



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



**FCA**  
FACULTAD DE  
CIENCIAS AGRARIAS

# **EFFECTO COMBINADO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EXTRACTO DE AJO, EN LA CONSERVACIÓN DE HAMBURGUESAS DE CARNE VACUNA REFRIGERADA**

**CASTILLO MARÍA PAULA**

TESIS DE GRADO PARA LA LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA  
Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.  
Mendoza, abril de 2017

Mendoza, abril de 2017.

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

EFFECTO COMBINADO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EXTRACTO DE AJO, EN LA  
CONSERVACIÓN DE HAMBURGUESAS DE CARNE VACUNA REFRIGERADA.

Castillo, María Paula

San Martín 5962, Carrodilla, Luján de cuyo, Mendoza, Argentina. CP: 5505.

[pau\\_239@hotmail.com](mailto:pau_239@hotmail.com). 4965723. 156397601.

Comisión de Tesis de Licenciatura en Bromatología:

-Ing. Agr. Lucía Vignoni

-Dra. Lic. Brom. Viviana Guinle

-Ing. Qco. Armando Navarro

Comisión Asesora de Tesis:

-Directora de tesis: Dra. Lic. Brom. Claudia Miriam Amadio

-Co directora de tesis: Bioq. Silvina Farrando

-Colaboradora: Dra. Lic. Brom. Alejandra Camargo

Tribunal Evaluador de Tesis:

-Presidente: Ing. Agr. Graciela RODRIGUEZ

-Vocales: Lic Brom. Nora MARTINENGO, Lic Brom. Alicia STOCCO

-Suplente: Ing. Agr. Cora DEDIOL

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a toda la gente que me motivó a terminar este trabajo, a mis amigos y a mi familia que confiaron en mí porque sabían que podía lograrlo. En especial le dedico este trabajo a mi mamá Patricia, que con su ejemplo me demostró lo bueno que es superarse a uno mismo y que siempre se puede aprender algo más.

Le doy gracias a mis compañeros de trabajo que me apoyaron y un especial agradecimiento a mi directora Claudia, que me ayudó desde el primer día a concretar este proyecto.

## RESUMEN

El uso de aceites esenciales como conservantes naturales cobra especial importancia en la industria alimentaria, ya que estos compuestos son reconocidos como seguros (GRAS) para ser usados en forma intencionada en alimentos. Los aceites esenciales de orégano y ajo constituyen una alternativa como potenciales agentes antioxidantes y antimicrobianos prolongando la vida útil de los alimentos. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar *in vitro* y en hamburguesas de carne vacuna las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del uso combinado de aceite esencial de orégano variedad Alpha Sumaj (AEO) y de ajo blanco subvariedad Plata (EA), producidos en Mendoza, Argentina. Se determinó: a) la actividad antioxidante *in vitro* de la mezcla de AEO y EA mediante el secuestro de radicales libres; b) la actividad biocida *in vitro* de los mismos sobre 9 cepas de bacterias alterantes y patógenas y en 2 cepas de hongos; c) análisis sensorial de las hamburguesas adicionadas con la mezcla de ambos extractos y refrigeradas y d) estudios de almacenaje para evaluar cambios químicos, sensoriales y microbiológicos.

La actividad antioxidante de la mezcla no se pudo medir debido a la formación de un precipitado en las muestras. Los análisis microbiológicos *in vitro* pusieron en evidencia un efecto sinérgico al combinar ambos extractos para la mayoría de las bacterias, excepto para *Pseudomonas* que resultó ser antagonico. Con respecto a la actividad antimicótica, el aceite de orégano ejerció efecto inhibitor del crecimiento micelial, mientras que el de ajo no.

Jueces expertos de la Facultad de Ciencias Agrarias eligieron por consenso utilizar una combinación de 0,8 % de EA + 150 mg.kg<sup>-1</sup> de AEO en las hamburguesas y 1 % de NaCl.

Para evaluar la vida útil se formaron 5 lotes de hamburguesas: al primero se le adicionó 150 mg.kg<sup>-1</sup> de AEO, al segundo 8 % de EA, al tercero la combinación de 150 mg.kg<sup>-1</sup> de AEO y 8 % de EA, al cuarto 200 mg.kg<sup>-1</sup> de terbutil hidroquinona (TBHQ) y las restantes sin ningún agregado sirvieron de control. A continuación se almacenaron crudas a 4 °C durante 9 días.

El valor de TBA en la muestra control aumenta con el tiempo, mientras que las muestras con TBHQ y AEO fueron significativamente menores todos los días de almacenamiento y no mostraron diferencias entre ellas. Tanto el EA como su combinación con AEO actuaron como potentes prooxidantes. El valor de pH sube hasta el día 6 y luego se mantiene sin diferencias significativas para todos los tratamientos excepto los que contienen EA, que disminuyen. Con respecto al color, el agregado de antioxidantes como el de extractos no modificó significativamente el valor de luminosidad (L\*). Las muestras con EA y su combinación con AEO disminuyen significativamente el valor de a\*(± rojo - verde) con respecto a las hamburguesas control, desde el primer día, indicando que su adición influye en el color rojo de las muestras. Las hamburguesas con EA y su combinación con AEO presentaron los valores más altos de b\*(± amarillo - azul). La adición de AEO redujo en general la actividad microbiana de las hamburguesas hasta el día 3, mientras que el agregado de EA (8 %) y su combinación con AEO redujeron significativamente la presencia de las bacterias estudiadas extendiendo la conservación de las hamburguesas hasta 6 días.

Los resultados sugieren que la mezcla de EA+AEO, a través de sus propiedades combinadas son potencialmente útiles en la preservación de los productos cárnicos. Los resultados del análisis de sensorial, indicaron las ventajas en el uso de estos extractos en los productos cárnicos que son susceptibles al enranciamiento.

Palabras Clave: orégano, ajo, aceites esenciales, antioxidantes, hamburguesas.

## INDICE GENERAL

1.1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
	Objetivo General: .....	3
	Objetivos Particulares: .....	3
	Hipótesis.....	3
CAPITULO 2 .....		4
OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS .....		4
2.1	ESPECIAS .....	4
2.2	AJO.....	4
2.3	ORÉGANO .....	5
2.4	EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.....	6
2.5	PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS .....	6
2.6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.6.1	OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.....	8
2.6.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE AJO.....	9
2.6.3	RENDIMIENTO .....	10
2.6.4	CAPACIDAD DE SECUESTRO DE RADICALES LIBRES .....	10
2.6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	10
2.7	RESULTADOS .....	11
2.7.1	RENDIMIENTO.....	11
2.7.2	CAPACIDAD DE SECUESTRO DE RADICALES LIBRES .....	11
2.8	CONCLUSIONES.....	11
CAPITULO 3 .....		12
EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO, EL EXTRACTO DE AJO Y SU COMBINACIÓN .....		12
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1.1	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “IN VITRO” .....	12
3.1.2	ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA “IN VITRO”.....	13
3.1.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE “IN VITRO” .....	13
3.1.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	13
3.2	RESULTADOS .....	13
3.2.1	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “IN VITRO” .....	13
3.2.2	ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA “IN VITRO”.....	14
3.2.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE “IN VITRO”.....	15
3.3	CONCLUSIONES.....	15
CAPITULO 4 .....		16
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE LA COMBINACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EL EXTRACTO DE AJO EN HAMBURGUESAS DE CARNE VACUNA.....		16
4.1	HAMBURGUESAS DE CARNE VACUNA REFRIGERADAS.....	16
4.2	RANCIDEZ .....	16
4.3	ANTIOXIDANTES .....	17
4.4	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PRODUCTOS CÁRNICOS.....	19
4.5	ALTERACION MICROBIANA DE LA CARNE.....	20
4.6	EVALUACION ORGANOLEPTICA DE LA CARNE.....	20
4.7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21

4.7.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÁXIMA DEL USO COMBINADO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EXTRACTO DE AJO.....	21
4.7.2 ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y MICROBIOLÓGICAS EN HAMBURGUESAS .....	22
4.8 RESULTADOS.....	23
4.8.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÁXIMA DEL USO COMBINADO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EXTRACTO DE AJO.....	23
4.8.2 ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y MICROBIOLÓGICAS EN HAMBURGUESAS .....	24
4.9 CONCLUSIONES.....	32
CAPITULO 5 .....	33
CONCLUSIONES GENERALES .....	33
ANEXOS .....	34
BIBLIOGRAFIA.....	48

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura química de los principales constituyentes de los aceites esenciales.....	7
Figura 2. Equipamiento usado en la destilación de orégano.....	8
Figura 3. Métodos para la extracción del aceite esencial de ajo.....	9
Figura 4. Estructura química de los antioxidantes naturales.....	18
Figura 5. Estructura química de los antioxidantes sintéticos.....	19
Figura 6: Ordenamiento por preferencia.....	24
Figura 7: Escalahedónica.....	24
Figura 8: Evolución del pH de hamburguesas almacenadas a 4 °C.....	25
Figura 9: Evolución del TBARs en hamburguesas almacenadas a 4 °C.....	26
Figura 10: Evolución de L* en hamburguesas almacenadas a 4 °C.....	27
Figura 11: Evolución de a* en hamburguesas almacenadas a 4 °C.....	28
Figura 12. Evolución de b* en hamburguesas almacenadas a 4°C.....	29
Figura 13: Recuento de coliformes totales en hamburguesas almacenadas a 4°C.....	30
Figura 14: Recuento de levaduras y hongos en hamburguesas almacenadas a 4 °C.....	31
Figura 15: Recuento de bacterias psicrótrofas en hamburguesas almacenadas a 4 °C.....	31
Figura 16: Modelo de planilla usada para la evaluación sensorial de las hamburguesas de carne vacuna.....	37
Tabla 1: Capacidad de secuestro de radicales libres en distintas muestras de extracto acuoso de ajo.....	11
Tabla 2: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano AEO, del Extracto de ajo (EA) y su combinación (AEO+EA).....	14
Tabla 3: Prueba de ADEVA correspondiente al porcentaje de secuestro de radicales libres según el extracto de ajo.....	35
Tabla 4: Prueba de Tukey correspondiente al porcentaje de secuestro de radicales libres según el extracto de ajo.....	35
Tabla 5: Prueba de ADEVA correspondiente al efecto antibacteriano in vitro del AE, AEO y su combinación sobre el tipo de bacteria estudiada.....	36
Tabla 6: Prueba de Tukey correspondiente al efecto antibacteriano in vitro del AE, AEO y su combinación.....	36
Tabla 7: Prueba de Tukey correspondiente al efecto antibacteriano in vitro según el tipo de bacteria.....	36
Tabla 8: Prueba de Friedman correspondiente a la distribución porcentual de la prueba de ordenamiento por preferencia.....	38
Tabla 9: Prueba de Friedman correspondiente a la distribución porcentual de la escala hedónica.....	38

Tabla 10: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del pH en hamburguesas según día y tratamiento.....	39
Tabla 11: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del pH en hamburguesas según día.....	39
Tabla 12: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del pH en hamburguesas según tratamiento.....	39
Tabla 13: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del TBARs en hamburguesas según día y tratamiento.....	40
Tabla 14: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del TBARs en hamburguesas según día.....	40
Tabla 15: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del TBARs en hamburguesas según tratamiento.....	40
Tabla 16: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del color L* en hamburguesas según día y tratamiento.....	41
Tabla 17: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color L* en hamburguesas según día.....	41
Tabla 18: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color L* en hamburguesas según tratamiento.....	41
Tabla 19: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del color a* en hamburguesas según día y tratamiento.....	42
Tabla 20: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color a* en hamburguesas según día.....	42
Tabla 21: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color a* en hamburguesas según tratamiento.....	42
Tabla 22: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del color b* en hamburguesas según día y tratamiento.....	43
Tabla 23: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color b* en hamburguesas según día.....	43
Tabla 24: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color b* en hamburguesas según tratamiento.....	43
Tabla 25: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de coliformes totales en hamburguesas según día y tratamiento.....	44
Tabla 26: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes totales en hamburguesas según día.....	44
Tabla 27: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes totales en hamburguesas según tratamiento.....	45
Tabla 28: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de coliformes fecales en hamburguesas según día y tratamiento.....	45
Tabla 29: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes fecales en hamburguesas según día.....	45

Tabla 30: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes fecales en hamburguesas según tratamiento.....	46
Tabla 31: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de levaduras y hongos en hamburguesas según día y tratamiento.....	46
Tabla 32: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de levaduras y hongos en hamburguesas según día.....	46
Tabla 33: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de levaduras y hongos en hamburguesas según tratamiento.....	47
Tabla 34: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de bacterias psicrófilas en hamburguesas según día y tratamiento.....	47
Tabla 35: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de bacterias psicrófilas en hamburguesas según día.....	47
Tabla 36: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de bacterias psicrófilas en hamburguesas según tratamiento.....	47

# CAPITULO 1

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La creciente demanda, por parte de los consumidores, de productos seguros y naturales sin conservantes químicos, ha dado lugar a una investigación exhaustiva sobre las técnicas de conservación, tendientes a mejorar la calidad microbiana y la seguridad de los productos, manteniendo las propiedades nutritivas y organolépticas del mismo.

Particularmente se ha incrementado el consumo de productos cárneos mínimamente procesados, y listos para consumir, prefiriéndose aquellos que contienen ingredientes naturales u orgánicos sin conservantes artificiales que no desencadenan alergias o sensibilidad (Mariutti y col., 2011).

Entre los procesos de deterioro asociados a la conservación de la carne fresca se encuentran la oxidación lipídica, la cual provoca la aparición de olores y sabores desagradables y la alteración del color, produciendo en general una reducción de la calidad organoléptica del producto. Así mismo dan lugar a una disminución del valor nutritivo de la carne y la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud, relacionados con el riesgo de padecer diversas patologías (Armenteros y col., 2012). Además, la carne es un buen sustrato para el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, por tener elevada actividad de agua (cercana a 1) y ser fuente de proteínas, lípidos, diversos componentes solubles de bajo peso molecular, vitaminas, minerales y una pequeña concentración de carbohidratos (0 - 1,2 %). La contaminación puede producirse durante las operaciones de sacrificio, procesado y almacenamiento. Para retrasar todos estos procesos de alteración de la carne durante estas fases se utiliza la refrigeración (Signorini, 2007).

Para preservar a los ácidos grasos poliinsaturados del deterioro oxidativo, se utilizan antioxidantes. Por su bajo costo, alta estabilidad y efectividad, los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP) y tercbutilhidroxiquinona (TBQH) son mayormente usados para tal fin. Debido a los efectos tóxicos y cancerígenos en la salud humana, la tendencia actual de los consumidores es rechazar el uso de aditivos sintéticos y demandar alimentos naturales y rápidos de preparar (Bandoniere y col., 2002).

En años recientes se han estudiado muchos vegetales y sus aceites esenciales como fuentes de antioxidantes naturales y conservantes. En este sentido, el uso alternativo de los recursos naturales, ha recibido cada vez más atención, principalmente debido a que muchos de estos productos tienen propiedades funcionales adicionales (Sánchez y col., 2011). En este contexto los aceites esenciales (AE) han ido ganando interés, debido a sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales y antifúngicas (Burt, 2004; Petrou y col., 2012) y porque son sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS), teniendo una amplia aceptación por los consumidores (Gutierrez y col., 2009). Su efecto es debido, principalmente, a su contenido en compuestos fenólicos y organosulfurados (Pezeshk y col., 2011).

En carnes y productos cárnicos, los AE de orégano, romero, tomillo, clavo, ajo, jengibre, cilantro y albahaca han demostrado un gran potencial de ser utilizados como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Dzudie, y col., 2004; Solomakos y col., 2008; Barbosa y col., 2009; Fratianni y col., 2010; Govaris y col., 2010; Ranjan y col., 2012; Bonilla y col., 2014; Chan y col., 2014).

Aunque los estudios *in vitro* avalan estas propiedades funcionales se ha encontrado que, generalmente, es necesaria una mayor concentración para lograr el mismo efecto en los alimentos, pudiendo alterar el sabor de los mismos y superar el límite aceptado por los consumidores (Lv y col., 2011). Debido a que los AE son mezclas de distintos componentes, una de las alternativas para lograr el efecto de conservación deseado a concentraciones más bajas, es

utilizar combinaciones de distintos extractos de plantas y así aumentar su bioactividad (Bassolé y Juliani, 2012).

Numerosas especies como el ajo, la cebolla, la menta, el anís, la albahaca, el cilantro, la canela, y el orégano han sido usadas como saborizantes y posteriormente reconocidas por su potencial antimicrobiano y antioxidante. Dentro de estas especies se destaca el orégano por su uso como antiespasmódico, antifúngico, anticoccidial y antibacteriano, debido a la presencia en sus hojas de p-cimeno y los derivados fenólicos carvacrol y timol (Vásques y col., 2014). Por otro lado el ajo se ha utilizado desde la antigüedad como una medicina por tener propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Sus principales constituyentes bioactivos son los compuestos organoazufrados y los fenólicos (Lanzotti, 2006; Camargo y col., 2007).

Si bien el orégano tiene su origen en la cuenca del Mediterráneo, su cultivo se encuentra extendido por todo el mundo. En Argentina, es la especia más importante tanto por su consumo como por su cultivo, siendo los principales centros de producción las provincias de Mendoza con 50 %, Córdoba 25 % y San Juan 15 % (Potaschner y Bauzá 2009).

Considerando además que el ajo (*Allium sativum* L.) es uno de los cultivos de hortalizas de mayor importancia económica en la provincia de Mendoza (Filippini, 2012), es que se propone a estas dos especies como objeto de estudio, con el fin de obtener un producto de calidad diferenciada y evaluar sus cualidades antioxidantes y conservantes.

Desde 1994, en la F.C.A. - U.N.Cuyo se están desarrollando estudios sobre la tecnología de obtención y conservación de los principios activos de distintas especies y su aplicación en alimentos para prolongar la vida útil o disminuir la adición de cloruro de sodio (Amadio y col., 1997; Gascón, 1999; Medina y col., 2003; Dupertuis y col., 2004; Medina y col., 2004a; Medina y col., 2004b; Zimmermann, y col., 2004; Dupertuis y col., 2005; Zimmermann, 2005; Zimmermann, 2006; Amadio y col., 2006; Manini y col., 2007; Miralles y col., 2007; Dupertuis y col., 2010; Amadio y col., 2011, Medina y col., 2011). Durante estos años, se ha evaluado la adición a distintos alimentos, de AE de plantas cultivadas y nativas de Mendoza (orégano criollo, compacto, mendocino y cordobés o tomillo del cerro), de extractos de hojas y de escobajos de vid, de ajo en polvo y vino tinto de vides Cavernet sauvignon obtenidas bajo diferentes condiciones. De todos los ensayos realizados, se destaca por sus propiedades antioxidantes y conservantes el AE de tomillo del cerro o *Acantholippia seriphoides* y por sus propiedades antioxidantes el orégano criollo u *Origanum x applii* (Medina y col., 2003).

Las propiedades antioxidantes y conservantes del aceite esencial de orégano cultivado en la provincia de Mendoza han sido estudiadas (Amadio, 2013). Al incorporarlo en hamburguesas de carne, en una dosis de 300 mg.kg<sup>-1</sup> resultó ser muy buen antioxidante y actuó frente a mohos y levaduras, pero su efecto contra las bacterias psicrófilas fue escaso. Con respecto al ajo cultivado en Mendoza se han evaluado las propiedades antibacterianas del ajo crudo y compuestos individuales frente a cepas alterantes y patógenas de alimentos (Farrando, 2012) y actividades fungitóxicas de extractos de ajo y compuestos organoazufrados frente a *Aspergillus flavus* y *Sclerotium cepivorum* (Tarquini y col., 2008; 2011), encontrándose resultados satisfactorios.

Por todo lo expuesto, se propone estudiar las propiedades saborizantes, conservantes y antioxidantes del aceite esencial de orégano en combinación con extractos de ajo en hamburguesas de carne vacuna, con el fin de prolongar su vida útil y limitar o evitar la incorporación de productos sintéticos.

## **1.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### ***Objetivo General:***

Evaluar el efecto combinado del aceite esencial de orégano y extracto de ajo, en la extensión de la vida útil de hamburguesas de carne vacuna refrigerada.

### ***Objetivos Particulares:***

- Evaluar el efecto de la adición de distintas concentraciones de aceite esencial de orégano y extracto de ajo sobre el sabor y la aceptabilidad de hamburguesas de carne vacuna, almacenadas en refrigeración.
- Valorar la actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro*, de la combinación de aceite esencial de orégano y de ajo.
- Determinar el potencial efecto antioxidante y antibacteriano de la combinación de aceite esencial de orégano y ajo en hamburguesas de carne vacuna almacenadas bajo refrigeración.
- Valorar la evolución del pH y color consecuente al empleo de la combinación de aceite esencial de orégano y ajo, durante su almacenamiento bajo refrigeración.

### ***Hipótesis***

- El uso combinado de aceite esencial de orégano y extracto de ajo aumenta la vida útil de las hamburguesas de carne vacuna refrigeradas.

## CAPITULO 2

### OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

#### 2.1 ESPECIAS

Las especias conforman un grupo de especies vegetales que se caracterizan por su contenido de sustancias aromáticas, sápidas, colorantes o excitantes que se encuentran en distintos órganos, tales como frutos (pimiento, pimienta negra), bulbos (ajo, cebolla), hojas (orégano, romero, tomillo), flores (clavo de olor), rizomas (jengibre) y otras. Sus aplicaciones son muy amplias e incluyen desde el uso culinario hasta la extracción de moléculas aromáticas para integrar una gama variada de productos como por ejemplo, ser parte de la composición de repelentes de insectos o productos de limpieza.

Los componentes de las especias forman parte de gran variedad de productos incorporados a la vida cotidiana, por lo que amplían en forma permanente su horizonte de aplicaciones en distintas actividades industriales. Con respecto a los alimentos las especias pueden ser adicionadas de diversas formas (enteras, trituradas, secas, pastas, infusiones, extractos aislados, etc.) y con distintos objetivos, por ejemplo, aderezar o mejorar el aroma, sabor y color de los alimentos y bebidas. En algunos casos, además pueden aportar propiedades antioxidantes y sirven para preservar el producto. El agregado de especias colabora con la generación del sabor distintivo de un producto, entendiéndose como tal al complejo conjunto de propiedades olfativas y gustativas percibidas en la degustación, que pueden estar influenciadas por propiedades táctiles y térmicas.

#### 2.2 AJO

El ajo, *Allium sativum* L, es de origen asiático (antiguo Turkeistán, límite con China, Afganistán e Irán), desde donde se extendió a China e India, hacia el este y el norte de Europa y el Mediterráneo hacia el Oeste. Su nombre latino (ajo, alho, ail, aglio, all, allo), proviene del vocablo celta all que significa fuerte, ardiente e incendiario, mientras que el nombre anglosajón (garlic), proviene de los vocablos gar atravesar y leac (olla, marmita), que probablemente están vinculados con el poder de su aroma.



Posee numerosas propiedades terapéuticas y nutricionales que contribuyen a la calidad de este alimento. Entre los principales beneficios para la salud se destacan sus propiedades antitóxicas, antihipertensivas, anticoagulantes, antirreumáticas y antioxidantes. También se le atribuyen beneficios médicos para problemas cardiovasculares, enfermedades infecciosas, cáncer y colesterol.

Actualmente, el ajo se ha consolidado como una de las principales hortalizas exportables de la Argentina, lo que ha permitido ubicar al país como el segundo exportador a nivel mundial, después de China y uno de los principales productores. Más del 85 % de las hectáreas cultivadas se encuentran en la región de Cuyo (Mendoza y San Juan), seguida en importancia por Córdoba y Buenos Aires.

El mercado internacional del ajo argentino está compuesto por más de 30 países, sin embargo sólo Brasil, Francia y EE.UU. importan más del 80 %.

La industria nacional produce pequeños volúmenes de ajos deshidratados, en pasta, pelados, trozados, y extractos oleosos, acuosos y alcohólicos.

Dentro del país, Mendoza es la principal provincia productora de Ajo, ya que con sus 8.666 hectáreas representa más del 75 % de la superficie nacional. Existen 6 departamentos que concentran el 81,4 % de la superficie total provincial implantada: Maipú, Tupungato, San Carlos, Luján de Cuyo, Lavalle y San Martín. (Censo Nacional Agropecuario 2000 (INDEC))

Actualmente en el mercado se comercializan los siguientes tipos comerciales de ajo, que son denominaciones vulgares, reconocidas internacionalmente, fundamentalmente asociadas al color de las hojas de protección de los bulbillos o excepcionalmente la de los bulbos: Ajo “rosado”, Ajo “morado”, Ajo “violeta”, Ajo “blanco”, Ajo “colorado” y Ajo “castaño”:

### 2.3 ORÉGANO

El orégano (*Origanum vulgare*) es originario de la zona de Turquía siendo ampliamente difundido, es consumido y cultivado en diferentes latitudes del mundo. Comercialmente se conocen bajo la forma de orégano varias especies, entendiéndose que bajo este carácter se considera principalmente su aroma y sabor. De ahí que en el mercado existen varios tipos, predominando el orégano Europeo (*Origanum vulgare*).



El orégano fue utilizado por su acción farmacológica a nivel interno como tónico general, digestivo, espasmolítico, carminativo, expectorante, antiséptico de las vías respiratorias y emenagogo; a nivel externo actúa como analgésico, cicatrizante y antiséptico.

Sus hojas son utilizadas como condimento, dando sabor a salsas, adobos y aromatizando comidas tradicionales.

En menor escala se usa en licorería y la esencia que se obtiene por medio de la destilación de toda la planta se distribuye en la industria farmacéutica, en perfumería y en determinados tipos de jabones.

Es una de las principales hierbas aromáticas cultivadas que se produce en el país, con unas 600 hectáreas sembradas. Los principales centros de producción son las provincias de Mendoza con 50 %, Córdoba 25 %, San Juan 15 %. Existen pequeñas producciones en casi todo el país, pero es importante destacar que los mejores rendimientos y aromas se obtienen en el centro oeste y noroeste del país.

En Argentina el orégano que se comercializa es reconocido como *Origanum vulgare ssp vulgare*, *Origanum vulgare ssp virens* además de los híbridos de los dos primeros con *Origanum mejorana*, denominados *Origanum x applii* y *Origanum x majoricum* respectivamente (Mariotti 2013).

Con el objetivo de contribuir a agregarle valor al cultivo y convertirlo en una herramienta de diferenciación para mejorar la rentabilidad de los negocios, el INTA y la Universidad de Córdoba

desarrollaron tres variedades de orégano: Don Bastías, Alpa Sumaj y Aguanda que se suman a los anteriores.

La esencia o aceite esencial es un líquido de color amarillo a pardo. Se obtiene de las flores de la planta, por lo que debe ser cosechada en plena floración para asegurar un rendimiento adecuado.

La composición química es variable dependiendo del tipo de planta que se cultiva. Contiene diversos compuestos químicos, principalmente carvacrol y timol y en menor proporción se encuentran fenoles, pinemo y ciremo como también sesquiterpenos y alfa-thuyona, dipenteno, alfa-terpineno y otros.

## ***2.4 EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS***

La selección del procedimiento adecuado de extracción se relaciona con el tipo de compuesto a ser extraído, ya que puede incrementar la concentración relativa de compuestos antioxidantes provenientes de las plantas (Suhaj, 2006).

Con referencia a los extractivos obtenidos de plantas aromáticas, pueden ser: aceites esenciales, resinoides, concretos, absolutos, extractos crudos o purificados, oleorresinas, exudados naturales (bálsamos y resinas), etc

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos y volátiles extraídos de material vegetal, como de flores, raíces, cortezas, hojas, semillas, cáscara, frutas, madera y de la planta entera. Son considerados como metabolitos secundarios, importantes para la defensa de la planta, ya que a menudo poseen propiedades antimicrobianas.

La extracción de los aceites esenciales se realiza por diversos métodos. Uno de los más usados debido a su alto rendimiento, pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada, es el de extracción por arrastre de vapor (Moreno y col., 2010). En él la parte de la planta que contiene al aceite esencial se pone en contacto directo con vapor. El vapor arrastra al aceite y luego se condensa. Los componentes volátiles son recolectados en agua, y separados por diferencia de densidad. Una variante de lo anterior es la hidrodestilación, la cual consiste en llevar a ebullición una mezcla de agua y material vegetal aromático y condensar directamente los vapores generados. Otros métodos emplean solventes volátiles, expresión, enfleurage, extracción por microondas y flúidos supercríticos. (Moreno y col., 2010).

Con respecto a los extractos, éstos se obtienen con solventes como el agua, glicoles, alcoholes o mezclas de éstos. El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente, utilizándose generalmente la agitación. Posterior a este paso, la mezcla es filtrada.

El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos variados. También depende del solvente empleado para extraer una parte vegetal definida.

## ***2.5 PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS***

Las plantas producen una variedad de compuestos con actividad antimicrobiana. Algunos están siempre presentes mientras que otros se producen en respuesta a la invasión microbiana o lesiones físicas. La identificación de los compuestos antimicrobianos más activos de aceites esenciales es difícil porque dichos aceites son mezclas complejas de hasta 45 componentes diferentes. Así mismo la composición de un aceite esencial particular puede variar dependiendo de la temporada de cosecha, y los métodos utilizados para extraer el aceite. (Morten y col., 2012)

Están compuestos por diversas sustancias orgánicas de bajo peso molecular con grandes diferencias en la actividad antimicrobiana. Los compuestos activos se pueden dividir en cuatro grupos según su estructura química: terpenos, terpenoides, fenilpropenos, y otros. En la figura 1 se pueden observar dichas estructuras químicas que conforman los principales constituyentes como compuestos activos de los aceites esenciales.

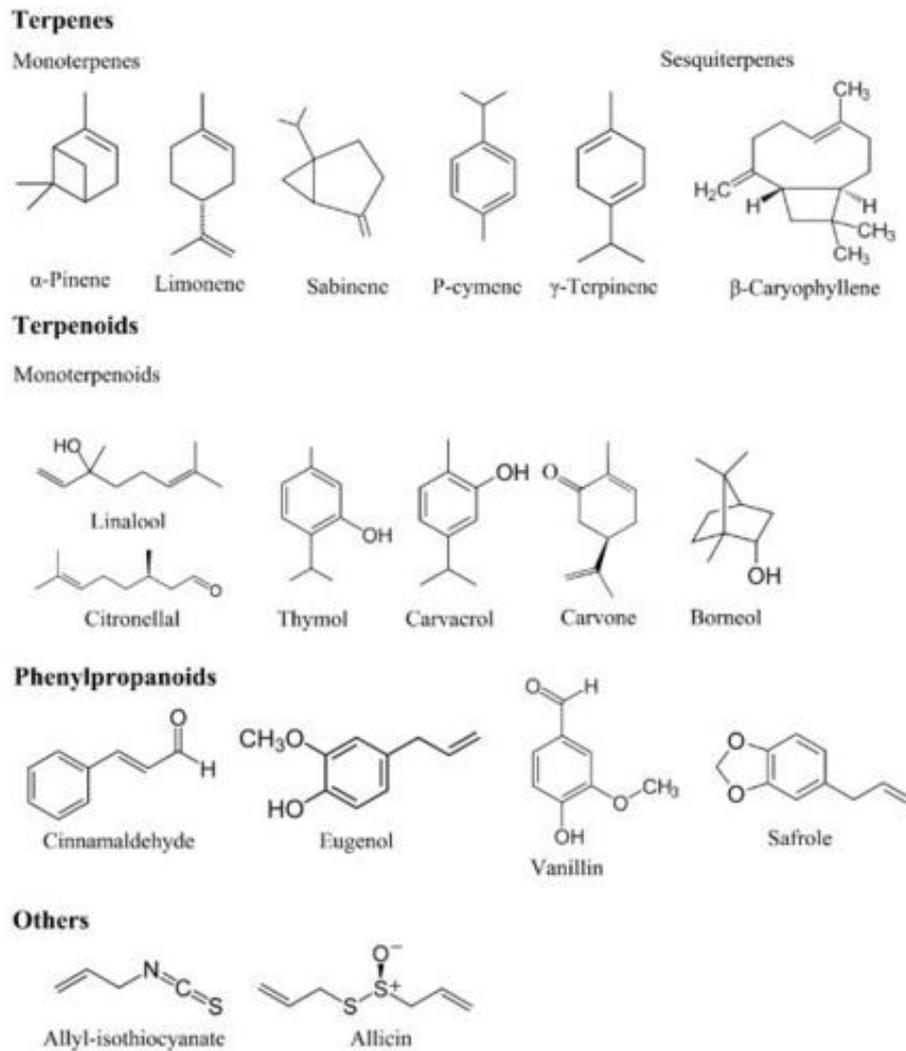


Figura 1. Estructura química de los principales constituyentes de los aceites esenciales.

En el caso específico del orégano, la acción antimicrobiana es debida a compuestos fenólicos, como el **timol** y **carvacrol**, los cuales interactúan con los fosfolípidos y proteínas de las membranas celulares, causándoles daños estructurales, funcionales y también dificultando la recuperación celular después de la exposición temporal. (Morten y col., 2012)

En los extractos de ajo, el compuesto activo es la **alicina** (dialiltiosulfinato). Dentro de los dientes de ajo, el aminoácido cisteína se convierte en aliina (S-alil-L-cisteína-S-óxido), un sulfóxido conocido sin actividad antimicrobiana. La conversión de aliina a la alicina antimicrobiana requiere la enzima alliinasa. Los estudios sugieren que la aliina y alliinasa se encuentran en dos compartimentos diferentes, y cuando se machacan los dientes de ajo, alliinasa entra en contacto con la aliina y produce alicina. La alicina tiene el olor acre típico del ajo y exhibe propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarios y antivirales. Los estudios demuestran que la alicina in vitro, tiene un gran potencial como conservante de alimentos, sin embargo, cuando se evaluó en matrices alimentarias, los resultados fueron contradictorios. (Morten y col., 2012)

Es importante entonces, mencionar que además de su actividad antimicrobiana, los aceites esenciales o extractos de plantas, poseen efecto antioxidante. En varios estudios, se ha demostrado que tanto extractos como aceites tienen alta estabilidad oxidativa, y esto es muy útil para retardar la oxidación en diversas matrices alimentarias (Tuğba y Medeni, 2012). En una investigación se comparó el poder antioxidante de diferentes extractos y aceites de plantas sobre la estabilidad oxidativa de diversos aceites comestibles. En todos los casos y también estableciendo comparaciones con antioxidantes sintéticos tales como el BHT y BHA, se demostró el efectivo poder de los extractos o aceites naturales contra la oxidación y estabilidad de los

aceites usados en frituras. En este trabajo, se analizó el efecto del orégano, utilizando las hojas y un extracto del mismo para su aplicación en aceite de fritura. Los resultados mostraron que ambos agregados podrían disminuir la formación de dienos conjugados, compuestos polares, triacilglicerol polimerizados, triacilglicerol diméricos, y el valor de p-anistidina del aceite de fritura. Al final del estudio, se determinó que el extracto de orégano fue más eficaz que la hoja sola, respecto a la estabilidad oxidativa del aceite. (Tuğba y Medeni, 2012)

En el ajo los compuestos que contienen azufre y sus precursores, han sido reportados como los principales responsables del efecto antioxidante que poseen (Kim y col., 1997; Lampe, 1999; Nuutila y col., 2003).

Por otra parte, algunos investigadores informaron que hay una relación entre las estructuras químicas de los compuestos más abundantes en las plantas y sus propiedades funcionales, mencionadas anteriormente. (Dean y Svoboda, 1989; Farag y col., 1989). Debido a que es probable que estos compuestos interactúen con el entorno, y además que la composición de los mismos puede variar de acuerdo a diversas condiciones, la investigación de su actividad en diferentes matrices alimentarias sigue siendo necesaria para su posterior aplicación con éxito en los alimentos.

## 2.6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.6.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

Se trabajó con las partes aéreas de plantas florecidas de una variedad monoclonal de orégano: Alpa Sumaj, cultivada en La Consulta, Mendoza (Estación Experimental INTA). Una vez cosechadas las plantas fueron secadas a temperatura ambiente y envasadas en bolsas de papel hasta su análisis.

El aceite esencial (AE) fue extraído por arrastre con vapor de agua en un destilador de vidrio de laboratorio (figura 2), el cual consta de un balón generador de vapor de 1000 ml, una columna de destilación donde se colocan 300 g de muestra seca y un refrigerante de bolas. El AE fue recolectado en una bureta graduada, que permitió medir el volumen, durante 40 minutos. El AE se conservó en recipientes de vidrio color caramelo bajo atmósfera inerte (N<sub>2</sub>) almacenados a  $4 \pm 2$  °C hasta sus análisis.

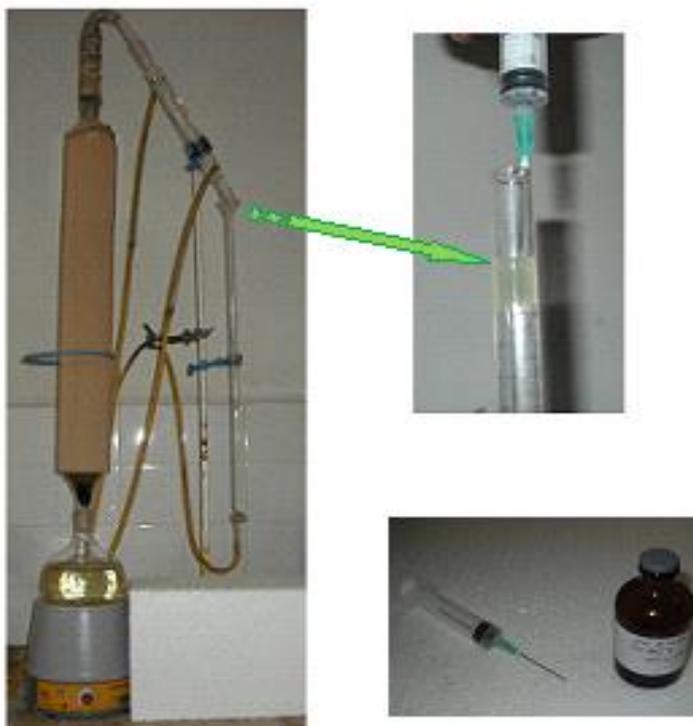


Figura 2. Equipamiento usado en la destilación de orégano.

## 2.6.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE AJO

Para la obtención de los extractos se empleó ajo variedad Plata.

Debido a la extensa bibliografía encontrada, se decidió probar distintos métodos de obtención tanto de aceites como de extractos y seleccionar según su rendimiento y capacidad de secuestro de radicales libres.

Los métodos ensayados fueron (figura 3):

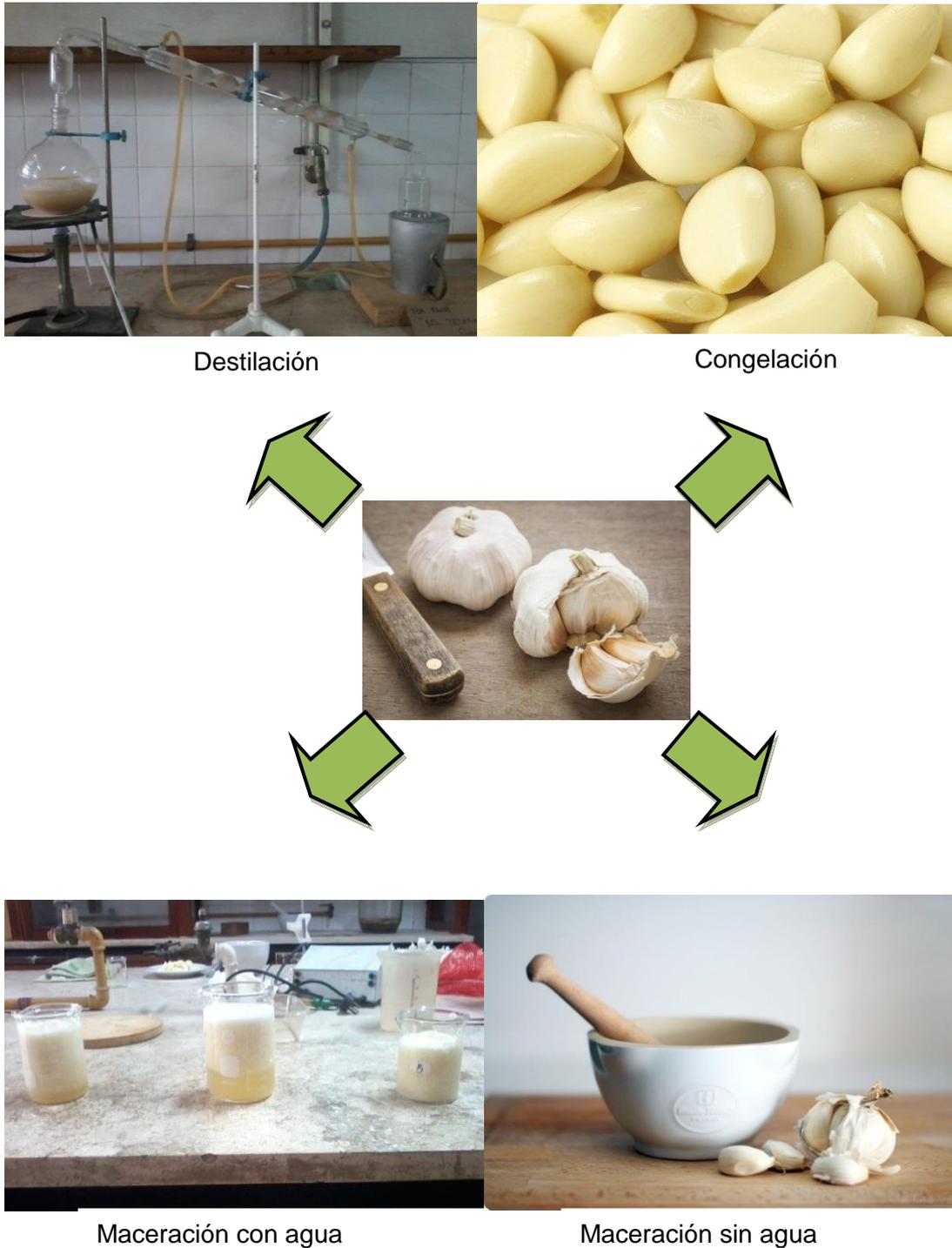


Figura 3. Métodos para la extracción del aceite esencial de ajo

*1-Aceite esencial* (Benkeblia, 2004): el aceite esencial se extrajo por hidrodestilación usando una unidad de destilación vertical de vapor. Una muestra de ajo de 100 g se cortó en pequeños trozos y se homogeneizó usando un mezclador doméstico, durante 1 minuto en la velocidad media, en 100 ml de agua destilada. Luego se maceró durante 1 hora.

Este método se desestimó debido a que la cantidad de aceite obtenida en el destilado fue insignificante.

#### *2-Extractos acuosos:*

2.1- Con mortero (Mukhtar y Ghori, 2012): 126 g de ajo limpio se homogeneizó con mortero, posteriormente se tamizó por tela de malla fina. Por este procedimiento casi no se obtuvo líquido por lo tanto se descartó.

#### 2.2- Maceración con agua:

2.2.1-Igual cantidad de agua y ajo (Irkin y Korukluoglu, 2007): 126 g de ajo pelado y limpio se procesó con igual volumen de agua, usando un procesador doméstico durante 1 minuto. La mezcla se filtró usando papel de filtro. Se obtuvieron 140 ml de extracto de ajo.

2.2.2-Doble cantidad de agua (Ugwu y Omale, 2011): se homogeneizó 126 g de ajo con 252 ml de agua destilada fría. La mezcla se filtró tres veces por tela de malla fina y posteriormente se centrifugó a 200 rpm durante 10 minutos. Se recogió un sobrenadante de 291 ml.

2.2.3-Doble cantidad de ajo (Amin y Kapadnis, 2005): se suspendió 126 g de ajo con 63 ml de agua y se homogeneizó con un procesador doméstico. Luego de media hora se filtró usando papel de filtro. Se obtuvieron 122 ml de extracto acuoso de ajo.

2.4-Congelando (Ziarlarimi, Irani, Gharahveysi, Rahmani, 2013): 126 g de ajo limpio se colocó en un recipiente plástico y se conservó en congelador a -20 °C durante 48 hs. Luego de descongelar por 30 minutos, el líquido obtenido por la rotura de las células se filtró. Por este método sólo se obtuvieron muy pocas gotas, por lo tanto se descartó su empleo.

Con el fin de seleccionar el método más adecuado para obtener el extracto de ajo, se realizaron las siguientes determinaciones:

### **2.6.3 RENDIMIENTO**

Se midieron los ml de extracto de ajo obtenido en relación a la cantidad de ajo y agua usados. Sólo se realizó en los siguientes extractos 2.2.1; 2.2.2 y 2.2.3.

### **2.6.4 CAPACIDAD DE SECUESTRO DE RADICALES LIBRES**

El secuestro de radicales libres se determinó en las muestras de extracto de ajo, usando 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical DPPH) siguiendo el método propuesto por Oktay y col., 2002. Se preparó una solución etanólica (0,01 mmol/l) de radical DPPH. A 10 ml de esta solución se le adicionó 3 ml de los extractos. Luego de 30 minutos se registró la absorbancia a 517 nm.

La actividad de secuestro de radicales libres se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad secuestrante (\%)} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

### **2.6.5 ANALISIS ESTADISTICO**

Las mediciones de la actividad antioxidante se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados por el análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias significativas entre medias se realizaron por Tukey con un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ .

## 2.7 RESULTADOS

### 2.7.1 RENDIMIENTO

El rendimiento de los extractos fue el siguiente:

Rendimiento 2.2.1=(126+126)/140=1.80

Rendimiento 2.2.2= (126+253)/ 291= 379/291= 1.30

Rendimiento 2.2.3= (126+63)/122=189/122= 1.55

El de mayor rendimiento fue el 2.2.1, seguido del 2.2.3 y 2.2.2.

### 2.7.2 CAPACIDAD DE SECUESTRO DE RADICALES LIBRES

La capacidad de secuestro de los extractos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Capacidad de secuestro de radicales libres en distintas muestras de extracto acuoso de ajo

EXTRACTO ACUOSO DE AJO	DPPH° (% de secuestro)
2.2.1	25b
2.2.2	10 a
2.2.3	61c

El extracto con doble cantidad de ajo presentó un valor significativamente ( $p<0,05$ ) mayor de % de secuestro radicales libres que los otros extractos. Ver anexo página 35.

## 2.8 CONCLUSIONES

De acuerdo al rendimiento y al secuestro de radicales libres de los extractos realizados se decidió seguir trabajando con el de doble cantidad de ajo, esperando que sea un extracto que actúe mejor frente a la oxidación lipídica.

## CAPITULO 3

### EVALUACIÓN IN VITRO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO, EL EXTRACTO DE AJO Y SU COMBINACIÓN

El uso de aceites esenciales como conservantes naturales cobra especial importancia en la industria alimenticia, ya que estos compuestos son reconocidos como seguros (GRAS) para ser usados en forma intencionada en alimentos. Los aceites esenciales de orégano y ajo constituyen una alternativa como potenciales agentes antioxidantes y antimicrobianos prolongando la vida útil de los alimentos.

Existen numerosos estudios realizados donde se demuestra la eficacia de los aceites esenciales *in vitro*, siendo frecuentemente mucho mayor este efecto que cuando se los incorpora en los alimentos (Nychas y col., 2013).

Con respecto a los aceites esenciales los más estudiados son los extractos del orégano, tomillo, romero, cilantro, cebolla y ajo. La efectividad de tales aceites se ha visto confirmada inhibiendo el crecimiento de diversos hongos y bacterias (Nychas, 1995).

Se ha encontrado que los aceites esenciales de especies de orégano presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae* y contra Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis, 2001).

Tienen además capacidad fungicida contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis galbrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*.

En ajo, muchos de los trabajos realizados sobre la actividad antimicrobiana, hacen referencia a su acción sobre bacterias patógenas, mohos micotoxigénicos y microorganismos deteriorativos. La alicina presente en el ajo, se muestra como bactericida tanto contra Gram negativas y Gram positivas: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*; impide el crecimiento de *S. aureus*, *B.cereus* aunque resulta ineficaz para *C. botulinum* (Beuchat y Golden, 1989).

Con respecto a la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y extractos de plantas, numerosos trabajos científicos avalan dichas propiedades *in vitro*. Lawrence, 2011 estudió la capacidad antioxidante del aceite esencial de ajo, Zimmermann, 2005, Amadio y col., 2006, 2011 han demostrado dicho efecto en el aceite esencial de orégano, entre otros.

#### 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon los aceites esenciales y extractos obtenidos en el Capítulo 2.

##### 3.1.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA "IN VITRO"

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo en la Cátedra de Microbiología Agrícola e Industrial, de la Facultad de Ciencias Agrarias, por el método de difusión en agar (Ponce, 2008).

El efecto inhibitor de los aceites esenciales y extractos obtenidos en el Capítulo 2 se determinó sobre bacterias patógenas transmitidas por alimentos, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* y alterantes *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli*, pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Un cultivo activo de cada cepa, se sembró, por triplicado, en cajas de Petri con agar Infusión Cerebro Corazón. Se realizó, en forma estéril, pocillos de 4 mm de diámetro, en los cuales se les agregó 20 µl de cada extracto y se incubó el sistema a 37 °C. Al cabo de 24 horas se midió el halo

de inhibición, con calibre, en milímetros. Según el diámetro las bacterias analizadas se agruparon, según Ponce (2008) en: no sensibles ( $d < 8$  mm), sensibles ( $9 \text{ mm} < d < 14$  mm), muy sensibles ( $14 \text{ mm} < d < 19$  mm) y extremadamente sensibles ( $d > 20$ mm).

### 3.1.2 ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA “IN VITRO”

Esta actividad se realizó en la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Se aislaron previamente hongos que se hallan normalmente en la flora microbiana de la carne molida. Los ensayos se realizaron con *Alternaria* sp. y *Thamnidium* sp

Se emplearon las siguientes técnicas:

-Método del pozo de agar: Se trabajó con placas de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 15 ml de Agar papa glucosado (APG) a pH 5,5 como medio de cultivo, previamente esterilizado. Se sembró un disco de 5 mm, del hongo en activo crecimiento y en el otro extremo de la placa se realizó un hoyo de 5 mm de diámetro donde se colocaron 10  $\mu$ l de los distintos compuestos a probar. Como testigo se utilizó agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a  $25 \pm 2$  °C y los ensayos se realizaron por triplicado.

-Método de estriado en superficie: Se trabajó con placas de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 15 ml de Agar papa glucosado (APG) a pH 5,5 como medio de cultivo, previamente esterilizado. Se sembró un disco del hongo de 5 mm en activo crecimiento y en el centro de la placa previo estriado de 10  $\mu$ l de los distintos compuestos a probar. Como testigo se utilizó agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a  $25 \pm 2$  °C, y los ensayos se realizaron por triplicado.

En ambos métodos, como datos se consideró el crecimiento micelial diario hasta que el testigo cubriera la placa de Petri.

### 3.1.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE “IN VITRO”

Se midió la capacidad de secuestro de radicales libres. El secuestro de radicales libres se determinó en las muestras de extracto de ajo, usando 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (radical DPPH) siguiendo el método propuesto por Oktay y col., 2002. Se preparó una solución etanólica (0,01 mmol/l) de radical DPPH. A 10 ml de esta solución se le adicionó 3 ml de los extractos. Luego de 30 minutos se leyó la absorbancia a 517 nm.

La actividad de secuestro de radicales libres se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad secuestrante (\%)} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

### 3.1.4 ANALISIS ESTADISTICO

En el caso de la actividad antibacteriana, cada parámetro fue testado por triplicado. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE analizados por el análisis de la varianza (ANOVA).

La actividad antimicótica se realizó por triplicado y los datos fueron analizados por el ANOVA. Las diferencias significativas entre medias se realizaron por Tukey con un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ .

Las mediciones de la actividad antioxidante se realizaron por triplicado.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “IN VITRO”

Los resultados de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano AEO, del Extracto de ajo (EA) y su combinación (AEO+EA)

Microorganismo	AEO	EA	AEO+EA	Aumento del área de la inhibición en comparación con el área teórica
	diámetro (mm)	diámetro (mm)	diámetro (mm)	(%)
<i>Enterococcus</i>	14,0±3,4cd	22,0±6cd	25,0±0,0cd	38,8
<i>Escherichia coli</i>	14,7±0,6bc	16,0±0,0bc	16,7±0,6bc	8,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,0±1,0 d	30,7±0,6d	30,3±0,6d	24,4
<i>Salmonella</i>	11,0±1,7bc	16,7±0,6bc	18,0±0,0bc	30
<i>Bacillus cereus</i>	14,3±1,5d	29,6±0,6d	31,3±0,6d	42,6
<i>Lactobacillus</i>	10,6±1,2ab	10,0±0,0ab	10,0±0,0ab	-2,9
<i>E. coli</i> O157:H7	15,0±0,0bcd	19,7±0,6bcd	20,0±0bcd	15,2
<i>Pseudomonas</i>	6,0±0,0a	5,7±0,6a	5,7±0,0a	-2,6
<i>Campylobacter</i>	15,3±3,1bcd	19,7±0,6bcd	19,7±0,6bcd	12,6

Medias con letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ( $P=0.05$ ).

	no sensibles		muy sensibles
	sensibles		extremadamente sensibles

Tanto el AEO, el EA y su combinación, presentaron halos de inhibición frente a las bacterias patógenas Gram negativas (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* comensal y la O157:H7) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Bacillus cereus* y *Lactobacillus*). *Pseudomonas* fue calificada como no sensible para las tres variables ensayadas. Ver anexo página 36.

El extracto de ajo y su combinación, actuaron especialmente contra Gram positivas.

El aceite esencial de orégano mostró una actividad moderada para las cepas probadas, con zonas de inhibición menores a 18 mm.

En general, las bacterias Gram positivas son más sensibles a la presencia de los extractos de especias y hierbas que las bacterias Gram negativas. Esto se debe, probablemente, a que las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa como parte de su pared celular, lo que restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través de su lipopolisacárido de cubierta (Fei y col., 2011).

El efecto de la mezcla de AEO y EA fue medido, comparando el área de inhibición experimental de la mezcla de extractos con el área teórica (calculada como la  $\frac{1}{2}$  de la zona de inhibición del AEO+ la  $\frac{1}{2}$  de la zona de inhibición del EA) (Kon y Rai, 2012). Se observa un efecto sinérgico para la mayoría de las bacterias, salvo para *Lactobacillus* y *Pseudomonas* que resultó ser antagónico. El mayor efecto sinérgico se presentó en *Bacillus cereus*, aumentando un 42 % el halo de inhibición con respecto al teórico.

### 3.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA "IN VITRO"

Bajo las condiciones experimentales ensayadas, el aceite de orégano ejerció un efecto inhibitorio del crecimiento micelial de ambos hongos, mientras que con el extracto de ajo no se obtuvieron diferencias con el testigo.

Con respecto al ajo existen numerosos estudios *in vitro* que demuestran la efectividad del ajo y sus derivados contra un amplio espectro de hongos como *Candida*, *Trichophyton*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y *Trichosporon* (Corzo y col., 2007). Sin embargo López y col., 2002 reportaron escaso o nulo efecto del extracto de ajo sobre *Penicillium olsonii* y

*Penicillium nalgiovense* aislados de la superficie de embutidos fermentados. Algunos autores concluyen que la inhibición de hongos por extractos de ajo es dosis dependiente (Shams y col., 2006) por lo que podemos decir que en las dosis ensayadas el extracto acuoso de ajo no resultó inhibidor de los hongos *Alternaria sp.* y *Thamnidium sp.*

### 3.2.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE “IN VITRO”

La actividad antioxidante de la mezcla no se pudo medir debido a la formación de un precipitado. Estas precipitaciones bloquearon el camino óptico y causaron DPPH negativo al utilizar la fórmula (Liu y col., 2014). Staško y col., 2007 reportaron que al caracterizar antioxidantes con proporciones de agua de más de 60 % (v / v) parte del DPPH forma un precipitado sólido que impide la reacción con el antioxidante.

Otra de las posibles causas es que al ser el ajo un alimento alcalino puede cambiar vigorosamente el pH de la reacción, produciendo resultados inesperados.

### 3.3 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados, podemos ver que tanto EA como AEO y su combinación, resultaron eficientes en la inhibición de bacterias patógenas y alterantes, excepto para el caso de *Pseudomonas* que no fue inhibida por ninguna de las variantes ensayadas.

La combinación de EA y AEO tuvo un efecto sinérgico, aumentando el halo de inhibición, sobre algunas de las bacterias en estudio. Esto nos indica el posible uso de los extractos ensayados como antibacterianos en alimentos tanto en forma individual como cuando están combinados.

En cuanto a poder antimicótico, el aceite esencial de orégano resultó efectivo, en cambio, el extracto de ajo no tuvo diferencia con el testigo. Este resultado indica que su agregado podría tener ningún o algún efecto positivo sobre la matriz a la que se agregue.

La actividad antioxidante *in vitro* de la combinación de los extractos no pudo medirse, por lo tanto, se evaluará directamente sobre el alimento.

## CAPITULO 4

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE LA COMBINACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EL EXTRACTO DE AJO EN HAMBURGUESAS DE CARNE VACUNA

### 4.1 HAMBURGUESAS DE CARNE VACUNA REFRIGERADAS

Según el Código Alimentario Argentino, Capítulo VI, artículo 330: Hamburguesa, es el producto elaborado con carne picada con el agregado de sal, glutamato de sodio y ácido ascórbico. Su contenido de grasa no podrá exceder del 20 %, definición a la que el producto debe ajustarse además de cumplir con cualquier otro requisito establecido para el grupo general al que pertenece (chacinado). Este tipo de alimentos son muy propensos a la oxidación lipídica por presentar en su composición tan alto contenido de grasa.

La oxidación lipídica y la contaminación bacteriana son los principales factores que determinan la pérdida de calidad de los alimentos y la vida útil. Por lo tanto, lo que retrasa la oxidación de lípidos y la prevención de la contaminación cruzada bacteriana son altamente relevantes para los procesadores de alimentos.

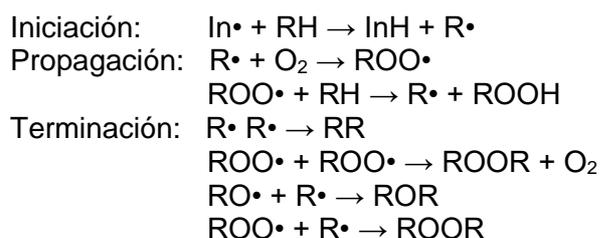
### 4.2 RANCIDEZ

Este fenómeno es una modificación de la composición de la grasa que implica cambios en el sabor y en el olor, originada por transformaciones químicas provocadas por factores físicos o biológicos.

La rancidez provoca el deterioro de grasas y aceites animales y vegetales. Se pueden clasificar en dos grandes grupos: rancidez biológica, lipólisis o rancidez hidrolítica; y rancidez oxidativa.

La lipólisis o rancidez hidrolítica es producida por la acción de determinadas enzimas, por el calentamiento o por las reacciones químicas que rompen el enlace éster de los lípidos. Entre las enzimas predominantes tenemos las fosfolipasas que atacan a los fosfolípidos, separando los ácidos grasos, las lipoxidasas que catalizan la oxidación de los carbonos insaturados de los ácidos grasos, las peroxidasas que transfieren oxígeno de los peróxidos al sustrato oxidable y éstos peróxidos formados sirven para oxidar nuevas moléculas de ácidos grasos insaturados siendo así una nueva fuente de enranciamiento. El efecto de los ácidos grasos libres sobre el olor y sabor depende de la longitud de las cadenas, generalmente, si son de catorce carbonos o menos se producen sabores y olores desagradables, en cambio los de más de doce carbonos solo alimentan la rancidez.

La autooxidación o rancidez oxidativa es causada por la acción del oxígeno sobre los ácidos grasos insaturados. Esto se produce por un mecanismo de reacción en cadena por radicales libres que comprende tres fases:



\*In•: iniciador, RH: hidrocarburo insaturado, R•: radical libre, ROO•: radical peróxido, ROOH: hidroperóxido, ROO•: radicales de terminación, RR, ROR, ROOR: compuestos estables.

La primera etapa o iniciación es donde se forman los radicales libres. Está favorecida por la presencia de metales como hierro, níquel, cobalto, cobre, manganeso. La iniciación también se puede producir en lípidos que ya tengan radicales peróxidos, en estos casos se denomina iniciación secundaria.

La segunda etapa o propagación, es donde los radicales libres reaccionan entre sí. Esta etapa incluye distintas reacciones que son rápidas porque los radicales libres son muy reactivos. Se produce una oxidación de lípidos insaturados a peróxidos y existe consumo de oxígeno gaseoso. Al principio se acumula peróxido pero luego termina por descender. Si el aporte de oxígeno es ilimitado se pueden oxidar todos los ácidos grasos insaturados. El aumento de peróxido favorece la iniciación ya que tienen una función catalizadora, y cada radical libre origina de 10 a 100 moléculas de peróxidos. La descomposición de dichos peróxidos puede seguir distintos caminos que llevan a diferentes reacciones de propagación, terminando en hidrocarburos, aldehídos, ácidos de cadena más corta u otros radicales libres.

La tercera etapa o terminación se produce paralelamente a las reacciones anteriores descriptas. Durante la misma, disminuye la cantidad de radicales libres. Dependiendo de la presión de oxígeno son las reacciones que se van a producir, pero ambas terminan en la formación de productos no radicales.

Los principales factores que afectan la oxidación son:

- Presencia de prooxidantes tales como metales, mioglobina, lipoxidasas o de antioxidantes que complejan metales
- Actividad agua
- Naturaleza y grado de dispersión de los lípidos( la superficie proteica los retarda y la glucídica los acelera)
- Grado de isomería (los ácidos grasos trans son más resistentes que los cis)

Existe un diferente comportamiento respecto al oxígeno y el tiempo, de acuerdo a las condiciones en que se encuentren los lípidos. Los lípidos puros tienen un corto o casi nulo período de inducción, tal vez por la presencia de metales en grasa de alimentos y de peróxidos, en cambio, los lípidos contenidos en alimentos tienen un prolongado período en el que la velocidad de consumo de oxígeno es constante. Esto determina que el enranciamiento aparezca más tarde en aquellos lípidos inmersos en una matriz alimentaria a diferencia de los puros.

Los principales cambios que produce la oxidación en los alimentos son:

- Disminución del índice de yodo
- Aumento del índice de saponificación
- Aumento de la viscosidad por incorporar oxígeno en las moléculas
- Aumento de la densidad
- Disminución del residuo insaponificable
- Modificación del sabor y color

### **4.3 ANTIOXIDANTES**

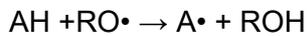
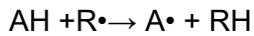
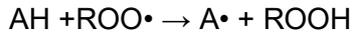
Los antioxidantes son sustancias que permiten retardar el comienzo o disminuir la oxidación de los lípidos. Existen cientos de compuestos tanto naturales como sintéticos con dichas propiedades, aunque para su empleo en alimentación deben ser seguros para la salud.

Por su mecanismo de acción se clasifican en:

**Antioxidantes tipo I:** son sustancias capaces de interrumpir la cadena de radicales cediendo un radical ( $H\bullet$ ) a un radical lipídico libre y quedando ellos en forma de radical. Como consecuencia disminuye el número de radicales libres, desciende la velocidad de oxidación y se prolonga el periodo de inducción. Los antioxidantes en forma de radical son estables y no reaccionan con los lípidos sino con otras moléculas similares, dando lugar a productos no radicales, o bien sufren una posterior oxidación, dando quinonas estables. Es necesario conocer la concentración del antioxidante en un alimento porque algunos ejercen una mayor protección cuanto mayor es su

concentración en el producto, pero otros tienen una concentración óptima por encima de la cual se comportan como agentes pro-oxidantes.

Las reacciones que se producen son las siguientes:



El radical A• que se forma es relativamente estable y no reacciona con los lípidos.

Se deben agregar en la etapa inicial durante el periodo de inducción, ya que si el contenido de peróxidos es relativamente elevado o si el alimento es rico en catalizadores metálicos, el efecto protector se anula.

Los antioxidantes naturales generalmente pertenecen al grupo de las vitaminas, donde sobresalen la vitamina A (betacarotenos, licopeno y luteína), vitamina E, vitamina B6, vitamina C, ácido fólico y algunos minerales como el selenio. Algunas estructuras químicas se muestran en la figura 4.

La presencia de sinergistas, sustancias que deben ser menos reactivas que el antioxidante y dar un radical libre más estable, permiten mejorar el efecto protector.

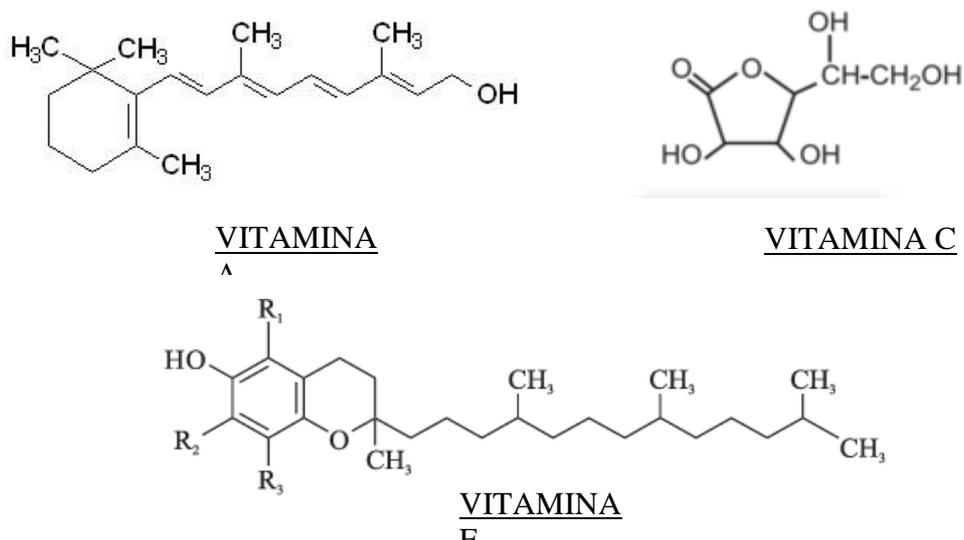


Figura 4. Estructura química de los antioxidantes naturales.

Los antioxidantes sintéticos más comúnmente usados son los derivados orto y para de los compuestos fenólicos, porque dan radicales libres relativamente estables debido a la localización del electrón entre dos formas de resonancia. Por otra parte, el radical libre es tanto más estable cuanto más grande es el grupo sustituyente pero su acción antioxidante disminuye.

Entre los más usados (figura 5) tenemos:

-Galato de propilo (GP): tiene baja solubilidad pero es más soluble en agua que en grasas, es poco resistente al calor y da sales oscuras con hierro.

-Butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT): son solubles en grasas, resisten al calor pero pueden dar olor desagradable y evaporan rápidamente. El BHT es más volátil que el BHA. Tienen efectos sinergistas si se usan combinados.

-Terbutilhidroquinona (TBQH): es muy poco soluble en agua y soluble en etanol, acético y éteres. Es estable a altas temperaturas. No causa decoloración y no causa olor ni sabor al alimento que se agrega.

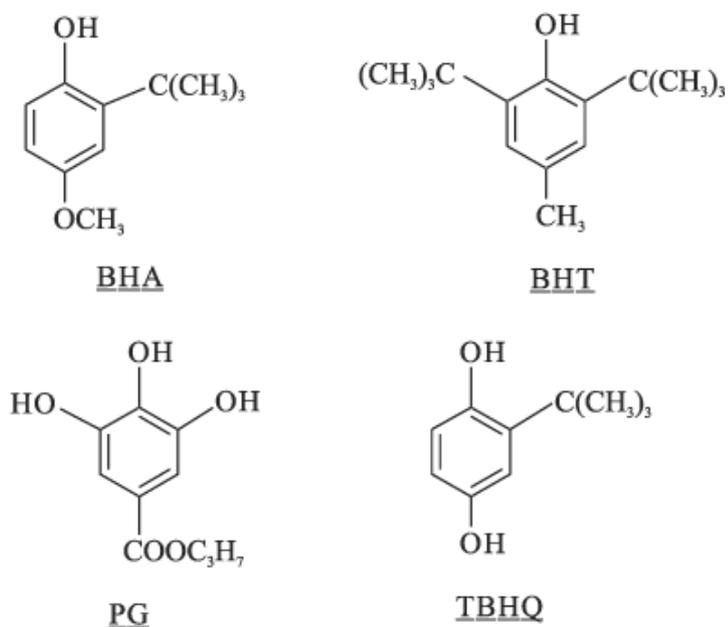


Figura 5. Estructura química de los antioxidantes sintéticos.

**Antioxidantes tipo II:** impiden o disminuyen la formación de radicales libres. En general son compuestos que complejan los metales. Los más utilizados son agentes complejantes o quelantes de los metales, como el ácido cítrico que compleja iones hierro, el EDTA y las aminas que destruyen los peróxidos. Su acción depende del pH y la temperatura, parámetros que gobiernan la estabilidad de los complejos formados. Se incluyen en este grupo otras sustancias como cambiadores de iones, aminoácidos y fosfatos.

**Antioxidantes tipo III:** son procedimientos físicos que protegen a los alimentos de la oxidación y que consisten en establecer las condiciones físicas, como reducir el contenido de oxígeno, humedad y temperatura. Para evitar el contacto del alimento con el oxígeno, se utiliza el envasado al vacío o en atmósferas modificadas en un material impermeable al oxígeno.

En la práctica, lo más frecuente, es utilizar mezclas de antioxidantes tipo I y II así como aplicar un procedimiento físico que proteja al alimento del enranciamiento.

La actividad antioxidante de los compuestos de los extractos en estudio, se atribuye principalmente a los constituyentes mayoritarios de los mismos, monoterpenos fenólicos en el caso del orégano y compuestos organosulfurados en el caso del ajo. Todos estos compuestos tienen la capacidad de actuar como antioxidantes por un mecanismo de captación de radicales libres (tipo I) y también a través de su conocida capacidad para quelar iones metálicos (tipo II). (Martín y col., 2002).

#### 4.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Los procesos oxidativos en la carne, la degradación de lípidos y proteínas, contribuyen al deterioro del flavor, la textura y el color de los productos cárnicos. Varios autores han postulado que en la carne y los productos cárnicos, los pigmentos y la oxidación de lípidos están relacionados entre sí. También se sabe que el oxígeno puede iniciar la peroxidación lipídica, lo que lleva a la formación de sustancias pro-oxidantes capaces de reaccionar con la oximioglobina (OMB) y que resulta en la formación de metamioglobina (MMB). La OMB podría ser oxidada no sólo por los radicales lipídicos, sino también por otros radicales pro-oxidantes generados por la presencia del oxígeno. Varios investigadores informaron que la susceptibilidad de la mioglobina a la autooxidación es el principal factor en la explicación de la estabilidad del color en la carne y los productos cárnicos. (Fernández y col., 2004)

#### **4.5 ALTERACION MICROBIANA DE LA CARNE**

Las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas, pues tienen un pH entre 5,1 y 5,6 adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, y un valor de actividad agua mayor que 0,85. El crecimiento de microorganismos en los productos cárnicos puede causar deterioro de los mismos o enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS).

Las hamburguesas al estar elaboradas en base a carne picada presentan los mismos problemas que la carne entera, pero agravados por la manipulación a la que se ve sometida, resultando, entre otras cosas, en una disminución del tiempo de conservación.

El primer indicio de la alteración de la carne fresca es la producción de olores desagradables, que son perceptibles cuando la cantidad de microorganismos presentes alcanza  $1.10^7$  ufc/cm<sup>2</sup>. (Escalante y col., 2008)

Para aumentar el período de vida útil de la carne, además de la refrigeración, se recurre al uso de aditivos sintéticos o naturales. Tal como se mencionó anteriormente, la preocupación por parte de los consumidores son los posibles efectos tóxicos y cancerígenos de los mismos, llevando con esto a un aumento en la demanda de los aditivos naturales para su uso en la preservación de alimentos.

El desarrollo y la aplicación de productos naturales con actividades antibacterianas en los productos cárnicos, pueden ser necesarios y útiles para aumentar la vida útil de almacenamiento y el potencial para la prevención de enfermedades alimentarias.

Diversos autores han determinado el uso de aceites esenciales con dicho efecto antimicrobiano en productos cárneos. Fernández López y col., 2004, comprobaron el efecto de extractos de romero, ajo y cítricos en hamburguesas de carne vacuna, Sallam y col., 2004, investigaron sobre el efecto del ajo, fresco, en polvo y aceite de ajo, en salchichas de pollo, Chen y col., 1996 estudiaron el efecto de distintas fuentes naturales tales como granos, semillas oleaginosas, especias, frutas y verduras para la aplicación en carnes.

#### **4.6 EVALUACION ORGANOLEPTICA DE LA CARNE**

La percepción sensorial desempeña un papel decisivo en la caracterización y evaluación de alimentos ya que en este caso no solamente intervienen los cinco sentidos sino que también interviene el factor afectivo. Es necesario por lo tanto, medir y regular las sensaciones definiendo umbrales, estableciendo pruebas y escalas y recurriendo al tratamiento estadístico para interpretar el significado de los datos.

Se dice entonces que la evaluación sensorial es una disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones humanas aquellas características de los alimentos y materiales que son percibidos a través de los sentidos de la vista, oído olfato, gusto y tacto.

Existen varias pruebas de análisis sensorial y cada una responde a objetivos determinados. Las pruebas que se pueden aplicar se dividen en dos grandes grupos, estos son: las **pruebas analíticas**, en donde se evalúan características sensoriales o la calidad de los alimentos, es decir, sus diferencias o clasificación; y las **pruebas afectivas** que evalúan la respuesta por los consumidores tales como reacción, preferencia o aceptación (Medina, 2012).

Dentro de las pruebas sensoriales afectivas tenemos dos grandes ramas: Las pruebas de preferencia y las de aceptabilidad.

Las pruebas de preferencia se utilizan para medir el interés o preferencia por un producto nuevo o compararlo con otro similar. Las que se usan frecuentemente son las de comparación pareada, de ordenamiento o ranking de preferencia y las de comparación múltiple. En este tipo de prueba se busca responder a la pregunta: ¿Qué muestra prefiere?

Las pruebas de aceptabilidad se usan cuando se desea cuantificar la magnitud del grado de aceptación de un alimento, señalando cuánto le agrada o desagrada el producto. Las escalas usadas son hedónicas y pueden ser verbales o descriptivas, numéricas o mixtas. Además existen

escalas estructuradas o no estructuradas. Las pruebas hedónicas de escala estructurada son aquellas que se les marcan varios puntos siguiendo una escala de gusto o desagrado, una escala de 4 puntos sería: me gusta mucho, me gusta, ni me gusta ni me disgusta, me disgusta mucho. Las de escala no estructurada son aquellas en donde se opta por una opción o la otra, por ejemplo: me gusta o no me gusta.

El número de jueces necesarios para que una prueba sensorial sea válida depende del tipo de juez que vaya a ser empleado. Existen cuatro tipos de jueces: el juez experto, juez entrenado, juez semientrenado o de laboratorio y el juez consumidor. (Quintero y col., 2014). Para las pruebas de aceptabilidad se requieren consumidores, siendo el número de jueces que se recomienda emplear mayor a 80 (Costell y Durán, 1981), generalmente entre 100 y 150, teniendo en cuenta que a mayor cantidad de jueces, la población se ve mejor representada. Pueden utilizarse de 25 a 30 jueces sólo si el resultado es a nivel de laboratorio (Espinosa 2007). Distintos artículos científicos avalan esta postura: Fernandez y col., 2004 trabajaron con 30 consumidores, Anular y col., 2006 emplearon 32 jueces, Gonzalez y col., 2008 utilizaron entre 40 y 50 personas y Cánovas y col., 2007 unos 42 consumidores.

En la actualidad, la industria cuenta con herramientas confiables, como la evaluación por métodos sensoriales e instrumentales, que le permiten predecir, caracterizar y controlar la calidad organoléptica de sus productos. Las evaluaciones por métodos instrumentales permiten caracterizar en los alimentos el aroma, terneza, color y textura; atributos que influyen sobre la decisión del consumidor en el momento de elegir un producto.

Un atributo sensorial en carne es el color ya que ayuda a inferir en su calidad, causando cierto rechazo por parte del consumidor, al percibir cambios o anomalías en su coloración. Sin embargo, cada consumidor describe el color de un producto de modo distinto, dando como resultado una amplia subjetividad. Por ello y a fin de promover una comunicación objetiva es imprescindible contar con un sistema de medición de color como el colorímetro o el espectrofotómetro.

El sistema de medición CIE L\*a\*b\* (CIELAB) utilizado, es un modelo cromático que se usa para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano. Los tres parámetros en el modelo, representan la luminosidad de color L\* (claro: L\*=100 u oscuro L\*:=0); y la orientación del color indicado con letras a\* (tendencia del color rojo o positivo al verde o negativo) y b\* (tendencia del color amarillo o positivo al azul o negativo) (Sitio oficial CIELAB, 2016).

## **4.7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.7.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÁXIMA DEL USO COMBINADO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EXTRACTO DE AJO**

El ensayo fue diseñado en dos etapas: la primera consistió en ajustar la dosis máxima de la combinación de AEO y EA con panelistas expertos. Esta información fue empleada para diagramar la etapa posterior en donde se incorporó la dosis elegida a las hamburguesas para evaluar la aceptación por parte de los consumidores.

Primera etapa:

Para conocer la concentración sensorialmente aceptada, se llevaron a cabo 5 sesiones con un panel de jueces expertos, en las que los resultados de cada una de ellas fueron empleados para el diseño de la siguiente. Se realizaron pruebas de aceptación mediante escala hedónica verbal.

Para la elaboración de las hamburguesas se usó carne molida especial, sal (1 %) y concentraciones variables de aceite esencial de orégano (100 a 300 ppm) y extracto de ajo (1 a 5 ml). Una vez homogeneizada la masa de carne, se formaron hamburguesas de 50 gramos cada una y se cocinaron en horno eléctrico hasta alcanzar los 75 °C en el centro geométrico del medallón de carne. Las muestras fueron presentadas a los jueces en trozos y calientes. Se usó como barreador galletas de agua sin sal y agua con jugo de limón.

Segunda etapa:

De la etapa anterior, se decidió por consenso que la mejor combinación era la de 150 mg.kg<sup>-1</sup> de AEO y 8 % de EA, habiendo discrepancias con respecto al porcentaje de sal a incorporar. Por lo que para la evaluación con consumidores se ensayaron dos concentraciones de ClNa (0,5 y 1 %).

Se realizó, una sesión con 40 consumidores, utilizando una escala hedónica de 5 puntos y una de ordenamiento por preferencia, comparando con una muestra testigo (sólo sal). Ver anexo página 37.

## **4.7.2 ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y MICROBIOLÓGICAS EN HAMBURGUESAS**

Para realizar estos estudios se trabajó con hamburguesas, usando para su elaboración carne vacuna molida, comprada en un comercio, adicionada de 1 % de sal. Se homogeneizó por amasado y se formaron 5 lotes; al primero se le adicionó 150 mg.kg<sup>-1</sup> de AEO, al segundo 8 % de EA, al tercero la combinación de 150 mg.kg<sup>-1</sup> de AEO y 8 % de EA, al cuarto 200 mg.kg<sup>-1</sup> del antioxidante sintético: TBHQ y el quinto se utilizó como control (sin ningún agregado). Se elaboraron hamburguesas de 50 gramos cada una, se cubrieron individualmente en film de PVC y se almacenaron crudas a 4 °C, durante 9 días. Las muestras se analizaron, por triplicado, al tiempo 0 y a los 3, 6 y 9 días de refrigeración.

### **4.7.2.1 Determinación de pH**

Se homogeneizaron muestras de 10 g con 50 ml de agua destilada. El pH se midió utilizando un peachímetro marca ARADEL MOD 2P.

### **4.7.2.2 Determinación de la actividad antioxidante usando el método de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)**

Se empleó el método de Lee y col. (1998) el cual consiste en una reacción entre el malonaldehído presente en la muestra y el TBA para dar un compuesto coloreado medible espectrofotométricamente a 532 nm. Se partió de 1,0 g de muestra previamente homogeneizada y se incorporó 2,5 ml de una solución (mezcla de: 0,375 % (m/v) TBA –15% (m/v) tricloroacético (TCA) – 0,25N HCl). Se calentó durante 10 min a 95-100 °C para desarrollar el color rosado. Se enfrió y centrifugó durante 25 min a 3500 rpm. El sobrenadante se leyó en espectrofotómetro Hach DR/2010. El TBARs se calculó de una curva estándar realizada con 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP). Los resultados se expresaron como mg de malonaldehído (MDA) kg<sup>-1</sup> de muestra.

### **4.7.2.3 Determinación de color**

El color de la superficie de las hamburguesas fue medido con un colorímetro Minolta CR 400 (Minolta Co., Osaka, Japan) con iluminante D65 y observador estandar 10°. Se utilizó un cabezal de lectura de 8 mm. Para cada muestra se tomó la media de ocho mediciones realizadas sobre la superficie. Se empleó la escala de CIELAB para la evaluación de los parámetros de color. El color fue descrito por las siguientes coordenadas: luminosidad (L\*), intensidad del color rojo (a\* ± rojo-verde) y la intensidad del color amarillo (b\* ± amarillo-azul).

### **4.7.2.4 Análisis microbiológico**

A partir de 25 g de muestra se realizaron diluciones decimales en agua peptonada al 0,1 % y se llevaron a cabo los siguientes análisis microbiológicos de las hamburguesas:

Coliformes totales: se empleó la técnica del Número Más Probable (NMP), con series de 3 tubos por dilución. Se sembró 1 ml de las diluciones 1.10<sup>-1</sup>, 1.10<sup>-2</sup> y 1.10<sup>-3</sup> en caldo MacConkey con campana de Durham. Se incubó a 35 °C por 24 a 48 hs.

Coliformes termotolerantes: se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP). Se sembró una ansada de cada tubo positivo de Coliformes totales, en caldo verde brillante bilis, con campana de Durham y se incubó a 44,5 °C por 24 a 48 hs.

*E. coli*: a partir de los tubos positivos de coliformes termotolerantes se aisló en Agar Eosina Azul de Metileno e incubó 24 a 48 horas a 37 °C. Para la identificación de este microorganismo, a las colonias típicas de *Escherichia coli*, se les realizó las pruebas IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato).

Levaduras y mohos: se sembró por el método pour plate, en Agar Levaduras y Mohos, 1 ml de las diluciones 1.10<sup>-1</sup>, 1.10<sup>-2</sup> y 1.10<sup>-3</sup> y se incubó a 30 °C por 24 a 48hs.

Bacterias psicrófilas: se sembró por el método pour plate, 1 ml de las diluciones 1.10<sup>-4</sup>, 1.10<sup>-5</sup> y 1.10<sup>-6</sup> en agar para recuento en placa. Se incubó a 15 °C por 48 hs.

#### 4.7.2.5 Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas sensoriales de preferencia fueron analizados mediante la prueba no paramétrica por rangos de Friedman para variables cualitativas discretas siendo el modelo matemático el siguiente:

$$Xr^2 = \frac{12}{Bk(k+1)} \sum_{i=1}^k T_i^2 - 3B(k+1)$$

X r2 = Estadístico de Friedman

B = Número de bloques

K = Número de tratamientos

Ti = Suma de rango

Los resultados de las pruebas fueron ingresados en una computadora y analizados por medio del software Infostat.

Para todas las mediciones analíticas se obtuvieron las medias y las desviaciones de tres mediciones. El estudio del efecto de la adición de la combinación de AEO y EA sobre la conservación, fue realizado siguiendo un experimento factorial con dos factores (tratamiento y tiempo de conservación) y un diseño completamente aleatorizado. La prueba de ANOVA fue utilizada para evaluar el efecto de los tratamientos (A) y la conservación (B) y la interacción entre ellos sobre los atributos de calidad, usando el software Statgraphics Centurion. La diferencia entre la media de los valores de los diferentes tratamientos y el período de almacenamiento fue determinada por la prueba de Tukey y la significancia estadística fue definida como p<0,05.

## 4.8 RESULTADOS

### 4.8.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÁXIMA DEL USO COMBINADO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO Y EXTRACTO DE AJO

Los resultados de la distribución porcentual de la prueba de ordenamiento y escala hedónica se muestran en la figura 6 y 7. Cabe aclarar que ningún consumidor marcó la selección me disgusta.

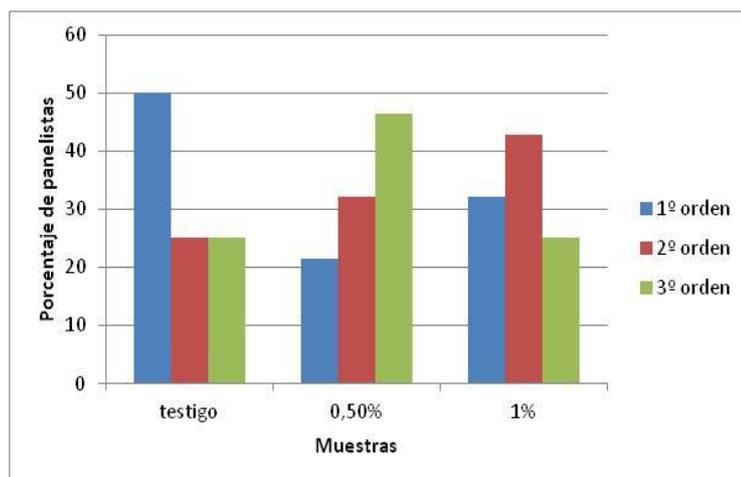


Figura 6: Ordenamiento por preferencia.

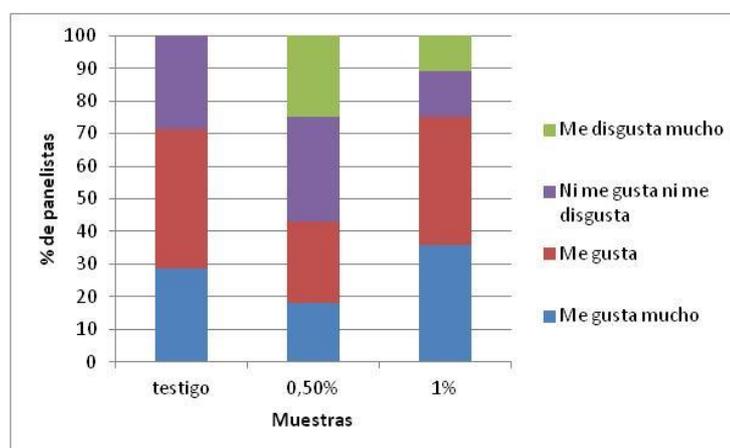


Figura 7: Escala hedónica.

Para el análisis de los resultados de la prueba de ordenamiento, se asignó con el valor 1 a la muestra preferida y el valor 3 al último en el orden de preferencia. La prueba de Friedman arrojó valores medios de 1,78 a 1,85 indicando un buen nivel de aceptación.

Los consumidores prefieren las muestras sin orégano o con AEO pero siempre con 1 % de sal. Las muestras con poca sal (0,5 %) fueron ordenadas preferentemente en tercer lugar.

Con respecto a la escala hedónica se le asignó el valor 5 a la opción “me gusta mucho” y 1 a la “me disgusta mucho”.

Al aplicar la prueba de Friedman no se encontraron diferencias significativas entre la muestra testigo y la que contenía  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  de AEO, 8 % del EA y 1 % de sal, por lo tanto se decidió seguir trabajando con estas concentraciones. Ver anexo página 38.

## 4.8.2 ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y MICROBIOLÓGICAS EN HAMBURGUESAS

### 4.8.2.1 pH

El análisis de la varianza para los datos de pH, indica que los valores de pH fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por los tratamientos aplicados y por el período de almacenamiento y su interacción. Ver anexo página 39.

Todos los tratamientos presentaron valores de pH significativamente menores al testigo luego del día 0 (fig. 8).

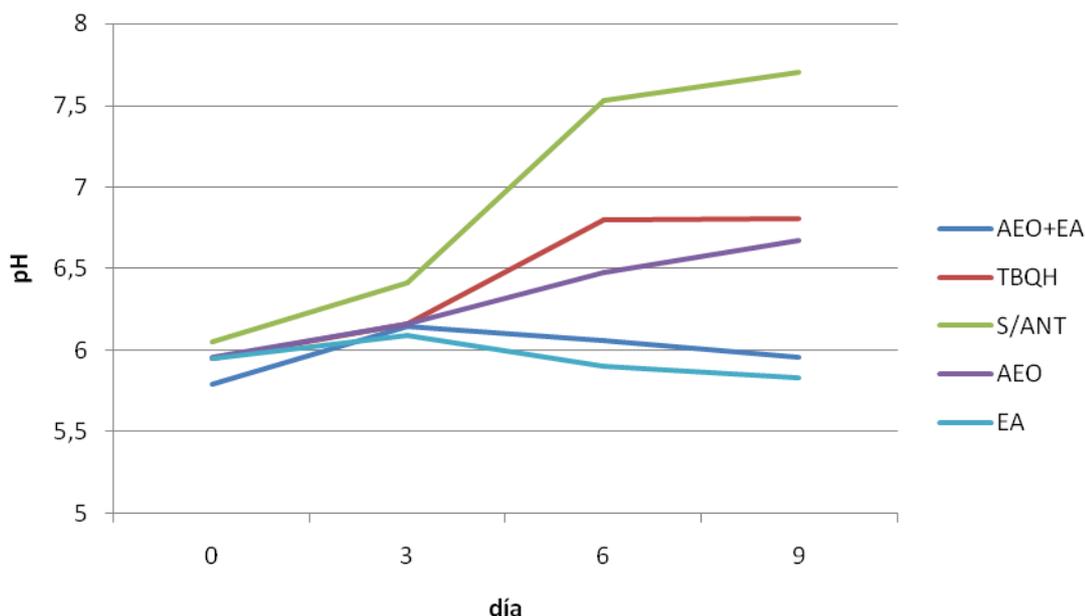


Figura 8: Evolución del pH de hamburguesas almacenadas a 4 °C.

El valor de pH sube hasta el día 6 y luego se mantiene sin diferencias significativas para todos los tratamientos excepto los que contienen EA que disminuyen.

El pH de la carne puede estar influenciado por la presencia de bacterias y puede reflejar la existencia de Gram positivas o negativas. Los ácidos orgánicos son producidos por las bacterias Gram positivas, haciendo disminuir el pH, mientras que las aminas producidas por las Gram negativas lo hacen subir (Wong y Kitts, 2002). El moderado descenso producido en las hamburguesas con EA sugiere que han actuado más las bacterias Gram positivas generando ácido láctico por fermentación.

El incremento del pH en el resto de los tratamientos podría atribuirse a la presencia de microorganismos alterantes en las hamburguesas de carne (Gill, 1983; Goddard y col., 1996; Masniyom y col, 2002). Tanto las bacterias como los hongos pueden secretar sustancias que incrementan el pH, por lo tanto su presencia lo aumenta a través del tiempo. Algunos autores estiman que el incremento en el pH refleja el grado de deterioro de la carne debido a la descomposición proteica con la consecuente formación de aminoácidos libres, predominando amoniaco y aminas, de reacción alcalina (Nurul, 2010).

#### 4.8.2.2 Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante del AEO, EA y su combinación en hamburguesas se evaluó midiendo el aldehído malónico (MDA) por el método del Ácido tiobarbitúrico (TBARS), según Lee y col., 1998.

Todos los valores de TBARS se encontraron entre 0,279 y 1,541 (fig. 9).

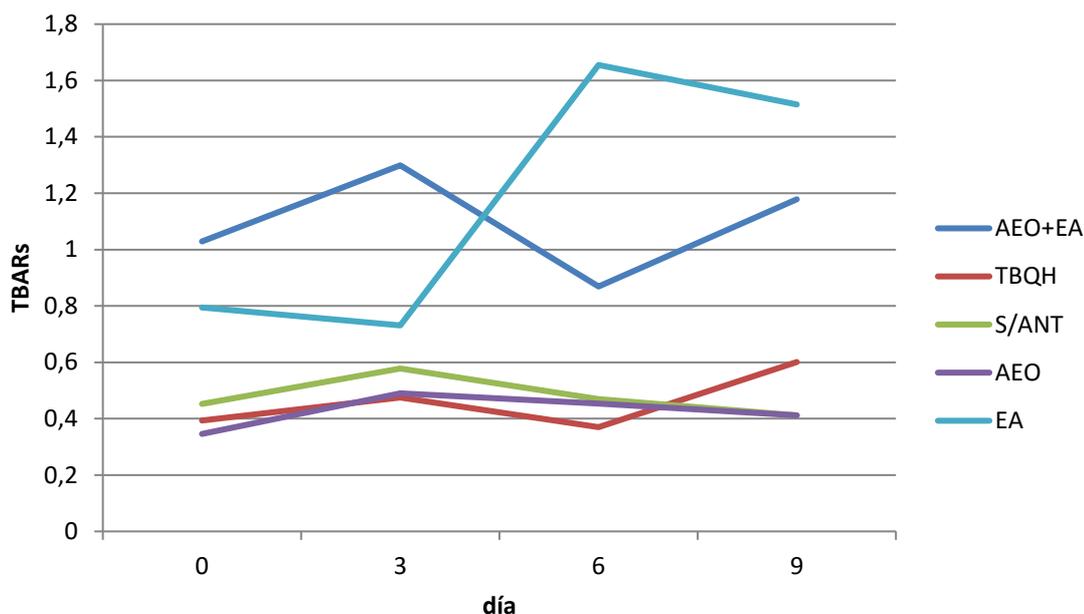


Figura 9: Evolución del TBARs en hamburguesas almacenadas a 4 °C.

Si bien no existen valores legislados, algunos autores han sugerido como límite, un rango de valores comprendido entre 0,5 y 1 mg MDA.kg<sup>-1</sup> en carne de cerdo, ya que con ese nivel sería detectado sensorialmente por panelistas (Tardlagis y col., 1960; Limbo y col., 2010). Campo y col., 2006, informaron que un valor de alrededor de 2,0 mg MDA.kg<sup>-1</sup> de TBARs se puede considerar como límite umbral para la aceptabilidad de la carne oxidada. Por lo tanto los valores evaluados estarían dentro del parámetro de aceptación de los consumidores.

El análisis de la varianza para los datos de TBARs, indican que los valores fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por el período de almacenamiento, por los tratamientos aplicados, y por la interacción entre ambos. Ver anexo página 40.

La rancidez oxidativa en la muestra control aumenta con el tiempo, mientras que las muestras que contenían TBHQ y AEO fueron significativamente menores en todos los días de almacenamiento y no mostraron diferencias significativas entre ellas. Por lo que el AEO mostró un efecto antioxidante tan eficaz como uno sintético.

Un resultado interesante se observó en este estudio, ya que tanto el extracto acuoso de ajo como su combinación con AEO actuaron como potentes prooxidantes. Los valores de TBARs fueron, en ambas, significativamente más altos que la muestras control. Al combinar el EA con el AEO se redujo significativamente el valor de TBARs sobre todo a partir del día 3. El mismo efecto prooxidante producido por distintas preparaciones de ajo se ha descrito anteriormente (Park y Chin, 2014; Wong y Kitts, 2002; Borek, 2001; Sun y col., 2000; Gazzani y col., 1998). Sin embargo, en la mayoría de la bibliografía, el ajo se menciona como inhibidor de la peroxidación lipídica en diversos productos cárnicos (Sallam y col., 2004, Yin y Cheng, 2003).

Respecto al efecto prooxidante, Nieto y col., 2012, indican que podría deberse a las propiedades reductoras de los constituyentes del ajo que mantienen el hierro hemo en la forma ferrosa en la reacción de Fenton y por lo tanto, la descomposición del peróxido de hidrógeno a radicales hidroxilo catalizaría la oxidación lipídica. Estos mismos autores indican que el efecto anti o prooxidante dependió de la dosis empleada, actuando como prooxidante cuando la concentración usada de aceite de ajo fue mayor.

### 4.8.2.3 Color

*Coordenada L\** (Valores de luminosidad-claridad): el análisis de la varianza para los datos de L\* indica que los valores fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por el período de almacenamiento. Ver anexo página 41.

Como se observa en la figura 10, en el día 3 todos los tratamientos disminuyen su luminosidad y luego aumentan progresivamente.

Tanto el agregado de antioxidantes como el de extractos no modificó significativamente el valor de L\*.

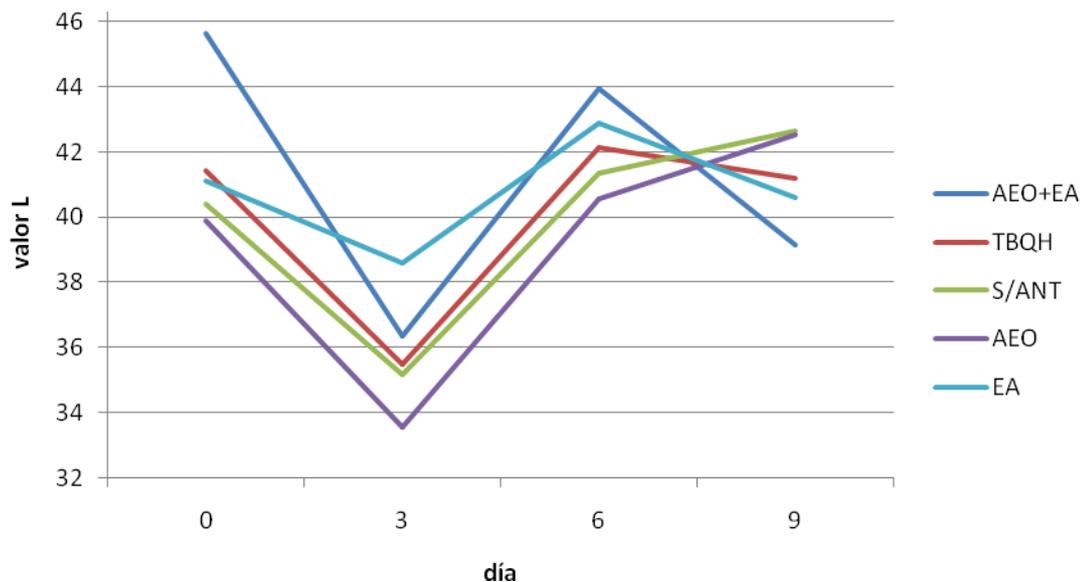


Figura 10: Evolución de L\* en hamburguesas almacenadas a 4 °C.

*Coordenada a\** (Valores del color que va de rojo a verde): el análisis de la varianza para los datos de a\* indica que los valores fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por el período de almacenamiento, por los tratamientos aplicados, y por la interacción entre ambos. Ver anexo página 42.

En la figura 11 se observa que las muestras con EA y su combinación con AEO disminuyen significativamente el color rojo con respecto a las hamburguesas control, desde el primer día, indicando que su adición influye en el color rojo de las muestras.

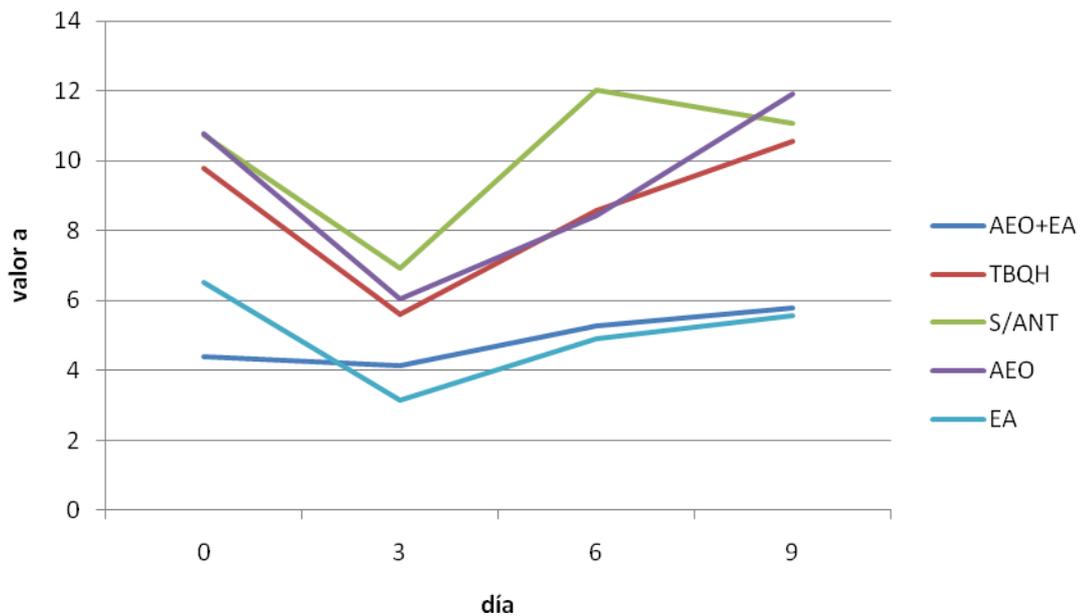


Figura 11: Evolución de  $a^*$  en hamburguesas almacenadas a 4 °C.

En general, la componente rojo-verde ( $a^*$ ) del color está relacionada con la presencia de pigmentos en el alimento, dependiendo en los alimentos cárneos fundamentalmente de los hemopigmentos (Mb y Hb) y de carotenoides que han sido incorporados en la dieta (cantaxantina, astaxantina, etc.) (Pérez y col., 2004). La relación entre la rancidez y los cambios de color ha sido descrita previamente por otros autores, indicando que la oxidación lipídica promueve la oxidación de la oximioglobina a metabioglobina y la consecuente decoloración del producto (Jeremiah, 2001; Fernández y col., 2004; Yu y col., 2002). Otros autores indican que el proceso es al revés, siendo la oxidación de los pigmentos los que catalizan la oxidación lipídica. (Gatellier y col., 2001; O'Grady y col., 2001; Baron y col., 2002).

Por lo que podemos inferir que la lectura más baja de  $a^*$  para las hamburguesas con EA y combinadas con AEO han sido influenciadas tanto por su composición como por el efecto prooxidante que presentan.

*Coordenada  $b^*$  (Valores del color que va del amarillo al azul):* el análisis de la varianza para los datos de  $b^*$  indica que los valores fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por el período de almacenamiento, por los tratamientos aplicados y por la interacción entre ambos. Ver anexo página 43.

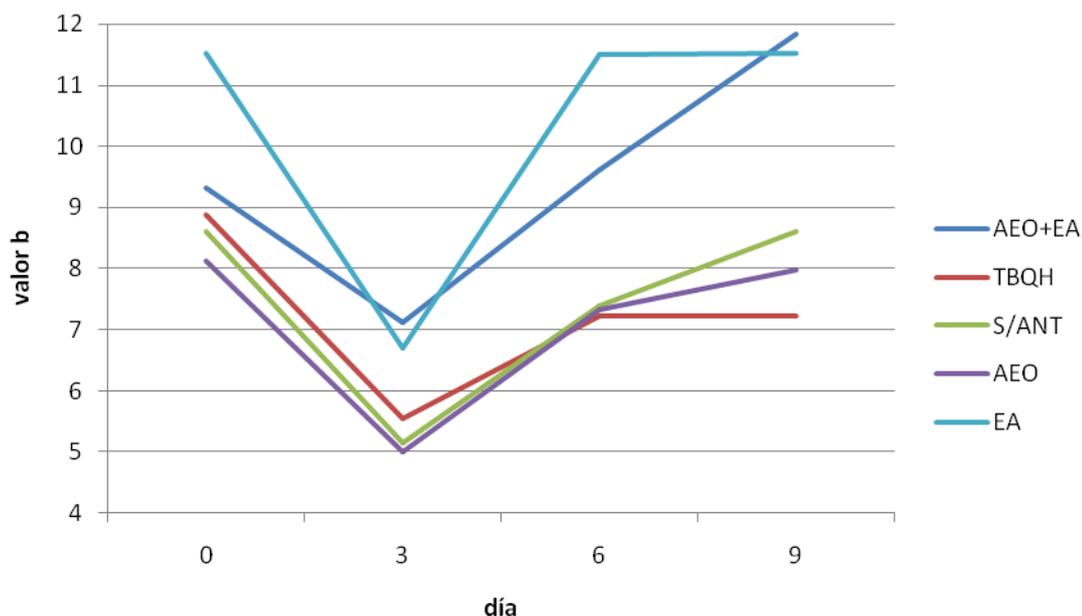


Figura 12. Evolución de  $b^*$  en hamburguesas almacenadas a 4°C.

Se puede observar en la figura 12 que todos los tratamientos hacen disminuir el valor de  $b^*$  el día 3, lo cual evidencia que existió una pérdida de los componentes amarillos.

Las hamburguesas con EA y su combinación con AEO presentaron los valores más altos para el día 6 y 9.

La coordenada  $b^*$  depende de los diferentes estados en que el pigmento mioglobina se encuentra (OMb y MetMb) (Pérez y col., 1998), por lo tanto se manifiesta en todas las muestras la formación de MetMb (color marrón) a expensas de la pérdida de OMb (color rojo brillante), siendo más intenso en las muestras que contenían EA y su combinación con AEO, evidenciando nuevamente su efecto prooxidante.

#### 4.8.2.4 Coliformes totales

El análisis de la varianza para coliformes dio significativo para los días de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Ver anexo página 44.

En la figura 13 se puede observar un efecto antimicrobiano similar para todos los tratamientos, disminuyendo el recuento de coliformes totales en el día 6. El menor valor para el día 9 se dio en la muestra con el tratamiento combinado, seguido de la muestra que contenía EA. Esta variación en las muestras con EA refleja una distribución no homogénea de los microorganismos en las muestras.

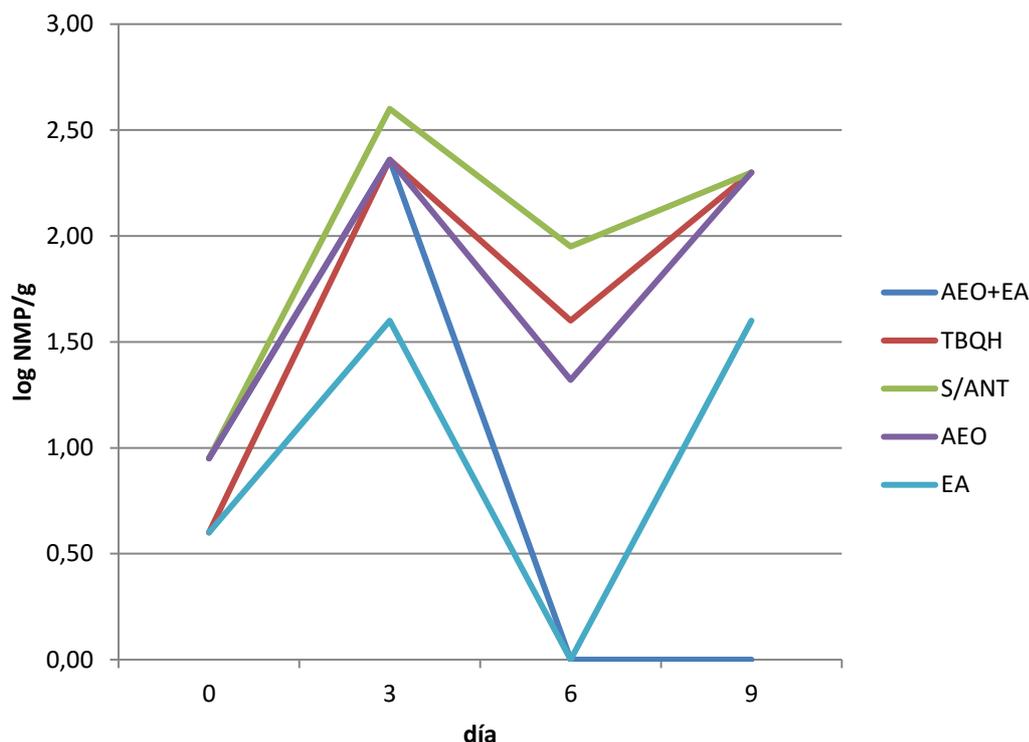


Figura 13: Recuento de coliformes totales en hamburguesas almacenadas a 4°C.

La disminución de la población de coliformes confirma la formación de ácido orgánico causado por el metabolismo bacteriano y la consecuente disminución del pH (Lee y col., 2009).

#### 4.8.2.5 Coliformes fecales y *E. coli*

El análisis de la varianza tanto para coliformes fecales como para *E. coli* dio significativo para los días de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Ver anexo página 45.

Todas las muestras presentaron un recuento entre  $<3$  y 4 NMP/g para el día 0, excepto la que contenía AEO (negativo). Los días siguientes el recuento dio negativo.

En la carne triturada o picada, según el criterio complementario del Artículo 255 del CAA (SAGPyA, 2010), se establece que el Recuento de *Escherichia coli* g para  $n=5$   $c=2$  deberá ser  $m=100$   $M=500$  y el criterio obligatorio fija ausencia de *Escherichia coli* O157:H7/NM en 65 g de producto para  $n=5$   $c=0$ .

La presencia de estos microorganismos indicaría contaminación con materia fecal. Esto se debe a inadecuadas técnicas de matanza, superficies en contacto con la carne contaminada con excrementos y/o inadecuado manejo de la carne por los manipuladores (Nel y col., 2004). En muchos productos crudos de origen animal, bajos recuentos de *E. coli* pueden ser esperados dada la asociación cercana de estos alimentos con el ambiente animal y por la probabilidad de la contaminación de las carcasas, reses, etc. con materia fecal animal durante la faena. Con respecto a *Escherichia coli* O157:H7 dado que es un patógeno con baja dosis infectiva el CAA no debe estar presente en carne picada.

#### 4.8.2.6 Levaduras y hongos

El análisis de la varianza para los datos de levaduras y hongos, indica que los recuentos fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por los tratamientos aplicados y por el período de almacenamiento. Ver anexo página 46.

Como se observa en la figura 14, el recuento de levaduras y hongos aumenta significativamente con el tiempo, estabilizándose el día 6.

Las muestras que contenían EA solo o combinado presentaron recuentos significativamente más bajos que las hamburguesas con TBHQ. Sin embargo no se diferenciaron del resto de los tratamientos, por lo tanto no habría un efecto sinérgico.

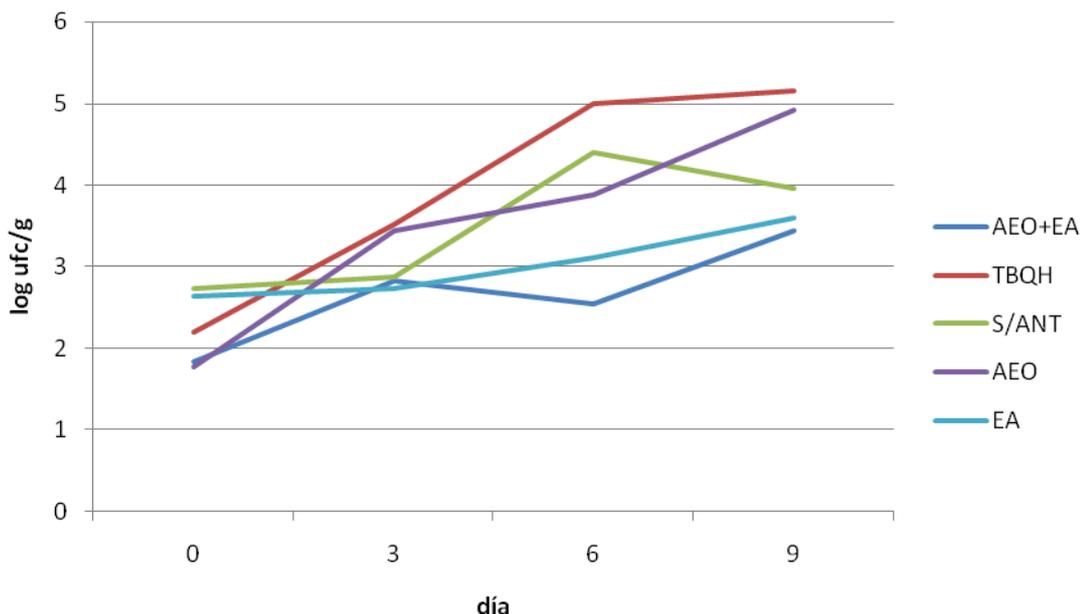


Figura 14: Recuento de levaduras y hongos en hamburguesas almacenadas a 4 °C.

#### 4.8.2.7 Bacterias psicrófilas

El análisis de la varianza dio significativo para el tratamiento y el tiempo ( $p < 0,05$ ).

El efecto de los conservantes sobre las bacterias psicrófilas, durante el tiempo de conservación se muestra en la figura 15. Ver anexo página 47.

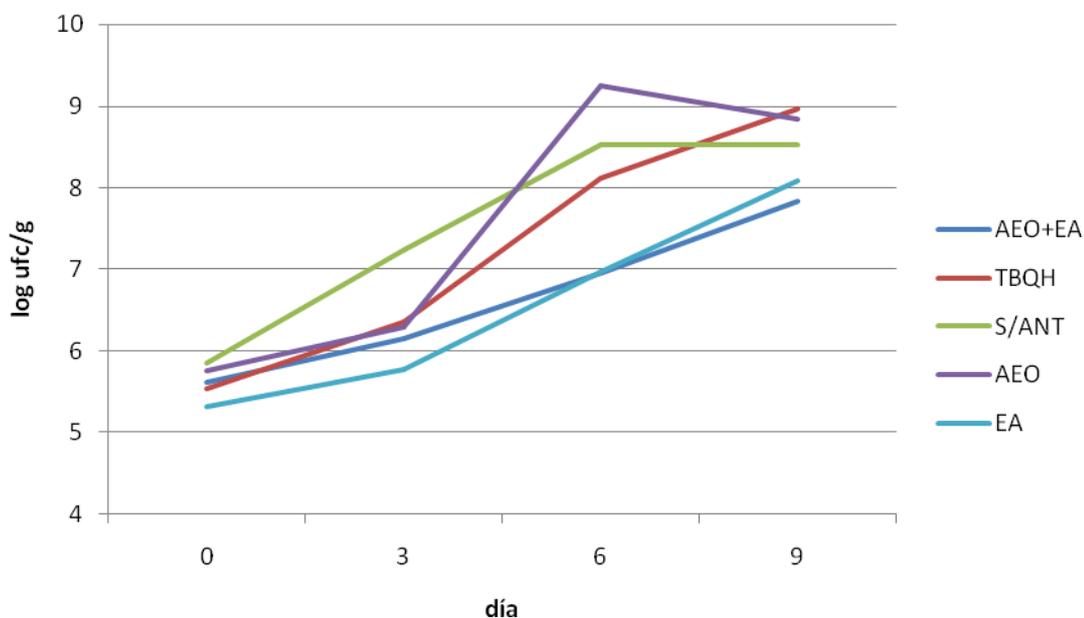


Figura 15: Recuento de bacterias psicrótrofas en hamburguesas almacenadas a 4 °C.

Se observa un aumento progresivo en el número de bacterias psicrófilas, desde el tiempo 0 hasta los 9 días de conservación analizados. El agregado de AEO no disminuyó el recuento respecto al control. Iguales resultados fueron reportados por Amadio, C., 2013 cuando se adicionaron 300 mg  $\text{kg}^{-1}$ . Sin embargo las muestras que contenían EA sólo o combinado redujeron el crecimiento de

psicrófilas hasta el día 6. No se observaron diferencias significativas entre ellos por lo tanto no existe un efecto sinérgico al usar ambos extractos combinados.

La alteración bacteriana de la carne refrigerada presenta olores anómalos, normalmente desagradables, cuando la tasa bacteriana llega a un valor de alrededor de  $7 \log \text{ufc.g}^{-1}$  (Kanatt y col., 2013).

Teniendo en cuenta estos valores y los resultados obtenidos se puede decir que el agregado de  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  de AEO puede mantener su vida útil microbiológica a  $4^\circ\text{C}$  hasta después del día 3 y se diferencia de las muestras testigo por el recuento de psicrófilas que se alteran antes de los tres días, mientras que el uso de EA al 8 % y su combinación con AEO permiten aumentar la vida útil microbiológica de las hamburguesas hasta el día 6.

#### **4.9 CONCLUSIONES**

El agregado de EA a las hamburguesas produce un descenso del valor de pH a partir del día 6, indicando una posible proliferación de microbiota Gram positiva.

El efecto antioxidante tanto del extracto acuoso de ajo como su combinación con AEO no pudo demostrarse ya que ambos actuaron como potentes prooxidantes. Los valores de TBARs fueron, en ambas, significativamente más altos que las muestras control.

Las muestras con EA y su combinación con AEO disminuyen significativamente el color rojo ( $a^*$ ) con respecto a las hamburguesas control desde el primer día, tornándose marrones a partir del día 3, evidenciando el efecto oxidante del EA.

Se comprobó el efecto antimicrobiano del EA en las concentraciones estudiadas, ya que el crecimiento de levaduras y hongos fue menor con la adición de EA solo o combinado con AEO. Con respecto a las bacterias psicrófilas el uso de EA y combinado con AEO resultó efectivo, aumentando el tiempo de vida útil del producto en 3 días.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES GENERALES

El efecto antimicrobiano *in vitro* del AEO, EA y su combinación quedó demostrado frente a ocho bacterias diferentes, entre ellas bacterias patógenas, Gram negativas y Gram positivas. La combinación de EA y AEO fue más efectiva en cuanto a la inhibición de dichas bacterias.

Con respecto a la actividad *in vitro* antifúngica, el EA no evidenció efecto, solo el AEO resultó efectivo.

La capacidad antioxidante *in vitro* de la combinación de AEO y EA no pudo medirse en las muestras presentadas, por la formación de un precipitado que impidió la lectura.

El parámetro de calidad elegido para valorar el deterioro oxidativo de alimentos fue la prueba de TBARs. Como resultado se pudo concluir que el uso de EA y su combinación con AEO en hamburguesas actúan como prooxidantes.

En las hamburguesas con EA (solo o combinado con AEO) hubo un descenso moderado del pH, lo que podría retardar el desarrollo de microorganismos alterantes.

La adición de EA afectó el color respecto al testigo y a las muestras que contenían sólo AEO. Los valores de L\* no se vieron afectados por el tratamiento, pero tanto a\* como b\* sufrieron modificaciones indicando un amarronamiento en las hamburguesas que contenían ajo. Esto está íntimamente relacionado con el efecto prooxidante del extracto.

El EA sólo y combinado con AEO, en las hamburguesas de carne vacuna, presentó los recuentos de coliformes totales menores para el último día de almacenamiento. Con respecto a levaduras y mohos presentó un efecto inhibitor mayor que el TBHQ. En cuanto a bacterias psicrófilas, el EA solo o combinado con AEO, redujo el recuento en el período de tiempo ensayado.

Por lo expuesto, se pudo alcanzar parcialmente la hipótesis planteada:

El uso combinado de aceite esencial de orégano y extracto de ajo permite aumentar la vida útil de las hamburguesas de carne vacuna refrigeradas ya que su empleo como aditivo de origen natural permite prolongar la vida útil de hamburguesas en relación a su actividad antimicrobiana, pero a las concentraciones ensayadas, resultó ser prooxidante.

# **ANEXOS**

Tabla 3: Prueba de ADEVA correspondiente al porcentaje de secuestro de radicales libres según el extracto de ajo.

Analysis of Variance for porcentaje de secuestro - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-
MAIN EFFECTS					
A:extracto	4122,0	2	2061,0	2061,00	0
RESIDUAL	6,0	6	1,0		
TOTAL (CORRECTED)	4128,0	8			

Tabla 4: Prueba de Tukey correspondiente al porcentaje de secuestro de radicales libres según el extracto de ajo.

Multiple Range Tests for porcentaje de secuestro by extracto

Method: 95,0 percent Tukey HSD

extracto	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
2	3	10,0	X
1	3	25,0	X
3	3	61,0	X

**Tabla 5: Prueba de ADEVA correspondiente al efecto antibacteriano in vitro del AE, AEO y su combinación sobre el tipo de bacteria estudiada.**

Analysis of Variance for inhibicion - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:extracto	663,432	2	331,716	127,95	0,0000
B:microorganismo	3086,84	8	385,855	148,83	0,0000
INTERACTIONS					
AB	544,79	16	34,0494	13,13	0,0000
RESIDUAL	140,0	54	2,59259		
TOTAL (CORRECTED)	4435,06	80			

**Tabla 6: Prueba de Tukey correspondiente al efecto antibacteriano in vitro del AE, AEO y su combinación.**

Multiple Range Tests for inhibicion by extracto

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
extracto	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
AEO	27	13,2222	X
EA	27	18,8889	X
AEO+EA	27	19,6296	X

**Tabla 7: Prueba de Tukey correspondiente al efecto antibacteriano in vitro según el tipo de bacteria.**

Multiple Range Tests for inhibicion by microorganismo

Method: 95,0 percent Tukey HSD			
microorganismo	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Pseudomonas	9	5,77778	X
Lactobacillus	9	10,2222	X
Salmonella	9	15,2222	X
E. coli	9	15,7778	XX
Campylobacter	9	18,2222	XX
E. coli 0157	9	18,2222	XX
enterococcus	9	20,3333	X
B. cereus	9	25,1111	X
S. aureus	9	26,3333	X

### EVALUACIÓN SENSORIAL DE HAMBURGUESAS CON ORÉGANO y AJO

Nombre:

Hora:

EDAD: entre 20 y 30 años ... entre 31 y 40 años ... entre 41 y 50 años ... más de 60 años ...

Usted recibirá 3 muestras de hamburguesas con orégano y ajo.

Por favor deguste y:

✓ ordene las muestras de acuerdo a su preferencia, colocando en el primer lugar la que más le gustó y en el último la que menos.

✓ indique, según la escala que se presenta, su opinión sobre ellas, escribiendo su código en el casillero correspondiente, separándolas por comas si es más de una.

**Nota:** entre una muestra y la siguiente, utilice como barredor jugo de limón y galletitas sin sal.

Orden de preferencia	Número
Primero	
Segundo	
Tercero	

ESCALA	MUESTRAS
Me gusta mucho	
Me gusta	
Ni me gusta ni me disgusta	
Me disgusta	
Me disgusta mucho	

COMENTARIOS:

- ¡Muchas Gracias!

Figura 16: Modelo de planilla usada para la evaluación sensorial de las hamburguesas de carne vacuna.

Tabla 8: Prueba de Friedman correspondiente a la distribución porcentual de la prueba de ordenamiento por preferencia.

**Prueba de Friedman**

testigo	C1%	C0,5%	T <sup>2</sup>	p
1,78	1,85	2,37	3,03	0,0571

*Minima diferencia significativa entre suma de rangos (14,222)*

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n
testigo	48,00	1,78	27 A
C1%	50,00	1,85	27 A B
C0,5%	64,00	2,37	27 B

*Letras distintas indican diferencias significativas(p< 0,050)*

Tabla 9: Prueba de Friedman correspondiente a la distribución porcentual de la escala hedónica.

**Prueba de Friedman**

testigo	C1%	C0,5%	T <sup>2</sup>	p
2,19	2,19	1,62	3,72	0,0311

*Minima diferencia significativa entre suma de rangos (12,748)*

Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n
C0,5%	42,00	1,62	26 A
C1%	57,00	2,19	26 B
testigo	57,00	2,19	26 B

*Letras distintas indican diferencias significativas(p< 0,050)*

**Tabla 10: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del pH en hamburguesas según día y tratamiento.**

Analysis of Variance for ph - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:repeticion	0,0119633	2	0,00598167	0,44	0,6481
B:dia	4,37546	3	1,45849	107,69	0,0000
C:tratamiento	7,47988	4	1,86997	138,07	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,0662367	6	0,0110394	0,82	0,5688
AC	0,0729533	8	0,00911917	0,67	0,7099
BC	4,63108	12	0,385924	28,49	0,0000
RESIDUAL	0,325047	24	0,0135436		
TOTAL (CORRECTED)	16,9626	59			

**Tabla 11: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del pH en hamburguesas según día.**

Multiple Range Tests for ph by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	15	5,942	X
3	15	6,19733	X
6	15	6,55933	X
9	15	6,59667	X

**Tabla 12: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del pH en hamburguesas según tratamiento.**

Multiple Range Tests for ph by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con EA	12	5,94583	X
con AEO y EA	12	5,99333	X
con AEO	12	6,32417	X
con TBQH	12	6,4325	X
sin antioxidada	12	6,92333	X

**Tabla 13: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del TBARs en hamburguesas según día y tratamiento.**

Analysis of Variance for absorbancia - Type III Sums of Squares

---

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:día	0,390928	3	0,130309	17,73	0,0000
B:repeticion	0,000432533	2	0,000216267	0,03	0,9710
C:tratamiento	6,78712	4	1,69678	230,87	0,0000
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	0,0791387	6	0,0131898	1,79	0,1428
AC	2,08694	12	0,173912	23,66	0,0000
BC	0,0729711	8	0,00912139	1,24	0,3188
RESIDUAL	0,176391	24	0,00734962		

**Tabla 14: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del TBARs en hamburguesas según día.**

Multiple Range Tests for absorbancia by dia

---

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	15	0,603467	X
3	15	0,714933	X
6	15	0,763933	XX
9	15	0,8234	X

**Tabla 15: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del TBARs en hamburguesas según tratamiento.**

Multiple Range Tests for absorbancia by tratamiento

---

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con TBQH	12	0,412083	X
con AEO	12	0,42575	X
sin antioxidada	12	0,525583	X
con AEO y EA	12	1,09442	X
con EA	12	1,17433	X

Tabla 16: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del color L\* en hamburguesas según día y tratamiento.

Analysis of Variance for color - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:día	452,352	3	150,784	55,89	0,0000
B:repeticion	6,11984	5	1,22397	0,45	0,8090
C:tratamiento	51,7295	4	12,9324	4,79	0,0020
INTERACTIONS					
AB	62,1699	15	4,14466	1,54	0,1207
AC	172,404	12	14,367	5,33	0,0000
BC	89,9202	20	4,49601	1,67	0,0656
RESIDUAL	164,578	61	2,698		

Tabla 17: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color L\* en hamburguesas según día.

Multiple Range Tests for color by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
3	23	35,4071	X
9	28	40,7311	X
0	45	40,986	X
6	25	41,2491	X

Tabla 18. Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color L\* en hamburguesas según tratamiento.

Multiple Range Tests for color by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con AEO	27	38,6031	X
con TBQH	25	39,1232	X
sin antioxidada	26	39,1954	X
con EA	26	40,4921	X
con EA+AEO	17	40,5528	X

**Tabla 19: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del color a\* en hamburguesas según día y tratamiento.**

Analysis of Variance for color - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:dia	256,527	3	85,5089	42,28	0,0000
B:repeticion	28,1973	5	5,63946	2,79	0,0249
C:tratamiento	583,319	4	145,83	72,11	0,0000
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	39,4839	15	2,63226	1,30	0,2300
AC	87,1169	12	7,25974	3,59	0,0005
BC	38,0739	20	1,90369	0,94	0,5409
RESIDUAL	121,347	60	2,02245		

**Tabla 20: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color a\* en hamburguesas según día.**

Multiple Range Tests for color by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
3	30	5,16933	X
6	30	7,841	X
0	30	8,42033	XX
9	30	8,98267	X

**Tabla 21: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color a\* en hamburguesas según tratamiento.**

Multiple Range Tests for color by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con EA+AEO	24	4,89958	X
con EA	24	5,04208	X
con TBQH	24	8,62333	X
con AEO	24	9,2875	X
sin antioxidada	24	10,1642	X

**Tabla 22: Prueba de ADEVA correspondiente a la evolución del color b\* en hamburguesas según día y tratamiento.**

Analysis of Variance for color - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:dia	219,36	3	73,1199	71,56	0,0000
B:repeticion	4,1755	5	0,8351	0,82	0,5422
C:tratamiento	170,202	4	42,5504	41,64	0,0000
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	21,6426	15	1,44284	1,41	0,1714
AC	57,3213	12	4,77677	4,67	0,0000
BC	21,2594	20	1,06297	1,04	0,4330
RESIDUAL	61,3118	60	1,02186		

**Tabla 23: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color b\* en hamburguesas según día.**

Multiple Range Tests for color by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
3	30	5,871	X
6	30	8,61	X
0	30	8,65633	X
9	30	9,43467	X

**Tabla 24: Prueba de Tukey correspondiente a la evolución del color b\* en hamburguesas según tratamiento.**

Multiple Range Tests for color by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con AEO	24	7,11417	X
sin antioxidada	24	7,18542	X
con TBQH	24	7,21958	X
con EA+AEO	24	9,47542	X
con EA	24	9,72042	X

Tabla 25: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de coliformes totales en hamburguesas según día y tratamiento.

Analysis of Variance for coliformes totales - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:dia	6,72616	3	2,24205	6,84	0,0061
B:tratamiento	4,15367	4	1,03842	3,17	0,0540
RESIDUAL	3,93331	12	0,327776		
TOTAL (CORRECTED)	14,8131	19			

Tabla 26: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes totales en hamburguesas según día.

Multiple Range Tests for coliformes totales by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	5	0,81337	X
6	5	0,975704	XX
9	5	1,70103	XX
3	5	2,25786	X

Tabla 27: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes totales en hamburguesas según tratamiento.

Multiple Range Tests for coliformes totales by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con AEO y EA	4	0,828993	X
con EA	4	0,951545	XX
con TBQH	4	1,71672	XX
con AEO	4	1,7348	XX
sin antioxidada	4	1,95289	X

**Tabla 28: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de coliformes fecales en hamburguesas según día y tratamiento.**

Analysis of Variance for coliformes fecales - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:dia	0,698779	3	0,232926	15,00	0,0002
B:tratamiento	0,062134	4	0,0155335	1,00	0,4449
RESIDUAL	0,186402	12	0,0155335		

**Tabla 29: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes fecales en hamburguesas según día.**

Multiple Range Tests for coliformes fecales by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
9	5	0,0	X
6	5	0,0	X
3	5	0,0	X
0	5	0,431672	X

**Tabla 30: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de coliformes fecales en hamburguesas según tratamiento.**

Multiple Range Tests for coliformes fecales by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con AEO	4	0,0	X
con AEO y EA	4	0,11928	X
con TBQH	4	0,11928	X
con EA	4	0,150515	X
sin antioxidada	4	0,150515	X

Tabla 31: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de levaduras y hongos en hamburguesas según día y tratamiento.

Analysis of Variance for levaduras y mohos - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:dia	11,171	3	3,72365	12,50	0,0005
B:tratamiento	3,96594	4	0,991486	3,33	0,0472
RESIDUAL	3,5747	12	0,297892		

Tabla 32: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de levaduras y hongos en hamburguesas según día.

Multiple Range Tests for levaduras y mohos by dia

Method: 95,0 percent LSD

dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	5	2,24064	X
3	5	3,08156	X
6	5	3,78494	XX
9	5	4,21249	X

Tabla 33: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de levaduras y hongos en hamburguesas según tratamiento.

Multiple Range Tests for levaduras y mohos by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con AEO y EA	4	2,66721	X
con EA	4	3,02221	X
sin antioxidada	4	3,48965	XX
con AEO	4	3,50772	XX
con TBQH	4	3,96276	X

Tabla 34: Prueba de ADEVA correspondiente al recuento de bacterias psicrófilas en hamburguesas según día y tratamiento.

Analysis of Variance for bacterias psicrófilas - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: día	26,4593	3	8,81977	41,79	0,0000
B: tratamiento	3,76372	4	0,94093	4,46	0,0194
RESIDUAL	2,53281	12	0,211067		

Tabla 35: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de bacterias psicrófilas en hamburguesas según día.

Multiple Range Tests for bacterias psicrófilas by día

Method: 95,0 percent LSD

día	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	5	5,61997	X
3	5	6,36204	X
6	5	7,96371	X
9	5	8,44566	X

Tabla 36: Prueba de Tukey correspondiente al recuento de bacterias psicrófilas en hamburguesas según tratamiento.

Multiple Range Tests for bacterias psicrófilas by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
con EA	4	6,53518	X
con AEO y EA	4	6,63359	XX
con TBQH	4	7,2447	XX
sin antioxidada	4	7,53768	X
con AEO	4	7,53806	X

## BIBLIOGRAFIA

- ALIGIANNIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S, CHINOUBI. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4168-4170.
- AMADIO, C. 2013. Genotipos de orégano de la provincia de Mendoza: caracterización físico-química y su empleo como aditivos alimentarios naturales. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Nacional De Cuyo, Facultad De Ciencias Agrarias, Argentina.
- AMADIO, C., ZIMMERMANN, M.; MEDINA, R.; MIRALLES, S. 2006. Antioxidant capacity of aromatic spices of Mendoza. *Molecular Medicinal Chemistry.* 10 May- August, 27- 29.
- AMADIO, C.; MEDINA, R.; DEDIOL, C.; ZIMMERMANN, M.; MIRALLES, S. 2011. "Aceite esencial de orégano: aditivo alimentario". *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.Cuyo*, 43, 237-245.
- AMADIO, C; MEDINA de DIAS, R. 1997 Efecto de distintos antioxidantes sobre la rancidez oxidativa de hamburguesas de nutria. Resúmenes del X Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Bs. As.
- AMIN, M., & KAPADNIS, B. P. 2005. Heat stable antimicrobial activity of *Allium ascalonicum* against bacteria and fungi. *Indian journal of experimental biology*, 43(8), 751.
- ANMAT. Código Alimentario Argentino. Capítulo VI. Alimentos cárneos y afines. [en línea]. [Consulta 20 de mayo 2016].
- ANULAR JESUS, RODRIGUEZ YECENIA. 2006. Características físicas y químicas, y prueba de preferencia de tres tipos de mangos criollos venezolanos. *Bioagro*.
- ARMENTEROS, M.; VENTANAS, S.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Y VENTANAS, J. 2012. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne*, 207. Junio 63-73.
- ASENCIO CLAUDIA MARIANA. 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. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- BANDONIENE, P. VENSKUTONIS, D. GRUZDIENE, M. MURKOVIC, Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil, *Eur. J. LipidSci. Technol.* 104 (2002) 286-292.
- BARBOSA, L. N., RALL, V. L. M., FERNANDES, A. A. H., USHIMARU, P. I., PROBST, I. S., & FERNANDES, A., Jr. 2009. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 725-728.
- BARON, C; SKIBSTED, L.; ANDERSEN, H. 2002. Concentration effects in myoglobin-catalyzed peroxidation of linoleate. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50 (4): 883-888.
- BARREIRO FERNÁNDEZ JOSÉ MANUEL, PÉREZ FERNANDO LOSADA, SANMARTÍN EMILIO RUZO. Valor de marca, calidad percibida y calidad real: un análisis comparativo del mercado de la leche.
- BASSOLÉ, I. , JULIANI H. 2012. Review: Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- BAUZÁ PABLO .2015. Producción de orégano en Mendoza, un trabajo de muchos. [en línea]. AEA INTA La Consulta. Mendoza, Argentina .<http://www.cpia.org.ar/agropost/201504/nota13.html> ] [Consulta 20 de abril de 2016]
- BELITZ, H. D. Y GROSCH, W. (1997). *Química de los Alimentos* (Segunda edición ed.). Zaragoza, España: Acribia.

- BENEKEBLIA, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 263–268.
- BEUCHAT, L.R. Y GOLDEN, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43(1): 134-142.
- BIESALSKI, H. K. 2005. Meat as a component of a healthy diet — Are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70, 509–524.
- BONILLA, J., VARGAS, M., ATARÉS, L., & CHIRALT, A. 2014. Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products. *Food and bioprocess technology*, 7(8), 2443-2450.
- BOREK, C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.* 131, 1010-1015.
- BUDUI DERGAL, S. (1990). *Química de los Alimentos* (Segunda edición ed.). México: Alhambra Mexicana.
- BURBA JOSE LUIS. 2003. Producción de ajo.[en línea]. Estación experimental Agropecuaria La consulta. Documento 069. Proyecto Ajo/INTA. [[http://www.latranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/INTA\\_Produccion\\_de\\_ajo\\_.pdf](http://www.latranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/INTA_Produccion_de_ajo_.pdf)] [Consulta 20 de abril de 2016]
- BURBA JOSE LUIS. 2008. Los grupos varietales de ajo (*Allium sativum* L.) Contribucion para su entendimiento. INTA. Estación Experimental Agropecuaria La Consulta. La Consulta, San Carlos, Mendoza, Argentina.
- BURT, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- C.CATALINA S. AVAGNINA .2007. El análisis sensorial. Curso superior de degustación de vinos. Estación Experimental Agropecuaria INTA . Mendoza, Argentina.
- CAMARGO, A.; MARCHEVSKY, E.; LUCO. 2007. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 3096-3103.
- CAMERONI GIMENA. 2013. Informe de producto: Ficha Técnica de Orégano "*Origanum vulgare*". [en línea]. Alimentos Argentinos. [[http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/aromaticas/productos/Oregano\\_2013\\_03Mar.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/aromaticas/productos/Oregano_2013_03Mar.pdf)] [Consulta 10 de mayo de 2016]
- CAMPO, M.; NUTE, G.; HUGHES, S.; ENSER, M.; WOOD, J.; RICHARDSON, R. 2006. Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72: 303 – 311.
- CÁNOVAS LAURA, BAUZÁ MÓNICA, HERRERA MARÍA CRISTINA, SANCE MARÍA. 2007. Cultivares de ajo: degustaciones dirigidas de productos gourmet. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XL. N° 1. Año 2008.17-27.
- CORZO MARTIÍNEZ, M.; CORZO, N. Y VILLAMIEL, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18 609-625.
- COSTELL, E; DURÁN, L. (1981). El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. III. Planificación, selección de jueces y diseño estadístico. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment*, 21(4), 454-470)
- CHAN, K. W., KHONG, N. M., IQBAL, S., CH'NG, S. E., YOUNAS, U., & BABJI, A. S. 2014. Cinnamon bark deodorised aqueous extract as potential natural antioxidant in meat emulsion system: a comparative study with synthetic and natural food antioxidants. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3269-3276.
- CHEFTEL, J. C. Y CHEFTEL, H. (1992). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los Alimentos*. (Vol I). Editorial Acribia.
- CHEN, H. M., MURAMOTO, K., YAMAUCHI, F., HUANG, C. L. (1996). Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, 42, 1102–1104.

- CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology* 24: 607–617.
- DEAN, S. G., SVOBODA, K. P. (1989). Antimicrobial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science*, 64, 205–210
- DINESH D. JAYASENA, AND CHEORUN JOC. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. Elsevier Ltd. *Trends in food, science and technology* xx (2013) 1-13.
- DUPERTUIS, L.; MEDINA R.; ZIMMERMANN, M.; AMADIO, C.; MIRALLES, S. 2004. Medallones de carne vacuna. Reducción del contenido de sal por incorporación de oleorresinas de especias. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Tomo XXXIV. Nº 2, 67-71.
- DUPERTUIS, L.; MEDINA R.; ZIMMERMANN, M.; AMADIO, C.; MIRALLES, S. 2010 “Medallones de carne vacuna: reducción del contenido de sal por incorporación de oleorresinas de especias” Cooperación Franco-Argentina en el área de ANALISIS SENSORIAL DE ALIMENTOS. Editorial: Consorcio Argentino ARFITEC (UBA, U.N.Cuyo; UCA; UCC), Buenos Aires. ISSN: en trámite. Idioma: Español-Francés. Pgs. 1-5.
- DURAN MELVÍN A., GONZALEZ P. PAULA A., CARDONA P. LEONARDO .2007.Obtención y caracterización de la oleorresina del ajo (*Allium sativum* ). [en línea]. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. [<http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/4183>] [Consulta 02 de mayo de 2016]
- DZUDIE, T., KOUEBOU, C. P., ESSIA-NGANG, J. J., & MBOFUNG, C. M. F. 2004. Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties. *Journal of Food Engineering*, 65, 67-72.
- ESCALANTE, A. S., URRUTIA, G. R. T., ARRIOLA, J. P. C., MÉNDEZ, N. F. G., & WATANABE, G. H. (2008). Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. *Nacameh*, 2(2), 124-159.
- ESPINOSA MANFUGÁS, Julia. Evaluación Sensorial de los Alimentos. La Habana: Editorial Universitaria 2007, 116 p.
- FARAG, R. S., DAW, Z. Y., HEWEDI, F. M., & EL-BAROTY, G. S. A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52, 665–667.
- FARRANDO, S.; LOCATELLI, D.; CAMARGO; A. 2012.3º Congr. Inter. Nutr. Tecn. Alim
- FEI, L., LIN, X., GUAN, Y., ZHI YANG, D., LI, Z., & DE YAO, K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324 - 1335.
- FENNEMA, OWEN R. (2000). *Química de los Alimentos* (Segunda edición ed.). Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- FERNÁNDEZ LÓPEZ, J., ZHI, N., ALESON CARBONELL, L., PÉREZ ALVAREZ, JA., KURI, V. 2004. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs.
- FILIPPINI, M. F., ABRIL, A., CONY, M., NOÉ, M., VENIER, M., CÓN SOLI, D., & VALLONE, R. , 2012. Effects of organic amendment application on soil quality and garlic yield in central-western Argentina. *The Open Agriculture Journal*, 6, 1-8.
- FRATIANNI, F., MARTINO, L. D., MELONE, A., FEO, V. D., COPPOLA, R., & NAZZARO, F. 2010. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75(8), 528-535.
- GASCÓN, A. 1999. Utilización de aceites esenciales de romero, aguaribay y eucaliptus. *P. Aromática*. Año 4, 16, 4.

- GATELLIER, P., HAMELIN, C., DURAND, Y., & RENERRE, M. 2001. Effect of a dietary vitamin E supplementation on colour stability and lipid oxidation of air-and modified atmosphere-packaged beef. *Meat Science*, 59(2), 133-140.
- GAZZANI, G., PAPETTI, A., MASSOLINI, G., AND DAGLIA, M. 1998. Anti-and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4118-4122.
- GILL, C. 1983. Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection*, 46: 444–452.
- GODDARD, B.; MIKEL, W.; CONNER, D.; JONES, W. 1996. Use of organic acids to improve the chemical, physical, and microbial attributes of beef strip loins stored at 1 °C for 112 days. *Journal of Food Protection*, 59: 849–853.
- GONZÁLEZ VIÑAS MIGUEL ANGEL, GARCÍA RUIZ ANTONIA, SÁNCHEZ EVA, LORENZO PALOMO. 2008. Informe final del proyecto “evaluación de la opinión de los consumidores sobre distintos alimentos mediterraneos”. *Química analítica y tecnología de alimentos*.
- GOVARIS, A., SOLOMAKOS, N., PEXARA, A., & CHATZOPOULOU, P. S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 175-180.
- GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 142-150.
- H. HAJIMEHDIPOOR, M. .KHANAVI, N. ADIB, M AMRI. SHEKARCHI, M. 2010. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatileoil [JournalListPharmacognMag](#)v.6(23).
- HARRIS, J. C., COTTRELL, S. L., PLUMMER, S. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiological Biotechnology*, 57, 282–286
- HOULIHAN, C. M., HO, C. T., CHANG, S. S. (1984). Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61, 1036–1039
- Informe Completo Sobre La Producción Y El Mercado De Ajo En Argentina. *Diario la tordilla*. [en línea]. Córdoba, Argentina. 2013. [<http://www.diariolatordilla.com.ar/informe-completo-sobre-la-produccion-y-el-mercado-de-ajo-en-argentina/>] [Consulta 01 de abril de 2016]
- INTI. Programa Pruebas de Desempeño de Productos Informe de Análisis de Hamburguesas y Medallones de Carne. 2008. [en línea] [[http://www.inti.gob.ar/productos/pdf/informe\\_hamburguesas.pdf](http://www.inti.gob.ar/productos/pdf/informe_hamburguesas.pdf)] [Consulta 01 de noviembre de 2016]
- IRKIN R, KORUKLUOGLU M. 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *Afr J Biotechnol* 6: 384- 387.
- J. C. Harris, S. L. Cottrell, S. Plummer, D. Lloyd .2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 57:282–286.
- J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ, N. ZHI , L. ALESON-CARBONELL , J.A. PÉREZ-ALVAREZ , V. KURI. 2004. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Elsevier Ltd.
- JAYASENA, D.D., JO, C. 2013. Essential oils as potencial antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 96-108.
- JEREMIAH, L. 2001. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. *Food Research International*, 34:749–772.

- KANATT, S. R., RAO, M. S., CHAWLA, S. P., Y SHARMA, A. 2013. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 321-326.
- KIM, S. M., KUBOTA, K., KOBAYASHI, A. (1997). Antioxidative activity of sulphur-containing flavour compounds in garlic. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 61, 1482–1485.
- KON, K. Y RAI, M. 2012. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Bioscience*, 4, 50–56.
- LAMPE, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 475S–490
- LANZOTTI V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr A.*, 1112:3–22.
- LAWSON, L. D., WANG, Z. J., & HUGHES, B. G. 1991. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)ylthiosulfonates in commercial garlic products. *Plantamedica*, (57), 363-70.
- LEE, B.; HENDRICKS, D.; CORNFORTH, D. 1998. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. *Journal of Food science*. 63 (3), 394-398.
- LIMBO, S.; TORRI, L.; SINELLI, N.; FRANZETTI, L.; CASIRAGHI, E. 2010. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, 84 (1): 129–136.
- LIU, C., YANG, X., YAO, Y., HUANG, W., SUN, W., MA, Y. 2014. Determination of Antioxidant Activity in Garlic (*Allium sativum*) Extracts Subjected to Boiling Process in vitro. *Journal of Food and Nutrition Research*, Vol. 2, 7. 383-387
- LÓPEZ DÍAZ, T.; GONZÁLEZ, C.; MORENO, B. Y OTERO, A. 2002. Effect of temperature water activity pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiology*, 19: 1-7.
- LV, F., LIANG, H., YUAN, Q., & LI, C. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057-3064.
- MANINI, C.; ZIMMERMANN, M.; MEDINA, R.; AMADIO, C.; ARANITI, E.; MIRALLES, S. 2007. Inhibición del radical superóxido por extractos vegetales. *La Alimentación Latinoamericana*. 272, 54 – 56.
- MARIUTTI, L. R. B., NOGUEIRA, G. C., & BRAGAGNOLO, N. 2011. Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. *Journal of Food Science*, 76(6), 909-915.
- MARTÍN, F. R., FRUTOS, M. J., PÉREZ ALVAREZ, J. A., MARTÍNEZ SÁNCHEZ, F., DEL RÍO, J. A. (2002). Flavonoids as nutraceuticals: structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. In Atta-Ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry* (Vol. 26, pp. 324–389). Amsterdam: Elsevier Science.
- MASNIYOM, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. 2002. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 873–880.
- MEDINA DE DIAS, R., ZIMMERMANN, M; AMADIO, C; DUPERTUIS, L; ESPEJO, C; RAIMONDO, E; DIP, G. 2003. Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias- UNCuyo*. Tomo XXXV. Nº 2, 13-23.
- MEDINA DE DIAS, R.E.I.; CAMARGO A., GONZÁLEZ, R. 2004. (a) Efecto antioxidante de la allicina contenida en polvo de ajo cv. Sureño en alimentos. Resúmenes de las XI Jornadas de Investigación y Docencia de la FCA-UNCuyo. Noviembre 2004. Mendoza- Argentina.

- MEDINA DE DIAS, R.E.I.; GRINTAL, M. 2004. (b) Efecto de la adición de sal y oleoresina de romero (ORR) a crema de leche pasteurizada. Resúmenes de las XI Jornadas de Investigación y Docencia de la FCA-UNCuyo. Noviembre 2004. Mendoza- Argentina.
- MEDINA DE DIAS, R.; ZIMMERMANN, M; DUPERTUIS, L; ESPEJO, C; AMADIO, C; RAIMONDO, E; DIP, G. 2011. Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. Revista Mundo Lácteo y Cárnico. Julio/Agosto 2011.
- MEDINA DE DÍAS, ROSA. 2004. Grasas de origen animal I. Grasas de origen animal II. Material didáctico 2004. Bromatología de alimentos zoógenos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.
- MEDINA DE DÍAS, ROSA. 2012. Evaluación sensorial en alimentos zoógenos. Material didáctico 2012. Bromatología de alimentos zoógenos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.
- MIRALLES, S.; MEDINA, R.; ZIMMERMANN, M.; AMADIO, C. 2007. Efecto del aceite esencial de tomillo mendocino (*Acantolippia seriphioides*) en la cinética de la oxidación de lípidos. La Industria Cárnica Latinoamericana; 151, 58 – 63.
- MORENO, J.; LÓPEZ, G.; SICHE, R. 2010. Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Scientia Agropecuaria 1: 147 – 154.
- MORTEN HYLDGAARD, TINA MYGIND AND RIKKIE LOUISE MEYER. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in microbiology. Volume 3. Article 12, p 1-24.
- MOULY, P. P., ARZOUYAN, C. R., GAYDOU, E. M., ESTIENNE, J. M. (1994). Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 70–79.
- MUHAMMAD SAMEEM JAVED, MUHAMMAD ISSA KHAN, MUHAMMAD ATIF RANDHAWA, MUHAMMAD WASIM SAJID, AMMAR AHMAD, KHAN, MUHAMMAD ADNAN NASIR. 2011. Garlic (*Allium Sativum* L.) as an antimicrobial and antioxidant agents in beef sausages. National Institute of Food Science and Technology, University of Agriculture, Faisalabad-Pakistan. Pakistan Journal of Food Sciences (2011), Volume 21, Issue 1-4, Page(s): 22-32.
- MUKHTAR S, GHORI I. 2012. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *E.coli* ATCC 25922 and *B.subtilis* DSM 3256. International Journal of applied biology and pharmaceutical Technology. 3(2): 131-136.
- NAKATANI, N., INATANI, R. (1984). Two antioxidant diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a new revised structure for rosmanol. Agricultural Biological Chemistry, 48, 2081–2085.
- NEL, S., LUES, J., BUYS, E.; VENTER, P. 2004. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. Meat Science, 66: 667-674.
- NIETO, G.; SKIBSTED, L.; ANDERSEN, M.; ROS, G. 2012. Actividad antioxidante y prooxidante del aceite esencial de ajo por resonancia de spin electrónica. An. Vet. (Murcia) 28: 23-33.
- NURUL, H., RUZITA, A.; ARONAL, A. 2010. The antioxidant effects of *Cosmos caudatus* and *Polygonum minus* in refrigerated duck meatballs. International Food Research Journal. 17: 893-904.
- NUUTILA, A. M., PUUPPONEN-PIMIA", R., AARNI, M., OKSMAN CALDENTY, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chemistry, 81, 485–493
- NYCHAS, G.J.E. 1995. Natural Antimicrobials from plants. En: New Methods of food preservation. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. p. 1-21. Citado en: Weltri-Chanes, J., VergaraBalderas, F., y López-Malo, A. 1997. Minimally Processed foods state of the Art and

- Future. En: P. Fito., E. OrtegaRodriguez y G. Barbosa-Canovas (Eds.). Food Engineering 2000. E.U.A. Chapman y Hall. pp. 181-212.
- NYCHAS, G.J.E., P.N., SKANDAMIS, C.C., TASSOU. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Roller S. (Ed.). CRC Press. Washington, D.C. Chap. 9: 177-199.
- O'GRADY, M, MONAHAN, F, BRUNTON, N. 2001. Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle—mechanistic studies. *Journal of Food Science* 66: 386–392.
- OKTAY, M., GÜLCIN, I., & KÜFREVIÖGLÜ, Ö. İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, vol. 36, p. 263-271.
- PARK, S.; CHIN, K. 2014. Effect of Fresh Garlic on Lipid Oxidation and Microbiological Changes of Pork Patties during Refrigerated Storage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34:5, 638–646.
- PÉREZ ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ROSMINI, M. 2004. Chemical and physical aspects of color in frozen muscle-based food, pp. 215-226 en *Handbook of Frozen Foods*, Marcel Dekker Inc.
- PÉREZ ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E. 1998. Caracterización de los parámetros de color de diferentes materias primas usadas en la industria cárnica, *Eurocarne* 63: 115-122.
- PETROU, S.; TSIRAKI, M.; GIATRAKOU, V.; SAVVAIDIS, I. 2012. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology* 156: 264–271.
- PEZESHK, S., REZAEI, M., & HOSSEINI, H. 2011. Effects of Turmeric, Shallot Extracts, and Their Combination on Quality Characteristics of Vacuum- Packaged Rainbow Trout Stored at  $4\pm 1^\circ$  C. *Journal of food science*, 76(6), 387-391.
- PONCE, A., ROURA, S., DEL VALLE, C.; MOREIRA, M. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo Studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 294-300.
- POTASCHNER, P.; BAUZÁ, P. 2009. Evaluación económica para cinco modelos de producción primaria de orégano en la Provincia de Mendoza utilizando cuatro variables críticas. Publicado en Internet, disponible en: [www.cappama.org.ar](http://www.cappama.org.ar). Activo mayo 2012.
- Programa Pruebas de Desempeño de Productos Informe de Análisis de Hamburguesas y Medallones de Carne. [en línea]. INTI. [[http://www.inti.gob.ar/productos/pdf/informe\\_hamburguesas.pdf](http://www.inti.gob.ar/productos/pdf/informe_hamburguesas.pdf)] [Consulta 26 de mayo de 2016]
- QUINTERO, C. A.; MALDONADO, Y.; CABALLERO, L. A.; RIVERA, M. E. (2014). Entrenamiento de jueces para la evaluación del color de la avena instantánea sabor fresa y crema de arroz sabor arequipe. @ limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 12(1).
- RANJAN, S., DASGUPTA, N., SAHA, P., RAKSHIT, M. AND RAMALINGAM, C. 2012. Comparative study of antibacterial activity of garlic and cinnamon at different temperature and its application on preservation of fish. *Advances in Applied Science Research*, , 3 (1), 495-501
- RODRÍGUEZ SAUCEDA, ELVIA NEREYDA. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, enero-abril, año/Vol. 7, Número 1 Universidad Autónoma Indígena de México Mochichahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 153-170.
- SALLAM, KH.I. M. ISHIOROSHI, K. SAMEJIMA. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebenson Wiss Technol.* 2004 December ; 37(8): 849–855. Elsevier Ltd.
- SÁNCHEZ GONZÁLEZ, L., PASTOR, C., VARGAS, M., CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., & CHÁFER, M. 2011. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and

without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57-63.

SCHIEBER, A., STINTZING, F. C., CARLE, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401–413.

SENASA. 2015. El ajo, un ícono de la calidad de los agroalimentos producidos por la Argentina. [en línea]. [<https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=10&io=30196>] [Consulta 22 de abril de 2016]

SHAMS GHAHFAROKHIA, M., SHOKOOHAMIRIA, M., AMIRRAJABA, N., MOGHADASIA, B., GHAJARIB, A., ZEINIC, F., SADEGHID, G., RAZZAGHI-ABYANEHD, M. 2006. In vitro antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. *Fitoterapia* 77, 321-323

SIGNORINI, M. 2007. Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. *Nacameh*, 1 (1), 26-40.

SITIO OFICIAL DE CIE Lab. [en línea]. [[www.cielab.com.au](http://www.cielab.com.au)] [Consulta 01 de noviembre de 2016]

SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A., KOIDIS, P., & BOTSOGLOU, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80, 159-166.

STAŠKO, A., BREZOVÁ, V., BISKUPIČ, S., MIŠÍK, V. 2007. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Research*, 41:4, 379-390.

STATGRAPHICS Plus for windows Versión 4.0 ( Statistical Graphics Corp., MD 20852, USA).

SUHAJ, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 531-537.

SUN, Y. M., OCKERMAN, H. W., AND MARRIOTT, N. G. 2000 Garlic in Chinese sausage. *J. Muscle Foods*, 11, 35-43.

TARLADGIS, B.; WATTS, B.; YOUNATHAN, M.; DUGAN, L. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 37: 44-48.

TARQUINI, A. 2011. Generación de tecnologías alternativas frente a los nuevos escenarios para la sustentabilidad de la cadena de valor de ajo diferenciado, Seminario Proyecto INTA/Ajo.

TARQUINI, A.; CAMARGO, A. Y LINARDELLI C. 2008. Congr. Inter. Alim. siglo XXI Avances en Latinoamérica.

TUĞBA İNANÇ AND MEDENI MASKAN. 2012. The Potential Application of Plant Essential Oils/Extracts as Natural Preservatives in Oils during Processing: A Review. *Journal of Food Science and Engineering* 2 (2012) 1-9.

UGWU, C.E., OMALE, J. 2011. Comparative effects of aqueous garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) extracts on some haematological and lipid indices of rats. *Ann. Rev. and Res. in Biol.*, 1(3), 37–44.

VÁSQUEZ VALLES, M., ALVARADO SALINAS, P., RODRÍGUEZ HARO, I., SALDAÑA SEVILLA, W., REYES LÁZARO, W. Y VARGAS HUAMÁN. A. 2014. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *REBIOL*; 34(1), 57-68.

WONG, P.; KITTS, D. 2002. The effects of herbal pre-seasoning on microbial and oxidative changes in irradiated beef steaks. *Food Chemistry*, 76:2, 197-205.

YU, L., SCALIN, L., WILSON, J., SCHMIDT, G. 2002. Rosemary extracts as inhibitors of lipid oxidation and color changes in cooked turkey products during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 67, 582–585.

ZHANG, W., XIAO, S., SAMARAWEEERA, H., LEE, E. J., & AHN, D. U. 2010. Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15-31.

ZIARLARIMI, A., IRANI, M., GHARAHVEYSI, S., & RAHMANI, Z. 2013. Investigation of antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*), mint (*Mentha spp.*) and onion (*Allium cepa*) herbal extracts on *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *African Journal of Biotechnology*, 10(50), 10320-10322.

ZIMMERMANN, M. 2005. Antioxidantes naturales. Actualización en Nutrición 3. Órgano de difusión de la Sociedad Argentina de Nutrición. 14-16.

ZIMMERMANN, M. 2006. Extractos de residuos de la vitivinicultura: concentración de polifenoles. *Revista FCA- UNCuyo*. Tomo XXXVIII. Nº 1: 99-104.

ZIMMERMANN, M.; MEDINA, R.E.I.; ROSSO, V. 2004. Subproductos de la vid como antioxidantes en aceite de oliva virgen. Resúmenes del XIII Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Octubre de 2004. Montevideo- Uruguay.