

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TEMA

“Microencapsulación de una mezcla de aceites esenciales de plantas aromáticas comestibles para mejorar la calidad microbiológica de quesos frescos”.

AUTOR:

ROBINSON VLADIMIR MONTESDEOCA ERAZO

DIRECTORES:

DR. LUIS RAMÓN BRAVO SÁNCHEZ

DR. YASIEL ARTEAGA CRESPO

PASTAZA-ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Robinson Vladimir Montesdeoca Erazo, con cédula de identidad 0804004554, declaro que las actividades realizadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación, que tiene como tema “**MICROENCAPSULACIÓN DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES PARA MEJORAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS FRESCOS**”, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además que me responsabilizo en forma legal y académicamente como el autor del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Robinson Vladimir Montesdeoca Erazo

CI. 0804004554

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, yo Luis Ramón Bravo Sánchez, con C.I: 175704145-2 y Yasiel Arteaga Crespo, con C.I: 175701625-6 Certificamos que el egresado Robinson Vladimir Montesdeoca Erazo, realizo el proyecto de investigación titulado: **“MICROENCAPSULACIÓN DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES PARA MEJORAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS FRESCOS”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial bajo nuestra supervisión.

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez
DIRECTOR DEL PROYECTO

Dr. Yasiel Arteaga Crespo
DIRECTOR DEL PROYECTO

INFORME DEL DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: “MICROENCAPSULACIÓN DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES PARA MEJORAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS FRESCOS”.

Autor (a): Robinson Vladimir Montesdeoca Erazo

Unidad de Titulación: Carrera Ingeniería Agroindustrial

Director del proyecto: PhD. Luis Bravo Sánchez, PhD. Yasiel Arteaga

Fecha: 04 de enero de 2019

Introducción y contexto de la investigación:

El principal motivo de estudio del presente tema de investigación es determinar si la microencapsulación de los aceites esenciales de tres especies comestibles, tiene el efecto deseado en un alimento que es de consumo masivo como lo es el queso fresco, que además es elaborado con leche de vaca y a veces no en las condiciones deseadas, por lo que podría haber presencia de agentes patógenos como bacterias y gérmenes indeseables en el alimento de consumo humano

Cumplimiento de objetivos:

Los objetivos trazados se cumplieron al 100 %

Principales resultados obtenidos:

Se extrajeron los aceites esenciales de las especias aromáticas comestibles *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) con rendimientos adecuados. Se empleó del “Spray dryer” con adición de goma arábiga y maltodextrina a los aceites esenciales para lograr una adecuada microencapsulación, con un rendimiento superior al 70 %, de las mezclas de los aceites esenciales para ser empleadas como aditivo alimentario en quesos. Se formularon quesos frescos con el empleo del material microencapsulado y se valoró la calidad microbiológica de los quesos elaborados, la cual fue adecuada pues no se observó crecimiento microbiano durante el período de estudio para los microorganismos patógenos *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella spp*

El estudiante Robinson Vladimir Montesdeoca Erazo ha mostrado durante el desarrollo de la investigación una elevada dedicación y un alto grado de independencia, sirviendo como guía de los principales elementos a desarrollar en la investigación.

Se destacó la actividad curricular por su rendimiento académico, mostrado durante la investigación interés, motivación en el mismo, lo cual condujo a culminar de forma exitosa el trabajo, cumpliendo con las 400 horas establecidas en el Reglamento de Régimen Académico de la UEA.

La presentación final del trabajo cumple con las normas establecidas en la reglamentación institucional.

La redacción, ortografía, calidad de los gráficos, tablas y anexos es adecuada.

Sin otro particular.

Atentamente,

PhD. Luis Ramón Bravo Sánchez
C.I.: 175704145-2

PhD. Yasiel Arteaga Crespo
C.I.: 175701625-6

AVAL

Quien suscribe, Luis Ramon Bravo Sánchez, Docente de la Universidad Estatal Amazónica avala el Proyecto de investigación:

Título: “MICROENCAPCULACION DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMATICAS COMESTIBLES PARA MEJORAR LA CALIDAD DE QUESOS FRESCOS”

Autor (a): Robinson Vladimir Montesdeoca Erazo

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Investigación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de investigación para que sea presentado ante la Coordinación de la Carrera Ingeniería Agroindustrial como forma de titulación como Ingeniero en Ingeniería Agroindustrial, y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que a si conste, firmo la presente a los 28 días del mes de enero del 2019.

Atentamente,

Luis Ramon Bravo Sánchez
175704145-2

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación aprueba el proyecto de investigación **“MICROENCAPSULACIÓN DE UNA MEZCLA DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES PARA MEJORAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE QUESOS FRESCOS”**.

Dr. Matteo Radice PhD
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Paulina Echeverría MsC
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Ketty Yánez MBA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento a Dios, el guía de todo, nuestro proveedor de vida y esperanzas eternas, por permitirme llegar hasta donde estoy ahora y poder seguir disfrutando de la familia y de cada uno de los logros que voy a ir adquiriendo de la mano del señor con el pasar de los años.

A la Universidad Estatal Amazónica, Facultad de Ciencias de la Tierra, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, por haberme permitido continuar con mis estudios de Pregrado y continuar con un paso más hacia la vida profesional.

A mi mamá, por ser el pilar fundamental de mi vida, por ser la razón por la cual busco superarme y por haberme brindado la oportunidad de continuar con mis estudios Universitarios, por su gran esfuerzo, inmensa dedicación y entera confianza.

Al doctor PhD. Luis Bravo Sánchez, por su apoyo incondicional y muy valiosa ayuda, durante toda esta etapa que duro el proyecto de investigación, por su paciencia, y la oportunidad de trabajar con usted durante el desarrollo de este proyecto, al doctor PhD.

Yasiel Arteaga, de igual manera por sus indicaciones, el tiempo, las opiniones y su paciencia prestada en este tema de investigación.

A los maestros de la universidad, que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera; sin su ayuda y conocimientos nos estaría donde estoy ahora.

A Adriana Sánchez, por su valioso apoyo y consejos en este tiempo de estudios, gracias por ser incondicional en mi vida y por estar en los momentos difíciles, regalándome su amor y cariño.

A mis compañeros, (Gonzalo, Morelia, Aykel, Carmen, Valeria, JhonJairo y Denisse), por todas las experiencias compartidas y vividas en las aulas de clases, y en cada uno de los semestres, gracias por todos los momentos ameno que pasamos juntos como compañeros y amigos.

A la Ing. Paulina Echeverria MsC. Por su ayuda y apoyo en la elaboración del queso fresco; objetivo primordial en el tema de esta investigación.

A las Ingenieras Andrea Tapuy y Andrea Riofrio, por su ayuda brindada en los laboratorios de Química y Biología, del cual están a cargo de los mismos.

Al doctor PhD. Orestes López, tutor de la Universidad Técnica de Ambato, por su ayuda con la microencapsulación de la mezcla de los aceites esenciales; objetivo fundamental en el tema de esta investigación.

DEDICATORIA

Dedico de manera muy especial a DIOS por estar en todo momento de mi vida, por darme las fuerzas para continuar en lo adverso, por guiarme en el sendero de lo sensato y darme sabiduría en las situaciones difíciles.

A mi mamá por su confianza brindada, valor y su lucha día a día para que lograra escalar y conquistar este escalón más en la vida.

A mi familia por toda la desconfianza que tenían en mí de que yo no iba lograr conseguir este escalón en mi vida, y que gracias a eso tuve toda la motivación personal para estudiar y llegar hasta donde estoy, con mucho cariño también este proyecto de investigación es dedicado a ellos.

RESUMEN

Los quesos frescos, procedentes de la industria artesanal rural del Ecuador, enfrentan graves problemas de inocuidad y conservación, resultado de la pobre aplicación de buenas prácticas de manufactura durante el proceso de producción y almacenamiento del queso. El presente estudio procura brindar una alternativa de conservación del queso, mediante el uso de una mezcla de aceites esenciales microencapsulados, como agente antimicrobiano. Los aceites esenciales, se extrajeron de las especias aromáticas comestibles con rendimientos adecuados de *Coriandrum sativum* L. (cilantro) 0,2247 %, *Apium graveolens* L. (apio) 0,1268 % y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) 0,3298 %. Se empleó la tecnología “Spray dryer” con adición de goma arábiga y maltodextrina a los aceites esenciales para lograr una adecuada microencapsulación, con un rendimiento superior al 70 %, de las mezclas de los aceites esenciales para ser empleadas como aditivo alimentario en quesos. Se formularon quesos frescos con el empleo del material microencapsulado y se valoró la calidad microbiológica de los quesos elaborados, la cual fue adecuada pues no se observó crecimiento microbiano durante el período de estudio para los microorganismos patógenos *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella spp* (NTE, 2012).

PALABRAS CLAVES

Aceites esenciales, microencapsulación, quesos frescos, crecimiento microbiano.

ABSTRACT

Manufactured fresh cheeses, from the rural industry of Ecuador, face serious problems of innocuousness and conservation, as a result of the poor application of good manufacturing practices during the process of cheese production and storage. The present study seeks to provide an alternative for the conservation of cheese, through the use of micro encapsulated essential oils, as an antimicrobial agent. The essential oils from the edible aromatic spices *Coriandrum sativum* L. (coriander), *Apium graveolens* L. (celery) and *Thymus vulgaris* L. (thyme) were extracted with adequate yields. "Spray dryer" technology was employed with the addition of arabic gum and maltodextrin to the essential oils in order to achieve an adequate microencapsulation, with a yield higher than 70%, of the mixtures of essential oils to be used as a food additive in cheeses. Fresh cheeses were formulated using microencapsulated material and the microbiological quality of the processed cheeses was assessed, which was adequate since no microbial growth was observed during the study period for the pathogenic microorganisms *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella spp.*

KEYWORDS

Essential oils, microencapsulation, fresh cheeses, microbial growth

INDICE

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I. | 1 |
| 1.1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.2. Planteamiento del problema..... | 3 |
| 1.3. OBJETIVO GENERAL | 3 |
| 1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3 |
| CAPÍTULO II. | 4 |
| 2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN..... | 4 |
| 2.1.1. PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES..... | 4 |
| <i>Thymus vulgaris</i> L. (TOMILLO)..... | 5 |
| 2.2. ACEITES ESENCIALES..... | 7 |
| 2.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES. | 7 |
| 2.2.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES..... | 8 |
| 2.3. ADITIVOS. | 9 |
| 2.4. ANTIOXIDANTES. | 10 |
| 2.5. AGENTES ANTIMICROBIANOS. - | 10 |
| 2.6. MICROENCAPSULACIÓN..... | 11 |
| 2.7. QUESO FRESCO..... | 11 |
| CAPÍTULO III. | 13 |
| 3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN..... | 13 |
| 3.1.1. LOCALIZACIÓN..... | 13 |
| 3.1.2. Tipo de Investigación..... | 13 |
| 3.1.3. Métodos de Investigación..... | 13 |
| 3.2. Diseño de la Investigación..... | 13 |
| 3.2.1. Equipos, materiales, utensilios, reactivos e instrumentos..... | 13 |
| 3.3. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL..... | 14 |
| 3.4. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: <i>Coriandrum sativum</i> L. (CILANTRO), <i>Apium graveolens</i> L. (APIO) y <i>Thymus vulgaris</i> L. (TOMILLO) 14 | |
| 3.5. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: <i>Coriandrum sativum</i> L. (CILANTRO), <i>Apium graveolens</i> L. (APIO) y <i>Thymus vulgaris</i> L. (TOMILLO)..... | 15 |
| 3.6. MICROENCAPSULACIÓN DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES..... | 16 |
| 3.7. EFICACIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN | 16 |
| 3.8. PREPARACIÓN DEL QUESO FRESCO CON LAS MICROCÁPSULAS DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES..... | 17 |
| 3.9. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS QUESOS FRESCOS..... | 18 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| 3.10. | DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO | 18 |
| CAPÍTULO IV | | 20 |
| 4.1. | RESULTADOS ESPERADOS | 20 |
| 4.1.1 | SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL..... | 20 |
| 4.1.2. | EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: Thymus vulgaris L. (TOMILLO), Coriandrum sativum L. (CILANTRO), Y Apium graveolens L. (APIO). | 20 |
| 4.1.3. | RENDIMIENTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: Thymus vulgaris L. (TOMILLO), Coriandrum sativum L. (CILANTRO), Y Apium graveolens L. (APIO). | 21 |
| 4.1.4. | ELABORACIÓN DEL QUESO FRESCO CON LA ADICIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: Thymus vulgaris L. (TOMILLO), Coriandrum sativum L. (CILANTRO), Y Apium graveolens L. (APIO). | 22 |
| 4.1.5. | ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN LOS QUESOS FRESCOS CON Y SIN LAS MICROCÁPSULAS DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES..... | 23 |
| CAPITULO V | | 26 |
| 5.1. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 26 |
| 5.1.1. | CONCLUSIONES | 26 |
| 5.1.2. | RECOMENDACIONES | 26 |
| CAPÍTULO VI | | 27 |
| 6.1. | BIBLIOGRAFÍA | 27 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Thymus vulgaris</i> L (Tomillo). | 5 |
| Tabla 2 Clasificación taxonómica de <i>Coriandrum sativum</i> L. (Cilantro)..... | 5 |
| Tabla 3 Clasificación taxonómica de <i>Apium graveolens</i> L. (Apio) | 6 |
| Tabla 4 Composición nutricional del queso fresco. | 11 |
| Tabla 5 Equipos, materiales, utensilios, reactivos e instrumentos..... | 12 |
| Tabla 6 Rendimientos de aceites esenciales sobre la base del peso seco para cada especie vegetal. | 19 |
| Tabla 7 Resultados de la elaboración del queso fresco con las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales..... | 21 |
| Tabla 8 Resultados del análisis microbiológico realizado a los quesos elaborados, con y sin los aceites esenciales microencapsulados..... | 23 |
| Tabla 9 Otras Enterobacterias | 24 |

Índice de ilustraciones

| | |
|---|----|
| Ilustración 1 Equipo extractor de aceites esenciales FIGMAY® (Argentina)..... | 14 |
| Ilustración 2 Büchi Mini Spray Dryer B-290 | 15 |
| Ilustración 3 Dispensor de alta velocidad M-Tops® SR-30..... | 16 |
| Ilustración 4 Diagrama de flujo de proceso de descripción del procedimiento. | 16 |
| Ilustración 5 Diagrama de flujo de proceso de descripción del procedimiento. | 18 |

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

La industria artesanal de quesos está distribuida en casi todas las comunidades de las provincias del Ecuador, aunque, es importante destacar que en la Amazonía no hay una presencia importante de queseras, si se compara con la región sierra y la costa, debido a que en la Amazonía el ganado bovino no tiene una producción de leche significativa, en promedio 4,1 litros/vaca/día (Censo Agropecuario MAC, INEC).

Las queseras artesanales pueden ser un negocio familiar, una empresa privada o una empresa comunitaria, manejan volúmenes muy pequeños de leche que van desde 150 litros por día y en el mejor de los casos 2000 litros día; son generadoras de empleo dentro de las comunidades, su principal producto es el queso fresco. Se define así, al queso que no tiene ningún proceso de maduración con alto contenido de humedad, esta puede ser desde un 50% a 70%. El alto contenido de humedad y el valor nutritivo que tiene este alimento lo hace susceptible a la contaminación microbiana, lo que reduce su tiempo de vida útil. Las pequeñas queseras, generan un volumen importante de quesos, pero frecuentemente se cuestiona la inocuidad del producto. La creciente conciencia y preocupación por la calidad y la inocuidad de los quesos han llevado al desarrollo de técnicas alternativas de conservación que están siendo investigadas para su aplicación, en las cuales se utilizan ingredientes de origen natural como agentes preservantes; especias y plantas aromáticas conocidas por proporcionar aroma y sabor a los alimentos, son ampliamente utilizados y si se llegan a utilizar como un aditivo; en las normativas se las clasifican como “sustancia reconocido como segura (GRAS por sus siglas en inglés)” lo cual indica que no necesitan estudios adicionales para que se puedan comercializar.

Los extractos de plantas aromáticas, en algunos casos son ricos en compuestos fenólicos, tales como los ácidos fenólicos, flavonoides y metabolitos secundarios de las plantas como los aceites esenciales (AEs), (compuestos aromáticos volátiles que se encuentran en las semillas, la corteza, los tallos, las raíces, las flores y otras partes de las plantas), los cuales, son sintetizados, almacenados y liberados al ambiente por una gran variedad de estructuras epidérmicas, cuya morfología es característica de cada grupo taxonómico. Sin embargo, la mayoría de las especies almacenan los compuestos volátiles sintetizados en estructuras especializadas denominadas, en general, tricomas glandulares (Usano-Aleman, Jaime., Palá-Paúl, Jesús., Diaz, 2014).

En particular, los AEs han despertado el interés como conservantes potenciales de los alimentos y tienen una amplia aceptación por parte de los consumidores por ser considerados sustancias naturales. Los AEs son compuestos volátiles, que conforman en general mezclas complejas y que se caracterizan por un olor característico. Además de su uso como agentes de sabor en los alimentos, algunos AEs exhiben propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (de Oliveira, T. L. C., de Carvalho, S. M., de Araújo Soares, R., Andradeb, M. A., Cardoso das, G., Ramos, M. E. M. & Picollia, 2012).

Estos productos de origen natural pueden extender la vida útil de quesos mediante la reducción o la eliminación de la supervivencia de las bacterias patógenas y mejorar la calidad general a través de la inhibición de la rancidez oxidativa (Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R. & Raychaudhuri, 2008). Los polifenoles de extractos de plantas y los AEs se han utilizado en diferentes matrices de alimentos para mejorar la estabilidad oxidativa de los lípidos. Solo unos pocos estudios han analizado la adición de antioxidantes para minimizar las reacciones oxidativas en los productos lácteos (Giroux, H.J., Houde, J., & Britten, 2010);(Boroski, M., Giroux, H. J., Sabik, H., Petit, H. V., Visentainer, J. V., Matumoto-Pintro, P. T. & Britten, 2012).

Todas las especies vegetales poseen la capacidad de producir compuestos de naturaleza volátil, sin embargo, en la mayoría de los casos, lo hacen únicamente en proporciones de trazas, excepto las consideradas como “plantas aromáticas”. Muchas de estas especies se cultivan en mayor o menor escala porque producen esencias que tienen algún tipo de interés comercial (Usano-Aleman, Jaime., Palá-Paúl, Jesús., Diaz, 2014).

Los aceites esenciales y sus componentes son productos naturales considerados no peligrosos para la salud humana, y que actualmente se le atribuyen importantes propiedades funcionales, lo cual resulta atractivo para los consumidores (Singh, 1999). Muchos autores, han reportado propiedades antioxidantes (Baratta, M, T., Dorman, H, J, D., Deans, S, G., Biondi, D., Ruberto, 1998); Deans, K, A., Youdim S, 2000) y antimicrobianas (Burt, 2004); (Holley, R, A., Patel, 2005) las cuales son aportadas, ya sea por las especias o sus aceites esenciales (Azizi, A., Yan, F., Honermeier, 2009).

Los AEs, al ser compuestos que provienen del metabolismo secundario, están sujetos a cambios en su producción en función de las necesidades de la planta. Estos son el producto final de un complejo proceso biológico que se encuentra fuertemente condicionado por diversos factores que van a determinar tanto la cantidad como la calidad del mismo (Usano Aleman, 2012).

La cantidad de especies de plantas aromáticas comestibles que se produce y comercializa a nivel mundial tiene una estimación de crecimiento medio anual del 7%, siendo los mercados de la industria farmacéutica, los suplementos dietéticos y la cosmética natural con base de plantas, los que mayores rendimientos obtienen (Usano-Aleman, Jaime., Palá-Paúl, Jesús., Diaz, 2014).

El principal motivo de estudio del presente tema de investigación es determinar si la microencapsulación de los aceites esenciales de tres especies comestibles, tiene el efecto de mejorar la calidad microbiológica del queso fresco. La mezcla de aceites esenciales, permitirá plantear una metodología para la formulación o elaboración de quesos frescos con las microcápsulas de aceites, lo cual ayudará a una prolongación en el tiempo de vida útil del producto, además de que proveerá al producto la parte funcional de la mezcla de aceites, haciendo de este un producto de mayor interés para el consumidor; la influencia del aceite esencial en la calidad microbiológica del queso, fue evaluada mediante análisis de laboratorio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los quesos frescos que se elaboran artesanalmente presentan a menudo problemas de contaminación microbiana que repercuten en la falta de seguridad para el consumidor y un acortamiento en la vida útil del producto.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad microbiológica de quesos frescos artesanales con la adición de mezclas de aceites esenciales microencapsulados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Proponer una vía para la microencapsulación de mezclas de aceites esenciales con vistas a su uso como aditivo alimentario en quesos.
2. Formular quesos frescos con el empleo del aditivo alimentario microencapsulado.
3. Valorar la calidad microbiológica en los quesos elaborados.

CAPÍTULO II.

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES.

Las plantas aromáticas, por definición, son aquellas que desprenden de sus hojas, raíces, y flores, un aroma más o menos intenso. En cuanto a sus posibles usos cotidianos, cabe destacar los siguientes:

- 1) Condimentos de alimentos para aportar sabor y aroma.
- 2) Remedios medicinales curativos o preventivos.
- 3) Repelentes naturales de plagas.

Algunas de las plantas aromáticas más frecuentemente empleadas en la elaboración de alimentos son: *Origanum majorana* L. (mejorana), *Ocimum basilicum* L. (albahaca) y *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo), (Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelman, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., Ragaert, 2017).

Entre otras especias de plantas aromáticas cultivadas se ha demostrado que tienen compuestos que proporcionan seguridad antimicrobiana en alimentos, los cuales están siendo empleados en la industria alimenticia, cosmética, de limpiadores y desinfectantes, de perfumería, entre otras se puede encontrar: *Lavandula hybrida*. (lavandín), *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto), *Origanum vulgare*. (orégano), *Artemisia dracunculus*. (estragón), *Melissa officinalis*. (melisa), *Ruta graveolens*. (ruda), *Angelica archangelica*. (angélica), *Chrysopogon zizanioides*. (vetiver), *Salvia sclarea*. (salvia moscatel), *Salvia officinalis*. (salvia común), *Mentha piperita*. (menta inglesa), *Artemisia absinthium*. (ajenjo), *Coriandrum sativum*. (coriandro), *Baccharis latifolia*. (chilca), y *Tagetes minuta*. (suico), (Ascerbi, 2012).

***Thymus vulgaris* L. (TOMILLO)**

Es una especie de planta con flores de la familia de la menta, nativa del sur de Europa, desde el Mediterráneo occidental al sur de Italia (Tabla 1). Es un arbusto de hoja perenne, de base arbolada, con pequeñas hojas aromáticas de color gris-verde y racimos de flores de color púrpura o rosa (Dorling, 2008). El tomillo crece bien en un clima de templado a cálido, seco y soleado (Hosseinzadeh, Saleh., Jafarikukhdan, Azizollah., Hosseini, Ahmadreza., Armand, 2015).

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Thymus vulgaris* L (Tomillo).

| | |
|------------|-------------------------------|
| Reino | <u>Plantae</u> |
| División | <u>Magnoliophyta</u> |
| Clase | <u>Magnoliopsida</u> |
| Orden | <u>Lamiales</u> |
| Familia | <u>Lamiaceae</u> |
| Subfamilia | <u>Nepetoideae</u> |
| Tribu | <u>Mentheae</u> |
| Género | <u><i>Thymus</i> L., 1753</u> |

Fuente: (Dorling, 2008)

Thymus vulgaris L., presenta en su composición, monoterpenos oxigenados: 56,53 %, hidrocarburos monoterpénicos: 28,69 %, hidrocarburos sesquiterpénicos: 5,04 % y sesquitepenos oxigenados: 1,84 % (KAYA, DURMUS., ARSLAN & RUSU, 2013).

La especie fue utilizada desde la antigüedad por los griegos como un aromatizante en sus templos y por los romanos en la cocina. Actualmente se usa en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Shabnum, S., & Wagay, 2011). Posee propiedades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, antivirales y como insecticida (Marino, M. and Bersani, 1999).

***Coriandrum sativum* L. (CILANTRO).**

Es una hierba anual, sus semillas y hojas son muy utilizadas en las cocinas tradicionales de América Latina, India y China (Tabla 2). Es una fuente potencial de lípidos y su aceite esencial es rico en linalol (Sahib N.G., Anwar F., Gilani A.-H., Hamid A.A., Saari N., 2013).

Tabla 2 Clasificación taxonómica de *Coriandrum sativum* L. (Cilantro)

| | |
|------------|--------------------------|
| Reino | <u>Plantae</u> |
| División | <u>Magnoliophyta</u> |
| Clase | <u>Magnoliopsida</u> |
| Orden | <u>Apiales</u> |
| Familia | <u>Apiaceae</u> |
| Subfamilia | <u>Apioideae</u> |
| Tribu | <u>Coriandreae</u> |
| Género | <u><i>Coriandrum</i></u> |

Fuente: (Torres-Aguirre, G. A., Muñoz-Bernal, Ó. A., Álvarez-Parrilla, E., Núñez-Gastélum, J. A., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Laura, 2018).

La composición metabólica del cilantro se basa principalmente en aceites esenciales, entre ellos d-linalol, 70 a 90 % pineno, dipenteno, geraniol, felandreno, borneol, limoneno, cineol, canfeno, citronelol, coriandrol y linalol (Infoagro, 1997).

En los países en vías de desarrollo, *Coriandrum sativum* L., es utilizado en alimentos y como medicamento natural por sus variadas propiedades, a nivel casero e industrial (Morales, 1995).

Sus actividades farmacológicas principales son: como antimicrobiano, antioxidante, antidiabético, ansiolítico, antiepiléptico, antidepresivo, antimutagénico, antiinflamatorio, antidislipidémico, antihipertensivo, neuroprotector y diurético (Sahib N.G., Anwar F., Gilani A.-H., Hamid A.A., Saari N., 2013).

***Apium graveolens* L. (APIO).**

Apium graveolens es una planta nativa de la llanura de Italia, donde se extendió a Suecia, Egipto, Argelia, Etiopía e India. Las flores son pequeñas y blancas, los dientes del cáliz son absolutos (Tabla 3). Posee cinco pétalos ovados agudos con puntas enharinadas (Fazal, S. S., & Singla, 2012).

En los países en desarrollo, el apio es utilizado en alimentos y medicinas. Se emplea directamente en la cocina tradicional y en la industrialización, como aditivo funcional (Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H., & Ashtary-Larky, 2015).

Tabla 3 Clasificación taxonómica de *Apium graveolens* L. (Apio)

| | |
|----------|----------------------|
| Reino | <u>Plantae</u> |
| División | <u>Magnoliophyta</u> |
| Clase | <u>Magnoliopsida</u> |
| Orden | <u>Apiales</u> |
| Familia | <u>Apiaceae</u> |
| Género | <u><i>Apium</i></u> |

Fuente: (Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H., & Ashtary-Larky, 2015).

2.2. ACEITES ESENCIALES.

Los aceites esenciales son sustancias a encontrar en las plantas, ya que estas los producen con la finalidad de protegerse así mismas de otras plantas invasoras, de animales, insectos, hongos entre otros. Los AEs son un concentrado de aromas y sabores que están constituidos por una mezcla compleja de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles, los cuales se hallan contenidos en las glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos

de las hojas, flores, corteza y semillas de los frutos (MARTINEZ, J., SULBARAN DE FERRER, B., OJEDA DE RODRIGUEZ, G., FERRER, A., NAVA, 2003).

Los aceites esenciales de especies aromáticas han sido estudiados principalmente desde un punto de vista de la química del aroma y fragancia. Su principal uso en los alimentos es para contribuir a aromatizar y mejorar sensorialmente los productos (Asensio, C, 2013).

2.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo).

Según Estudios realizados por diferentes autores (Shabnum, S., & Wagay, 2011), (Burt, 2004), (de Carvalho et al., 2015) y (Nemati, Barzegar, Khosravinezhad, & Talebi, 2017), demuestran que en el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) son 4 los compuestos que más denotan presencia porcentual, tales como timol (46,2 %), p-cinene (28,55 %), carvacrol (18,31 %), γ -terpinene (14,1 %), y que coinciden entre los ya mencionados y otros compuestos más.

Aceite esencial de *Coriandrum sativum* L. (Cilantro).

En diferentes estudios realizados, se ha encontrado por diferentes autores, (Curioni, A., Arizio, 1997), (Government, 2013), (Dyulgerov, N., & Dyulgerova, 2013)", (Arak & Raal, 2013), (Khani & Rahdari, 2012), una elevada variabilidad en la composición química del aceite esencial de cilantro (*Coriandrum sativum*), la sola molécula que se encuentra en cantidades relevantes en los 3 estudios, es el linalol, que se presenta en rangos de 58 a 82%. De igual manera, sucede con el alcanfor que se encuentra en rangos de 3,02 a 5,3 % otra molécula de gran presencia.

Aceite esencial de *Apium graveolens* L. (Apio)

En otros estudios realizados, por diferentes autores, (Curioni, A., Arizio, 1997), (Government, 2013), (Dyulgerov, N., & Dyulgerova, 2013)", (Arak & Raal, 2013), (Khani & Rahdari, 2012), han encontrado una elevada variabilidad en la composición química del aceite esencial de apio (*Apium graveolens*), la sola molécula que se encuentra en cantidades relevantes en los 4 estudios, es el D-limonene, que se presenta en rangos de 32,16 a 58,29 %. De igual forma pasa con la molécula de myrcene que se encuentra en rangos de 9,14 a 19,51 %, y la molécula de β -Selinene con rangos de 5,98 a 8,1 %.

2.2.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

En este método se utilizan muestras frescas o secas y molidas y disolventes volátiles como: etanol y cloroformo, entre otros. Los disolventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias (grasas y ceras) en forma de una oleorresina o extracto impuro. Se utiliza generalmente solo a escala de laboratorio, por los elevados costos de los disolventes orgánicos (Martínez, 2003; Molina, J. B., Vanegas, P., & Martínez-Correa, 2016).

EXTRACCIÓN POR MICROONDAS.

Es una alternativa para la extracción de aceites esenciales, la técnica puede utilizarse como un método convencional como la hidrodestilación. Es necesario modificar un horno de microondas haciendo un orificio en la parte superior y conectando un matraz con un sistema de refrigeración (Bayramoglu, B., Shanin, S. y Sumnu, 2008).

Los beneficios son: la reducción del tiempo y la disminución de la energía que se consume. Este método se puede emplear a escala industrial mediante reactores si se requiere un buen manejo y seguridad (Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, 2009).

DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR.

La muestra vegetal fresca o seca, cortada en trozos pequeños, entra en una cámara que es sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado. Así, se arrastra la esencia condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Este método se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento y no se necesita de tecnología sofisticada. (Peredo-Luna, H., Palou-García, E., López-Malo, 2009).

El equipo más conocido para la destilación por arrastre con vapor es la llamada trampa Clevenger, considerada internacionalmente como la más adecuada para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática. La trampa está compuesta por un balón, donde se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura. Se le calienta constantemente y el aceite esencial, con el agua, se evaporan continuamente. Un condensador acoplado al balón y un reservorio final permite separar el aceite esencial de la mezcla condensada (Peredo-Luna, H., Palou-García, E., López-Malo, 2009).

2.3. ADITIVOS.

Basándose en la normativa de la Comunidad Europea (DOCE), la definición de aditivos alimentarios es la siguiente “cualquier sustancia que, normalmente, no se consume como

alimento en sí o ni se use como ingrediente característico en la alimentación, independientemente de que tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada a los productos alimenticios, con un propósito tecnológico en la fase de su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envase, transporte o almacenamiento tenga, o pueda esperarse razonablemente que tenga, directa o indirectamente, como resultado que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan en un componente de dichos productos alimenticios (Europeas, 1988).

2.4. ANTIOXIDANTES.

Son compuestos químicos utilizados en la industria alimentaria, para evitar la oxidación producida por el oxígeno o por la luz, en algunos alimentos como los zumos de frutas se les adiciona con más frecuencia ácido ascórbico y tocoferol a los aceites y emulsiones con el fin de evitar el enranciamiento de los mismos, preservar ciertas cualidades o características como son el color y el sabor (DURAN, 2001).

Los antioxidantes también no solo actúan sobre los zumos de frutas o las grasas si no también restringe la oxidación de otras sustancias como las proteínas y ácido desoxirribonucleico, en otras palabras los antioxidantes son las sustancias que en pequeñas proporciones (menos 0,001 %) y en presencia de sustratos oxidables retardan o previenen significativamente la oxidación en los mismos (ALEX LOPEZ CORDOBA, 2012).

En la industria alimentaria se pueden identificar algunos recubrimientos activos elaborados con la incorporación de aceites esenciales. Su composición con base a terpenos y compuestos fenólicos les confieren capacidad antioxidante y antimicrobiana (Rodríguez, 2011).

2.5. AGENTES ANTIMICROBIANOS. -

La eliminación de la microflora mediante métodos físicos no siempre es posible, en estos casos, se necesita del uso de agentes antimicrobianos. El espectro de compuestos utilizado para este propósito apenas ha cambiado en el tiempo. Encontrar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, de toxicidad insignificante para los mamíferos y costo aceptable, es uno de los retos de la investigación fitoquímica (Belitz, H, D., Grosch, W., Schieberle, 2009).

Por otro lado, los consumidores prefieren alimentos mínimamente procesados y elaborados sin sustancias sintéticas (Appendini, P. & Hotchkiss, 2002). La industria alimentaria investiga cada vez más la sustitución de las técnicas tradicionales de conservación de

alimentos (tratamientos térmicos intensos, salado, secado y conservación química) por otros nuevos. Además, la legislación alimentaria está experimentando una tendencia de consumo verde, que requiere menos aditivos alimentarios sintéticos y productos con menos impacto en el medio ambiente (Burt, 2004). Es por esto que los productos naturales obtenidos de plantas surgen como una importante alternativa para el control de microorganismos. Algunas especies han demostrado tener compuestos que proporcionan seguridad microbiológica en alimentos. Muchos de estos compuestos como eugenol, citral, pineno, timol, ácido cinámico y carvacrol se caracterizan por una actividad antimicrobiana prominente (Konning, G. H., Agyare, C. & Enninson, 2004).

2.6. MICROENCAPSULACIÓN.

Según la definición de varios autores, la microencapsulación, es una técnica o proceso tecnológico que permite contener o atrapar los componentes activos de un compuesto, con el fin de preservar y mantener sus funciones, para una prolongación en la utilización de los componentes bioactivos (Hogan S, McNamee B, Dolores E, 2001), (López, 2010).

Se han encontrado diversas razones por las cuales se ha empleado la técnica de encapsulación, una de ellas es proporcionar una barrera física entre los componentes bioactivos sensibles y el medio ambiente, lo que permite estabilizar los ingredientes de los alimentos durante el procesamiento y en el producto final, al reducir procesos de degradación como la oxidación o la hidrólisis, lo que incrementa la biodisponibilidad de los principios activos. Además, permite la liberación del contenido a una velocidad controlada a lo largo del tiempo o bajo condiciones específicas en el sitio deseado (NEDOVIC, V., Kalusevica, A., Manojlovic, V., Levica, S., Bugarskib, 2011).

2.7. QUESO FRESCO.

El queso es un concentrado de leche sólida que se compone principalmente de proteínas y grasas. Se consume en todo el mundo y constituye una parte integral de la dieta de la población (Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fustier, P., Salmieri, S. & Lacroix, 2011). El queso procesado puede normalmente ser considerado como un producto estable con una vida útil razonable. Sin embargo, durante un almacenamiento prolongado se encontró que la exposición a la luz influye en menor cantidad que a las elevadas temperatura, ya que los cambios que sufren son notables por el aumento de la viscosidad del producto,

produciendo efecto del pardeamiento del queso (Kristensen, D., Hansen, E., Arndal, A., Appelgren Trinderup, R. & Skibsted, 2001).

El queso aporta vitaminas A, D, B12 y B2, encargadas de proteger al organismo de posibles infecciones, apoyando al buen funcionamiento del sistema nervioso y cardiovascular. Contribuye a la regeneración y mantenimiento de los tejidos del cuerpo por su gran contenido proteico. Al ser un producto rico en calcio y fósforo favorece a la formación y crecimiento de los huesos (EDUVIRAMA, 2012). En la tabla 4 se presenta el contenido nutricional del queso fresco.

Tabla 4 Composición nutricional del queso fresco.

| Composición nutricional del queso fresco | 100g de porción comestible |
|--|----------------------------|
| Humedad % | 46-57 |
| Grasa % | 18-29 |
| Proteína % | 17-21 |
| Ceniza % | - |
| Lactosa % | - |
| Calcio % | - |
| Fosforo % | - |
| Sal | 1.0-3.0 |
| Ph | 6.1 |
| Valor nutrimental (kcal/100g) | 255±37 |

(Alais, 1985).

(Van, Hekken., Farkye, 2003).

(García- Islas, 2006).

Según estudios realizado por varios autores (Chavarrias, 2014), (Amiott, 1995), (Silva, Guillermo., Gutuirrez, 2011), mencionan que el queso fresco posee una vida útil de entre 10 días a 2 semanas a menos de 10° C, esto se debe a la carga microbiana que se desarrolla durante su almacenamiento.

El control del crecimiento de bacterias, hongos y otros microorganismos durante el proceso de almacenamiento, contribuye a una mayor vida útil del queso (Chavarrias, 2014). Los quesos que presentan un alto contenido de agua son proclives a un inmediato deterioro, siendo este un motivo para el desarrollo de nuevas tecnologías que faciliten la prolongación de la vida útil del producto, sin afectar sus características nutricionales (Neila, S.P.S. Richards., Isadora A.M, Barreto., Joao Borgues, 2016).

CAPÍTULO III.

3.1. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Química y Biología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en el kilómetro 2 y medio de la vía Puyo - Tena (Paso Lateral) de la ciudad de Puyo, Pastaza, con una altitud de 940 m.s.n.m., latitud de 0° 59' -1" y longitud de 77° 49' 0" W; y en el laboratorio de investigación de la Facultad de Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el campus Huachi en la avenida los Chaquis y Río Payamino ciudad de Ambato, Tungurahua, Ecuador.

3.1.2. Tipo de Investigación

El presente proyecto será una investigación de tipo aplicada, la cual se fundamentará en la experimentación.

3.1.3. Métodos de Investigación

Se emplearon métodos cuantitativos que permitieron controlar las variables independientes, se realizaron cálculos numéricos y análisis estadísticos para establecer modelos de comportamiento.

Para realizar el conteo de microorganismo y unidades formadoras de colonias se utilizó la fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\# \text{ colonias} * \text{factor decimal de dilucion}}{\text{factor dilucion (volumen de la simbra)}}$$

3.2. Diseño de la Investigación

3.2.1. Equipos, materiales, utensilios, reactivos e instrumentos

Tabla 5 Equipos, materiales, utensilios, reactivos e instrumentos.

- Balanza analítica ADAM. Alemania.
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos.
- Extractor de aceites esenciales. FIGMAY®. Argentina
- Agua destilada
- Etanol
- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico.
- Apio, Cilantro, Tomillo en estado seco.
- Dispensador de alta velocidad M-Tops® SR-30
- Goma arábica y maltodextrina
- leche de vaca cruda

- Büchi Mini Spray Dryer B-290
- Pipetas
- Placas Petri
- Micro pipetas
- Incubadora memmert
- VORTEX MIXER VM-300
- Agar para cultivo peptone wáter
- Agar sangre
- Balanza Pioneer™
- Plato agitador IKA® CMAG HS 10
- Microscopio MOTIC IMAGES PLUS2 ML.
- molde para quesos, mesas metálicas, lira, cloruro de calcio, cuajo, sal, agua.
- Fundas de resistencia térmica
- Estufa
- Cofia, mandil, mascarilla, guantes de latex.
- Autoclave shenan LDZX-50FBS
- Refrigeradora RI-585 NO FROST
- Agar para coliformes chromocult®
- Tubos de ensayo, puntas para pipeta.
- Plato agitador- calentador BOEGO MSH-420
- Asa de Drigalski y Asa redonda de platino

Fuente: elaboración propia

3.3. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las especies vegetales comestibles: *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Apium graveolens* L. (apio) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) fueron adquiridas en el mercado local por tratarse de plantas domesticadas, de alto consumo por la población.

Se separó el material foliar, se lavó con agua corriente y agua destilada, parte del material vegetal se sometió posteriormente a secado al aire, a temperatura ambiente y a la sombra, durante 72 horas y se dividió finamente con la ayuda de tijeras previo a la extracción.

3.4. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), *Apium graveolens* L. (APIO) y *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO)

Se empleó la destilación por arrastre con vapor mediante un equipo extractor de aceites esenciales a escala laboratorio, fabricado por FIGMAY® (Argentina) para separar los aceites más ligeros que el agua (Figura 1).

Se colocaron cantidades exactamente pesadas del material vegetal seco de cada especie vegetal (3 Kg de tomillo, 5 Kg de apio y 4 Kg de cilantro), en el extractor y se realizó la extracción de los aceites esenciales durante 30 minutos.

Posteriormente se separó la fase oleosa (fase superior) del agua a través del dispositivo de separación del equipo. Se hizo el mismo procedimiento para las 3 especies vegetales.



Ilustración 1 Equipo extractor de aceites esenciales FIGMAY® (Argentina).

Se determinó cuantitativamente el rendimiento para cada uno de los aceites esenciales a partir del peso seco de cada planta aromática, a través de la siguiente fórmula:

$$R(\%) = \frac{Pa * 100}{Pm}$$

Donde:

R (%) – rendimiento

Pa – peso del aceite (g)

Pm – peso del material vegetal seco (g)

3.5. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), *Apium graveolens* L. (APIO) y *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO).

Para la preparación de la mezcla de los aceites esenciales, primero se determinó la cantidad de aceite extraído de las plantas, para seguir con la formulación planteada por (GUEVARA 2018), en el cual señala que a concentraciones de 67,7 % de tomillo, 16,1 % apio y 16,1 % de cilantro, se garantiza una elevada actividad antioxidante y existe potenciación de dicha actividad biológica (sinergia). Luego, la mezcla de aceites (9,3 mL) fue trasladada hasta la ciudad de Ambato al campus de la UTA donde está situada la facultad de alimentos para la posterior microencapsulación.

3.6. MICROENCAPSULACIÓN DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Para realizar la microencapsulación de los aceites esenciales, primero se procedió a realizar el pesado del material encapsulante (goma arábica 9,3 g, maltodextrina 27,9 g), luego se midió la cantidad 124 mL de agua para realizar la mezcla mediante un dispersor de alta velocidad para facilitar la uniformidad entre el material encapsulante- agua- mezcla de aceites esenciales, luego una vez obtenida una mezcla uniforme, se procedió a programar el Spray Dryer para que trabaje a las condiciones óptimas y no tener pérdidas o inconvenientes con el equipo; una vez obtenidos los aceites microencapsulados se tomó el peso y verificó cual fue el rendimiento total.

3.7. EFICACIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN

Los análisis que son aplicados para medir la eficacia de la microencapsulación tienen como objetivo señalar la cantidad de la sustancia activa que fue encapsulada dando de esta manera una medida aproximada de la eficacia del procedimiento utilizado (López, 2010).



Ilustración 2 Büchi Mini
Spray Dryer B-290

$$R(\%) = \frac{MP}{MT} * 100$$

Donde:

R (%) – rendimiento

MP – masa práctica (g)

MT – masa teórica (g)



Ilustración 3 Dispensador de alta velocidad
M-Tops® SR-30

3.8. PREPARACIÓN DEL QUESO FRESCO CON LAS MICROCÁPSULAS DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES.

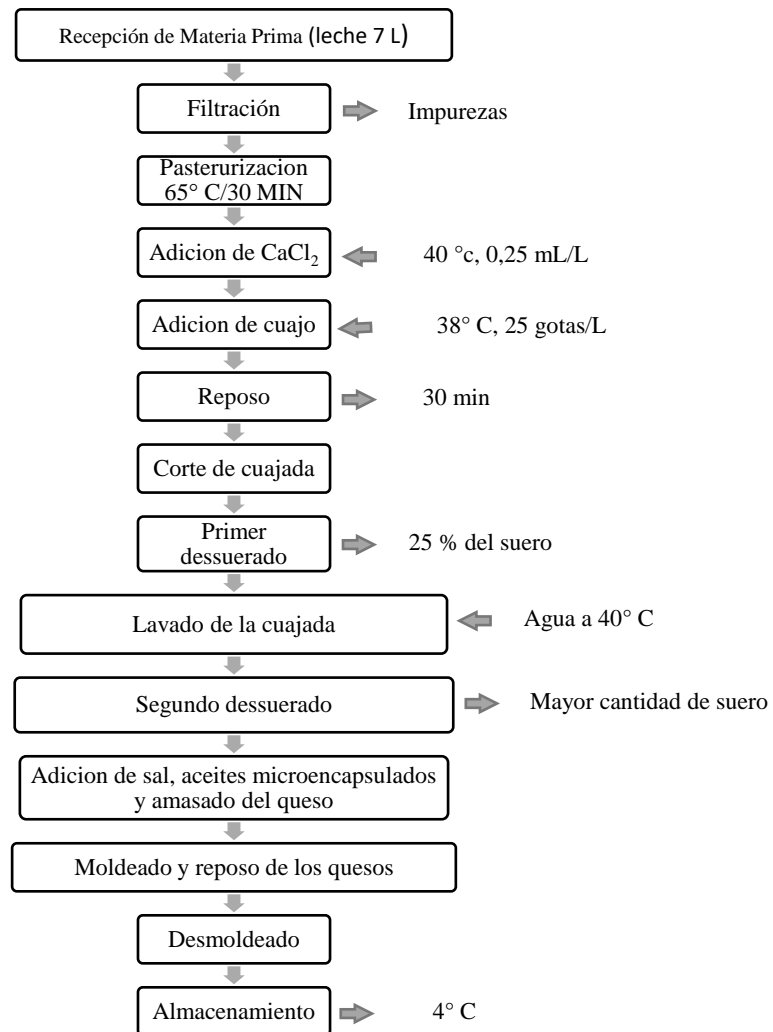


Ilustración 4 Diagrama de flujo de la elaboración del queso fresco

Se procedió con la elaboración del queso fresco con siete litros de leche cruda, para luego hacer una pasteurización lenta a 65° C/30 min, luego se bajó la temperatura a 40° C para incorporarle a la leche 0,25 mL/L de disolución de cloruro de calcio (95 % P/P) pues el calcio que contiene la leche se separa por la acción de la pasteurización, produciendo una descalcificación parcial de las caseínas, haciendo perder la firmeza de la cuajada, dando como resultados rendimiento inferiores a los esperados; se bajó nuevamente la temperatura hasta los 38° C para añadir el cuajo (CHEESE-MIX® REG.SAN.NO. 011251 INHQAN 1209) 25 gotas/10 L y se dejó en reposo la leche para que se coagulara y obtener así una buena cuajada. A continuación, se realizó el corte de la cuajada de forma horizontal y vertical, formando una cuadrícula en la misma; se dejó reposar por 5 min, se agito la cuajada y luego se retiró el 25 % del suero, a continuación, se le adicionó agua tibia a 40° C para realizar el lavado de la cuajada, con el fin de quitar residuos del suero y bloquear el desarrollo de microorganismos dañinos al queso. Posteriormente, se volvió a retirar la mayor cantidad de suero de la cuajada para obtener el queso, después se adicionó 12 % de sal y se dividió en dos partes iguales, para adicionarle a una de ellas 0,5 % de la mezcla de aceites esenciales microencapsulados y a la otra dejarla únicamente con la sal; luego, se procedió a colocar los quesos en los moldes para obtener un producto compacto y uniforme, y así permitirle que salga un poco más del suero que aún contenía, luego se desmoldo y se llevó a almacenamiento a 4°C.

3.9. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS QUESOS FRESCOS.

Se siguieron los siguientes pasos para analizar microbiológicamente los quesos elaborados.

Se pesó 8,1 g del medio de cultivo: water peptona, y 26,5 g de agar para coliformes, en estado sólido y se disolvió con agua destilada a una temperatura de 80° C por 15 min.

Se tomaron 9 mL de la disolución de agar peptona con una pipeta y se colocaron en 20 tubos de ensayos para realizar las diluciones de 1:10.

Se sometió a autoclave el agar peptona y el agar para coliformes y todos los demás materiales que se iban a utilizar en la siembra de los microorganismos, para asegurar la esterilidad de los mismos y no tener contaminaciones antes de iniciar la siembra.

Se tomaron muestras de 10 g de cada uno de los dos quesos frescos elaborados, el primero con las microcápsulas y el segundo sin las microcápsulas, luego se añadió 90

mL de agua destilada, previamente esterilizada en la autoclave, a los 10 g de queso; posteriormente se mezcló cuidadosamente el agua añadida con la totalidad de la muestra tomada de cada queso y, de los líquidos sobrenadantes se tomaron, con una micropipeta, sendas alícuotas de 1 mL y se vertieron a los dos primeros tubos de ensayo, Finalmente se aplicó una dilución de 1:10.

Se tomaron 100 µL de cada tubo de ensayo y se los adicionó a las diferentes cajas Petri que contenían el agar para coliformes. Se realizó la siembra superficial con el asa de Drigalski, se rotularon cada una de las cajas Petri con la muestra diluida del queso, se las llevó hasta la incubadora a 37° C para dejar reposar por un periodo de 24 horas y posteriormente realizar la toma de resultados.

3.10. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO

En este diagrama se muestran los pasos a seguir durante todo el período del proyecto de investigación, desde la extracción de los aceites esenciales hasta los resultados microbiológicos que se obtuvieron, a partir de la incorporación de las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales en el queso fresco, con el objetivo de determinar si hay mejoras en la calidad microbiológica de los mismos.

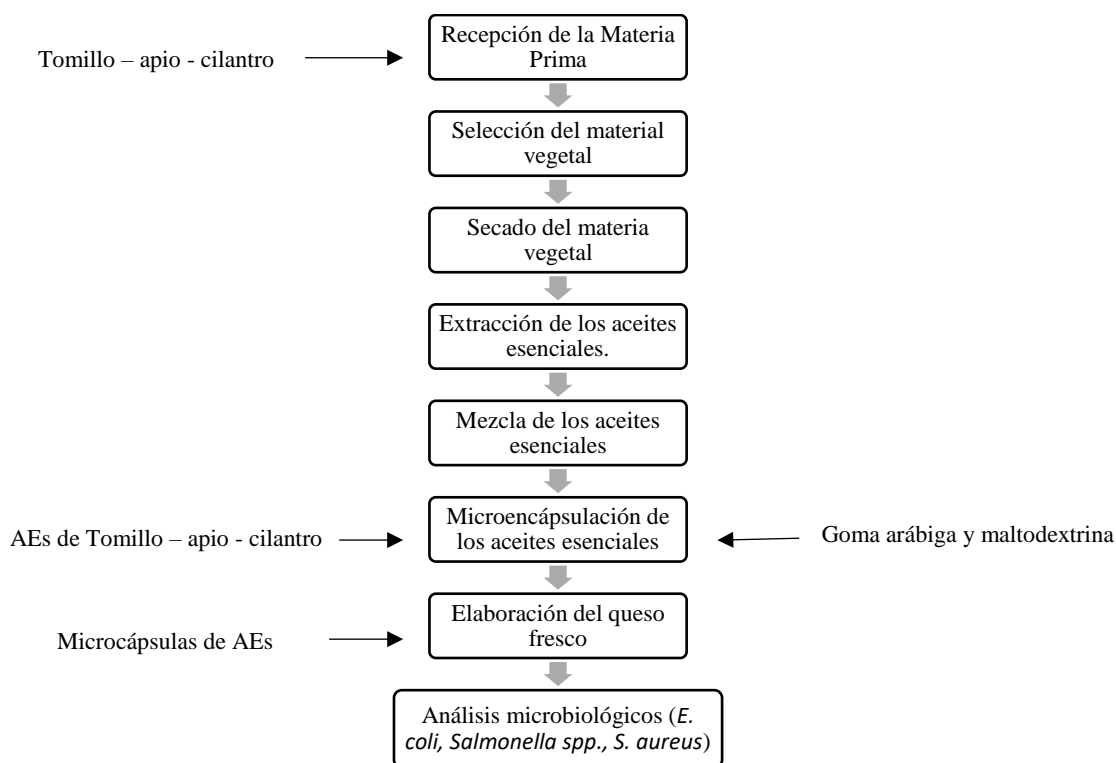


Ilustración 5 Diagrama de flujo de proceso de descripción del procedimiento.

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS

SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se empleó material vegetal seco de *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO), *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), y *Apium graveolens* L. (APIO), , ya que se conocía que estas especias una vez sometidas a secado, producían aceites esenciales con un mayor potencial antioxidante que en estado fresco (GUEVARA, 2018). Para la obtención del material seco se seleccionó el método de secado al aire, a temperatura ambiente y a la sombra, durante 72 horas, para lograr en lo posible que se volatilizaran mínimamente los aceites a emplear.

4.1.2. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO), *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), Y *Apium graveolens* L. (APIO).

Para la obtención de los aceites esenciales se utilizó la destilación por arrastre con vapor por ser un método en el cual se obtienen buenos rendimientos, además, por su facilidad de uso y manejo a escala de laboratorio (Peredo-Luna, H., Palou-García, E., López-Malo, 2009).

Los rendimientos calculados para cada uno de los aceites esenciales, sobre la base del peso seco de cada planta aromática, se reflejan en la Tabla 6.

Tabla 6 Rendimientos de aceites esenciales sobre la base del peso seco para cada especie vegetal.

| | <i>Apium graveolens</i> L. | <i>Coriandrum sativum</i> L. | <i>Thymus vulgaris</i> L. |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Rendimiento Seco (%) | 0,1268 | 0,2247 | 0,3298 |

Fuente: Elaboración propia

4.1.3. RENDIMIENTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO), *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), Y *Apium graveolens* L. (APIO).

Para determinar el total del rendimiento de la microencapsulación de la mezcla de los aceites esenciales, se calculó el peso de cada compuesto utilizado para la misma, tales como: la mezcla de los aceites (9,3 mL, correspondiente a 8,23 g), la goma arábica (9,3 g), la maltodextrina (27,9 g) y el agua destilada (124 mL).

El rendimiento de microencapsulación (RE) se calculó empleando la expresión siguiente (Hogan S, McNamee B, Dolores E, 2001):

$$RE = \frac{Masa\ práctica * 100\ \%}{Masa\ teórica}$$

$$RE = \frac{33,0\ g * 100\ \%}{45,4\ g}$$

$$RE = 72,6\ \%$$

Se puede apreciar que el rendimiento de la microencapsulación de los aceites esenciales fue muy alto 72,6 % (Restrepo, Jaime., Vinasco, Luz, E., Jaramillo, Lorena P., Colmenares, 2009), (López, 2010), con una leve pérdida debido posiblemente a la temperatura de entrada de aire caliente 100 a 200 °C, hacia la cámara, y que por acción de esta temperatura y por el tiempo que las partículas de microcápsulas quedaron adheridas a las paredes de la cámara estas se pueden quemar, dejando una pérdida inevitable; también existió una pérdida cuando se retiró el material del “Spray Dryer”.

4.1.4. ELABORACIÓN DEL QUESO FRESCO CON LA ADICIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES: *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO), *Coriandrum sativum* L. (CILANTRO), Y *Apium graveolens* L. (APIO).

Para la obtención del queso fresco se necesitaron siete litros de leche de vaca cruda, de los cuales se obtuvo un rendimiento de 990 gramos de queso fresco, donde se esperaba que la adición de las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales mejorase gradual y potencialmente las características microbiológicas en el queso fresco, ya que en estudios anteriores (Ruiz, 2014), (de Carvalho et al., 2015), se demostró que la incorporación de algunos aceites esenciales, como el aceite de *Thymus piperella*, ocasiona una efectiva inhibición microbiológica, además todos los aceites analizados presentaron un alto contenido en fenoles totales, así como una importante actividad antioxidante (Ruiz, 2014), en la tabla 7 se puede apreciar de mejor manera el resultado de la elaboración del queso fresco con las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales.

Tabla 7 Resultados de la elaboración del queso fresco con las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales.

| | L | CaCl ₂ % | Cuajo % | Sal g | AEs % | Masa Total |
|---------|---|---------------------|---------|-------|-------|------------|
| Leche | 7 | 0,122 | 0,049 | 0 | | 0 |
| Queso 1 | 0 | 0 | 0 | 42 | 0,5 | 489 g |
| Queso 2 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 501 g |

Fuente: elaboración propia.

4.1.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN LOS QUESOS FRESCOS CON Y SIN LAS MICROCÁPSULAS DE LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para el desarrollo de esta investigación se prepararon dos muestras de queso tipo fresco: control 1 con las microcápsulas de la mezcla de aceites esenciales y control 2 sin las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales, elaborados en el laboratorio de Agroindustria de la Universidad Estatal Amazónica.

Para los análisis microbiológicos se aplicaron tres tratamientos y se analizaron microbiológicamente ambos controles (INEN-1529-14, 2013), (INEN-ISO-6579, 2014), (INEN-1529-8, 2016), al primer día, al quinto día y al décimo día. Como lo indica la normativa técnica, se determinó la presencia o ausencia de microorganismos patógenos como: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos fueron comparados con la Normativa Técnica Ecuatoriana (NTE INEN) con los límites permisibles para identificar el nivel de buena calidad o nivel aceptable de calidad, para *Escherichia coli*, el cual debe ser: menor a 10 UFC/g, de *Salmonella spp.* debe dar ausencia total y para *Staphylococcus aureus* debe ser como máximo 10^2 UFC/g (Alba, 2017).

De acuerdo al resultado obtenido en el día uno del análisis, se evidenció que a una concentración del 0,5% de las microcápsulas de la mezcla de aceites esenciales adicionadas al control 1, no hubo presencia de crecimiento colonial de las bacterias *Echerichia coli*, *Salmonella spp* ni *Staphylococcus aureus*, así mismo en el control 2 sin las microcápsulas de la mezcla de los aceites esenciales al queso fresco, no se identificó presencia de los microorganismos ya mencionados.

Día cinco: en este período de tiempo no hubo presencia de ninguno de los tres microorganismos estudiados: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, en ninguno de los dos controles.

Día 10: de igual forma no hubo presencia de crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* *Staphylococcus*, *Salmonella spp* en ninguno de los dos tratamientos.

Además, se desarrolló en los dos tratamientos (queso con la mezcla de aceites y queso sin la mezcla de aceites), presencia colonial de las bacterias coliformes “*Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*”, observando la formación de las colonias de un color

rojo en los medios de cultivo específicos Agar para Coliformes “Chromocult® Coliform Agar acc. ISO 9308-1” presentes en la dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Con lo cual se puede argumentar que estas bacterias son fermentadoras de la lactosa y están presentes en las fuentes o redes de agua.

Tabla 8 Resultados del análisis microbiológico realizado a los quesos elaborados, con y sin los aceites esenciales microencapsulados

| TIEMPO | MUESTRA (Queso Fresco) | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella spp.</i> |
|--------|------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------|
| día 1 | control 1 | < 10 UFC/g | <10 ² UFC/g | ausencia total |
| | control 2 | < 10 UFC/g | <10 ² UFC/g | ausencia total |
| día 5 | control 1 | < 10 UFC/g | <10 ² UFC/g | ausencia total |
| | control 2 | < 10 UFC/g | <10 ² UFC/g | ausencia total |
| día 10 | control 1 | < 10 UFC/g | <10 ² UFC/g | ausencia total |
| | control 2 | < 10 UFC/g | <10 ² UFC/g | ausencia total |

Fuente: elaboración propia

control 1= Queso fresco con aceites

control 2= Queso fresco sin aceites

Con los resultados obtenidos se puede argumentar, en primer lugar, que la leche fue obtenida aplicando buenas prácticas de ordeño (BPO), y luego se siguieron prácticas adecuadas de manufactura, para la obtención del queso como producto final.

Hasta el décimo día de ensayo no se apreció crecimiento bacteriano para los microorganismos recogidos en la tabla 8 en ninguno de los quesos elaborados, sin embargo, a partir de día 5, se observó la presencia de otras enterobacterias por encima del índice máximo para identificar nivel aceptable de calidad 10^3 (NTE, 2012), en los quesos sin la adición de los aceites esenciales microencapsulados.

Tabla 9 Otras Enterobacterias

| TIEMPO | MUESTRA | OTRAS ENTEROBACTERIAS |
|---------------|----------------|------------------------------|
| día 1 | Control 1 | $< 2 \times 10^2$ |
| | Control 2 | 2×10^2 |
| día 5 | Control 1 | 2×10^3 |
| | Control 2 | 2×10^4 |
| día 10 | Control 1 | 2×10^5 |
| | Control 2 | 2×10^6 |

Fuente: elaboración propia

Como se evidencia en la tabla 9, la presencia de los AEs microencapsulados en el control 1 disminuye la contaminación de enterobacterias en comparación al control 2, si se toman en cuenta las muestras analizadas en el día 1.

Los análisis del día 5 y día 10, muestran un aumento de la contaminación en ambos controles, pero el control enriquecido con aceites esenciales microencapsulados se mantiene con una carga microbiana inferior.

Tomando en cuenta la Normativa Técnica Ecuatoriana (NTE, 2012), que hace referencia al índice máximo permisible para indicar nivel aceptable de calidad en enterobacterias es de 10^3 que pueden estar presentes en el queso fresco, se puede indicar que el queso cumple con los estándares de calidad en el día 1 para ambos controles.

A los 30 días de elaborados los quesos se intentó nuevamente realizar el conteo microbiano, sin embargo, el gran crecimiento de hongos presente en el queso, no permitió llevar a cabo dicho análisis.

Es importante resaltar que la presencia de los aceites microencapsulados puede ser de fundamental ayuda en la conservación de los quesos por períodos más prolongados, debido a su alto contenido de compuestos como: eugenol, timol y carvacrol presentes en el tomillo (aceite esencial mayoritario), de conocida actividad antimicrobiana (Vasquez, Oscar., Alva, Alenguer., Marreros, 2001).

Por el alto contenido de agua (NTE, 2012), en este tipo de quesos, se puede ver favorecido el crecimiento de los microorganismos patógenos.

En un estudio realizado por (Mejía-lópez et al., 2017) se demostró que en la prueba control de queso fresco el número de colonias de *S. aureus* aumentó con el tiempo y que por el contrario al adicionar hojas de tomillo al queso fresco entre el 0,75 % y 1,0 % previamente limpiadas y secas, estas disminuyen, con el tiempo, de manera

significativa, el número de colonias de *Staphylococcus aureus*, alargando la vida útil del producto en anaquel, también se menciona que al adicionar hojas de tomillo al 0,5 % las colonias tienen crecimiento desde el día 1 al día 8 y que a partir de ahí existe una disminución de las unidades formadoras de colonia.

En general, la aplicación del tomillo en el queso fresco inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Mejía-lópez et al., 2017), por lo que la aplicación de este antimicrobiano natural proporcionaría una garantía de inocuidad y prolongación de la conservación en anaquel.

Finalmente, es importante destacar que la microencapsulación facilita la adición de los aceites esenciales durante la elaboración del queso fresco, permite disminuir las pérdidas y lograr una mejor dosificación. Además de la protección contra microorganismos, las mezclas de aceites esenciales añadidas darán funcionalidad a los quesos, por la conocida actividad antioxidante (GUEVARA, 2018), y ofrecerán caracteres organolépticos atractivos en cuanto al olor, pues se trata de especias conocidas y ampliamente utilizadas por la población.

CAPITULO V.

1.1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.1.1. CONCLUSIONES

- El empleo del “Spray dryer” y la adición de goma arábica y maltodextrina permitió la adecuada microencapsulación, con un adecuado rendimiento (superior al 70 %), de las mezclas de aceites esenciales de especias comestibles para ser empleadas como aditivo alimentario en quesos.
- Fue posible la formulación de los quesos frescos con el empleo del aditivo alimentario microencapsulado.
- La calidad microbiológica de los quesos elaborados fue adecuada, teniendo en cuenta la normativa técnica ecuatoriana, pues no se observó crecimiento microbiano durante el período de estudio para *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.
- La contaminación debido a enterobacterias se presentó con menor cantidad en las muestras enriquecidas con AEs microencapsulados, sin embargo, el tratamiento 1 no cumplió con la normativa (NTE 12) al día 5 y día 10.

1.1.2. RECOMENDACIONES

- Realizar otros experimentos con cantidades superiores a 0,5 % de AEs microencapsulados con vista a prolongar la vida útil de los quesos.
- Estudiar la estabilidad microbiológica en condiciones de anaquel por un tiempo más prolongado al que se realizó en el presente estudio (10 días) con vistas a establecer un período de vida útil del queso con el aditivo de aceites esenciales microencapsulados.
- Realizar un estudio de percepción del consumidor con respecto a las características organolépticas del queso con aceites esenciales.

CAPÍTULO VI

6.1. BIBLIOGRAFÍA

- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. (editorial R. S.A., Ed.) (Cuarta edi). Barcelona, España.
- Alba, R. (2017). *COMPARACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE UN QUESO FRESCO PROCESADO SIN CONSERVADORES Y QUESOS FRESCOS CON RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES DE QUITOSANO Y ACEITES ESENCIALES*. SAN CARLOS DE GUATEMALA.
- ALEX LOPEZ CORDOBA. (2012). *No Title*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
- Amiott, J. (1995). *CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA LECHE: PRINCIPIOS Y APLICACIONES*. (Acribiia, Ed.). Zaragoza. Retrieved from <http://redbiblio.unne.edu.ar/opac/cgi-bin/pgopac.cgi?VDOC=16.53195>
- Appendini, P. & Hotchkiss, J. H. (2002). eview of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 3: 113-126.
- Arak, E., & Raal, A. (2013). Essential Oil Composition of Coriandrum sativum L . Fruits from Different Countries Essential Oil Composition of Coriandrum sativum L ., (April 2014). <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643910>
- Ascerbi, M. & R. M. (2012). Hierbas aromáticas y especias. Análisis de Cadena Alimentaria. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos*.
- Asensio, C, M. (2013). *UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE VARIEDADES DE ORÉGANO COMO CONSERVANTE ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE Y DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE ALIMENTOS: QUESOS COTTAGE, RICOTA Y ACEITE DE OLIVA*.
- Azizi, A., Yan, F., Honermeier, B. (2009). Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, 29: 554-561.
- Bandyopadhyay, M., Chakraborty, R. & Raychaudhuri, U. (2008). Antioxidant activity of natural plant sources in dairy dessert (Sandesh) under thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 41(5):816-825.
- Baratta, M, T., Dorman, H, J, D., Deans, S, G., Biondi, D., Ruberto, G. (1998, November). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*,

10 (6): 618-627.

- Bayramoglu, B., Shanin, S. y Sumnu, G. (2008). Solvent-free microware extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, 88, 535–540.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. (Springer, Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. (4th ed.).
- Boroski, M., Giroux, H. J., Sabik, H., Petit, H. V., Visentainer, J. V., Matumoto-Pintro, P. T. & Britten, M. (2012). Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1):167-174.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microware hidrodifusion and gravity. *Food Chemistry*, 114, 355–362.
- Burt, S. (2004, August). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 223–253.
- Chavarrias, M. (2014). Mayor vida útil para el queso fresco. *Consumer Eroski*. Retrieved from <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2014/06/12/220040.php>
- Curioni, A., Arizio, O. (1997). El cultivo de coriandro (*Coriandrum sativum* L.). *Plantas Aromáticas y Medicinales*, 1–34.
- de Carvalho, R. J., de Souza, G. T., Honório, V. G., de Sousa, J. P., da Conceição, M. L., Maganani, M., & de Souza, E. L. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.003>
- de Oliveira, T. L. C., de Carvalho, S. M., de Araújo Soares, R., Andradeb, M. A., Cardoso das, G., Ramos, M. E. M. & Picollia, H. R. (2012). Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *LWT - Food Science and Technology*, 204–212.
- Deans, K. A., Youdim S, G. (2000). Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *British Journal of Nutrition*, 83, 87–93.
- Dorling, K. (2008). *RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. (HARCOVER, Ed.) (3rd

ed.).

DURAN, L. (2001, January). ADITIVOS NATURALES. *ARBOR*, 105.

Dyulgerov, N., & Dyulgerova, B. (2013). variation of yield components in coriander (*Codiandrum sativum* L.). *Agricultural Science and Technology*, 160–163.

Fazal, S. S., & Singla, R. K. (2012). Review on the pharmacognostical & pharmacological characterization of *Apium graveolens* Linn. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 36–42.

García- Islas, B. (2006). *Caracterización fisicoquímica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hgo con el fin de proponer normas de calidad*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO.

Giroux, H.J., Houde, J., & Britten, M. (2010). Use of heated milk protein-sugar blends as antioxidant in dairy beverages enriched with linseed oil. *Food Science and Technology*, 43: 1373-1378.

Government, of S. (2013). Coriander.

GUEVARA, J. (2018). *OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICAS COMESTIBLES*. UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZONICA.

Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fustier, P., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2011). Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. *Food Research International*, 44: 494-497.

Hogan S, McNamee B, Dolores E, O. M. (2001). Microencapsulating properties of sodium caseinate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1934–1938. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf000276q>

Holley, R, A., Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 273–292.

Hosseinzadeh, Saleh., Jafarikukhdan, Azizollah., Hosseini, Ahmadreza., Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6, 635–642. Retrieved from https://file.scirp.org/pdf/IJCM_2015091513262965.pdf

INEN-1529-14, N. (2013). CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. STAPHYLOCOCCUS AUREUS. RECUENTO EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.

INEN-1529-8, N. (2016). CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETECCIÓN Y RECUENTO DE ESCHERICHIA COLI PRESUNTIVA POR LA

TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.

- INEN-ISO-6579, N. (2014). MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO Y ALIMENTACIÓN ANIMAL. MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP (ISO 6579:2002, IDT).
- KAYA, DURMUS., ARSLAN, M., & RUSU, L. (2013). EFFECTS OF HARVESTING HOUR ON ESSENTIAL OIL CONTENT AND COMPOSITION OF THYMUS VULGARIS. *FARMACIA*, 6, 61. Retrieved from http://www.revistafarmacia.ro/201306/art-16-kaya_1194-1203.pdf
- Khani, A., & Rahdari, T. (2012). Chemical Composition and Insecticidal Activity of Essential Oil from Coriandrum sativum Seeds against Tribolium confusum and Callosobruchus maculatus, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/263517>
- Konning, G. H., Agyare, C. & Enninson, B. (2004). Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia*, 75: 65-67.
- Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H., & Ashtary-Larky, D. (2015). A review on medicinal plant of Apium graveolens. *Advanced Herbal Medicine*, 1(1), 48–59.
- Kristensen, D., Hansen, E., Arndal, A., Appelgren Trinderup, R. & Skibsted, L. H. (2001). Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *International Dairy Journal*, 11: 837-843.
- López, O. D. H. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión Microencapsulation of oily substances by aspersion drying. *Revista Cubana de Farmacia Versión On-Line ISSN 1561-2988*, 44(3), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.002>
- Marino, M. and Bersani, C. (1999). Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Thymus vulgaris L. *Journal of Food Protection*, 62, 1017–1023.
- MARTINEZ, J., SULBARAN DE FERRER, B., OJEDA DE RODRIGUEZ, G., FERRER, A., NAVA, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *REV. FAC. AGRON (LUZ)*, 503. Retrieved from http://revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre_diciembre2003/Ra40310.pdf
- Martínez, M. A. (2003). Aceites Esenciales.
- Mejía-lópez, A., Herrera, B., Salazar, M., Rojas, F., Gavín, V., & Escobar, A. (2017). Tomillo (Thymus vulgaris) como agente antimicrobiano en la producción de queso fresco, 45–54.
- Molina, J. B., Vanegas, P., & Martínez-Correa, H. A. (2016). Comparación entre métodos

- de extracción de aceite de semilla de zapallo (*Curcubita moschata*). *Agronomía Colombiana*, 34, 588–590.
- Morales, J. . (1995). Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. Cultivo de cilantro, cilantro ancho y perejil. Retrieved from <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/download/cilantro.pdf>.
- NEDOVIC, V., Kalusevica, A., Manojlovicb, V., Levica, S., Bugarskib, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *PROCEDIA FOOD SCIENCE*. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S2211601X11002665/1-s2.0-S2211601X11002665-main.pdf?_tid=debe9725-e908-4cb2-b68c-22d82b320018&acdnat=1537215218_c427638339ccbfebf26de7bd62a1c7d9
- Neila, S.P.S. Richards., Isadora A.M, Barreto., Joao Borgues, L. (2016). MUESTRAS DE QUESOS COMERCIALES DESHIDRATADAS POR PROCESO DE MICROONDAS AL VACÍO. *Publitec*, 58–61. Retrieved from <http://www.publitec.com.ar/contenido/objetos/Muestrasdequesoscomerciales.pdf>
- Nemati, Z., Barzegar, R., Khosravinezhad, M., & Talebi, E. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil, 3(2), 26–32.
- NTE, I. 1528:2012. (2012). NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO MADURADOS., *primera re*, 9.
- Peredo-Luna, H., Palou-García, E., López-Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3–1, 24–32.
- Restrepo, Jaime., Vinasco, Luz, E., Jaramillo, Lorena P., Colmenares, A. J. (2009). Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*cymbopogon citratus*) en β - ciclodextrinas usando CO 2 supercrítico Encapsulation of essential oil from citral (*cymbopogon citratus*) in β -ciclodextrines by using supercritical CO 2. *Redalyc*, 11, 9–19.
- Rodriguez, E. (2011). NATURAL ANTIMICROBIAL AGENT USE IN THEPRESERVATION OF FRUITS AND VEGETABLES. *Ra Xhimhai*, 7, 153–170. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/50829317_NATURAL_ANTIMICROBIAL_AGENT_USE_IN_THE_PRESERVATION_OF_FRUITS_AND_VEGETABLES
- Ruiz, Y. (2014). Caracterización de aceites esenciales de plantas aromáticas mediterráneas y su aplicacion a films de quitosano para la conservación de productos carnicos. *Dialnet*. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=70815>
- Sahib N.G., Anwar F., Gilani A.-H., Hamid A.A., Saari N., A. K. M. (2013). Coriander

- (*Coriandrum sativum* L.): A Potential Source of High-Value Components for Functional. *Foods and Nutraceuticals - A Review. Phytotherapy Research.*, 27(10), 1439–1456.
- Shabnum, S., & Wagay, M. G. (2011). Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research & Development*, 11, 83–94.
- Silva, Guillermo., Gutierrez, N. (2011). *Decimo segundo curso nacional de fabricación de quesos naturales.*
- Singh, S. & M. D. . (1999). Evaluation of the gastric antiulcer activity of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holy Basil). *Elsevier*, 13–19. Retrieved from <https://eurekamag.com/pdf/003/003133376.pdf>
- Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelman, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., Ragaert, P. (2017). Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chen.*
- Torres-Aguirre, G. A., Muñoz-Bernal, Ó. A., Álvarez-Parrilla, E., Núñez-Gastélum, J. A., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Laura, A. (2018). Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. *Revista TIP*, 21(2), 103–115.
- Usano-Aleman, Jaime., Palá-Paúl, Jesús., Diaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (BIOLOGIA)*, 7 (2), 60–70.
- Usano Aleman, J. (2012). *Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de Salvia lavandulifolia VAHL.* Retrieved from <https://eprints.ucm.es/16629/1/T33989.pdf>
- Van, Hekken., Farkye, N. (2003). Hispanic cheeses: The quest for queso. *Food Technology*, 57, 32–38.
- Vasquez, Oscar., Alva, Alenguer., Marreros, J. (2001). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1, 38–42.