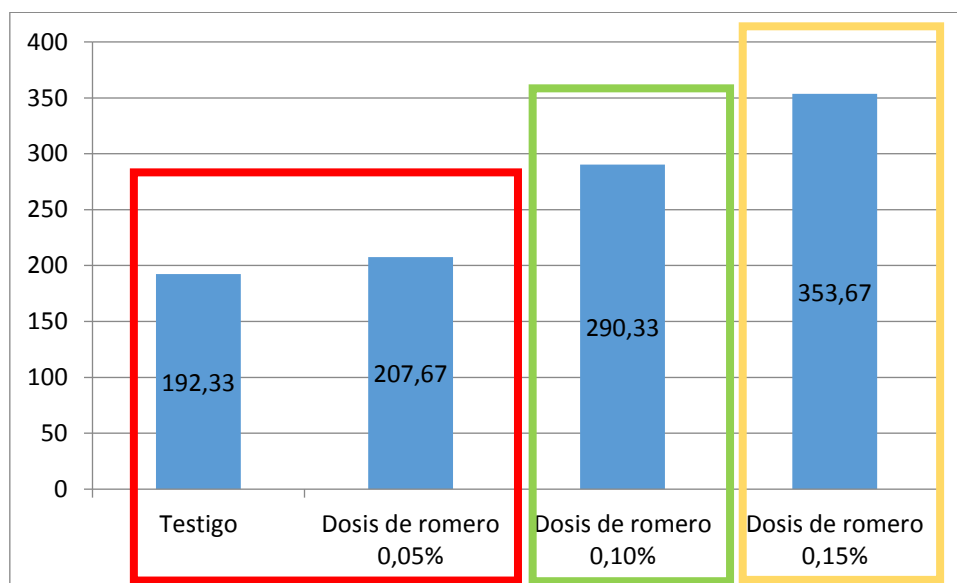


FIGURA 2. EVALUACIÓN PODER ANTIOXIDANTE A LOS OCHO DÍAS.

Por último, en la Prueba FRAP a los 16 días de elaborado el producto y bajo condiciones controladas se observó en la tabla 6 del análisis de Varianza que la tendencia se mantiene obteniendo un mero de $p < 0,0001$, lo que indicó que existían diferencias altamente significativas entre tratamientos.

Tabla 9 Análisis de varianza poder antioxidante FRAP evaluación 16 días

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	p_valor
Modelo	52888,67	3	17629,56	98,63	<0,0001
Tratamientos	52888,67	3	17629,56	98,63	<0,0001
Error	1430	8	178,75		
Total	54318,67	11			
Coefficiente de variación:	5,51				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Al realizar un análisis mucho más detallado mediante el método de Tukey cuyos resultados se reflejan en la tabla 8 se evidencia que los resultados que se dan entre el testigo con una media de 169,67 μm Eq-Trolox/mL y el tratamiento con dosis de aceite esencial de *R. officinalis* de 0,05% para el que se obtuvo una media de 189,33 μm Eq-Trolox/mL no fueron significativos entre las dos repeticiones.

Tabla 10 Prueba de Tukey evaluación antioxidante 16 días

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Testigo	169,67	3	7,72	A
Dosis de romero 0,05%	189,33	3	7,72	A
Dosis de romero 0,10%	278,67	3	7,72	B
Dosis de romero 0,15%	333	3	7,72	C

Fuente: Ramiro Jaramillo

Pero entre estos y los otros dos tratamientos con dosis mayores de *R. officinalis* si existieron diferencias significativas con rangos B y C, entre los tratamientos con dosis de aceite esencial de *R. officinalis* de 0,10% con una media de 278,67 μm Eq-Trolox/ml y la dosis más elevada de 0,15% de aceite esencial de *R. officinalis* con una media de 333 μm Eq-Trolox/ml como lo podemos apreciar en la figura 3, existieron diferencias significativas demostrando que al utilizar dosis más elevada de aceite esencial de *R. officinalis* existe un mejor control del oxidativo del queso fresco de leche de vaca.

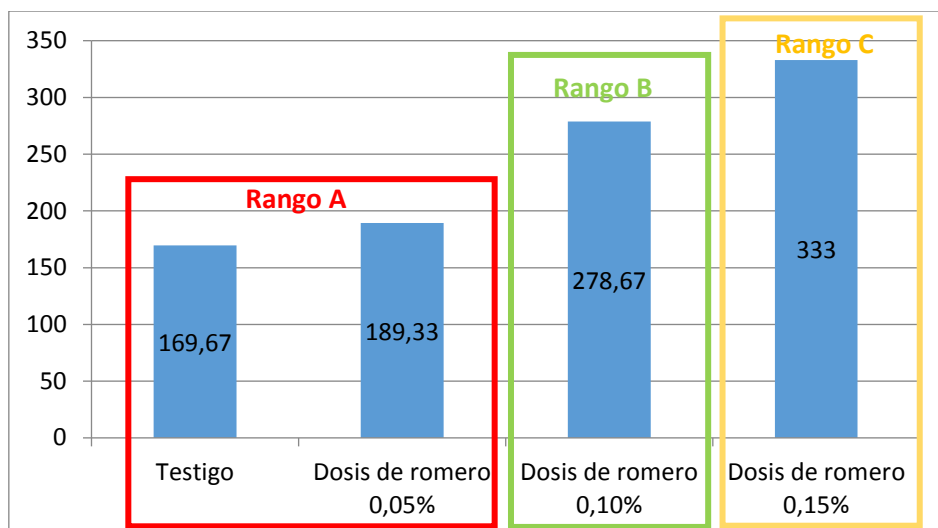


FIGURA 3. EVALUACIÓN PODER ANTIOXIDANTE A LOS DIECISÉIS DÍAS.

Esto también lo menciona Ortiz (2016), en su estudio de aprovechamiento de la actividad de extractos y aceites esenciales de romero, tomillo y menta como aditivo funcional en aceites esenciales concluye que el *R. officinalis* posee una alta actividad antioxidante y según los parámetros obtenidos en su estudio de concentración de dienos conjugados (moléculas con dobles enlaces adyacentes) actúa principalmente sobre los productos primarios de oxidación, confirmando la naturaleza de antioxidante primario que se les atribuye a todos los aceites esenciales. En la bibliografía todavía no existe suficiente información sobre la capacidad antioxidante del aceite esencial de romero derivada por medio del método de ABTS; sin embargo, al comparar el resultado obtenido con la capacidad antioxidante reportada por Lin *et al.* (2007) para el aceite esencial de la raíz de “Dong Quai”, también llamada Angélica china o ginseng hembra (*Angelicae sinensis*), siendo este valor de 0,98 mg Trolox/100 ml aceite esencial, se puede observar que la capacidad antioxidante del aceite esencial de *R. officinalis* es muy superior a la del aceite esencial de “Dong Quai”. Esta diferencia se puede adjudicar, principalmente, a la distinta composición química entre ambos aceites esenciales.

En el estudio realizado por Hala, Ebtisan Ghita, Sanaa, (2010) en el que se fabricó queso con aceite esencial de *R. officinalis* como antioxidante natural indica que el contenido de humedad del queso suave resultante suplementado con diferentes concentraciones de extracto de romero durante el almacenamiento en frío siendo evidente que el aumento de la concentración de extracto aumentó significativamente el contenido de humedad para todas las muestras de queso y se observó esta tendencia a lo largo de periodos de almacenamiento como resultado de la retención de las proteínas del suero en la textura del queso, además de que se podía observar en las evaluaciones FRAP que el queso tenía un menor grado de oxidación, por lo cual aumentaba

su vida útil en percha.

Pérez, Calderón y Croci (2007) en su estudio de los compuestos fenólicos parecen no ser los únicos compuestos responsables de la actividad antioxidante del aceite esencial de *R. officinalis*. Además, se reveló que los aceites esenciales de *R. officinalis* podrían actuar como donantes de hidrógeno o de electrones y reaccionar con los radicales libres convirtiéndose en productos más estables y de esta manera lograr la terminación de reacciones en cadena de radicales. Todo esto lleva a pensar que el aceite esencial de *R. officinalis* en dosis mayores como la de 0,15% es ideal para la prevención oxidativa de queso fresco de leche de vaca.

En contraposición, un estudio de Hala, *et. al.* (2010) señala que según investigaciones preliminares un enfoque de múltiples métodos de análisis de antioxidantes es necesario en la evaluación de la conservación de los alimentos, y que métodos rápidos y reproducibles deben usarse siempre que sean confiables como es el caso del método FRAP y el DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) con lo que se corrobora los resultados obtenidos.

Análisis microbiológico

El queso fresco de vaca es un medio ideal para el desarrollo de bacterias si no se ha guardado el debido proceso higiénico que va desde la obtención de la materia prima, las condiciones higiénicas en el que se lleva a cabo, el tiempo y temperatura de almacenamiento del producto, la limpieza de equipos utensilios usados durante el procesamiento y su almacenamiento, consistes de esta realidad durante la elaboración de este estudio se guardaron las más rigurosas buenas prácticas de higiene asegurándonos desde el principio obtener materia prima de la más alta calidad y durante el procesamiento resguardando la no contaminación del producto para no influir en los resultados, es por eso en la tabla 9 se puede evidenciar los resultados obtenidos al someter queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* en diferentes dosis en las pruebas realizadas en las que se ejecutó conteos de bacterias como *Escherichia coli*, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 11 Resultados de análisis microbiológicos en los diferentes tratamientos

Código x tratamiento	coliformes totales	<i>E. coli.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	(ufc/g)	(ufc/g)	(ufc/g)
TR1B1	1,1*10	ausencia	1,5*10
TR1B2	2,5*10	ausencia	1,1*10 ²
TR1B3	3,5*10 ²	ausencia	2,7*10 ²
TR2B1	1,4*10	ausencia	1,1*10
TR2B2	2,1*10	ausencia	2,2*10 ²
TR2B3	1,1*10 ²	ausencia	1,7*10 ³
TR3B1	1,1*10	ausencia	2,1*10
TR3B2	1,1*10	ausencia	2,1*10 ²
TR3B3	3,5*10 ²	ausencia	2,2*10 ²
A1R1B1	2,1*10	ausencia	1,1*10
A1R1B2	3,1*10	ausencia	1,5*10
A1R1B3	1,1*10 ²	ausencia	2,1*10 ²
A1R2B1	1,1*10	ausencia	2,1*10
A1R2B2	2,1*10	ausencia	2,5*10
A1R2B3	1,1*10 ²	ausencia	1,1*10 ²
A1R3B1	1,1*10	ausencia	3,1*10
A1R3B2	2,1*10	ausencia	5,1*10
A1R3B3	1,2*10 ²	ausencia	1,1*10 ²
A2R1B1	2,3*10	ausencia	1,1*10
A2R1B2	2,2*10 ²	ausencia	2,4*10
A2R1B3	3,2*10 ²	ausencia	3,7*10
A2R2B1	1,3*10	ausencia	3,1*10
A2R2B2	2,5*10	ausencia	5,1*10
A2R2B3	4,1*10	ausencia	1,1*10 ²
A2R3B1	1,1*10	ausencia	5,1*10
A2R3B2	2,1*10	ausencia	1,1*10 ²
A2R3B3	2,5*10	ausencia	2,7*10 ²
A3R1B1	1,5*10	ausencia	1,2*10
A3R1B2	2,2*10	ausencia	2,1*10
A3R1B3	1,1*10 ²	ausencia	2,9*10
A3R2B1	1,1*10	ausencia	1,1*10
A3R2B2	2,2*10	ausencia	1,2*10
A3R2B3	3,1*10 ²	ausencia	2,1*10
A3R3B1	1,1*10	ausencia	1,2*10
A3R3B2	2,1*10	ausencia	2,1*10 ²
A3R3B4	3,7*10	ausencia	2,9*10 ²

Fuente: Ramiro Jaramillo

Como se evidenció en la tabla 9 en el conteo de UFC (Unidades formadoras de colonias) de *E. coli* existió ausencia de dicha bacteria, ya que desde la recolección de la materia prima hasta el proceso de elaboración de queso se manejó buenas prácticas de higiene logrando bajar al mínimo la presencia de la bacteria *E. coli*, esto lo respaldan autores como Cristóbal y Maurtica (2003) que afirmaron que la presencia de *E. coli* dentro del queso fresco se da principalmente por la condiciones deficientes de manufactura, y si es que se reasegurara las mínimas

condiciones y capacitación de los manipuladores, el uso de agua segura, etc., se podría obtener alimentos de alta calidad.

Además esto lo confirma Vázquez, Salhuana, Jiménez y Leidyn (2017), que en su estudio realizado comparaciones a diferentes empresas que en un grupo majeban buenas prácticas de higiene y otro grupo no lo hacían, en las primeras no se encontró queso fresco con presencias de *E. coli*, pero en las que había controles sanitarios deficientes y no se manejan buenas prácticas de higiene se encontró porcentajes de *E. coli* que oscilan entre el 20% al 100%, esto los autores afirman es por falta de higiene durante el periodo de elaboración o manipulación del queso fresco provoca los altos índices de contaminación con dicha bacteria.

Igualmente, la Norma INEN 2829 (2013), señala que un queso fresco para ser identificado como producto de buena calidad debe tener niveles menores a 10 UFC en un gramo, por lo cual el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* en sus diferentes tratamientos y el control realizados en el presente estudio cumple con la normativa ecuatoriana de calidad.

En lo que se refiere al conteo de coliformes totales, se puede evidenciar que al primer día de elaborado el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* el análisis de varianza ANOVA que fue obtenido a través del programa estadístico INFOSTAT arroja los siguientes resultados evidenciados en la tabla 10 donde se observa que obtenemos valores promedios de $p= 5785$, lo cual indica que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos al primer día de elaborado.

Tabla 12 Análisis de varianza de coliformes totales presentes evaluación 1 día

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	P. valor
Modelo.	95,23	3	31,74	0,7	0,5785
Tratamientos	95,23	3	31,74	0,7	0,5785
Error	363,34	8	45,42		
Total	458,57	11			
Coficiente de variación:	56,47				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Al no obtener diferencias significativas se realizó la prueba estadística para comprobar si existe diferencia de las medias, entre tratamientos tal como lo vemos en la tabla 11, utilizando el método de Tukey.

Tabla 13 Prueba de Tukey evaluación coliformes totales 1 día

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Dosis de romero 0,05%	7,73	3	3,89	A
Testigo	12	3	3,89	A
Dosis de romero 0,15%	12,33	3	3,89	A
Dosis de romero 0,10%	15,67	3	3,89	A

Fuente: Ramiro Jaramillo

Esto implica que las condiciones de desarrollo de Coliformes totales fueron iguales para los tres tratamientos y en el testigo. En este sentido según Norma INEN 2829 (2013), para tener un queso de buena calidad el parámetro básico de presencia de *Enterobacterias* y bacterias coliformes totales es de 2×10^2 UFC/g. Para el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* los niveles promedios que estaban por debajo de lo indicado por la norma en los tres tratamientos más el testigo (tabla 9) para el primer día de elaboración. Este estudio de coliformes totales también lo realizaron Rodríguez, Borrás, Pulido, García, (2015) en el que sustenta que las coliformes totales son un importante indicador de contaminación que advierte de la posible presencia de otros microorganismos patógenos en el producto lácteo comercializado, siendo su presencia un potencial riesgo de sintomatología clínica para los consumidores de los mencionados productos

Con respecto al conteo de coliformes totales en el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* a los ocho días de elaborado se pudo observar que los mismos resultados se obtienen en el análisis de varianza ANOVA (tabla 12) ya que el análisis de varianza se tiene un valor de $p = 0,5964$, lo que indica que cuyo valor no es significativo entre tratamientos es decir no arroja diferencias sustanciales en el desarrollo de Coliformes totales en los diferentes tratamientos de queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis*

Tabla 14 Análisis de varianza de coliformes totales presentes evaluación 8 días

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	P_valor
Modelo	44,92	3	14,97	0,67	0,5964
Tratamientos	44,92	3	14,97	0,67	0,5964
Error	180	8	22,5		
Total	224,92	11			
Coefficiente de variación:	21,64				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Al no obtener diferencias significativas se realizó la prueba estadística para comprobar si existe diferencia entre las medias de los tratamientos tal como lo vemos en la tabla 13, utilizando el método de estadístico de Tukey.

Tabla 15 Prueba de Tukey evaluación coliformes totales 8 días

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Testigo	19	3	2,74	A
Dosis de romero 0,15%	21,67	3	2,74	A
Dosis de romero 0,10%	22,67	3	2,74	A
Dosis de romero 0,05%	24,33	3	2,74	A

Fuente: Ramiro Jaramillo

Como se puede evidenciar no existe diferencias entre las medias de los tratamientos por lo que el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* comparado con el queso fresco solo tuvieron presencia de coliformes totales que estuvieron por debajo de lo requerido por la Norma INEN 2829 (2013), lo cual indica que el aceite esencial de *R. officinalis* no detiene mayormente el desarrollo normal de las bacterias coliformes totales.

Estos resultados nos llevan a citar a Silva, Siqueira, Silva y Gil (2013), los cuales afirman que el aceite esencial de *R. officinalis* es un producto con que actúa débilmente contra las bacterias gram-negativas ya que su control es principalmente dirigido a las bacterias gram-positivas lo cual también afirma De acuerdo con Harris (2003), la estructura de la pared celular de las bacterias gram-negativas se compone sobre todo de un lipopolisacárido que bloquea la penetración de aceites hidrófobos y evita la acumulación de los aceites esenciales en la membrana de las células diana, que confiere una mayor resistencia a estas bacterias.

Pero cuando se realiza la prueba de Coliformes totales del queso fresco de vaca con aceite esencial de *R. officinalis* a los 16 días se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con un valor de $p=0,4783$ como se lo ve en la tabla 14 de análisis de varianza ANOVA.

Tabla 16 Análisis de varianza de coliformes totales presentes evaluación 16 días

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	P_valor
Modelo	45510,92	3	15170,31	0,91	0,4783
Tratamientos	45510,92	3	15170,31	0,91	0,4783
Error	133460	8	16682,5		
Total	178970,92	11			
Coefficiente de variación:	77,77				

Fuente: Ramiro Jaramillo

La prueba estadística para comprobar si existe diferencia entre las medias de los tratamientos tal se observa en la tabla 15, utilizando el método de estadístico de Tukey.

Tabla 17 Prueba de Tukey evaluación coliformes totales 16 días

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Dosis de romero 0,05%	113,33	3	74,57	A
Dosis de romero 0,10%	128,67	3	74,57	A
Dosis de romero 0,15%	152,33	3	74,57	A
Testigo	270	3	74,57	B

Fuente: Ramiro Jaramillo

Se puede observar que los tratamientos con dosis de *R. officinalis* al 0,05; 0,10 y 0,15% tienen conteos que estadísticamente son significativos con respecto al control que tiene poblaciones mucho mayores de Coliformes totales, y que los conteos de ufc/g. son mucho menores en el tratamiento con aceite esencial de *R. officinalis*. Analizando individualmente el testigo podemos afirmar que el producto después de los 16 días de ser procesado está por encima de la Norma INEN 2829 (2013), en lo que se refiere un queso de buena calidad pasando a ser un producto de nivel aceptable con una lectura media de Coliformes totales de $2,7 \times 10^2$, en correlación a este estudio Arguello, Lucero, Castillo, Escobar y Gallegos (2015), en un estudio de calidad de quesos realizado en la ciudad de Riobamba indican que los quesos frescos consumidos en la localidad tienen niveles que van por encima de las $4,7 \times 10^4$, lo que implica que el producto realizado tiene una mejor calidad que el producto comercial de la misma ciudad, pero con el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* el conteo de UFC de coliformes totales es menor en todos los tratamientos existiendo a los 16 días una diferencia con el testigo.

Por otro lado en lo que se refiere al conteo de *Staphylococcus aureus* se pudo evidenciar que al día uno de análisis de varianza ANOVA (tabla 16) no se observa diferencias significativas entre

los tratamientos ya que obtiene un valor de $p= 0,2645$, es decir, todos los tratamientos tienen las mismas características a nivel estadístico.

Tabla 18 Análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* presentes evaluación 1 día

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	p_valor
Modelo	630,33	3	210,11	1,6	0,2645
Tratamientos	630,33	3	210,11	1,6	0,2645
Error	1051,33	8	131,42		
Total	1681,67	11			
Coefficiente de variación:	57,8				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Al realizar la prueba estadística para comprobar si existe diferencia entre las medias entre los tratamientos tal como lo se observa en la tabla 17, utilizando el método de estadístico de Tukey se observa que no hay diferencia entre las medias del tratamiento.

Tabla 19 Prueba de Tukey, evaluación *Staphylococcus aureus* 1 día

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Dosis de romero 0,15%	11,67	3	6,62	A
Testigo	15,67	3	6,62	A
Dosis de romero 0,05%	21	3	6,62	A
Dosis de romero 0,10%	31	3	6,62	A

Fuente: Ramiro Jaramillo

Tomando en cuenta lo que dice la Norma INEN 2829 (2013), donde se señala que un queso es considerado de buena calidad si tiene menos de 10 UFC/g. dentro de sus resultados microbiológicos y si tiene menos de 10^2 UFC/g. es considerado un queso de nivel aceptable por lo cual en base a la Tabla. 6. Resultados de análisis microbiológicos en *Staphylococcus aureus* en los diferentes tratamientos se puede evidenciar todos los tratamientos se encuentran por debajo a lo solicitado en la norma nacional evidenciándose lo útil que es trabajar con buenas prácticas de higiene.

Evaluando la presencia de *Staphylococcus aureus* a los ocho días de elaborado el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* se puede observar que en el análisis de varianza ANOVA tabla 18 presenta diferencias significativas con valores de $p= 0.001$

Tabla 20 Análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* presentes evaluación 8 días

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	p_valor
Modelo	53860,92	3	17953,64	16	0,0010
Tratamientos	53860,92	3	17953,64	16	0,001
Error	8977,33	8			
Total	62838,25	11			
Coefficiente de variación:	52,14				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Al realizar la prueba de Tukey la cual se refleja en la tabla 19, se puede ver que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos principalmente entre los tratamientos de queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* y el testigo que no lo tiene.

Tabla 21 Prueba de Tukey evaluación *Staphylococcus aureus* 8 días

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Dosis de romero 0,15%	18	3	19,34	A
Dosis de romero 0,10%	28,67	3	19,34	A
Dosis de romero 0,05%	30,33	3	19,34	A
Testigo	180	3	19,34	B

Fuente: Ramiro Jaramillo

En conclusión se puede apreciar que entre los tratamientos evaluados con la presencia de *Staphylococcus aureus*, sobresalen los tratamientos de queso fresco con aceite de *R. officinalis* en las diferentes dosis comparada con el testigo, ya que tienen un mejor control de la bacteria analizada y no permiten el desarrollo de unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus aureus*, pero todavía no se observa diferencias significativas entre estos tres tratamientos durante los primeros ocho días. En relación a esto Silva, et, al. (2013) En la conclusión de su estudio que el aceite esencial de *R. officinalis* tiene un efecto inhibitorio contra diversas cepas de organismos patógenos como *S. aureus* que pueden usar al queso fresco como medio de cultivo y que puede ser utilizado para controlar estos microorganismos como conservante, pero su uso debe ir combinado con otras técnicas de conservación.

Por último en el análisis de varianza ANOVA a los 16 días tabla 20 se puede observar que no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos con el testigo es decir que ninguno sobresale estadísticamente sobre el resto por lo cual se obtiene un valor de $p=0.6419$ lo que

indica que no existió mayor control para *Staphylococcus aureus* con la adición de *R. officinalis* en queso fresco de leche de vaca.

Tabla 22 Análisis de varianza de *Staphylococcus aureus* presentes evaluación 16 días

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	p_valor
Modelo	19045,58	3	6348,53	0,58	0,6419
Tratamientos	19045,58	3	6348,53	0,58	0,6419
Error	86921,33	8	10865,17		
Total	105966,92	11			
Coefficiente de variación:	67,72				

Fuente: Ramiro Jaramillo

Al realizar la prueba de Tukey la cual se refleja en la tabla 21, se puede ver que no existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos obteniendo medias no significativas entre los tratamientos analizados

Tabla 23 Prueba de Tukey evaluación *Staphylococcus aureus* 16 días

Código	Medias	n	E.E.	Significancia
Dosis de romero 0,15%	113,33	3	60,18	A
Dosis de romero 0,10%	139	3	60,18	A
Dosis de romero 0,05%	143,33	3	60,18	A
Testigo	220	3	60,18	A

Fuente: Ramiro Jaramillo

En lo que se refiere la Norma INEN 2829 (2013), señala que los quesos que se encuentra con presencia inferiores a 10^2 UFC/g. es considerado un queso de nivel aceptable, pero el queso fresco con aceite esencial de *R. officinalis* obtiene valores por encima de 1.3×10^2 UFC/g. Estando por encima del valor necesario de la norma, además el testigo tiene un conteo de *Staphylococcus aureus* de 2.2×10^2 UFC/g. lo que implica que el control tuvo un nivel de infestación mucho más alto que el de los tratamientos con el aceite esencial este deficiente control lo sustenta también los investigadores Magua, Romero, Garro y Okulik (2006), las bacterias gram-negativas resultan ser más sensibles a los terpenoides presentes en el aceite esencial de *R. officinalis* esto es en base que los mecanismos de acción de dichos compuestos es la disrupción de la membrana celular de la bacteria desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, produciendo la muerte celular de la bacteria, en contraste las bacterias gram-

positivas tienen una estructura celular multicapa (red de mureina muy desarrollada y llega a tener más de cuarenta capas), por lo tanto Arguello, et, al (2015) menciona que es de suma importancia la aplicación de buenas prácticas de higiene a lo largo de la cadena de producción de los establecimiento de lácteos para asegurar la calidad alimentaria

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

El queso fresco de leche de vaca con aceite esencial de *R. officinalis* tuvo un efecto inhibitor sobre el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus* en las diferentes dosis de la investigación a los 8 días de elaboración, los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 0,15% de aceite esencial de *R. officinalis*. A mayor concentración del aceite esencial en el queso fresco menor fue el crecimiento de coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.

El aceite esencial de *R. officinalis* preservó al queso fresco del deterioro oxidativo y mantuvo más bajos los niveles de oxidación frente al tratamiento testigo, siendo el tratamiento con la dosis de 0,15% de aceite esencial de *R. officinalis* el que mejor resultado de actividad antioxidativa tuvo a lo largo del ensayo.

El efecto inhibitorio del aceite esencial de *R. officinalis* en las diferentes bacterias patógenas fue dependiente de la cantidad de días de conservación y de la carga microbiana inicial del microorganismo presente en el queso fresco.

RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones futuras encaminadas a estudiar en forma más profunda la de adición de los aceites esenciales para poder verificar el impacto sobre las propiedades mecánicas y funcionales de los quesos frescos, y asimismo sobre las características sensoriales del alimento tratado.

El desafío de la fabricación de alimentos es evitar la contaminación por parte de organismos patógenos en los lugares donde estos son elaborados y almacenados, para ello tienen que tener implementados rigurosos programas de salinización y limpieza, con lo cual se ayuda en gran manera a utilizar sustancias naturales de conservación como aceites, extractos, los cuales ayudan a preservar y mantener la calidad e inocuidad de los alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Attar A & H. Al-Rethea. (2017). Chemoprotective effect of omega-3 fatty acids on thioacetamide induced hepatic fibrosis in male rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4). Pp. 956-965.
2. Apango, A. (2005) *Elaboración de quesos*, México D.F: primera edición, Editorial Acribia,. p. 45-57.
3. Arguello P. Lucero O. Castillo G. Escobar S, Gallegos J. (2015). Calidad Microbiológica de los quesos frescos elaborados en zonas Rurales de Riobamba: Ecuador: *Revista Perspectiva*. P. 66
4. Asociación Española de Normalización y Certificación. (2006). Norma UNE 84306:2006. Aceite Esencial de Romero de España. España.
5. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*R. officinalis* and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agr Food Chem*. p. 7879 7885
6. Bracco, U., J. Loeliger & J.L. Viret. (1981). Production and use of natural antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society*, p.686
7. Cenzano, M. (2002). *Leche y Productos Lácteos*. Caracas Venezuela: 3ra ed. Edit. Morlanes. p. 86 – 92
8. Chipault, J.R., G.R. Mizuno, J.M. Hawkins & W.O. Lundberg. (1952). The antioxidant properties of spices in foods. *Food Research International*, p.46-55.
9. CODEX ESTÁNDAR 283. (1978). Norma general del codex para el queso. *Codex Alimentarius*. pp. 2 – 6.
10. Conner, D. (1993). *Naturally Occurring compounds, antimicrobials in foods*. New York
11. Cristobal, R. L, Maurtica, D.J. (2003) Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Revista Panamericana de Salud*. [Http://www.biología.edu.ar/bacterias/bacterias_relevantes](http://www.biología.edu.ar/bacterias/bacterias_relevantes).
12. Cuvelier, M.E., C. Berset & H. Richard. (1994). Separation of major antioxidants in sage by high performance liquid chromatography. *Sciences des Aliments*, p. 811-815.
13. De Rivera D. y C. Obón 1995. *Las plantas, las esencias y los perfumes*. Murcia España: Editora ayuntamiento de Murcia.p.78-79

14. Erkan N., E. Ayranci & E. Ayranci. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*R. officinalis*) extract (Blackseed (*Nigella Sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarínico acid and sesamol *Food chemistry*, vol. 110:76-82.
15. Fernández, O. y Ale, O. (2008). *Cultivo de Plantas Aromáticas y Medicinales de la Región de Tacna*. Ediciones. Escuela de Campo: FCAG/UNJBG-Tacna.
16. Fox, P.F. (1987). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. New York. EE.UU: Elsevier Applied Science.
17. Galvan, M (2005), *Proceso básico de la leche y el queso*, México: Editorial DGSCAUNAM,. p. 110-123.
18. García, C., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.
19. Glass, K.A., Prasad, B.B., Schlynter, J.H., Uljas, H.E., Farkye, N.Y. y Luchansky, J.B. (1995). Effects of acid type and alta 2341 on *Listeria monocytogenes* in a queso blanco type of cheese. *Journal of Food Protection*. 58(7): 737
20. Gutiérrez, J. y Morales, J. A. (2004). “Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito”. *Rev. Medicina Interna de México*. p20
21. Hala, Ebtisan Ghita, Sanaa, (2010) *Fabricación de queso con poca grasa UF-Soft complementado con extracto de romero (como antioxidante natural)*, El Cairo, Egipto: *Jornal of America Science* (10), p. 48
22. Hernández, P.L.C. (2003). *Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para E. coli y L. innocua*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Las Américas.
23. Harris, R. (2003). Sinergism in the essential oil world. *The International Journal of Aromatherapy*, v. 12, n. 4, p. 179-186.
24. Johonson, M y LAW, B. (2011). *The fundamentals of cheese technology*, Reino Unido: Wiley Blackwell,. p. 61- 85
25. Klancnik A, Guzej B, Kolar M H, Abramovic H Y Moz Ina S (2009) *In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations*. *J Food Protec.* p. 1744–1752
26. Kumar N & V. Balamuruga, (2015). *In vitro antioxidant activity.Total phenolic and total flavonoid contents of flower extract of calotropis gigantean*. *Reaserch Journal oh phytochemistry*, 9(3), 137-143.

27. Lee SY, Gwon SY, Kim SJ, Moon BK (2009). Inhibitory effect of commercial green tea and rosemary leaf powders on the growth of foodborne pathogens in laboratory media and oriental-style rice cakes. p. 1107-1111.
28. Lin, C. Y. y Chen, L. W. (2006). Emulsification characteristics of three and two phase emulsions prepared by the ultrasonic emulsification method. *Fuel Processing Technology*, 87:309-317.
29. Look de Ugaz, Olga. (1999) "Investigación Fotoquímica; Métodos en el estudio de Productos Naturales". Lima, Peru: Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial.
30. Madrid, A. (2003) *Curso de Industrias Lácteas*. Madrid-España: Editorial Mundo prensa AMB Ediciones.. pp. 12 – 25.
31. Magua F, Romero A, Garro O, Okulik N (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides,. Buenos Aires Argentina: Facultad de Agroindustrias, p. 88
32. Martinello, M. y Pramparo, M. (2005). Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. *Curitiba, Brazil: Technol.* 16(5):17-20
33. Martinez, M.S., L.P. Naranjo & N.R. Jose. (2004). Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *R. officinalis* en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
34. Medina, M. y Aragundi E. (2007) Determinación de costos de calidad en el proceso productivo del queso (tesis de grado) Escuela Superior Politécnica de Litoral. Guayaquil Ecuador. pp. 91.
35. Meyer, M.R. (2007). *Elaboración de Productos Lácteos*. México: Ed. Trillas.
36. Morales R. (2014). En flora ibérica. Plantas vasculares de la península ibérica e Islas Baleares. Real jardín botánico, Madrid. España: CSCIC, pp. 327-331.
37. Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Sci Technol* p. 565-570.
38. Mounchid K, Bourjilat F, Dersi N, Aboussaouira T, Rachida A, Tantaoui-Elaraki A, et al. The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus*
39. Norma INEN 2829 (2013) NORMA GENERAL PARA EL QUESO (CODEX STAN 283-1978, MOD).
40. Nychas G, Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. *Ital J Food Sci.* p. 65-75.

41. Ortiz Y. (2016) Aprovechamiento de la actividad de extractos y aceites esenciales de romero, tomillo y menta como aditivo funcional en aceites esenciales, Bogotá, Colombia: Tesis facultad de ciencia Agrarias p. 86
42. Pelayo Maite. (2010) Función de la corteza en el queso. Madrid España: Editorial Mundi Prensas. p. 39-42
43. Pérez. C.E, (2010). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
44. Pérez, MB; Calderón, NL y Croci, CA (2007). Mejora inducida por radiación de la actividad antioxidante en extractos de romero (*R. officinalis*), Química de los alimentos 104, pp. 585-592
45. Rota C, Carramiñana JJ, Burillo J, Herrera A. (2004) In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. J Food Prot. p. 1252,1256
46. Rodas, M. A. (2012). Análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor. Guatemala: p. 5
47. Rodríguez J. Borrás S. Pulido M. García D. (2015), Calidad Microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas del mercado de Tunja, Colombia. Revista cubana de higiene y epidemiología V. 53, p. 2
48. Sánchez M.(1980).Diccionario de plantas Agrícolas. Madrid, España: Ministerio de Agricultura. p.468.
49. Santos M. Armando (2000), Leche y sus Derivados, México: cuarta impresión. pp. 27. Silva D. Siqueira F. Silva E. y Gil A. (2013) Evaluation rosemary essential oil in the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Coalho cheese: Brazil. p.6-8
50. Souza L.C., MG. Goes., A.T.R. Del Fabro., L. Filho., C.B. Boeira & S.P. Jessie. (2012). Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice Q13. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, vol. 40:103-109.
51. Stojanovic, R. & M. Nesic. (2010). Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial rosemary essential oil (*R. officinalis*) Biologica Nyssana, p. 83-88.
52. Thorsen M. y K. Hildebrandt (2003). Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. Journal of Chromatography A, 995:119

53. Udayarajan C. (2007). Relating physicochemical characteristics of cheese to its functional performance. EE.UU. p. 83 – 84.
54. Vásquez V. Salhuana J. Jiménez D. y Leidyn M. (2018), Evaluación de la calidad Bacteriológica de quesos frescos en Cajamarca. Lima, Perú: Departamento académico UNALM. p. 48
55. Villena, E. (2002). Diccionarios amuletos y supersticiones. Monterrey, México: Editorial Obelisco p. 54