

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,  
para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencia y Tecnología de  
Alimentos.

**UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES COMO  
ANTIFÚNGICOS PARA APLICACIÓN EN  
INDUSTRIA QUESERA.**

Por

**Lic. María Delfina BOCCO GIANELLO**

Directora de Tesis: Mg. Laura FRISÓN

Co-Directora de Tesis: Mg. Carolina CHIERICATTI

Miembros del Jurado: Dra. Patricia QUIROGA

Dra. Patricia BURNS

Dra. Marisol LABAS

**CÁTEDRA DE MICROBIOLOGIA - DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

2023

**Índice de contenidos**

|  |    |
|--|----|
| <b>Índice de contenidos</b> .....  | 1  |
| <b>Índice de Tablas</b> .....  | 4  |
| <b>Índice de Figuras</b> ... ..  | 5  |
| <b>Abreviaturas</b> .....  | 8  |
| <b>Resumen</b> .....   | 9  |
| <b>1. Introducción</b>   |    |
| 1.1. Consideraciones generales.....  | 11 |
| 1.2. Quesos.....   | 12 |
| 1.3. Aditivos alimentarios.....  | 14 |
| 1.3.1. Natamicina.....   | 15 |
| 1.3.2. Aceites Esenciales (AE).....  | 16 |
| 1.3.2.1. Orégano: <i>Origanum vulgare L.</i> .....   | 20 |
| 1.3.2.2. Tomillo: <i>Thymus vulgaris</i> .....   | 22 |
| 1.3.2.3. Romero: <i>Rosmarinus officinalis L.</i> .....  | 24 |
| 1.3.2.4. Método de acción antimicrobiano.....  | 26 |
| 1.3.3. Definición en el Código Alimentario Argentino y reglamentación.....                             | 27 |
| 1.3.4. Interés por los aceites esenciales y su uso en la industria alimentaria.....                    | 28 |
| <b>2. Objetivos</b>  |    |
| 2.1. General.....  | 30 |
| 2.2. Específicos.....  | 30 |
| <b>3. Materiales y métodos</b>   |    |
| 3.1. Muestreo de ambientes de industrias lácteas y de quesos.....                                      | 31 |
| 3.2. Aislamiento e identificación de los mohos presentes en industria quesera y muestras de queso..... | 32 |
| 3.2.1. Aislamiento de los mohos.....   | 32 |



|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 3.2.2.    | Identificación de la flora fúngica.....  | 32 |
| 3.2.3.    | Observación macroscópica de las colonias.....  | 33 |
| 3.2.4.    | Observación microscópica de las colonias.....  | 34 |
| 3.2.5.    | Conservación de los mohos.....   | 34 |
| 3.2.6.    | Reactivación de los mohos.....   | 34 |
| 3.2.7.    | Preparación de las suspensiones de propágulos fúngicos utilizados en los ensayos.....                                    | 35 |
| 3.2.8.    | Recuento de propágulos fúngicos.....   | 35 |
| 3.2.8.1.  | Recuento en cámara de Neubauer.....  | 35 |
| 3.2.8.2.  | Recuento microbiológico en placa de Petri con medio Extracto de Malta Agar (MEA).....                                    | 36 |
| 3.3.      | Realización de ensayos con los aceites esenciales.....   | 36 |
| 3.3.1.    | Método de difusión en agar con pozo del aceite esencial.....   | 37 |
| 3.3.2.    | Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS)  | 38 |
| 3.3.3.    | Elección del tipo de queso.....  | 39 |
| 3.3.4.    | Aplicación del aceite esencial sobre la superficie de los quesos.....  | 41 |
| 3.3.4.A.  | Esprayado de la solución de aceite esencial.....   | 40 |
| 3.3.4.B.  | Pincelado de la solución de aceite esencial.....   | 42 |
| 3.4.      | Evaluación de la acción inhibitoria de los aceites esenciales sobre la superficie de los quesos.....                     | 42 |
| 3.5.      | Análisis sensorial del queso tratado.....  | 43 |
| 3.6.      | Utilización de un recubrimiento comercial como vehículo del aceite esencial para aplicar en la superficie del queso..... | 44 |
| 3.7.      | Análisis estadístico.....  | 45 |
| <b>4.</b> | <b>Resultados y discusión</b>  |    |
| 4.1.      | Aislamiento e identificación de los mohos presentes en ambientes de industrias queseras y muestras de queso.....         | 46 |
| 4.2.      | Realización de ensayos <i>in vitro</i> con aceites esenciales.....   | 53 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.2.1.     | Método de difusión en agar con pozo frente a las especies de <i>Penicillium</i> identificadas.....  | 53         |
| 4.2.2.     | Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS).....  | 58         |
| 4.3.       | Aplicación del aceite esencial de orégano sobre la superficie de queso Tybo durante el almacenamiento.....  | 61         |
| 4.3.1.     | Esprayado de la solución de aceite esencial de orégano sobre la superficie de quesos. ....  | 61         |
| 4.3.2.     | Pincelado de la solución de aceite esencial de orégano sobre la superficie de quesos.....   | 63         |
| 4.3.3.     | Acción inhibitoria del aceite esencial de orégano frente al <i>P. roqueforti</i> sobre la superficie de quesos con diferentes concentraciones de inóculo      | 63         |
| 4.3.4.     | Acción inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre <i>P. brevicompactum</i> sobre la superficie de quesos con diferentes concentraciones de inóculo..... | 67         |
| 4.4.       | Análisis sensorial de los quesos tratados con aceite esencial de orégano.....   | 74         |
| 4.5.       | Utilización de un recubrimiento como vehículo del aceite esencial de orégano.....   | 76         |
| <b>5.</b>  | <b>Conclusiones.....</b>  | <b>82</b>  |
| <b>6.</b>  | <b>Bibliografía.....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>7.</b>  | <b>ANEXO I: Composición de los Medios de Cultivo.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>8.</b>  | <b>ANEXO II: Imágenes de especies y géneros identificados.....</b>  | <b>103</b> |
| <b>9.</b>  | <b>ANEXO III: Registro fotográfico de los ensayos realizados con los aceites esenciales.....</b>  | <b>105</b> |
| <b>10.</b> | <b>ANEXO IV: Análisis estadístico.....</b>  | <b>115</b> |

**Índice de Tablas**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Parámetros microbiológicos que debe cumplir el Queso Tybo según el CAA.....  | 40 |
| <b>Tabla 2.</b> Evaluación de la acción inhibitoria de los aceites esenciales expresados en porcentajes de Inhibición según el grado de desarrollo fúngico observado.....  | 43 |
| <b>Tabla 3.</b> Tarjeta de evaluación sensorial para la prueba de aceptabilidad de quesos Tybo tratados con aceite esencial a dos concentraciones y el control (queso sin tratamiento).....  | 44 |
| <b>Tabla 4.</b> Listado de los géneros de mohos encontrados en las industrias queseras visitadas.....  | 46 |
| <b>Tabla 5.</b> Taxonomía del género <i>Penicillium</i> según el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) consultado en diciembre 2022.....   | 46 |
| <b>Tabla 6.</b> Acción antifúngica de los aceites esenciales frente a las especies de <i>Penicillium</i> aisladas. ....  | 54 |
| <b>Tabla 7.</b> Acción antifúngica del aceite esencial de orégano frente a <i>P. roqueforti</i> y <i>P. brevicompactum</i> .....   | 56 |
| <b>Tabla 8.</b> Porcentajes relativos de las principales moléculas encontradas en aceite esencial de tomillo y de orégano de acuerdo a su orden de elución por Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) ..... | 59 |
| <b>Tabla 9.</b> Resultados promedio de la evaluación sensorial para la prueba de aceptabilidad de quesos Tybo tratados con aceite esencial de orégano.....   | 75 |

**Índice de Figuras**

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Fórmula química y apariencia de la Natamicina.....   | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Estructuras de a) Monoterpenos, b) Terpenoides; c) Fenilpropanoides....  | 18 |
| <b>Figura 3.</b> Factores que afectan la eficacia de la acción antimicrobiana de aceite esencial en alimentos adaptado de Da Silva y colaboradores.....   | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Hojas fresca y secas de <i>Origanum vulgare L.</i> .....   | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Hojas fresca y secas de <i>Thymus vulgaris</i> .....   | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Hojas fresca y secas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> .....   | 24 |
| <b>Figura 7.</b> N° de publicaciones por año según la cadena de búsqueda en la base de datos de investigación: ("natural antimicrobials" OR "essential oils" OR "bioactive compounds") AND cheese. (Consultado en Septiembre 2022)..... | 29 |
| <b>Figura 8.</b> Equipo de muestreo de aire centrífugo Standard RCS.....  | 31 |
| <b>Figura 9.</b> Tiras multipocillos con medio de cultivo Extracto Malta Agar (MEA). A) Sin carga fúngica. B) Con desarrollo fúngico.....   | 31 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema de la cámara de Neubauer y vista de un recuadro de la misma en el microscopio a 40X.....  | 35 |
| <b>Figura 11.</b> A) Extremo del tubo de vidrio biselado. B) Caja de Petri con medio solidificado con dos pozos realizados con esta técnica.....  | 37 |
| <b>Figura 12.</b> A) Porción de queso Tybo secándose en el flujo laminar luego de ser inoculado. B) Porciones de queso sobre la caja de Petri, dentro de bolsas de polietileno transparentes y rotuladas. ....                          | 42 |
| <b>Figura 13.</b> A) Pincel de cerdas sintéticas. B) Caja de Petri con porción de queso pincelado con esta técnica.....   | 42 |
| <b>Figura 14.</b> Características macroscópicas de las especies de <i>Penicillium</i> cultivadas en diferentes medios y condiciones.....  | 47 |
| <b>Figura 15.</b> <i>Penicillium roqueforti</i> . A) Penicilios c/ barra son 10 µm B) y C) conidios, c/ barra son 5 µm.....   | 48 |
| <b>Figura 16.</b> <i>Penicillium brevicompactum</i> . A y B) Penicilios c/ barra son 10µm C) conidios, c/ barra son 5 µm.....   | 49 |
| <b>Figura 17.</b> <i>Penicillium glabrum</i> . A, B y C) Penicilios c/ barra son 10 µm, D) conidios, c/ barra son 5 µm.....   | 50 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 18.</b> <i>Penicillium commune</i> A, B y C) Penicilios c/ barra son 10 µm D) conidios, c/ barra son 5 µm.....  | 51 |
| <b>Figura 19.</b> <i>Penicillium citrinum</i> A y B) Penicilios c/ barra son 10 µm C) conidios, c/ barra son 5 µm.....  | 52 |
| <b>Figura 20.</b> Ensayo de método de difusión en agar con pozo para <i>P. roqueforti</i> frente a los controles 1) Natamicina 0,5% p/v (halo de inhibición de 50 mm). 2) Tween20® 0,1% p/v. 3). Alcohol etílico absoluto 99,5%. ....   | 54 |
| <b>Figura 21.</b> Ensayo de método de difusión en agar con pozo para <i>P. citrinum</i> frente al aceite esencial de orégano (A) y al aceite esencial de tomillo (B). Donde cada pozo 1, 2 y 3 corresponden a las concentraciones de cada aceite 1%, 5% y 10% p/v   | 55 |
| <b>Figura 22.</b> Ensayo de método de difusión en agar con pozo para <i>P. citrinum</i> frente al aceite esencial de orégano visto al trasluz. Donde cada pozo 1, 2 y 3 corresponden a las concentraciones del aceite esencial 1%, 5% y 10% p/v.....  | 55 |
| <b>Figura 23.</b> Cromatograma obtenidos por Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) de los aceites esenciales de tomillo y orégano utilizados en los ensayos.....  | 58 |
| <b>Figura 24.</b> Ensayo de esprayado sobre la porción de queso con aceite esencial de orégano frente a <i>P. roqueforti</i> luego de 15 días a 20°C A) 2% p/v de aceite esencial de orégano base acuosa B) 5% p/v de aceite esencial de orégano base acuosa.....   | 61 |
| <b>Figura 25.</b> Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Alta de <i>Penicillium roqueforti</i> ( $10^5$ - $10^6$ propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....    | 64 |
| <b>Figura 26.</b> Acción de las formulaciones de aceite esencia de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Media de <i>Penicillium roqueforti</i> ( $10^3$ - $10^4$ propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....    | 65 |
| <b>Figura 27.</b> Acción de las formulaciones de aceite esencia de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Baja de <i>Penicillium roqueforti</i> ( $10^2$ - $10^3$ propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....     | 64 |
| <b>Figura 28.</b> Acción de las formulaciones de aceite esencia de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una Alta concentración de <i>Penicillium brevicompactum</i> ( $10^5$ - $10^6$ propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )..... | 68 |
| <b>Figura 29.</b> Acción de las formulaciones de aceite esencia de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Media de <i>Penicillium</i>   | 69 |

*brevicompectum* ( $10^3$ - $10^4$  propágulos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....

**Figura 30.** Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Baja de *Penicillium brevicompectum* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )..... 70

**Figura 31.** Comparación de la acción inhibitoria de formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa frente a una concentración Baja de propágulos de *Penicillium roqueforti* y *P. brevicompectum* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C..... 72

**Figura 32.** Comparación de la acción inhibitoria de formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base etanólica frente a una concentración Baja de propágulos fúngicos de *Penicillium roqueforti* y *P. brevicompectum* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C..... 72

**Figura 33.** Porcentaje de inhibición en función del tiempo de almacenamiento a 10°C de los controles realizados en el ensayo con queso Tybo con recubrimiento más aceite esencial de orégano frente a Baja y Alta concentración de propágulos fúngicos de *P. roqueforti*..... 76

**Figura 34.** Porcentaje de inhibición en función del tiempo (días) de almacenamiento a 10°C del queso Tybo con recubrimiento como vehículo del aceite esencial de orégano frente a Baja y Alta concentración de propágulos fúngicos de *P. roqueforti* ..... 78

**Abreviaturas**

AE: aceite esencial

AEO: aceite esencial de orégano

AER: aceite esencial de romero

AET: aceite esencial de tomillo

BPM: buenas prácticas de manufactura

CAA: código alimentario argentino

CREA: agar creatina sacarosa

CYA: agar extracto levadura Czapek

ETA: enfermedades de transmisión alimentarias

FDA: Administración de Drogas y Alimentos (siglas en inglés)

G25N: agar nitrato de glicerol 25%

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa

GRAS: Generalmente Reconocidos Como Seguro (siglas en inglés)

m.o.: microorganismos

MEA: agar extracto de malta

UFC: unidades formadoras de colonias

YES: agar extracto de levadura

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue estudiar la aplicabilidad de aceites esenciales de orégano (AEO), de tomillo (AET) y de romero (AER) como inhibidores del desarrollo fúngico para ser aplicados en la superficie de quesos durante su maduración o almacenamiento.

Se realizó el aislamiento e identificación de mohos obtenidos en industrias queseras. Se seleccionaron cinco mohos del género *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. commune* y *P. citrinum*) debido a su frecuencia en estas industrias y su importancia en el impacto económico cuando proliferan.

Diferentes concentraciones y formulaciones de los aceites esenciales se enfrentaron a los mohos seleccionados in vitro, desarrollando el método de difusión en agar con pozo donde se encontró que el AEO fue el de mayor acción antifúngica seguida por el AET y en menor medida por el AER. Se realizó cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) para conocer la composición del AEO y AET.

Diferentes concentraciones y formulaciones del AEO (1%, 2% y 5% p/v en formulaciones acuosas y etanólicas) se enfrentaron al *P. roqueforti* y al *P. brevicompactum* a tres concentraciones: Alta ( $10^5$ - $10^6$  propágulos fúngicos/mL), Media ( $10^3$ - $10^4$  propágulos fúngicos/mL) y Baja ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL), en porciones de queso Tybo (prueba en matriz alimentaria), con dos técnicas de aplicación deferentes, mediante esprayado y por pincelado. Los mejores resultados de inhibición fúngica fueron logrados mediante la aplicación por pincelado de la formulación de AEO de 5% p/v en base etanólica, extendiendo la vida útil de la porción de queso por 28 días a 10°C en el caso del *P. roqueforti* a baja concentración de propágulos fúngicos. La especie *P. brevicompactum* resultó ser más resistente a la acción antifúngica del AEO que la especie *P. roqueforti*.

Se incorporó AEO a un recubrimiento neutro apto para la industria quesera para evaluar si mejoraba la acción antifúngica del aceite esencial, y se aplicó mediante pincelado sobre la superficie de queso Tybo. Se encontró que no aportaba un beneficio mayor al ya encontrado en la aplicación de las formulaciones de AEO directamente sobre la superficie mediante pincelado.



Podemos concluir que hemos encontrado una técnica para determinar la acción antifúngica de AE y cómo buscar en futuras muestras compuestos con características antimicrobianas, antioxidantes y antifúngicos de interés en estos compuestos. Logramos extender la vida útil durante el almacenamiento a 10°C de porciones fraccionadas de queso Tybo con el agregado, mediante la aplicación por pincelado, de AEO entre 10 a 28 días según la concentración aplicada de AEO.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Consideraciones generales

La mayoría de los alimentos son perecederos y requieren ciertos cuidados a la hora de elaborar, almacenar y distribuir los mismos, para evitar su contaminación y prolongarle la vida útil (*Lucera y col., 2012*). El crecimiento de microorganismos es una de las causas por la cual estos se deterioran, generando una enorme cantidad de desechos y provocando grandes pérdidas económicas en las industrias. Un escenario todavía más preocupante es el crecimiento de microorganismos patógenos y la presencia de toxinas lo que representa una amenaza para la salud de los consumidores. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son, actualmente, una importante causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (*Khorshidian y col., 2018*). Además, la aparición de superbacterias resistentes a múltiples fármacos y conservantes, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp* y *Pseudomonas aeruginosa*, aumentó significativamente la tasa de incidencia en los últimos años (*Siler y col., 2020*).

Los hongos filamentosos (mohos) son ubicuos y pueden desarrollarse en diversos alimentos, provocando en ellos sabor desagradable, acidez, fermentación, decoloración, desintegración, pudrición, degradación y el biodeterioro de una gran variedad de productos alimenticios y piensos (*Nevarez y col., 2010*). Su crecimiento se puede ver influenciado por cambios en las condiciones medioambientales como la temperatura, actividad de agua, pH, conservantes, que pueden ser fuentes potenciales de estrés para los mohos (*Filtenborg y col., 1996; Pitt y Hocking, 2009*).

Si bien es discutible si los géneros *Aspergillus* o *Penicillium* son de mayor importancia económica como causante del deterioro de los alimentos, es cierto que *Penicillium* es el género más diverso, en términos de número de especies y de hábitats en que se encuentra (*Pitt y Hocking, 2009*). La mayoría de las especies descritas son mohos del suelo, y su presencia en los alimentos es generalmente accidental y rara vez tiene importantes consecuencias. Sin embargo, muchas especies están estrechamente asociadas con los suministros de alimentos para humanos. Algunas especies son patógenas destructivas en frutos (por ejemplo, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*); algunas crecen por debajo de una actividad acuosa (aw) de 0,80 (por ejemplo, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. implicatum*), otros a baja tensión de oxígeno y son resistentes a los conservantes (*P. roqueforti*) (*Pitt y Hocking, 2009*).

## 1.2. Quesos

El queso es uno de los productos lácteos más populares, ya que es una fuente rica de nutrientes esenciales como proteínas, vitaminas, minerales, ácidos grasos de cadena corta y ciertos ácidos grasos trans, lo que lo hace además, un alimento extremadamente perecedero (*López-Expósito y col., 2012; Marcial y col., 2016; Christaki y col., 2021*). Con amplia distribución geográfica y encontrándose en diferentes lugares del mundo, se proyecta que el mercado del queso alcanzaría los US\$ 112 mil millones para el 2025 (*Lima y col., 2021*).

La definición bromatológica que se encuentra en nuestro Código Alimentario Argentino (CAA) en el capítulo 8 art. 605, define por queso al producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes. Se entiende por “queso fresco” el que está listo para el consumo poco después de su fabricación, mientras que “queso madurado” es aquel que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso (<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>).

Las comunidades microbianas que pueden crecer sobre las superficies de los quesos están compuestas por bacterias, levaduras y mohos. Estas comunidades interactúan entre sí, generando las propiedades sensoriales propias del queso (*Monnet y col., 2014*). La capacidad de los microorganismos para establecerse en la superficie de los quesos depende de la habilidad de usar el queso como un medio de crecimiento eficiente, donde la composición y estructura van cambiando a lo largo de la madurez. Además, los microorganismos tienen que adaptarse a la presencia de otros microorganismos, pudiendo tener interacciones positivas o negativas con los mismos (*Muñoz-Tebar y col., 2021*). Las condiciones abióticas, como la temperatura y la humedad relativa, también influyen en el crecimiento de microorganismos en la superficie del queso. La capacidad de sobrevivir en el entorno de fabricación de queso es otra característica importante, ya que favorece la posterior recontaminación del mismo (*Johnson, 2001*). En quesos frescos por ejemplo,

pueden desarrollar ciertos microorganismos provenientes de los géneros psicrotróficos como son *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Achromobacter spp.* y *Flavobacterium spp.* Otras bacterias involucradas en el deterioro de quesos son algunas integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, *Bacillus spp.*, *Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum* y *C. sporogenes* (Robinson y col., 2002). En cuanto a las levaduras, aquellas encontradas con frecuencia en quesos contaminados pertenecen a los géneros *Candida spp.*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia spp.*, *Kluyveromyces marxianus* y *Debaryomyces hansenii* (Kosse y col., 1997). Los géneros de mohos más comunes relacionados al deterioro pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Monilia* y *Alternaria*. Los factores que permiten que los mismos causen deterioro en quesos es la importante actividad lipolítica que poseen y la resistencia a los conservantes de los ácidos grasos libres (Johnson, 2001). Los mohos del género *Penicillium* son los más tolerantes a la restricción hídrica (Finne Kure, 2019). El crecimiento de los mohos en quesos está asociado con manchas y olores indeseables, a la licuación de la cuajada y, en algunos casos, a la producción de micotoxinas, implicando pérdidas económicas industriales importantes (Saladino y col., 2017). Aunque el queso no es un sustrato atractivo para la producción de micotoxinas, se pueden formar algunas como el Ácido mycophenolico, Acido cyclopiazónico, roquefortina C, Acido penicilínico, Sterigmatocystina, Aflatoxina M1, Citrinina; pero las mismas no persisten luego de los tiempos de maduración de los quesos aunque algunos reportes manifiestan haber encontrado Citrinina y Ocratoxina A sobre queso grana (Decontardi y col., 2017; Dobson, 2017).

Las especies del género *Penicillium* son los principales agentes de deterioro del queso ya que su almacenamiento prolongado bajo refrigeración crea un entorno que favorece a *P. roqueforti*. Otra especie que produce deterioro es *P. commune*, ocasionando decoloración en la superficie y aparición de sabores desagradables (Pitt y Hocking, 2009; Banjara y col., 2015). El sorbato de potasio ha sido usado ampliamente para prevenir el crecimiento de mohos en quesos. Algunas especies mediante decarboxilación del conservante producen un compuesto con olor a hidrocarburo o a solvente después de 24 a 36 horas de incubación. Este compuesto volátil se denomina 1,3-pentadileno y causa muchos problemas en quesos de pasta dura o semidura luego de la maduración, por lo tanto el sorbato de potasio no cumple en estos casos con su función inhibitoria del crecimiento fúngico (Marth y col., 1966). En Europa, en los quesos envasados, el *P.*

*commune* fue la especie de descomposición más común, junto a *P. verrucosum*, *P. solitum*, *P. roqueforti* y *P. nalgiovense* también significativos (Kure y Skaar, 2019).

Se han utilizado diferentes métodos para producir alimentos inocuos, que incluyen procesamiento térmico, disminución de la actividad del agua, diversos métodos de envasado, irradiación, alta presión, procesamiento de campo eléctrico pulsado de alta intensidad y la adición de conservantes químicos (Khorshidian y col., 2018). La producción de alimentos inocuos con bajas cantidades de conservantes sintéticos o ausencia de los mismos (aditivos alimentarios), es uno de los desafíos más importantes en la industria alimentaria (Ahmed y col., 2021).

### 1.3. Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios, sean de calidad alimentaria y/o generalmente reconocidos como seguros (GRAS), han sido utilizados normalmente por la industria alimentaria hasta el presente; sin embargo, aquellos aditivos de función conservante sintéticos están siendo reemplazados por conservantes naturales a medida que los consumidores buscan alimentos que acompañen un estilo de vida más saludable (Zantar y col., 2014). Aunque no se ha definido una categoría específica para aditivos naturales, existen varios antioxidantes, antimicrobianos, edulcorantes y colorantes derivados de animales, plantas y microorganismos. Ejemplos de conservantes naturales son las bacteriocinas, la natamicina, la reuterina de fuentes microbianas; la lisozima, la lactoperoxidasa, la lactoferrina de origen animal; y los polifenoles y los aceites esenciales de origen vegetal (Carocho y col., 2015).

El ácido benzoico, el ácido sórbico, el metilparabeno y el propilparabeno se usan comúnmente en la industria de alimentos y bebidas como conservantes químicos. Pueden mejorar la seguridad y la estabilidad de los alimentos a lo largo de toda la vida útil al controlar los microorganismos patógenos y relacionados con el deterioro (Dutra da Silva y col., 2021). El uso de conservantes químicos dentro del rango definido puede garantizar la seguridad alimentaria. Sin embargo, su uso a largo plazo es un riesgo potencial para la salud de los seres humanos. Esto plantea desafíos considerables, especialmente porque las reservas químicas y los agentes antimicrobianos artificiales se utilizan cada vez más para inactivar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición (Li y col., 2022). En los últimos años, la industria alimentaria tiene una demanda creciente de compuestos naturales como nuevos conservantes de alimentos para

evitar el deterioro y los microorganismos patógenos, así como para sustentar la innovación en el envasado de alimentos (Dutra da Silva y col., 2021). En comparación con los conservantes químicos, se ha encontrado que los aceites esenciales (AE) tienen efectos antimicrobianos comparables como conservantes naturales, y además tienen las ventajas de sus atributos de seguridad, que no son tóxicos y que son respetuosos con el medio ambiente. Los AE como sustitutos de los conservantes químicos están ganando popularidad debido a su mejor tolerancia en el cuerpo humano y su superioridad inherente para la industria alimentaria (Li y col., 2022).

### 1.3.1. Natamicina

Este compuesto se utiliza hace más de 30 años para prolongar la vida útil de diferentes alimentos, entre los que se encuentra el queso, mediante la eliminación de levadura y mohos y por consiguiente la producción de micotoxinas debido a sus propiedades antifúngicas (Codex alimentarius, 2000).

La natamicina (pimaricina; E-235) es un fungicida del grupo de los macrólidos polienos eficaz contra mohos y levaduras. Sin embargo no actúa contra bacterias, virus u otros organismos tales como los protozoos, razón por la cual en nuestro código alimentario en el capítulo 18 art. 100.3 se lo define como un conservante antimicótico (<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>). Este compuesto se produce a partir de la fermentación aeróbica de *Streptomyces natalensis* y especies afines. La fermentación se lleva a cabo durante varios días y tras varios procesos se puede aislar el compuesto. La natamicina seca obtenida de la fermentación es de color blanco-crema y tiene poco o ningún olor ni sabor (Meena y col., 2021).

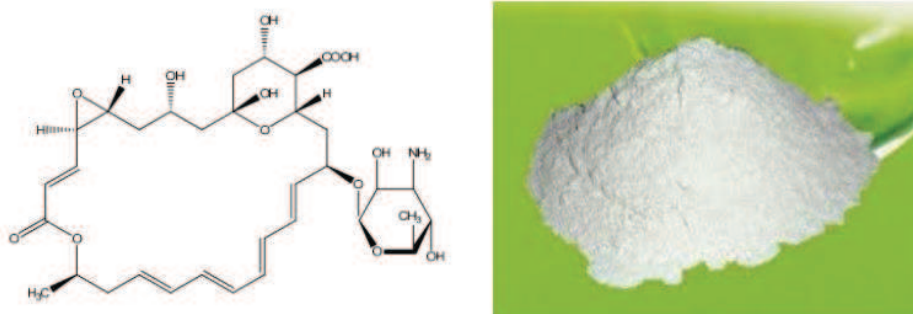


Figura 1. Fórmula química y apariencia de la Natamicina.

El mecanismo de acción se basa en la unión de este compuesto a las paredes celulares de los mohos. Mediante estos enlaces se crea un poro entre las células de los mohos y la natamicina a través del cual los iones pueden pasar libremente y como consecuencia, alteran el control iónico de la célula y provoca su muerte. Se ha observado que la natamicina tiene un efecto inhibitorio mayor sobre la producción de toxinas que sobre el crecimiento de los mohos (*Míguez Pérez, 2014*).

En el capítulo 18 art. 100.3 del CAA se establece que la natamicina puede ser empleada para el tratamiento de cáscara de quesos de pasta dura o semidura o de sus cubiertas protectoras y de las envolturas de embutidos secos que deban sufrir un proceso de maduración. La concentración residual en la superficie de las cáscaras o envolturas no deberá ser mayor de 1 mg/dm<sup>2</sup> de superficie de queso o embutido, no debiendo detectarse la presencia del antimicótico en el interior del producto a una profundidad mayor de 2 mm (<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>). También está autorizada por la normativa de EEUU para su uso como tratamiento de superficie en quesos duros, semiduros y semiblandos, a un nivel máximo de 1 mg/dm<sup>2</sup> de superficie (aunque no debe detectarse a una profundidad de 5 mm) (*Nájera y col., 2021*).

En el queso, la natamicina se puede aplicar sobre la superficie mediante la inmersión del producto en solución acuosa o bien, mediante la pulverización de la solución acuosa alrededor del producto, la solubilidad de este compuesto en agua es de 20-50 mg/L (*Meena y col., 2021*). Una ventaja es que la natamicina no afecta a las propiedades organolépticas del alimento, ni inhibe los cultivos iniciadores en los alimentos fermentados. Se estima que la eficacia de la natamicina en la superficie del alimento se mantiene durante tres meses o más, según las condiciones de almacenamiento. El calor afecta en poca medida a este compuesto, pero se degrada con el tiempo cuando está expuesta a la luz ultravioleta (*Míguez Pérez, 2014*).

### **1.3.2. Aceites esenciales (AE)**

Las especias naturales se clasifican en tres tipos, incluyen el tipo picante (pimienta, chile, jengibre, ajo, cebolla, asafétida, limoncillo, galanga mayor y mostaza negra), el de sabor fuerte (clavo, anís estrellado, cardamomo, hinojo, casia, orégano, tomillo, nuez moscada, apio, cilantro, alcaravea, eneldo y albahaca) y los de sabor ligero (curry, laurel, granada, sésamo, etc.). Se han demostrado que casi todas las especias dentro del tipo sabor picante y de sabor fuerte contienen AE, mientras que aquellas de

sabor ligero tienen un contenido de aceite muy bajo. Además, estos AE han mostrado poseer actividades antibacterianas y antifúngicas, contra hongos y bacterias patógenas y de deterioro (*Li y col., 2022*).

Existen alrededor de 3000 AE diferentes, de los cuales 300 son los utilizados comercialmente en el mercado de aromatizantes y fragancias (*Burt, 2004*). Aunque los AE se han utilizado principalmente como agentes aromatizantes en la industria alimentaria, debido a su actividad antimicrobiana ya mencionada, se pueden incorporar a los productos alimenticios para prolongar su vida útil. Sin embargo, para que la aplicación sea viable, deben estudiarse sus propiedades, las concentraciones inhibitorias mínimas, cuáles son los microorganismos sensibles, el modo de acción, las interacciones probables con la matriz alimentaria, así como también, como afectarían la calidad sensorial en los alimentos (*Khorshidian y col., 2018*).

Los AE se definen como líquidos lipofílicos mezcla de diversos compuestos, que se extraen de diversas plantas y contienen componentes naturales biológicamente activos, los cuales poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes y se secretan como metabolitos secundarios, cumpliendo funciones en la polinización o en mecanismos de defensa contra bacterias y hongos (*Tajkarimi y col., 2010*). Se caracterizan por el olor aromático, son generalmente incoloros o ligeramente amarillentos e insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos (*Nazzaro y col., 2013*).

- **Composición química de los AE**

Los AE son mezclas complejas de compuestos bioactivos de bajo peso molecular, sintetizados por plantas, presentes en hojas, tallos, yemas, semillas, frutos, glándulas y flores (*Hou y col., 2022*). Los compuestos bioactivos se sintetizan en el citoplasma y los plástidos de las células vegetales a través de las vías del ácido malónico, ácido mevalónico y metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP), y las plantas las almacenan en tricomas glandulares, en cavidades secretoras, y en conductos de resina o células epidérmicas (*Dutra da Silva y col.; 2021*).

Los compuestos volátiles presentes en los AE tienen varias funciones ecológicas, que incluyen acción antibacteriana, antifúngica, insecticida, antiviral, y también son capaces de atraer a ciertos insectos que polinizan las plantas (*Hou y col., 2022*). Las propiedades de los AE de cada especie vegetal están asociadas a los metabolitos



secundarios producidos por la planta, que incluyen terpenos, fenilpropanoides, aldehídos, ésteres, alcoholes y cetonas. El mayor grupo de sustancias presentes en ellos corresponde a los terpenos y sus derivados oxigenados (Dutra da Silva y col.; 2021).

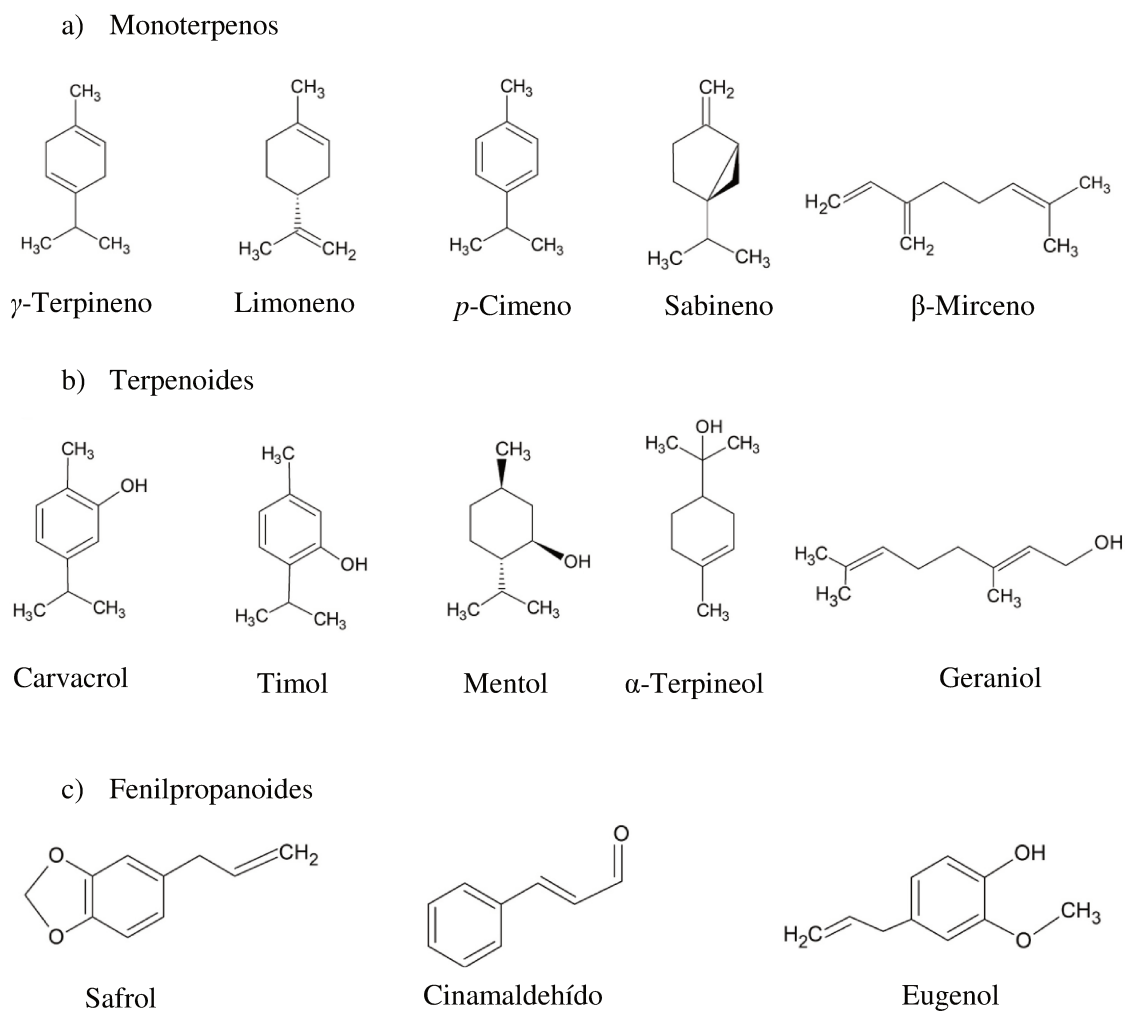


Figura 2. Estructuras de a) Monoterpenos, b) Terpenoides; c) Fenilpropanoides. (Fuente: National Library of Medicine (PubChem®))

Los terpenos (Figura 2) están formados por combinaciones de moléculas de isopreno, clasificadas según la cantidad de unidades que forma la molécula, y pueden ser monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, tetraterpenos y politerpenos. Los monoterpenos están predominantemente presentes en los AE y pueden variar en estructura molecular para formar otros compuestos, como los terpenoides. Algunos ejemplos de monoterpenos incluyen limoneno, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, sabineno y  $\beta$ -

mircenos (*Sharma y col., 2017*). Los terpenoides son el resultado de modificaciones enzimáticas de los terpenos y los grupos hidroxilo del mismo son los responsables de la acción antimicrobiana. Sus variaciones estructurales y la posición del grupo hidroxilo en los mismos pueden influir en la eficacia del compuesto contra los microorganismos. Algunos ejemplos incluyen carvacrol, timol, mentol,  $\alpha$ -terpineol y geraniol (*Dutra da Silva y col.; 2021*). Los fenilpropanoides son una familia de varios grupos de compuestos orgánicos sintetizados en plantas a partir de la fenilalanina. Constituyen una pequeña porción de los AE, pero algunos de sus constituyentes como el eugenol, el isoeugenol, el safrol y el cinamaldehído tienen una excelente actividad antimicrobiana (*Hyldgaard y col., 2012*).

La clase de componentes químicos y su concentración pueden variar entre diferentes especies de plantas, e incluso dentro de una misma especie, debido a variaciones en el momento de la cosecha, condiciones climáticas, parte de la planta, método de extracción, secado y almacenamiento que se utilizó para la extracción del AE entre otros factores (Figura 3) (*Masotti y col., 2003; Angioni y col., 2006*). Las condiciones de estrés pueden ser responsables del aumento de la producción de ciertas moléculas y la termorregulación es un posible factor relacionado con la variación en la composición del AE en relación con las diferentes estaciones, con la posibilidad de aumentar la producción durante los períodos más cálidos como mecanismo para proteger la planta contra la desecación y exposición solar (*Dutra da Silva y col.; 2021*).

El proceso de secado del material vegetal es importante ya que reduce el contenido de agua influyendo directamente en la disminución de la actividad del agua. En consecuencia, se reducen o detienen las actividades enzimáticas y el deterioro microbiano, que interfieren en la composición química y el rendimiento del AE (*Dorneles y col., 2019*). Durante el proceso de extracción, pueden ocurrir oxidaciones, hidrólisis y otras reacciones químicas de los constituyentes químicos y provocar cambios en la composición (*Megawati Fardhyanti y col., 2019*). A escala de laboratorio, la extracción por hidrodestilación en un sistema Clevenger modificado es la más utilizada. En las producciones comerciales, la destilación por arrastre con vapor de agua es el método de extracción más común (*Sadeh y col., 2019*). La extracción por solventes también es muy utilizada, sin embargo, su aplicación en alimentos es limitada, debido a las altas cantidades de solvente requeridas y la toxicidad del solvente orgánico utilizado en el proceso (*Dutra da Silva y col., 2021*).



Figura 3. Factores que afectan la eficacia de la acción antimicrobiana de AE en alimentos adaptado de Dutra Da Silva y colaboradores (*Dutra da Silva y col.; 2021*).

Se han probado técnicas alternativas para la extracción de AE, como la extracción asistida por microondas, la extracción asistida por ultrasonidos y la hidrodestilación óhmica, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia, la sostenibilidad y la economía en el proceso de extracción (*Megawati Fardhyanti y col., 2019*) (*Hou y col., 2022*).

### 1.3.2.1. Orégano: *Origanum vulgare* L.

Dentro del género *Origanum*, el *O. vulgare* posee el área de distribución más grande y se puede encontrar en toda Europa, en partes de Asia y en el norte de África. El *O. vulgare* es una planta perenne leñosa con alturas de hasta 100 cm y tallos pilosos, hirsutos o glabros (a veces glaucos). Las hojas (6–40 mm de largo, 5–30 mm de ancho) son pecioladas a subsésiles, ovadas o redondeadas con puntas agudas u obtusas y márgenes enteros. Dado que el *O. vulgare* es bastante variable en sus caracteres morfológicos, se llegan a diferenciar seis subespecies. Las tres subespecies que aparecen en las partes más septentrionales del área de distribución (*ssp. vulgare*, *ssp. virens* (Hoffmannsegg y Link) Ietswaart y *ssp. viride* (Boissier) Hayek) suelen ser fuentes pobres de volátiles. Las subespecies en el rango más al sur del área de distribución (*ssp.*

*glandulosum* (Desfontaines), *ssp. hirtum* (Link) Ietswaart y *ssp. gracile* (Koch) Ietswaart) suelen ser buenas fuentes de aceites esenciales (Lukas y Novak, 2020).



Figura 4. Hojas fresca y secas de *Origanum vulgare L*

El orégano se ha utilizado para muchos propósitos en la medicina tradicional y en los alimentos debido a sus actividades antimicrobiana, antioxidante, expectorante, antiespasmódica, carminativa, antiviral, inmunomoduladora y antiparasitaria. La actividad antimicrobiana convirtió al orégano en uno de los reemplazos más prometedores de los antibióticos en la nutrición animal, luego se pensó como posible aditivo alimentario (Lukas y Novak, 2020).

Los monoterpenos fenólicos, carvacrol y timol son los principales compuestos del AE de orégano (AEO). Existe una gran variación en la relación de estos compuestos con otros, primero en la relación con sus precursores p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, pero también con otros mono- y sesquiterpenos. Las diferencias se deben a influencias genéticas, estacionales y ontogénicas. Por lo tanto, la relación carvacrol/timol aumenta durante los meses de verano, mientras que, en invierno y a principios de la primavera, aumenta el p-cimeno (Baranauskienė y col., 2013).

La hierba seca y el AE de las partes aéreas son los principales productos comercializados del orégano. Hasta comienzo del año 2000, casi todo el material se recolectaba en la naturaleza. Desde entonces, el cultivo ha aumentado constantemente, pero la recolección silvestre sigue siendo la principal fuente de obtención para su comercialización. El orégano se hizo muy popular después de la Segunda Guerra Mundial junto con la popularidad de la pizza italiana, primero en Estados Unidos y luego en todo el mundo (Lukas y Novak, 2020). Italia tiene un enorme consumo interno, por lo tanto, la producción italiana se consume en el país y no hay cantidades significativas en el mercado internacional. Grecia es el principal proveedor del mercado estadounidense donde se denomina en el comercio "orégano griego". Además de Grecia, Albania, Israel,

Marruecos, Líbano y Argentina, Turquía es uno de los principales países involucrados en la producción y exportación de orégano, donde se cultiva ampliamente en la región del Egeo. En Turquía, solo se cultivan *O. onites* y *O. vulgare*. La mayor parte del material vegetal de orégano turco recolectado del medio silvestre y vendido en los mercados proviene de *O. minutiflorum*, *O. onites* y *O. vulgare subsp. Vulgare* (Koksal y col., 2010).

Argentina produce unas 600 toneladas al año en una superficie de 500 hectáreas, principalmente en las provincias de Mendoza, Córdoba y San Juan. La mayoría de las especies cultivadas aquí son *O. vulgare ssp. viridulum* Nyman y *O. majoricum* Cambessedes (un híbrido entre *O. vulgare ssp. vulgare* y *O. majorana*). Ejemplos de nombres de variedades/ecotipos/clones son 'compacto', 'cordobés', 'criollo', 'mendocino', 'nativo', 'verde limón', 'negrito', 'peruano' y 'green spanish' (Varela y col., 2014). En el mercado de las hierbas frescas, el orégano es una de las plantas más importantes.

### 1.3.2.2. Tomillo: *Thymus vulgaris*

El *T. vulgaris* es originario de la cuenca del Mediterráneo occidental, desde España y las Islas Baleares hasta el sureste de Italia. El tomillo era utilizado por los antiguos griegos y los antiguos egipcios, y fue propagado hacia el norte de Europa por los romanos y posteriormente (durante el siglo XVI), hacia América del Norte por los colonos europeos (Amouretti y Comet, 1993).



Figura 5. Hojas fresca y secas de *Thymus vulgaris*

El *T. vulgaris* es un arbusto semiperenne que crece de 10 a 50 cm de alto por cada 40 a 50 cm de ancho, con ramas leñosas erectas a semipermeables. El tallo es cuadrangular y se vuelve leñoso con la edad. Las hojas son lineales a elípticas, de 3 a 8

mm de largo y de 0,5 a 2,5 mm de ancho, con un número variable de pelos glandulares. El cáliz mide 3-4 mm de largo con pelos cortos y el tubo es campanulado. La corola es de color blanquecino a púrpura pálido. El *T. vulgaris* es muy variable en la forma de hojas, brácteas e inflorescencias, ya sea en poblaciones silvestres o en formas cultivadas (Vouillamoz y Christ, 2020).

El *T. vulgaris* se ha utilizado desde la antigüedad con fines aromáticos y medicinales. Como planta aromática, se utiliza hoy en día para dar sabor a alimentos (por ejemplo, quesos y carnes), en licores y mezclas de hierbas. Como planta medicinal, las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de su AE se utilizan para tratar la alopecia, la placa dental, las infecciones por dermatofitos, la bronquitis, la tos, los trastornos inflamatorios de la piel y los trastornos gastrointestinales (Satyal y col., 2016). En cosmética, el extracto de tomillo se utiliza en champús, pastas dentales, acondicionadores para el cabello, colonias, jabones, detergentes y cremas (Vouillamoz y Christ, 2020).

Los constituyentes más importantes del AE comercial de *T. vulgaris* son timol (23–60 %),  $\alpha$ -terpineol (18–50 %), p-cimeno (8–44 %), carvacrol (2–8 %) y linalol (3–4%). Se han descrito numerosos quimiotipos (CT), lo que la convierte en una de las especies de hierbas con la mayor diversidad de AE (Satyal y col., 2016). El perfil fitoquímico de *T. vulgaris*, especialmente los monoterpenos, no solo varía según el genotipo sino también de otros factores como ya mencionamos (ubicación, elevación, prácticas culturales, tiempo de cosecha, métodos de secado y condiciones de almacenamiento). Además, las distribuciones enantioméricas de los compuestos quirales también pueden variar, lo que da como resultado distintas actividades, sabores y aromas medicinales y biológicos: por ejemplo, el L-linalol tiene actividad anticonvulsiva en un modelo de ratón, mientras que el D-linalol es inactivo (de Sousa y col., 2010). Además de compuestos volátiles, *T. vulgaris* acumula varios metabolitos especializados como flavonoides y otros polifenoles y triterpenoides (Vouillamoz y Christ, 2020). El contenido de AE de tomillo (AET) de los cultivos de *T. vulgaris* normalmente representa del 1,5 al 6,5 % del peso seco de las hojas (Teuscher y col., 2005).

El *T. vulgaris* se cultiva y recolecta silvestre en la mayoría de los países europeos, y España produce alrededor del 90% de la producción mundial de aceite de tomillo (*T. vulgaris* y *T. zygis* combinados). El *T. vulgaris* también se produce en Francia, Alemania, Suiza, Portugal, Italia, Bulgaria, Hungría, Turquía y Grecia. También existen



producciones en Rusia, América del Norte, África del Norte (Argelia y Marruecos), China, Japón, India, Sudáfrica, Chile, Brasil, Nueva Zelanda, Irán, Arabia Saudita y Camerún (Vouillamoz y Christ, 2020).

### 1.3.2.3. Romero: *Rosmarinus officinalis* L.

El romero no es solo una hierba culinaria sino también una planta medicinal muy apreciada y de gran potencial farmacológico, considerando sus propiedades como antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antidepresiva, neuroprotectora, colinérgica, antiinflamatoria, analgésica, antiespasmódica, diurética, expectorante y carminativa (Amaral y col., 2019). Siendo una de las fuentes más abundantes de compuestos antioxidantes, el romero se está volviendo cada vez más importante no solo en la conservación y estabilidad de los alimentos, sino también en la medicina preventiva, en el control de enfermedades humanas causadas por patógenos y, recientemente, en la protección de plantas y en la medicina veterinaria. El mayor interés se concentra en el posible desarrollo de nuevos fármacos a base de romero (Hammer y Junghanns, 2020).



Figura 6. Hojas fresca y secas de *Rosmarinus officinalis* L.

Las partes aéreas de las plantas de romero se utilizan para la producción de AE, obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua. Los principales constituyentes del AE de romero (AER), destacados por su efecto antimicrobiano y antifúngico, son 1,8-cineol (20–50 %),  $\alpha$ -pineno (15–26 %), alcanfor (10–25 %), acetato de bornilo (1–5 %), borneol (1–6 %), canfeno (5–10 %) y  $\alpha$ -terpineol (12–24 %). El limoneno, el  $\beta$ -pineno, el  $\beta$ -cariofileno y el mirceno presentes en el aceite le dan un sabor especial (ESCOP, 2003).

Los compuestos fenólicos como el ácido carnósico y el carnosol, y el ácido rosmarínico, son los principales responsables de la distintiva actividad antioxidante del

romero (*Birtić y col., 2015*). Le dan al romero un sabor amargo suave y afectan la generación de malos sabores. Sus propiedades antioxidantes distintivas han hecho del romero un material vegetal muy prometedor para la farmacia y la cosmética y valioso para la industria alimentaria. En el mercado se puede encontrar una gama de productos de romero, pero los más importantes, además de las partes frescas o las plantas en maceta, son las hojas secas que normalmente se recolectan antes de la floración, el AER y diferentes extractos en polvo, infusión o extractos secos (*Hammer y Junghanns, 2020*).

El género *Rosmarinus L.* incluye solo tres especies: *Rosmarinus officinalis L. (R. lavandulaceus)* *R. Laxiflorus* (De Noé)); *Rosmarinus eriocalyx* (Jord y Fourr) y *Rosmarinus tomentosus* (Mor. y Maire). Se describen tres quimiotipos de aceite principales, cuyas propiedades químicas son significativas para el mercado:

- Aceites de alcanfor-borneol con proporciones aproximadamente iguales (20-30%) de 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno y alcanfor (España, Francia, Italia, Bulgaria, Grecia).
- Aceites de cineol con más del 40% de 1,8-cineol (Marruecos, Túnez, Turquía, Yugoslavia, Grecia, Italia, Francia).
- Aceites de verbenona que contienen hasta un 15 % de verbenona (Francia, Egipto).

Y otra composición química podría definirse según la cantidad comparativamente mayor de mirceno en los aceites de Argentina, Portugal y España (*Hammer y Junghanns, 2020*).

España ha sido tradicionalmente el mayor proveedor de AER, seguido de Marruecos y Túnez (*Farooqi y Sreeramu, 2001*). El consumo mundial de AER está aumentando gradualmente a lo largo de los años. Siendo el principal mercado mundial los Estados Unidos, seguido de Japón con alrededor del 10% de la demanda mundial y Europa. Sin embargo, la producción continúa concentrándose en Europa, con siete de las empresas de procesamiento más grandes del mundo. Los principales usuarios de AE son las empresas de refrescos de los Estados Unidos y los productores de sabores y fragancias de Francia, Gran Bretaña e India o la industria farmacéutica de Suiza y Alemania (*Hammer y Junghanns, 2020*).



El AER se utiliza ampliamente para la conservación de alimentos, como aditivo en productos cárnicos preenvasados, en aromaterapia y en cosmética como ingrediente en jabones, cremas, velas, desodorantes, tónicos capilares y champús. También se usa en muchos limpiadores domésticos y ambientadores y, recientemente, como componente principal de algunos pesticidas orgánicos (*Hammer y Junghanns, 2020*).

#### **1.3.2.4. Método de acción antimicrobiano**

La hidrofobicidad de los componentes provenientes de los AE, es lo que les permite ingresar en los microorganismos a través de la membrana celular, interfiriendo con los mecanismos de transporte molecular que conducen a la inactivación celular (*Burt, 2004; Goñi y col., 2009*). Los compuestos antimicrobianos más activos presentes en los AE se pueden dividir en cuatro grupos según la estructura química (Figura 2): terpenos, terpenoides, fenilpropenos y otros compuestos tales como alicina o isotiocianatos (*Hyldgaard y col., 2012*).

En general, la aplicación de AE provoca la coagulación de las células, lo que provoca daños irreparables en la membrana plasmática, aumentando su permeabilidad e interfiriendo con la síntesis de ATP, lo que conduce al daño de la membrana celular. Los AE son capaces de penetrar y alterar la estructura celular fúngica y las membranas intracelulares a través de un mecanismo de permeación que contribuye a la disolución de las células mitocondriales. Esto está influenciado por un aumento de electrones libres a lo largo de la ruta del sistema de transporte de electrones (*Singh y col., 2017*). Los aceites también pueden interrumpir la hiperpolarización de la membrana celular al influir en los depósitos de iones, particularmente iones de calcio, bombas de partículas y depósitos de ATP, reduciendo así la permeabilidad de la membrana. Esta modificación en la fluidez de la membrana puede causar daño oxidativo y obstruir las vías del citocromo C, la absorción de enzimas y cantidades de iones de calcio. En consecuencia, la permeabilización de una membrana celular superior e inferior puede conducir a la muerte celular (*Aysegul y col., 2020*).

La célula, bajo actividades metabólicas normales, puede generar moléculas altamente reactivas y tóxicas como especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen oxígeno singulete ( $^1\text{O}^2$ ), ion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), ion hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que pueden causar daño al ADN, proteínas, lípidos y enzimas. Por lo tanto, se debe prestar atención al uso de antioxidantes para inhibir la peroxidación de

lípidos y proteger del daño causado por los radicales libres (Adel y col., 2019). Los antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) se han utilizado como antioxidantes y en la actualidad los usos de estos compuestos están restringido debido a su carcinogenicidad y otras propiedades tóxicas. A raíz de esto, el interés por los antioxidantes naturales que contienen los AE ha aumentado considerablemente, no solo en el campo farmacéutico, sino también en el cosmético, alimentario, etc. (Hou y col., 2022).

### 1.3.3. Definición en el Código Alimentario Argentino y reglamentación

La definición de AE en el CAA se encuentra en el capítulo 18 en el anexo I de *MERCOSUR/GMC/RES N° 46/93* y es la siguiente: “(...) son los productos volátiles de origen vegetal obtenidos por procesos físicos (destilación por arrastre con vapor de agua, destilación a presión reducida u otro método adecuado). Los aceites esenciales se pueden presentar aisladamente o mezclados entre sí, rectificadas, destiladas o concentradas...” y están contemplados para utilizarse como saborizantes y aromatizantes, no como conservantes (<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>).

En Estados Unidos, la aplicación de AE y extractos en alimentos está regulada legalmente por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA). Dado que los AE y los extractos son reconocidos como GRAS por la FDA, no están sujetos a restricciones cuantitativas con respecto a su uso, pero su aplicación debe cumplir con las buenas prácticas de fabricación. Por lo tanto, técnicamente, los AE y los extractos no se consideran aditivos, ya que no se necesita la aprobación del gobierno antes de su uso. En este sentido, su aplicación en alimentos, y consecuentemente en queso, se considera segura y está legalmente aprobada en Estados Unidos (Christaki y col., 2021).

Por otro lado, en Europa está en vigor un marco legal diferente. En particular, los AE no se consideran aditivos y su aplicación en alimentos no está permitida, aunque una amplia variedad de sustancias de AE (por ej., limoneno) se reconocen como aditivos (Reglamento de la Comisión Europea 1334/2008 y Reglamento 1130/2011). Sin embargo, cabe señalar que los aromatizantes y los aditivos son dos grupos diferentes que se clasifican en el grupo general de agentes de mejora de alimentos. En cuanto a los extractos, solo el extracto de romero está autorizado para su uso como aditivo alimentario en varias categorías de alimentos con niveles máximos en la Unión Europea, bajo el

código número E392 (Reglamento de la Comisión Europea 1333/2008 y Reg. 1130/2011). Sin embargo, se espera que se aprueben más extractos en los próximos años. Aun así, en base a la normativa anterior, no se permite la incorporación de aderezos ni extractos de romero en quesos y productos queseros en la Unión Europea, limitando así la variedad de nuevos productos que se pueden comercializar (*Christaki y col., 2021*). Los extractos de romero también están legalizados como antioxidantes naturales efectivos para la conservación de alimentos en Japón y China (*Birtić y col., 2015*).

Para cosméticos, según la Farmacopea Europea, el contenido de AET de *T. vulgaris* debe ser superior al 1,2 % (v/p, obtenido por hidrodestilación) representando el timol y el carvacrol juntos al menos el 40% (*Vouillamoz y Christ, 2020*).

#### **1.3.4. Interés por los aceites esenciales y su uso en la industria alimentaria**

En los últimos años, los AE se han utilizado ampliamente como conservantes en productos alimenticios, como frutas, verduras, jugos, leche, queso, carne vacuna, pollo, salchichas y pescado. Sin embargo, debido a la poca solubilidad en agua, la inestabilidad y el fuerte sabor de los AE, su rango de aplicación en el almacenamiento y conservación de alimentos es limitado (*Li y col., 2022*).

Últimamente los consumidores han vuelto su atención a los alimentos con alto valor nutricional y han puesto más énfasis en la seguridad, lo que trae nuevos desafíos a la industria alimentaria (*Ahmed y col., 2021*). Para satisfacer tales necesidades, la industria se esforzó por obtener nuevas tecnologías de procesamiento y conservación de alimentos para mejorar la seguridad alimentaria y reducir su pérdida nutricional (*Li y col., 2022*).

Hoy en día existe un fuerte interés en el consumo de quesos no pasteurizados y tradicionales. El queso tradicional se elabora con leche sin pasteurizar, y si la leche contiene patógenos como *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y/o *Escherichia coli*, o si se produce una contaminación secundaria durante la producción del queso, puede provocar una ETA (*Li y col., 2022*). Por estas razones se ha pensado la utilización de AE como conservantes naturales y así prevenir y prolongar la vida útil de los productos lácteos, garantizando la seguridad de los alimentos y la salud del consumidor (*Ahmed y col., 2021*)

La Figura 7 muestra el incremento del interés a lo largo de los años que se refleja en el número de publicaciones científicas relacionadas con enfoques basados en

antimicrobianos naturales y aplicaciones en el contexto de la conservación del queso. Se han realizado estudios con AE y extractos de plantas para ayudar a la conservación del queso, y algunos de ellos se centran en mejorar la conservación de la leche cruda y su función durante la elaboración del queso como aditivo alimentario alternativo debido a la presencia de los bioactivos con actividad antimicrobiana de amplio espectro (como los compuestos fenoles y terpenos) (Lima y col., 2021). Según la bibliografía, las concentraciones de AE añadidas al queso son muy variables y en un amplio rango de 0,00001% a 12%, las cuales dependen del tipo de AE y de su actividad, de los microorganismos a enfrentar, de la técnica de encapsulación/aplicación con la que se elaboró la formulación y del producto general (Christaki y col., 2021).

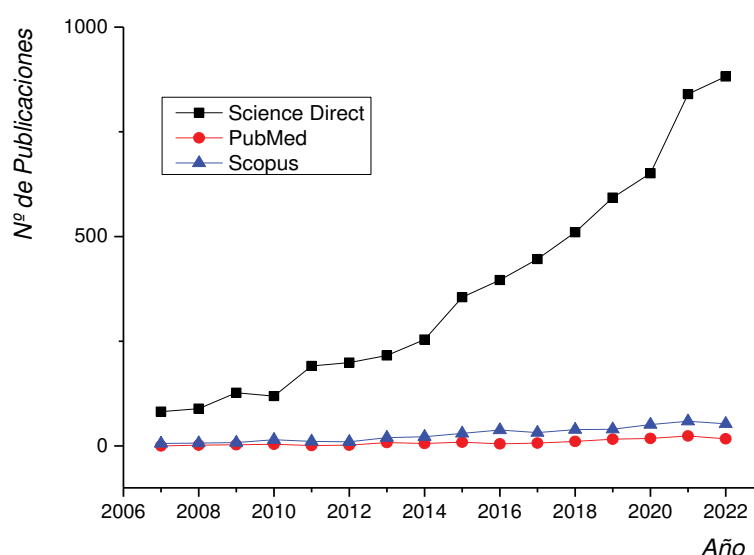


Figura 7. N° de publicaciones por año según la cadena de búsqueda en la base de datos de investigación: ("natural antimicrobials" OR "essential oils" OR "bioactive compounds") AND cheese. (Consultado en Septiembre 2022).

Sin embargo, todavía existen dudas sobre la aplicabilidad de los antimicrobianos naturales en términos de propósitos de conservación del queso, que podrían estar jugando un papel en los desafíos actuales de la industria láctea. Por un lado si los antimicrobianos naturales pueden inhibir el crecimiento microbiano de una manera igual o más efectiva que los aditivos químicos tradicionales en la conservación del queso, y por otro, si se podrán aplicar como agente antimicrobiano para prolongar la vida útil en comparación con los aditivos tradicionales utilizados en la actualidad durante la fabricación (Lima y col., 2021).

## 2. OBJETIVOS

En respuesta a la creciente demanda en la industria alimenticia por compuestos naturales como nuevos conservantes, buscando satisfacer a los consumidores que exigen alimentos con alto valor nutricional, que utilicen conservantes no tóxicos ni que sean un riesgo potencial para la salud cuando se consumen a largo plazo, respetuosos con el medio ambiente en cuanto a su elaboración y desecho, se planteó acompañar el interés creciente por los AE como posibles conservantes naturales.

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Se propuso estudiar la acción antifúngica del aceite esencial de orégano (AEO), del aceite esencial de tomillo (AET) y del aceite esencial de romero (AER) frente a algunas especies del género *Penicillium* para ser aplicados en la superficie de quesos semiduros utilizando diferentes formulaciones que aseguren una fácil aplicación.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar mohos presentes en el sector de producción y en cámaras de maduración de tres industrias queseras de Santa Fe.
- Poner a punto el método de difusión en agar con pozo para evaluar acción antifúngica de AE.
- Estudiar la acción antifúngica in vitro de AEO, AET y AER frente a cinco especies aisladas e identificadas del género *Penicillium*.
- Estudiar la composición general de algunos AE mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS).
- Estudiar la aplicabilidad por esprayado y por pincelado sobre la superficie de queso semiduro durante su almacenamiento, de diferentes formulaciones del AE que mejores resultados antifúngicos demuestre.
- Evaluar el impacto sensorial sobre el queso de algunas formulaciones del AE que mejor funcionó.
- Estudiar la utilización de una pintura neutra como vehículo del AE elegido para evaluar su acción antifúngica.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestreo de ambientes de industrias lácteas y de quesos

Se realizó la toma de muestra del aire en el interior (sala de producción) de tres industrias lácteas de la ciudad de Santa Fe con un equipo de muestreo de aire centrífugo Standard RCS (Biotest Diagnostics Corporation, Denville, New Jersey, USA) (Figura 8) (Frisón y col., 2012).



Figura 8. Equipo de muestreo de aire centrífugo Standard RCS.

El tiempo de muestreo fue de 1 minuto. Las tiras multipocillos se incubaron 7 días a una temperatura de 25°C (Figura 9). Estas tiras contenían Extracto de Malta Agar (MEA) ya solidificado.

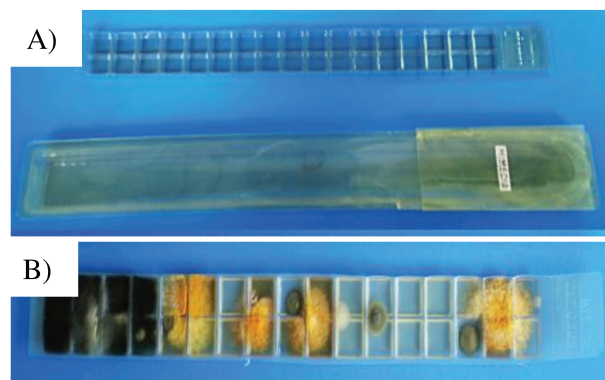


Figura 9. Tiras multipocillos con medio de cultivo Extracto de Malta Agar (MEA). A) Sin carga fúngica. B) Con desarrollo fúngico.

Se realizó el análisis de muestras de quesos llevando a cabo un recuento fúngico por el método de plaqueo por dilución (F.D.A., 2001; Bills y col., 2004). Para ello, se

pesaron en esterilidad 10 g de la muestra de queso y se depositaron en un erlenmeyer que contenía 90 mL de agua de peptona al 0,1% (m/v), luego se agitó por 10 min a 250 r.p.m. en un agitador orbital. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas (hasta  $10^{-6}$ ) en agua de peptona al 0,1% (m/v), y se sembraron 1 mL de cada dilución en una placa de Petri a la que se le agregó 10 mL de medio de cultivo MEA con agregado de cloranfenicol (100 mg/L) fundido y enfriado a 45°C. Las placas se incubaron a 25°C por 7 días. En forma adicional, para los quesos de pasta dura y semidura, se colocaron trozos de quesos sobre placas de MEA con agregado de cloranfenicol ya solidificado y se incubaron a 25°C por 7 días.

### **3.2. Aislamiento e identificación de los mohos presentes en ambientes de industrias queseras y en muestras de queso**

Se realizó el aislamiento e identificación de los mohos obtenidos tanto del ambiente de la industria quesera como de las muestras de queso analizadas, mediante el cultivo en medios específicos y la observación de características macroscópicas y microscópicas, mediante el uso de claves taxonómicas, con especial énfasis en el género *Penicillium*. Para ello se procedió de acuerdo a Pitt y Hocking (2009) y a las guías de laboratorio de Klich y Pitt (1998). Se utilizó como bibliografía de apoyo a Samson y col. (2010).

#### **3.2.1. Aislamiento de los mohos**

Para poder obtener cultivos puros, libres de contaminación y listos para la identificación de especies, cada una de las colonias obtenidas fueron aisladas e identificadas de acuerdo a sus características macro y microscópicas. Con ansa aguja se tomaron pequeños trozos de micelio o esporas, se colocaron en placas con MEA y se incubaron durante 7 días a 25°C. Se constató la pureza de las colonias por la uniformidad en la apariencia de las mismas.

#### **3.2.2. Identificación de la flora fúngica**

La identificación de los mohos presentes en la industria quesera se realizó mediante el cultivo en medios específicos y la observación de las características macroscópicas y microscópicas en distintas condiciones de cultivo y mediante el uso de las claves taxonómicas de la bibliografía citada.

Para determinar las características macroscópicas de los aislados seleccionados, se cultivaron en distintos medios (ANEXO I): MEA, G25N (agar nitrato glicerol 25%), CYA (agar extracto levadura Czapek), YES (agar extracto de levadura) y CREA (agar creatina sacarosa) y se determinó el diámetro de las colonias a tiempos y temperaturas determinadas, como también la textura y el color de las colonias, entre otras características.

Para determinar las características microscópicas, se observó en microscopio óptico la morfología de los conidióforos y la forma y tamaño de los conidios.

Las condiciones de cultivo utilizadas durante la incubación por 7 días de cada uno se detallan a continuación:

- MEA (agar extracto de malta) a 25°C.
- G25N (agar nitrato de glicerol 25%) a 25°C.
- CYA (agar extracto levadura Czapek) a 5°C, 25°C y 37°C.
- YES (agar extracto de levadura) a 25°C.
- CREA (agar creatina sacarosa) a 25°C.

La siembra se realizó tocando tres veces con el ansa de aguja sobre la superficie de la placa con medio ya solidificado, dando lugar al desarrollo posterior de tres colonias por placa sembrada. La experiencia se realizó por triplicado.

### **3.2.3. Observación macroscópica de las colonias**

Las características de las mismas fueron observadas bajo una lupa estereoscópica (Leica Zoom 2000).

#### **Se determinó:**

- ✓ Diámetro promedio
- ✓ Color de la colonia
- ✓ Color micelio
- ✓ Presencia de exudado
- ✓ Pigmentos solubles
- ✓ Reverso
- ✓ Teleomorfo
- ✓ Esclerocio



Los diámetros de las tres colonias desarrolladas, fueron medidos en el reverso de cada una de las Placas de Petri. Se calculó el diámetro promedio y el valor se expresó en milímetros (mm) y se comparó con las claves taxonómicas de la bibliografía anteriormente mencionada.

#### **3.2.4. Observación microscópica de las colonias**

Se llevó a cabo la observación y medición de las estructuras características de cada género. Para ello se realizó un montaje húmedo entre porta y cubre sobre una gota de azul de algodón. Se observó en microscopio óptico (Leica CME), utilizándose los objetivos de la siguiente manera:

- ✓ 10x (estructuras de fructificación).
- ✓ 40x (detalles y medición de estructuras).
- ✓ 100x (textura y ornamentación de esporas y medición fina).

Con las características de cada colonia aislada, se ingresó a las claves taxonómicas de Pitt y Hocking (2009), para su identificación. Se utilizó como bibliografía de apoyo Samson y col. (2010) entre otros.

De los mohos identificados se tomaron cinco aislados del género *Penicillium* para los estudios posteriores.

#### **3.2.5 Conservación de los mohos**

La conservación de los mohos aislados, una vez identificados se realizó en crioviales con Agar-Agua (0,2% m/v). Los mismos se mantuvieron debidamente rotulados a temperatura de 10°C en heladera hasta su posterior uso.

#### **3.2.6 Reactivación de los mohos**

A partir de cepas puras conservadas en crioviales con Agar – Agua al 0.2% (m/v), se realizaron repiques sobre placas con medio MEA con agregado de cloranfenicol. Las placas se incubaron por 7 días a 25°C para tener cultivos en fase exponencial de crecimiento y con suficientes conidios para realizar los ensayos.

### 3.2.7 Preparación de las suspensiones de propágulos fúngicos utilizados en los ensayos

Se cosecharon los propágulos fúngicos (conidios y restos de hifas) de cada una de las especies a ser ensayadas por raspado de la superficie de las placas de reactivación y se resuspendieron en Tween® 20 (polysorbate) (0,1% p/v). Se realizó el recuento en cámara de Neubauer y se ajustaron las concentraciones mediante diluciones, a un valor de  $10^2$ - $10^3$  (llamada concentración Baja),  $10^3$ - $10^4$  (llamada concentración Media) y  $10^5$ - $10^6$  (llamada concentración Alta) de propágulos fúngicos/mL y se corroboraron las concentraciones iniciales de las suspensiones utilizadas por recuento microbiológico cultivando en placas con medio MEA e incubando por 7 días a 25 °C (Sobrero y col., 2013).

### 3.2.8 Recuento de propágulos fúngicos

#### 3.2.8.1 Recuento en cámara de Neubauer

En la cámara de Neubauer se cuantifican células vivas y muertas; la misma consta de dos cuadrados reticulados, cada uno de los cuales delimita un cuadrado de  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  de lado. Según el tipo de cámara, estos cuadrados pueden estar divididos en  $4 \times 4$  o  $5 \times 5$  y a su vez en cuadrados más pequeños separados todos por líneas triples. El recuento se debe efectuar en cinco de estos cuadrados medianos. Por otra parte, cada uno de estos cuadrados medianos está dividido en 16 cuadraditos que sirven como referencia para el recuento.

Se coloca un cubreobjetos por encima de la cámara, luego se homogeniza bien la dilución y se siembra con micropipeta, liberando el líquido suavemente para que ingrese por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos (Figura 10). El recuento se efectúa bajo microscopio óptico (Leica CME) en 10x o en 40-45x.

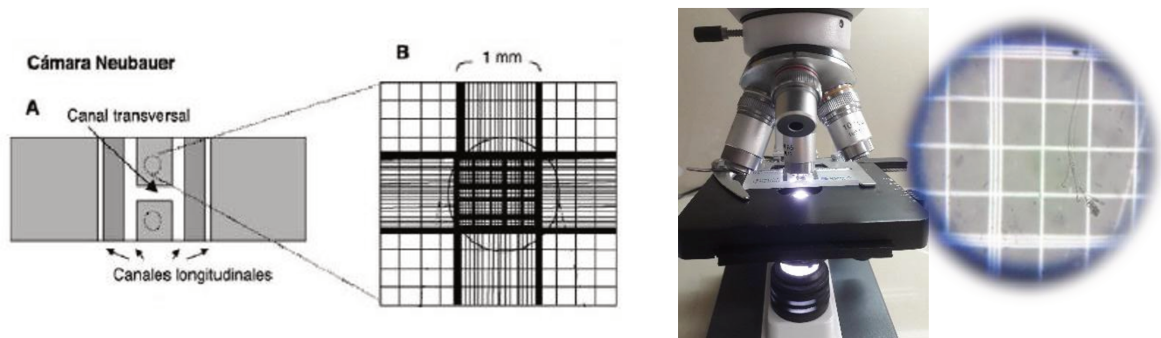


Figura 10. Esquema de la cámara de Neubauer y vista de un recuadro de la misma en el microscopio a 40X.

El recuento de mohos se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$N = \sum N_i$$

Donde:  $N_i$ : es el recuento parcial de cada uno de los 5 cuadrados medianos contados.

El recuento de células por mililitro (N) se calcula con la siguiente ecuación:

$$N = N_i \cdot 5 \cdot 1/\text{dil.} \cdot 10^4$$

Donde:

5: factor para conocer el número de células en todo el cuadrado de  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  de lado.

1/dil: inversa del factor de la dilución efectuada.

$10^4$ : para referir el resultado a  $\text{mm}^3$  o mL.

### **3.2.8.2 Recuento microbiológico en placa de Petri con medio MEA**

Se llevó a cabo un recuento fúngico por el método de plqueo por dilución (F.D.A., 2001; Bills y col., 2004). Para ello se tomó 1 mL de la suspensión en estudio y se llevó a otro tubo conteniendo 9 mL de agua de peptona 0,1% p/v, se agitó en vortex durante unos 20 segundos y se tomó 1 mL de ésta y se llevó a otro tubo conteniendo también 9 mL de agua de peptona 0,1% p/v y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de  $10^5$  propágulos fúngicos/mL u otra deseada. Luego se sembró 1 mL en placas estériles de las últimas 3 diluciones (por duplicado), se agregó medio MEA, se mezcló suavemente con movimientos en forma de ocho y se incubó en estufa por 7 días a 25 °C. Luego se contaron las colonias formadas y afectando por el factor de dilución, se expresaron los resultados como propágulos fúngicos /mL.

### **3.3 Realización de ensayos con los aceites esenciales**

Los ensayos de inhibición en placas y sobre quesos se realizaron con AE de la marca Flora Azul, proveniente de la provincia de Río Negro (Argentina), y que son aptos para consumo humano. Las variedades elegidas fueron: Orégano (*origanum vulgare*), Tomillo (*thymus vulgaris*) y Romero (*rosmarius officinalis*), pensando en su aplicación

en quesos. Los ensayos con los AE se realizaron a diferentes concentraciones (1%, 5% y 10% p/v) y a un tiempo entre 21 y 35 días.

### 3.3.1 Método de difusión en agar con pozo del aceite esencial

El método de difusión en agar con pozo (o pocillo) descrito por Deans (1987) permite una difusión radial de la muestra a través del medio solidificado (Panda y col., 2009).

Trabajando en condiciones de esterilidad dentro del flujo laminar marca Isocide™, se colocó 1 mL de la suspensión de propágulos fúngicos de concentración conocida de la especie fúngica a evaluar, dentro de la placa de Petri, luego se agregó 19 mL de medio MEA, el cual fue previamente fundido y enfriado a una temperatura de 45°C para no afectar la viabilidad de los conidios a sembrar. Se dejan dentro del flujo laminar en corriente de aire estéril las placas destapadas durante 10 minutos, tiempo suficiente para que se solidifique el medio, el cual requerimos que sea firme para poder realizar el pozo u hoyo.

Utilizando un tubo estéril de vidrio de boca biselada de 8 mm de diámetro (fabricado exclusivamente para este ensayo), se realizaron los hoyos en la placa, (entre 2 y 4 hoyos por placa) (Figura 11). Con la ayuda de una pinza esterilizada por flameado, se retiró cualquier resto de medio que pudiera quedar dentro del pozo.

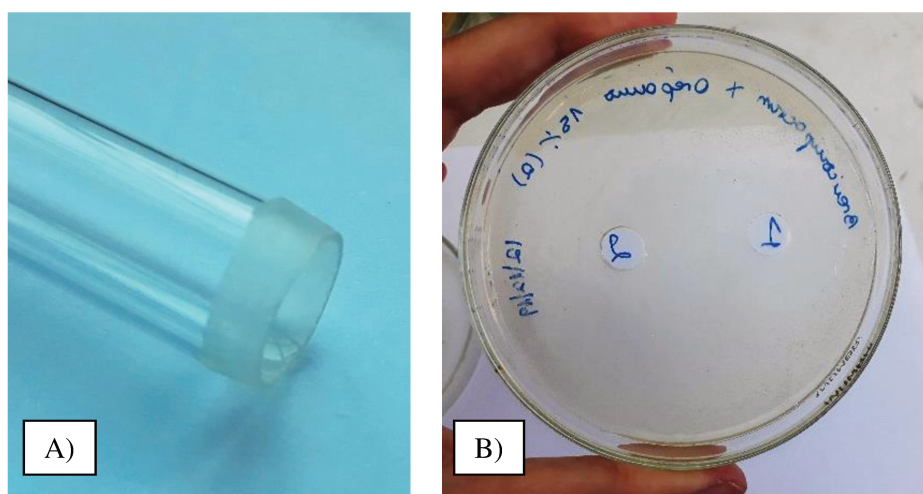


Figura 11. A) Extremo del tubo de vidrio biselado. B) Caja de Petri con medio solidificado con dos pozos realizados con esta técnica.

A partir de una solución de Tween20® al 0,1% p/v fueron preparadas cada una de las concentraciones de AE a estudiar (1%, 5% y 10% p/v) y se procedió a sembrar 75 µL de cada una de ellas, como también la solución de Tween20® 0,1% p/v y el alcohol etílico absoluto al 99,5%. También se sembró una solución de natamicina marca Fungilact® al 0,5% p/v para comparar si el efecto inhibitorio de los AE sería igual, mayor o menor que este compuesto usado como antifúngico en quesos. Luego se dejó secar en corriente de aire estéril durante 1 hora dentro del flujo laminar para dejar que se difunda el volumen de solución sembrada. Se procedió entonces a cerrar las placas y a incubarlas 7 días a 25°C dejándolas el primer día en posición anverso (placa con tapa para arriba) para darle tiempo a difundir y con la tapa para abajo el resto del tiempo de incubación para evitar la condensación sobre la misma.

Luego de los 7 días, se interpretaron los resultados midiendo con calibrador vernier el diámetro de los halos de inhibición (zona traslúcida o transparente) formados alrededor de cada pozo, al cual se le restó el diámetro propio del pozo (8 mm). Con el objetivo de determinar el diámetro promedio cada halo, se obtuvieron 3 valores midiendo el diámetro desde el reverso de la placa y pasando por diferentes puntos de la circunferencia.

Se consideró que la acción antifúngica fue significativa (+) cuando el valor del diámetro promedio del halo resultó igual o mayor a 10 mm (*de Souza y col., 2005*) (*Finos y col., 2021*).

De los resultados obtenidos con el método de difusión de agar con pozo, se tomarán las dos especies de *Penicillium* que mostraron ser inhibidas por el AE ensayado, para luego estudiarse la aplicación del aceite en quesos.

### **3.3.2. Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS)**

A los AE que mostraron acción efectiva frente a las especies estudiadas en el punto 3.3.1., se les realizó una cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) en el Instituto INTEC de Santa Fe, para confirmar la presencia de moléculas como el timol y carvacrol, presente comúnmente en AE, al cual se le atribuye acciones antimicrobianas y antioxidantes (*Abbaszadeh y col., 2014*). El equipo utilizado fue un cromatógrafo gaseoso (modelo Clarus 600, Perkin Elmer, Waltham, MA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masa (MS Clarus 600T) y con inyector programable

Split/Splitless (PSS). Las condiciones del horno fueron 70° (2') – 4°/min – 230° durante 42 minutos. Caudal He de 0,8 mL/min, volumen inyectado 1 µL y la columna utilizada fue Elite-5 – 30m x 0,25mm x 0,25 µm, con un rango de temperatura de -60 a 330/350 °C (Perkin Elmer N3107076), con inyector a T= 280°, modo split 20:1. Línea de transferencia: 220 °C. Estos parámetros fueron adaptados del método realizado por Almeida y col. (2021).

### 3.3.3. Elección del tipo de queso

En ésta tesis se optó por utilizar el queso denominado Queso Tybo, el cual se describe en el CAA en el capítulo 8, art. 633 del año 2006, como un queso de mediana humedad y semigraso, con las siguientes propiedades sensoriales:

- Consistencia: semidura, elástica.
- Textura: compacta, lisa, no granulosa.
- Color: blanco amarillento uniforme.
- Sabor: láctico, suave, ligeramente salado, característico.
- Olor: característico, poco acentuado.
- Corteza: lisa, consistente, bien formada, sin grietas ni fisuras o sin corteza.
- Ojos: algunos ojos pequeños bien diseminados o sin ojos.

Se comercializa en forma paralelepípeda de sección transversal rectangular con un peso por horma de 3 a 5 kg.

En cuanto al proceso de elaboración, se obtiene primero una masa semicocida, la cual es lavada por adición de agua caliente, previa remoción parcial del suero, luego pre-prensada bajo suero, moldeada, prensada nuevamente, salada y madurada durante el tiempo necesario para lograr sus características específicas (por lo menos 25 días). El Queso Tybo deberá mantenerse hasta y durante su expendio a una temperatura no superior a 12°C.

En cuanto a los criterios microbiológicos el CAA establece que debe cumplir con lo establecido en el artículo 605 inciso 6, para quesos de mediana humedad como se detalla en la Tabla 1 (<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>).

Tabla 1. Parámetros microbiológicos que debe cumplir el Queso Tybo según el CAA (<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>).

| Microorganismos                                  | Criterios de Aceptación          | Categoría ICMSF | Métodos de Ensayo      |
|--|----------------------------------|-----------------|------------------------|
| <i>Coliformes</i> / g (30°C)                     | n = 5 c = 2<br>m = 1000 M = 5000 | 5               | FIL 73A : 1985         |
| <i>Coliformes</i> / g (45°C)                     | n = 5 c = 2<br>m = 100 M = 500   | 5               | APHA 1992, Cap. 24 (1) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> coag. positiva / g. | n = 5 c = 2<br>m = 100 M = 1000  | 5               | FIL 145 : 1990         |
| <i>Salmonella spp</i> / 25 g.                    | n = 5 c = 0 m = 0                | 10              | FIL 93A : 1985         |
| <i>Listeria monocytogenes</i> / 25g              | n = 5 c = 0 m = 0                | 10              | FIL 143 : 1990         |

n: número de unidades de muestra analizada.

c: número máximo de unidades de muestra cuyos resultados pueden estar comprendidos entre m (calidad aceptable) y M (calidad aceptable provisionalmente).

m: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable.

M: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable provisionalmente.

(1) Compendium of methods for the microbiological examinations of foods. 3° Edición.

Editado por Carl Vanderzant y Don F. Splittstoesser.

Fuente: ICMSF - Métodos de muestreo para análisis microbiológicos. Método de toma de muestra: FIL 50 C: 1999.

Por todas las características antes descriptas es que se optó por este tipo de queso, que se consigue fácilmente en queserías y supermercados de la zona y que nos permitiría repetitividad en los diferentes ensayos a evaluar.

### 3.3.4. Aplicación del aceite esencial sobre la superficie de los quesos

Con las diluciones de AE que mostraron un efecto antifúngico significativo (+) con el método de difusión en agar con pozo, se recubrieron porciones de queso Tybo de 8 cm

de largo por 4 cm de ancho, por triplicado para cada formulación de AE a ensayar. Se evaluaron tres concentraciones de inóculo: Alta, Media y Baja ( $10^6 - 10^5$ ,  $10^4 - 10^3$  y  $10^3 - 10^2$  propágulos fúngicos/mL) de las dos especies *Penicillium* seleccionadas. Se realizaron dos controles para cada concentración de inóculo fúngico. Control positivo: porción de queso inoculado sin agregado de AE. Control negativo: porción de queso con aplicación de Natamicina al 0,5% p/v e inoculado. Se estudiaron dos temperaturas de incubación: 10°C (heladera) y 20°C. Los tiempos de incubación variaron entre 2 y 5 semanas. Con las concentraciones de AE que fueron capaces de inhibir el crecimiento de las especies fúngicas estudiadas, se realizó la aplicación del AE de dos formas diferentes:

#### 3.3.4.A. Esprayado de la solución de aceite esencial

Para la forma de aplicación por esprayado se prepararon las concentraciones (1%, 2% y 5% p/v) en soluciones acuosas y en soluciones etanólicas (alcohol etílico absoluto 99,5% marca Cicarelli®), para comparar cual era el mejor vehículo para la aplicación de este método en queso; luego se homogenizaron durante cinco minutos en vortex y se esprayó tres veces a una distancia de 10 cm sobre cada porción de queso. Luego se procedió a inocular 100  $\mu$ L de la solución de propágulos fúngicos preparada en el punto 3.2.7 y se dejaron secar sobre una caja de Petri estéril en corriente de aire estéril provista por un flujo laminar durante 1 hora. Las cajas de Petri conteniendo el queso esprayado e inoculado, se guardaron dentro de una bolsa de polietileno transparente para prevenir la volatilización del contenido y evitar la contaminación durante el almacenamiento como se muestra en la Figura 12, y se incubaron a las dos temperaturas de estudio (10°C y 20°C).

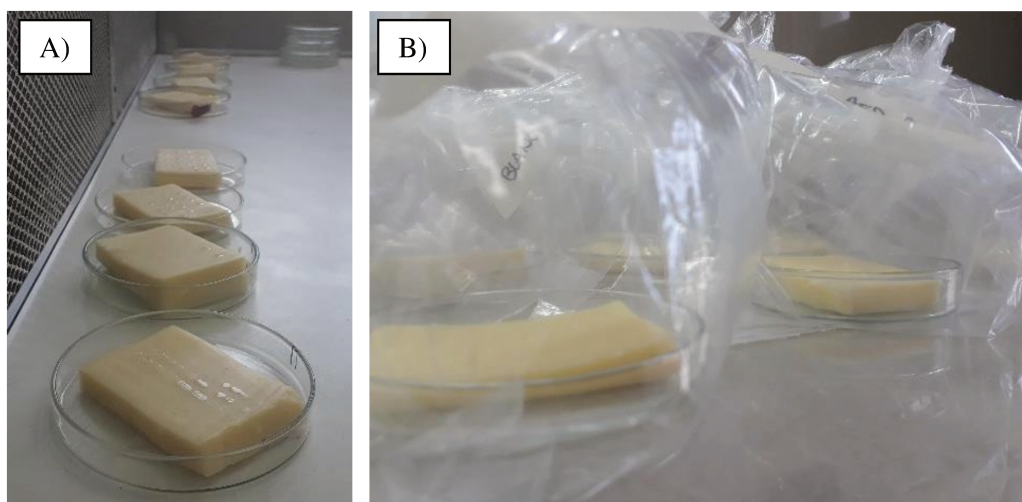


Figura 12. A) Porción de queso Tybo secándose en el flujo laminar luego de ser inoculado. B) Porciones de queso sobre la caja de Petri, dentro de bolsas de polietileno transparentes y rotuladas.



### 3.3.4.B. Pincelado de la solución de aceite esencial

Con un pincel de cerdas sintéticas, sumergido previamente durante una hora en una solución de etanol-agua (70-30% v/v) y su posterior secado con papel absorbente, se sumergió suavemente en cada solución de AE y se pinceló la superficie de cada porción de queso dentro del flujo laminar (Figura 13). La aplicación se realizó con una pincelada suave y en dos direcciones para asegurar que sea homogéneo, lo cual se corroboró por el leve brillo plastificante que la formulación le aportaba a la superficie.

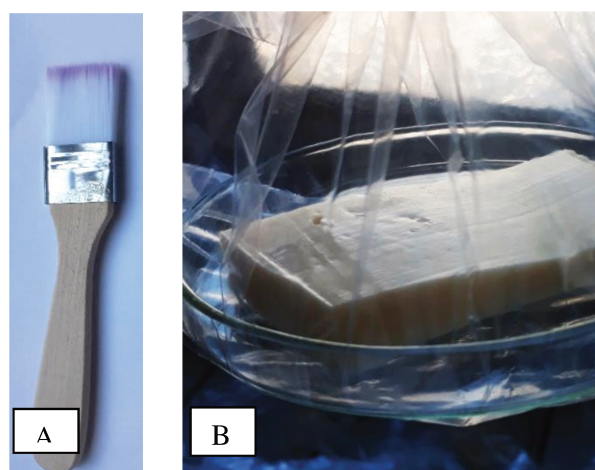



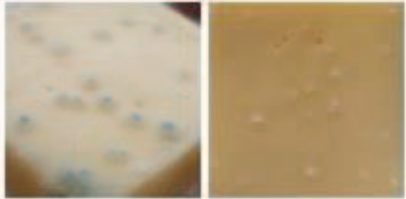
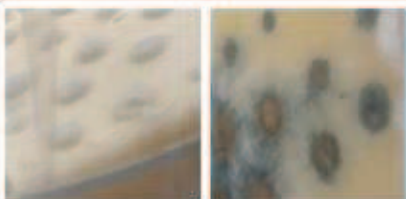

Figura 13. A) Pincel de cerdas sintéticas. B) Caja de Petri con porción de queso pincelado con esta técnica.

Se dejó absorber la solución durante 45 minutos en corriente de aire estéril, luego se inocularon 100  $\mu$ L de la solución del propágulos fúngicos a ensayar preparada en el punto 3.2.7 y se dejó secar en corriente de aire estéril provisto por el flujo laminar durante 1 hora. Luego se colocaron dentro de una bolsa de polietileno transparente y se cultivaron a la temperatura y tiempo a estudiar, tal como se explica en el punto anterior. Todos los ensayos se realizaron por triplicado

### 3.4. Evaluación de la acción inhibitoria de los aceites esenciales sobre la superficie de quesos

Debido a que no existe de manera estandarizada una metodología analítica microbiológica para valorar la concentración fúngica en la superficie de los quesos (Tremmel; 2021), se procedió a realizar una valoración semicuantitativa, establecida por criterio propio. La misma consistió en evaluar mediante inspección visual el desarrollo fúngico en la superficie del queso.

Tabla 2. Evaluación de la acción inhibitoria de los aceites esenciales expresados en porcentajes de Inhibición según el grado de desarrollo fúngico observado.

| <b>% de Inhibición</b> | <b>Observación visual de la porción de queso</b>                                    | <b>Desarrollo fúngico</b>                | <b>Resultado del Ensayo</b> |
|------------------------|---|--|-----------------------------|
| 96% - 100%             |    | Sin desarrollo o traza (<5% cubierto)    | Acción Inhibitoria          |
| 70% - 95%              |    | Leve desarrollo (5%-30% cubierto)        | Leve Acción Inhibitoria     |
| 40%-60%                |   | Moderado desarrollo (31%-69% cubierto)   | Sin acción Inhibitoria      |
| 10%-40%                |  | Abundante desarrollo (61%-100% cubierto) | Sin acción Inhibitoria      |

En la Tabla 2 se muestran los valores de % de Inhibición (1er columna) que se obtienen de una inspección visual crítica de la superficie del queso (2da columna). Se consideró con “Acción inhibitoria” el ensayo donde no se observa desarrollo fúngico y “Sin acción inhibitoria” al ensayo donde hubo un desarrollo notable del moho a simple vista.

### 3.5. Análisis sensorial del queso tratado

Se realizó en el Laboratorio de Microbiología (FIQ-UNL) un análisis sensorial con diez jurados no entrenados pero consumidores frecuentes de quesos semiduros y de condimentos de hierbas, con el fin de averiguar la aceptación del producto.

Se evaluaron cuatro características organolépticas: aspecto, olor/aroma, sabor y textura. La escala hedónica fue de cinco puntos con los extremos de (1) me desagrada

muchísimo y (5) me gusta muchísimo (Leonelli Pires de Campos y col.; 2022). Se le otorgó a cada jurado tres muestras de queso de 30 gramos incubados durante 21 días en heladera, una de queso sin tratar y las otras dos tratadas con el AE que resultó más efectivo en los ensayos anteriores, aplicada con técnica de pincelado. Además, se les consultó a los consumidores si comprarían o no el producto.

En la Tabla 3 se observa la tarjeta de evaluación sensorial para la prueba de aceptabilidad de quesos tratados con AE.

Tabla 3. Tarjeta de evaluación sensorial para la prueba de aceptabilidad de quesos Tybo tratados con aceite esencial a dos concentraciones y el control (queso sin tratamiento).

| <u>Evaluación sensorial (prueba de aceptación)</u>  |         |         |         |
|---|---------|---------|---------|
| Fecha:  |         |         |         |
| Usted recibirá tres muestras, por favor otorgar un valor de 1 a 5 para cada atributo marcado, siendo los extremos (1) me disgusta muchísimo y (5) me gusta muchísimo. |         |         |         |
| Atributo  | M1      | M2      | M3      |
| Apariencia  |         |         |         |
| Olor/aroma  |         |         |         |
| Sabor   |         |         |         |
| Textura   |         |         |         |
| Comprobarías este producto?<br>(marcar opción elegida)  |         |         |         |
|   | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| ¡Muchas gracias por su colaboración!  |         |         |         |

Los resultados de cada valor otorgado a los atributos luego se promediaron para su análisis.

### **3.6. Utilización de un recubrimiento comercial como vehículo del aceite esencial para aplicar en la superficie del queso**

Se utilizó una pintura plástica de color neutro, de aplicación directa por sobre la superficie del queso de la empresa Lopez Ingeniería para Lácteos S.R.L. (Santa Fe, Argentina). Es un recubrimiento utilizado para quesos sin agregado de ningún activo antimicrobiano, de aspecto blanquecino y muy viscoso. Para la aplicación de este recubrimiento y según la concentración de la formulación deseada, se pesó la pintura

sobre un recipiente estéril y se le agrego la cantidad de AE (g) de manera de obtener la concentración que resulto efectiva en el ensayo de aplicación del AE sobre la superficie de los quesos (punto 3.3.4), se mezcló manualmente durante 1 min y se pinceló como se indica en el punto 3.3.4.B, debido a la consistencia de la pintura. Se realizaron dos capas de pincelado, con un tiempo de secado de 40 minutos entre capas en aire estéril provisto por el flujo laminar. Luego se inoculó con dos concentraciones de propágulos fúngicos (a concentración Baja y Alta) con las dos especies del género *Penicillium* que se utilizaron en los ensayos con queso. La caja de Petri conteniendo la porción de queso, inoculado y con la pintura de recubrimiento y con el agregado del AE, se colocó en una bolsa transparente de polietileno para evitar la contaminación y se incubó a 10°C en heladera, durante 4 semanas.

### **3.7. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, con un 95% de confianza). Para ver diferencias entre las medias de los tratamientos, se llevó a cabo la prueba de Tukey utilizando el programa estadístico Minitab 17. Se consideró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre aquellas muestras o tratamientos que compartían una misma letra y cuando el  $p > 0.05$ . Las muestras se realizaron por triplicado.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Aislamiento e identificación de los mohos presentes en ambientes de industrias queseras y muestras de queso.

Los diferentes géneros de mohos aislados en la industria quesera se resumen en la Tabla 4. En este trabajo de tesis, nos centramos en el género *Penicillium* debido a su frecuencia de aparición y su importancia en el impacto económico que causa su presencia. Según NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) este género se clasifica taxonómicamente según se muestra en la Tabla 5.

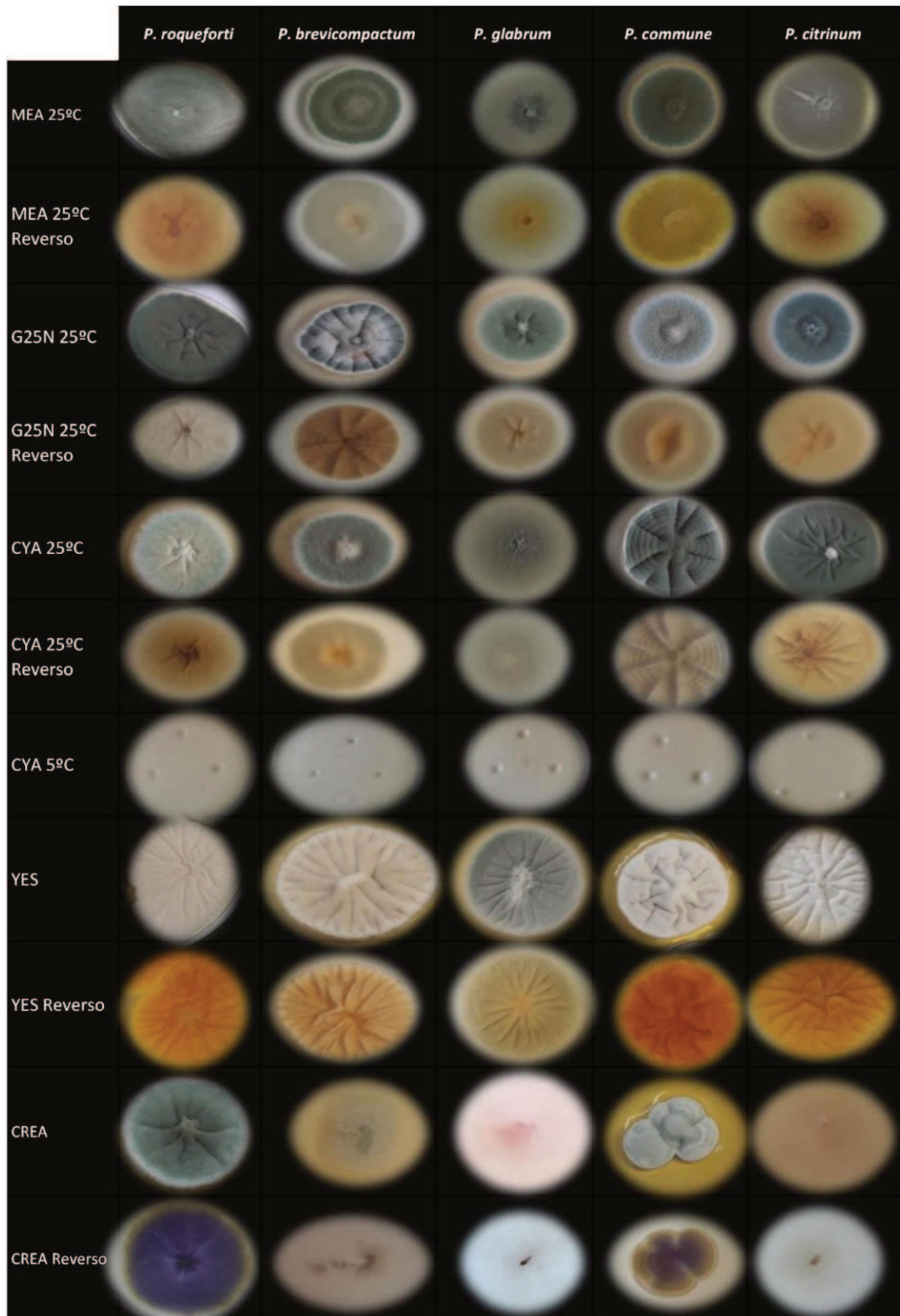
|  |                          |
|--|--------------------------|
| En ambientes de industrias queseras (cámara de maduración, salas de elaboración y salas de rayado) | <i>Alternaria sp.</i>    |
|  | <i>Aspergillus spp.</i>  |
|  | <i>Chaetomium sp.</i>    |
|  | <i>Cladosporium spp.</i> |
|  | <i>Epicoccum sp.</i>     |
|  | <i>Fusarium spp.</i>     |
|  | <i>Paecilomyces sp.</i>  |
| En las muestras de quesos analizados   | <i>Penicillium spp.</i>  |

Tabla 5. Taxonomía del género *Penicillium* según el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) consultado en diciembre 2022.

|             |                    |               |            |
|-------------|--------------------|---------------|------------|
| • Género:   | <i>Penicillium</i> | • Filo:       | Ascomycota |
| • Familia:  | Aspergillaceae     | • Subreino:   | Dikarya    |
| • Orden:    | Eurotiales         | • Reino:      | Fungi      |
| • Subclase: | Eurotiomycetidae   | • Superreino: | Eukaryota  |
| • Clase:    | Eurotiomycetes     |               |            |
| • Subfilo:  | Pezizomycotina     |               |            |

Las características macroscópicas de cada una de las especies del género *Penicillium* encontradas en las industrias queseras visitadas, se pueden observar en la Figura 14, en los diferentes medios utilizados (CYA a 5, 25 y 37 °C; MEA a 25 °C, G25N a 25 °C, YES a 25°C y CREA a 25°C).

Figura 14. Características macroscópicas de las especies de *Penicillium* cultivadas en diferentes medios y condiciones.





***Penicillium roqueforti* Thom**

Las colonias en medio CYA y MEA crecieron rápidamente, alcanzando unos 58 mm de diámetro, se las observó ligeramente sulcadas radialmente, el micelio fue de color blanco; la producción de conidios fue elevada, y en los márgenes se observó levemente un color turquesa grisáceo, predominantemente verde opaco y en algunas colonias el centro color marrón oliva. El reverso fue de color marrón pálido. En medio a CYA a 5°C, las colonias presentaron un diámetro 4 mm. A 37°C no desarrollaron.

Las colonias en medio G25N tuvieron un diámetro de 22 mm, fueron planas y ligeramente sulcadas radialmente, colores similares a los de CYA.

Las colonias desarrolladas en medio YES mostraron una esporulación decolorada y las colonias alcanzaron un diámetro de 50 mm. En medio CREA, hubo un buen crecimiento sin producción de ácido ya que se observa el reverso de color violeta, el diámetro fue de 30 mm.

Características microscópicas: Los conidióforos presentaban estrías de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de largo, sus paredes característicamente muy rugosas, con grandes penicilos terminales, típicamente terverticilados, ocasionalmente cuaterverticilados o raramente biverticilados; los conidios eran esféricos con paredes delgadas, perfectamente lisas, de color verde oscuro, sostenidos en columnas largas.

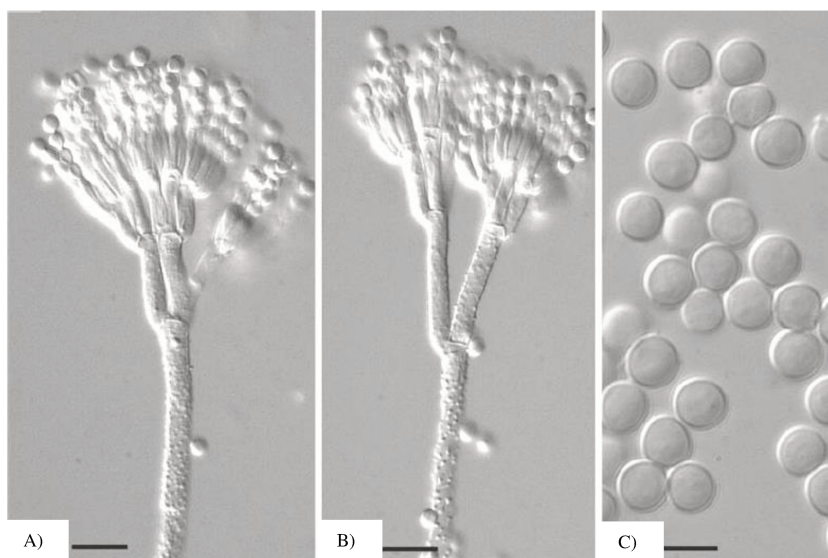


Figura 15. *Penicillium roqueforti*. A) Penicilios c/ barra son 10 $\mu\text{m}$  B) y C) conidios, c/ barra son 5  $\mu\text{m}$  (Pitt y Hocking, 2009).

***Penicillium brevicompactum* Dierckx**

En medio MEA las colonias presentaron un diámetro de 18 mm, eran planas aterciopeladas, con micelio color blanco y producción densa de conidios, verde mate a verde oscuro. Exudado también presente de color claro. El reverso era color pálido.

Las colonias en medio G25N presentaron un diámetro de 15 mm, con textura granular. El reverso fue de color pálido.

Las colonias en medio CYA tuvieron 21 mm de diámetro, eran radialmente sulcadas, moderadamente profundas, de textura aterciopelada. El micelio era de color blanco con formación de conidios de color verde claro opaco. Exudado presente como gotitas diminutas. El reverso era color amarillento pálido. A 5°C, se produjeron microcolonias de 2 mm de diámetro. Sin crecimiento a 37°C.

En medio YES las colonias alcanzaron los 20 mm con reverso color crema. En medio CREA hubo un menor desarrollo con colonias de 10 mm de diámetro y sin producción de ácido.

Características microscópicas: los conidióforos de 500 a 800  $\mu\text{m}$  de largo, de paredes lisas, con penicilios terverticilados anchos y compactos de menos de 40  $\mu\text{m}$  de largo, con ramas cortas y anchas, a menudo dobladas alejándose del eje. Las métulas se encuentran en racimos divergentes, cortos y anchos, de 10  $\mu\text{m}$  de largo. Las fialides en verticilos divergentes, ampuliformes, de 7  $\mu\text{m}$  de largo, los conidios elipsoidales de 2.5–3.5  $\mu\text{m}$  de largo, con paredes lisas o muy finamente rugosas, sostenidas en cadenas divergentes y desordenadas.

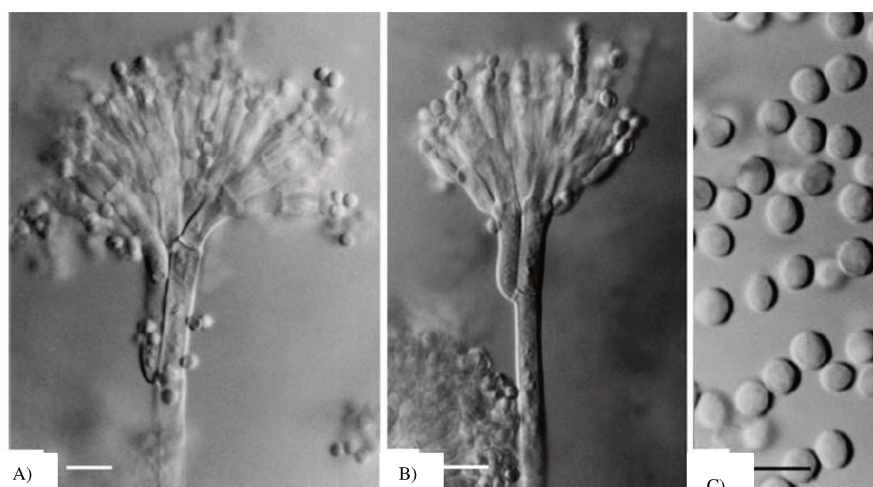


Figura 16. *Penicillium brevicompactum*. A y B) Penicilios c/ barra son 10  $\mu\text{m}$  C) conidios, c/ barra son 5  $\mu\text{m}$  (Pitt y Hocking, 2009).



***Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling**

Las colonias en medio MEA tuvieron un diámetro de 44 mm, fueron bajas, aterciopeladas, abultadas centralmente. El micelio era color blanco visible solo en los centros, la producción de conidios fue moderada, de color verde mate a verde oscuro, el reverso se mostró de color amarillo.

Las colonias en medio G25N tuvieron un diámetro de 23 mm, sulcadas o arrugadas en el centro y de textura aterciopeladas, el micelio presentaba un color blanco bien en el centro.

Las colonias en medio CYA tuvieron un diámetro de 30 mm de bordes indefinidos con textura aterciopelada, el micelio era de color blanquecino visible en el centro, y el color de los conidios fue igual que en medio MEA. No se observaron exudados o pigmentos. A 5°C se formaron colonias de 4 mm de diámetro. Sin crecimiento a 37°C.

En medio YES hubo poca esporulación, las colonias eran sulcadas y no hubo difusión de pigmentos al agar. Las colonias crecieron hasta 33 mm de diámetro, con un reverso color crema amarronado. En medio CREA presentó un crecimiento muy pobre y se observó reacción ácida.

Características microscópicas: Los conidióforos presentaron estipes de 50–100  $\mu\text{m}$  de largo, con paredes lisas a finamente rugosas, monoverticiladas, vesiculadas de 6  $\mu\text{m}$  diámetro; con fialides numerosos, ampuliformes, de 8–12  $\mu\text{m}$  de largo; los conidios eran esféricos o subsféricos de 3,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con paredes lisas o muy finamente rugosas, sostenidas en columnas largas y bien definidas.

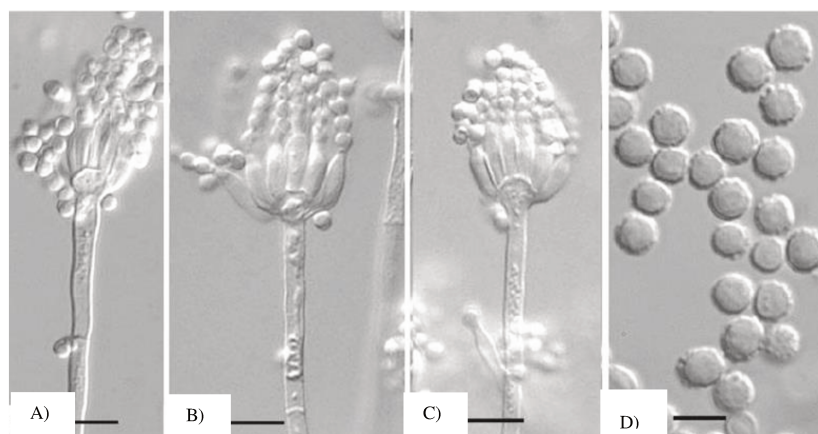


Figura 17. *Penicillium glabrum*. A, B y C) Penicilios c/ barra son 10  $\mu\text{m}$ , D) conidios, c/ barra son 5  $\mu\text{m}$  (Pitt y Hocking, 2009).

***Penicillium commune* Thom**

Las colonias en medio MEA presentaron un diámetro de 23 mm, se mostraron planas, bajas y densas, con su superficie aterciopelada. De micelio discreto y blanco, la producción de conidios fue moderada y color verde mate. El reverso presentaba un color amarillento muy claro.

Las colonias en medio G25N tuvieron 18 mm de diámetro, planas y de profundidad baja, densas. El micelio era de color blanco a amarillento con reverso pálido.

Las colonias en medio CYA tuvieron 30 mm de diámetro, eran radialmente sulcadas y aterciopeladas, con un discreto micelio color blanco. Con moderada producción de conidios y de color verde apagado, no se observaron exudados. El reverso fue de un color pálido. A 5°C se formaron colonias de 4 mm de diámetro. Sin crecimiento a 37°C.

En medio YES tuvieron 25 mm de diámetro, color crema también en reverso, con poca generación de conidios. En medio CREA creció hasta los 20 mm y mostró reacción ácida.

Características microscópicas: Los conidióforos con estipes de 200 mm de largo, con paredes finamente rugosas, portadoras de penicilios terminales terverticilados; con 1 o 2 por penicilios, con fialides ampuliforme de 9–11 mm de largo. Los conidios fueron esféricos, también se encontraron algunos subesféricos, de 4,0 mm de diámetro, con paredes lisas, mostrando cadenas desordenadas.

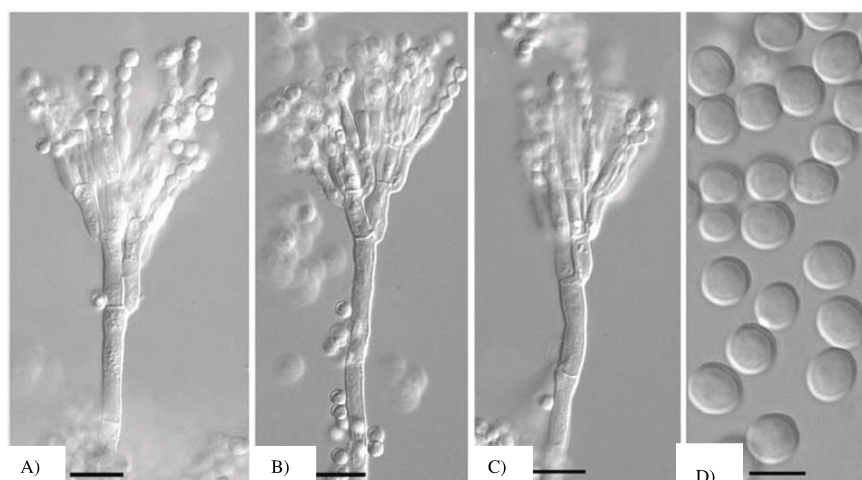


Figura 18. *Penicillium commune* A, B y C) Penicilios c/ barra son 10µm D) conidios, c/ barra son 5 µm (Pitt y Hocking, 2009).

***Penicillium citrinum* Thom**

Las colonias en medio MEA tuvieron 18 mm de diámetro, eran planas con micelio de color blanco, con formación moderada de conidios azul grisáceo en los márgenes, en otras partes eran verde opaco. El reverso presentaba un color marrón pálido.

Las colonias en medio G25N tuvieron un diámetro de 17 mm, eran aterciopeladas concentradas en el centro, el micelio era color blanco con conidios abundantes de color verde mate. El reverso era de color pálido.

Las colonias en medio YES tuvieron 41 mm, eran de color blanco en el anverso y amarillento en el reverso. Las colonias en medio CREA prácticamente no desarrollaron y no mostraron reacción ácida.

Las colonias en medio CYA presentaron 30 mm de diámetro, eran radialmente sulcadas, con áreas aterciopeladas. Con micelio color blanco en áreas periféricas y en el centro, con moderada producción de conidios color turquesa grisácea. Con exudado claro amarillo pálido. El reverso era de color marrón amarillento. Sin germinación a 5°C. A 37°C, las colonias fueron de 8 mm de diámetro.

Características microscópicas: Los conidióforos presentaron estipes de 300  $\mu\text{m}$  de largo, de paredes lisas, que terminan en verticilos bien definidos de 3 a 5 métulas divergentes de longitud uniforme, comúnmente agrandadas o vesiculadas apicalmente, con fialides ampuliformes de 8  $\mu\text{m}$  de largo, con conidios esféricos de 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con paredes lisas o muy finamente rugosas, sostenidas en columnas largas y bien definidas, una por métula, dispuestas en un verticilo característico en cada conidióforo.

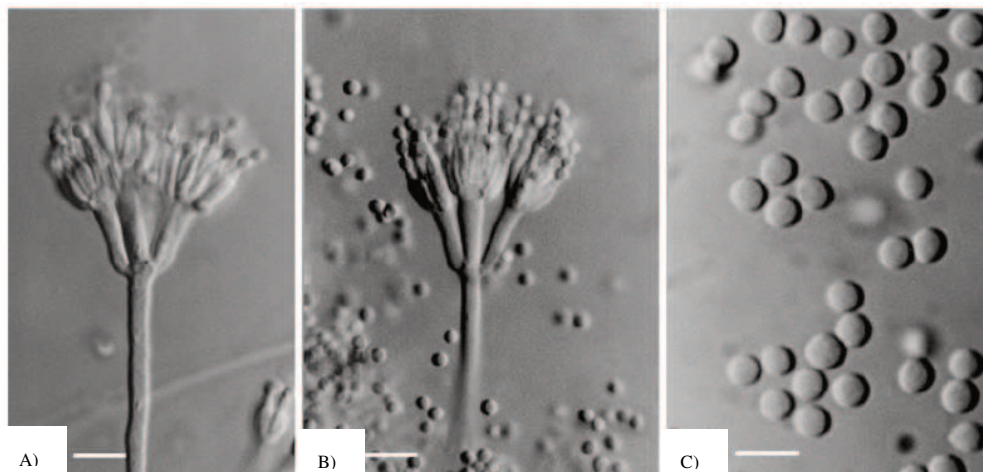


Figura 19. *Penicillium citrinum* A y B) Penicilios c/ barra son 10 $\mu\text{m}$  C) conidios, c/ barra son 5  $\mu\text{m}$  (Pitt y Hocking, 2009).

Nuestros resultados mostraron que el género *Penicillium* fue el más abundante. Estos datos se correlacionan con los encontrados por otros grupos de investigación, donde el estudio de los microorganismos del aire y superficies en industrias queseras demostró la presencia de varios géneros de mohos contaminantes, siendo el *Penicillium* el más importante en cantidad y variedad de especies (Finne Kure y Skaar, 2019; Ramos-Pereyra y col., 2019; Griffin y col., 2020; Kandasamy y col., 2020). Las especies de *Penicillium* encontradas en este trabajo también fueron encontradas por de Souza y col. (2021) (*P. roqueforti* y *P. glabrum*), Kandasamy y col. (2020) (*P. commune* y *P. brevicompactum*), estos autores no encontraron *P. citrinum* que si fue aislado de las muestras correspondiente a los ambientes muestreados en este trabajo. Esta última especie que generalmente se haya en granos, es una especie distribuida mundialmente en muchos alimentos y aunque sea menos común, también se ha encontrado en quesos (Pitt y Hocking, 2009).

Las especies *P. roqueforti*, *P. commune* y *P. brevicompactum* pueden crecer a bajas temperaturas y a baja concentración de oxígeno (principalmente los dos primeros), lo que hacen de este género un contaminante muy común en industrias queseras, lo que conlleva a pérdidas económicas importantes en todo el mundo (Souza y col., 2021; Olivier Bernardi y col., 2019).

## **4.2 Realización de los ensayos *in vitro* con aceites esenciales**

### **4.2.1. Método de difusión en agar con pozo frente a las especies de *Penicillium* identificadas.**

Los resultados obtenidos del estudio de la acción antifúngica del AEO, del AET y del AER (1%, 5% y 10% p/v), frente a las especies de *P. roqueforti*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. commune* y *P. citrinum* se muestran en la Tabla 6. La concentración inicial de los propágulos fúngicos en estos ensayos fue de  $10^5$  propágulos fúngicos/mL.

Se puede observar en la Tabla 6 que los AE mostraron diferentes comportamientos frente a las cepas estudiadas. El AEO fue el de mayor acción antifúngica frente a todas las especies ensayadas, resultando las concentraciones de 5% y 10% p/v las más efectivas. El AET solo fue efectivo frente a las especies *P. roqueforti*, *P. brevicompactum* y *P. commune* a las concentraciones de 5% y 10% p/v. El AER no fue efectivo frente a las especies estudiadas a ninguna de las concentraciones ensayadas. El control con

Tween20® 0,1% p/v y con alcohol etílico absoluto 99,5% no presentaron halo de inhibición en todos los casos ensayados. Los puntos que resultaron con acción antifúngica significativa mostraron halos mayores que los obtenidos por la Natamicina 0,5% p/v.

Tabla 6. Acción antifúngica de los aceites esenciales frente a las especies de *Penicillium* aisladas.

| Especies de <i>Penicillium</i> | AEO                     |    |     | AET |    |     | AER |    |     |
|--------------------------------|-------------------------|----|-----|-----|----|-----|-----|----|-----|
|                                | Concentraciones (% p/v) |    |     |     |    |     |     |    |     |
|                                | 1%                      | 5% | 10% | 1%  | 5% | 10% | 1%  | 5% | 10% |
| <i>P. roqueforti</i>           | +                       | +  | +   | -   | +  | +   | -   | -  | -   |
| <i>P. brevicompactum</i>       | +                       | +  | +   | -   | +  | +   | -   | -  | -   |
| <i>P. glabrum</i>              | -                       | +  | +   | -   | -  | -   | -   | -  | -   |
| <i>P. commune</i>              | -                       | +  | +   | -   | +  | +   | -   | -  | -   |
| <i>P. citrinum</i>             | -                       | +  | +   | -   | -  | -   | -   | -  | -   |

(+) Acción antifúngica significativa (halo igual o mayor de 10 mm)

(-) Sin acción antifúngica (halo menor de 10 mm).

AEO: Aceite Esencial de Orégano / AET: Aceite Esencial de Tomillo / AER: Aceite Esencial de Romero

En la figura 20 se puede observar el ensayo de método de difusión en agar con pozo para *P. roqueforti* frente a los controles Natamicina 0,5% p/v, Tween20® 0,1% p/v y Alcohol etílico absoluto 99,5%. Se obtuvo un halo de inhibición de 31 mm para la Natamicina 0,5%p/v (pozo1), mientras que no se obtuvieron halos de inhibición para Tween 20 0,1 %p/v (pozo 2) ni para el Alcohol etílico absoluto 99,5% (pozo 3).

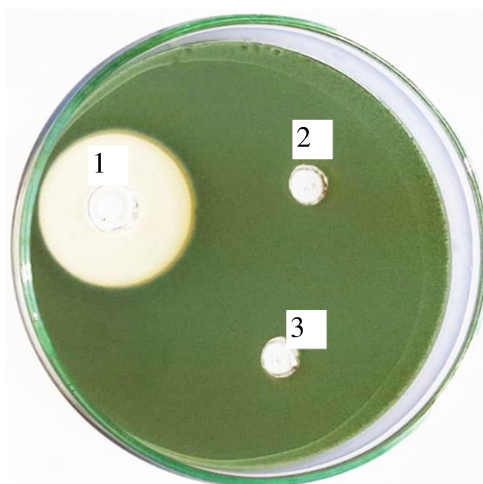


Figura 20. Ensayo de método de difusión en agar con pozo para *P. roqueforti* frente a los controles 1) Natamicina 0,5% p/v. 2) Tween20® 0,1% p/v. 3) Alcohol etílico absoluto 99,5%.



En la Figura 21 se observa la diferencia entre un ensayo con inhibición significativa (+) (placa A) y otro ensayo (placa B) con AE que no muestra acción inhibitoria (-) (punto 1) y una leve acción (punto 2 y 3). En este caso en particular se muestra el ensayo correspondiente a *P. citrinum* frente a AEO y AET (ANEXO III).

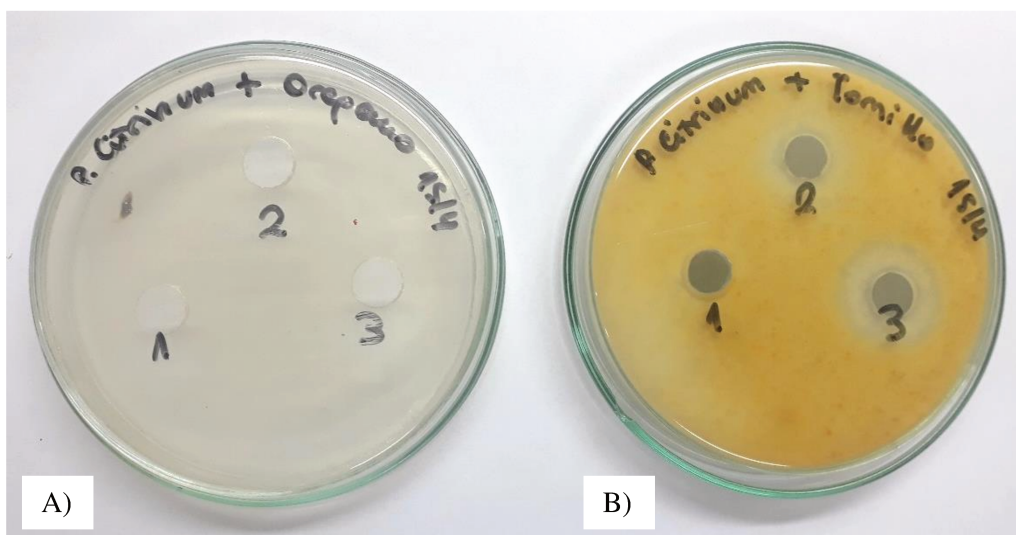


Figura 21. Ensayo de método de difusión en agar con pozo para *P. citrinum* frente a AEO (A) y AET (B). Donde cada pozo 1, 2 y 3 corresponden a las concentraciones de cada aceite 1%, 5% y 10% p/v.

En la Figura 22 se muestra la placa correspondiente al ensayo del método de difusión en agar con pozo de AEO frente a *P. citrinum* a trasluz, donde se puede apreciar el crecimiento del moho en las cercanías del pozo con 1% p/v de AEO (pozo 1).

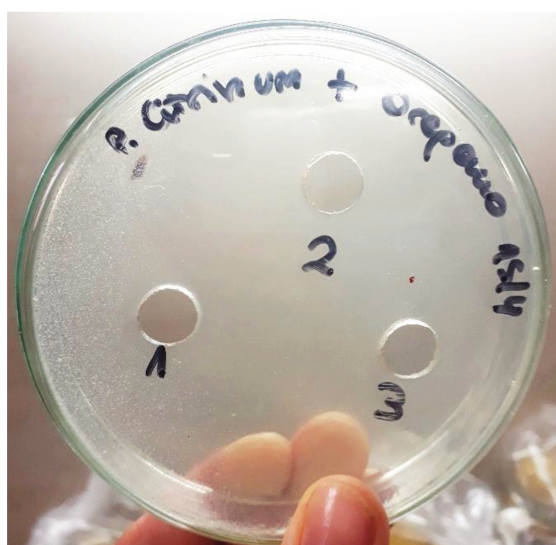


Figura 22. Ensayo de método de difusión en agar con pozo para *P. citrinum* frente al aceite esencial de orégano visto al trasluz. Donde cada pozo 1, 2 y 3 corresponden a las concentraciones del aceite esencial al 1%, 5% y 10% p/v.

Debido a que el AEO mostró acción antifúngica significativa antifúngica a las concentraciones de 1%, 5% y 10% p/v para *P. roqueforti* y *P. brevicompactum*, se ensayaron concentraciones menores (0,25% y 0,5% p/v) e intermedias (2%, 3%, 4% p/v) frente a *P. roqueforti* debido a que esta especie es muy contaminante en las industrias queseras y difícil de erradicar y frente al *P. brevicompactum* en este ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Acción antifúngica del aceite esencial de orégano frente a *P. roqueforti* y *P. brevicompactum*

|                          | AEO                     |       |    |    |    |    |    |     |
|--------------------------|-------------------------|-------|----|----|----|----|----|-----|
|                          | Concentraciones (% p/v) |       |    |    |    |    |    |     |
|                          | 0,25%                   | 0,50% | 1% | 2% | 3% | 4% | 5% | 10% |
| <i>P. roqueforti</i>     | -                       | -     | +  | +  | +  | +  | +  | +   |
| <i>P. brevicompactum</i> | -                       | -     | +  | +  | +  | +  | +  | +   |

(+) Acción antifúngica significativa (halo igual o mayor de 10 mm)

(-) Sin acción antifúngica (halo menor de 10 mm).

AEO: Aceite Esencial de Orégano

En la Tabla 7 se puede observar que ambas especies tuvieron un comportamiento similar en el ensayo. El AEO fue efectivo para las concentraciones intermedias probadas (2%, 3% y 4% p/v), mientras que para concentraciones menores (0,25% y 0,5% p/v), este aceite no mostró acción antifúngica.

Estos resultados obtenidos, se correlacionan con los encontrados por otros grupos de investigación, donde los AEO y AET han mostrado mejor acción antimicrobiana que el de romero (Cano Embuena y col., 2016; Sakkas y Papadopoulou; 2017). Otros autores demostraron que el AET presentaba un mayor efecto antifúngico que el AEO en contraposición con nuestros resultados (Lima y col., 2021). Las diferencias principales se deben a la concentración del compuesto activo que presentan estos AE a las que se le adjudican la acción antifúngica: timol y carvacrol.

Almeida y col. (2021) encontraron al igual que en este trabajo de tesis, que el AEO resultó tener acción antifúngica frente a *P. commune* aunque a una concentración menor que la nuestra (4 mg/mL). Similares resultados fueron encontrados por Muñoz-Tebar (2021) que con 10 mg/mL de AEO obtuvieron una inhibición del 45% frente al *P. commune*. Leonelli Pires de Campos (2022) encontró que el agregado de 0,02% (v/v) de

AEO en la preparación de queso Minas, poseía acción inhibitoria de la esporulación de *P. citrinum* durante 15 días. Otros autores, encontraron acción antifúngica del AEO frente a *Aspergillus niger* (Santoyo y col., 2006; Boudin y col., 2016). También se ha demostrado la acción antimicrobiana de este AE frente a bacterias tales como *Escherichia coli*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* *A. acidoterrestris* (Li y col., 2022) y *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert y col., 2001).

Klaric (2006) encontró que AET presentaba acción antifúngica frente al *P. brevicompactum* pero a concentraciones menores del aceite que las ensayadas en este trabajo (39 µg/mL). Sakkas (2017) demostró la acción antifúngica del AET frente a *Fusarium moniliforme*. También se ha encontrado su acción antimicrobiana frente a bacterias tales como *Listeria monocytogenes* (Somrani y col., 2020), *Escherichia coli*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* y *A. acidoterrestris* (Li y col., 2022).

En cuanto al AER, en contraposición con nuestros resultados, la bibliografía informa que este aceite suprime el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbruekii*, *S. cerevisia* y *C. krusei*, mostrando mayores efectos inhibitorios sobre las bacterias (MIC: 0.5–1.5 mg/mL) analizadas que sobre las levaduras. Además, se encontró que el AER mostró mejores actividades antifúngicas especialmente contra *C. albicans*, *Trichophyton tonsurans* y *Trichophyton rubrum* (CIM 15,0–30,2 L). También se le adjudican importantes actividades antibacterianas frente a *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* y *Shigella sonnei*, mediante el ensayo de dilución en caldo y difusión en agar con disco (Liu y col., 2017). En nuestros ensayos este aceite no tuvo acción inhibitoria frente a las especies de *Penicillium* estudiadas en las concentraciones ensayadas.

Cabe destacar que el método de difusión en agar con pozo manifestó ser un ensayo adecuado para emplear en evaluaciones iniciales, ya que su enfoque semi-cuantitativo permitió una caracterización rápida, sencilla y general de la susceptibilidad de los mohos frente a los AE evaluados. Se pudo explorar un rango de concentración considerablemente amplio utilizando poca cantidad de materiales y espacio físico reducido, lo que facilitó la puesta a punto y la optimización experimental del método.



Debido a que las concentraciones 1%, 2%, 3%, 4%, 5% y 10% p/v de AEO resultaron efectivas en este ensayo, se eligieron 1%, 2% y 5% p/v para los ensayos sobre la superficie de quesos.

#### 4.2.2. Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS)

Debido a que AEO y AET mostraron acción antifúngica significativa frente a las especies estudiadas se realizó una cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) de estos dos aceites.

La Figura 23 muestra el cromatograma superpuesto de los dos AE y en la Tabla 8 se identifican los picos enumerados por orden de elución.

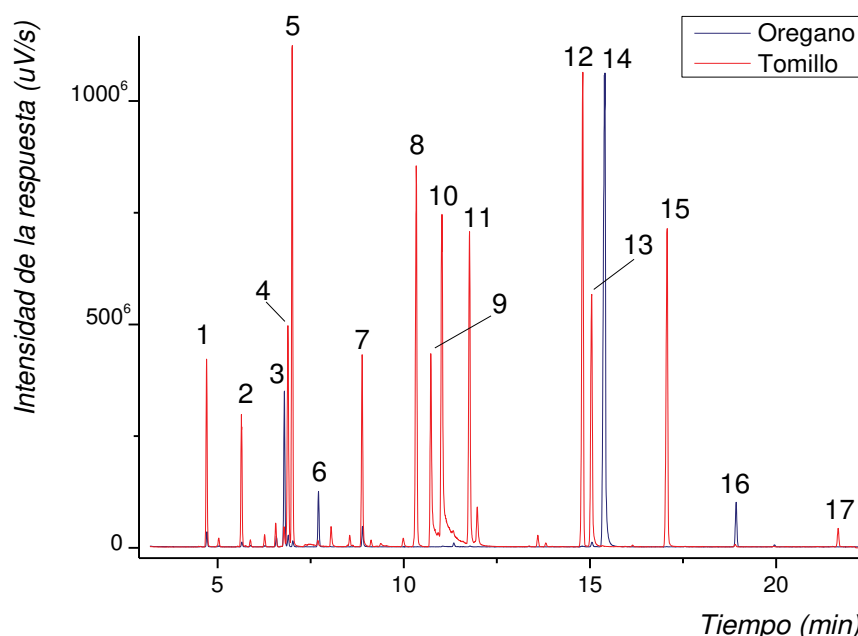


Figura 23. Cromatograma obtenido por GC-MS de los aceites esenciales de tomillo y orégano utilizados en los ensayos.

En la composición del AEO se puede observar que contiene un mayor porcentaje de carvacrol (73,3%), seguido por o-cimeno (12,9%),  $\gamma$ -terpinen y butilhidroxitolueno (4,7%) y por último de linalool en bajo porcentaje (1,9%). Estos valores se correlacionan con los encontrados por Kosakowska y col. (2019) donde en orégano griego hallaron carvacrol en un porcentaje similar de 73,8%, mientras que Asensio y col. (2012) en muestras de orégano de origen argentino se encontraron AEO enriquecidos en carvacrol pero con porcentajes menores a los nuestros de 24,54% para “orégano cordobés” y 30,19% para “orégano criollo” y, al igual que en nuestro caso, con ausencia de timol en ambos tipos de oréganos. En cuanto al o-cimeno, en el “orégano cordobés” se encontró

en un porcentaje de 14,5% y la presencia de un 9% de  $\gamma$ -terpinen, ambos porcentajes mayores a los encontrados en este análisis. La importancia de la especie utilizada se ve también reflejada en lo encontrado por Asensio y col. (2020) donde elaboran el AEO a partir de *O. vulgare ssp. hitum* (clon criollo) y encuentran por GC-MS un porcentaje mayor de timol a los mencionados anteriormente de 16,87% y un porcentaje bajo de composición de carvacrol de 0,83%.

Tabla 8. Porcentajes relativos de las principales moléculas encontradas en aceite esencial de tomillo y de orégano de acuerdo a su orden de elución por GC-MS.

| N° | Metabolito               | Acción conocida  | TR (min) | % en AE |      |
|----|--------------------------|--|----------|---------|------|
|    |                          |  |          | AET     | AEO  |
| 1  | 1R- $\alpha$ -Pinene     | Antioxidante <sup>1</sup>                                  | 4,7      | 3,9     | -    |
| 2  | L- $\beta$ -pinene       | Fungicida <sup>2</sup>                                     | 5,6      | 2,9     | -    |
| 3  | o-Cymene                 | Antioxidante <sup>3</sup>                                  | 6,8      | -       | 12,7 |
| 4  | Limonene                 | Antioxidante <sup>1</sup>                                  | 6,9      | 5,5     | -    |
| 5  | Eucalyptol               | Fungicida <sup>4</sup>                                     | 7        | 10,9    | -    |
| 6  | $\gamma$ -Terpinen       | Fungicida <sup>4</sup>                                     | 7,7      | -       | 4,7  |
| 7  | Linalool                 | Antioxidante <sup>1</sup> ;<br>Antimicrobiano <sup>5</sup> | 8,9      | 4,5     | 1,9  |
| 8  | Canphor                  | Antioxidante débil <sup>6</sup>                            | 10,3     | 10,3    | -    |
| 9  | Isoborneol               | Antimicrobiano <sup>7</sup>                                | 10,7     | 6,8     | -    |
| 10 | Borneol                  | Antimicrobiano <sup>8</sup>                                | 11       | 11,6    | -    |
| 11 | $\alpha$ -Terpineol      | Antimicrobiano <sup>8</sup>                                | 11,8     | 11      | -    |
| 12 | Borneol acetate          | Fungicida débil <sup>5</sup>                               | 14,8     | 13,6    | -    |
| 13 | Thymol                   | Fungicida <sup>9</sup>                                     | 15,1     | 7,9     | -    |
| 14 | Carvacrol                | Fungicida <sup>9</sup>                                     | 15,4     | -       | 73,3 |
| 15 | Eugenol                  | Fungicida <sup>9</sup>                                     | 17       | 9,8     | -    |
| 16 | $\beta$ -caryophyllene   | Fungicida <sup>10</sup>                                    | 18,9     | -       | 4,7  |
| 17 | Butylated Hydroxytoluene | Antioxidante <sup>8</sup>                                  | 21,7     | 0,5     | -    |

TR: tiempo de retención / % AE: % de aceite esencial

AEO: aceite esencial de orégano / AET: aceite esencial de tomillo.

<sup>1</sup> (Al-ansari, 2021)    <sup>4</sup> (Morcia y col., 2013)    <sup>7</sup> (Machado y col., 2021)    <sup>9</sup> (Abbaszadeh y col., 2014)

<sup>2</sup> (Shi y col., 2019)    <sup>5</sup> (Kotan y col., 2007)    <sup>8</sup> (Hou y col., 2022)    <sup>10</sup> (Jassal y col., 2021)

<sup>3</sup> (Nie y col., 2019)    <sup>6</sup> (Chaturvedia y col., 2018)

En la composición del AET encontramos un mayor número de compuestos en comparación con el AEO, de los cuales los principales fueron acetato de borneol (13,6%), borneol (11,6%),  $\alpha$ -Terpineol (11%), seguido de eucaliptol y canfor (10,9% y 10,6%), de eugenol (9,8%) y timol (7,9%), de isoborneol (6,8%), limonene (5,5%), linalool (4,5%) y por ultimo 1R- $\alpha$ -Pinene, L- $\beta$ -pinene y butilhidroxitolueno (3,9%, 2,9% y 0,5%). Satyal y col. (2016) consideraron rangos como valores normales de los componentes del AET,

siendo para el timol un 23–60%, para el  $\alpha$ -terpineol entre 18–50 %, y para el linalool (3–4%. Los hallados en esta tesis se encontraron por debajo de estos rangos salvo el porcentaje de linalool que fue mayor. Otros autores encontraron para el AET compuestos que no se detectaron en este trabajo tales como p-cimeno (8–44 %) y carvacrol (2–8 %) (Vouillamoz y Christ, 2020).

Dado que la acción antifúngica de un AE se registra en la bibliografía relacionada con los porcentajes de timol y carvacrol que contenga (Sakkas y col., 2017), la superior acción antifúngica del AEO encontrada en este trabajo cuando se compara con el AET, se ve reflejada en la diferencia de concentraciones de estos terpenos. En la composición del AEO hay un porcentaje mayor de carvacrol (73,3%) y ausencia de timol, mientras que para AET se registra ausencia de carvacrol y una presencia baja de timol de 7,9%. En un estudio realizado por Bozin y col. (2006), se comparó la acción antibacteriana y antifúngica del AEO y AET cuya composición química era de 13,9% de timol y 61,3% de carvacrol para el AEO, y de 47,9% de timol y 5,9% de carvacrol para el AET, estos autores encontraron características antimicrobianas similares entre estos dos AE. Ellos observaron que el AET mostró una acción antibacteriana mayor que el AEO, mientras que el AEO mostró una mayor acción antifúngica que el AET. Esta diferencia se debe a la composición química de los terpenos en estos AE, donde una mayor proporción de carvacrol resultó en una mejor acción antifúngica, similar a lo encontrado en este trabajo.

Haciendo mención especial a la importancia de la concentración de cada molécula en los AE a la hora de evaluar una acción específica, Klaric y col. (2006) evaluaron la acción antifúngica de AET y del timol como sustancia pura, frente a mohos aislados de casas con humedad, donde encontraron que el timol posee tres veces mayor acción antifúngica que el AET, cuya composición en el aceite era, no casualmente, de 33% (la 3er parte).

Como ya se mencionó, la composición de AE de una planta determinada es muy variable tanto en la composición química, como en el potencial terapéutico. Por lo tanto, la evaluación de la eficacia y la seguridad de las preparaciones alimenticias que contienen extractos de plantas o AE deben ser evaluadas en cada caso particular (Ahmed, 2021).

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo del inciso 4.2.1 donde se estudió la acción antifúngica de los AE mediante el método de difusión en agar con pozo frente a las especies de *Penicillium* identificadas, y apoyado por los resultados obtenidos de la

cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS), para los siguientes ensayos sobre queso se decidió utilizar el AEO ya que había demostrado ser el AE con mayor acción antifúngica frente a los mohos estudiados.

### 4.3. Aplicación del aceite esencial de orégano sobre la superficie de queso Tybo durante el almacenamiento.

#### 4.3.1 Esprayado de la solución de aceite esencial de orégano sobre la superficie de quesos.

El esprayado, tanto de soluciones acuosas como etanólicas, no fue un método de aplicación que encontramos efectivo frente a las cepas evaluadas (ANEXO III). Las muestras almacenadas por 7 días a 10°C de la porción de queso con AEO, tanto en base acuosa como etanólica, presentaron el mismo retraso de crecimiento que la muestra control (queso inoculado sin AE), indicando que el retraso del crecimiento se debía a la baja temperatura (10°C) y no a la aplicación del aceite. A los 15 días el desarrollo fue muy abundante (5% de inhibición), cubriendo toda la porción del queso. No hubo desarrollo fúngico en el control negativo (Natamicina 0,5% p/v en queso inoculado) durante los 15 días de ensayo. Pruebas preliminares realizadas a mayores temperaturas de incubación de 20 y 28°C (resultados no mostrados) dieron a conocer la incompatibilidad del ensayo a estas temperaturas, donde en menos de 3 días el desarrollo fúngico ya era visible con o sin AE, y a los 15 días ya era completo (Figura 24).

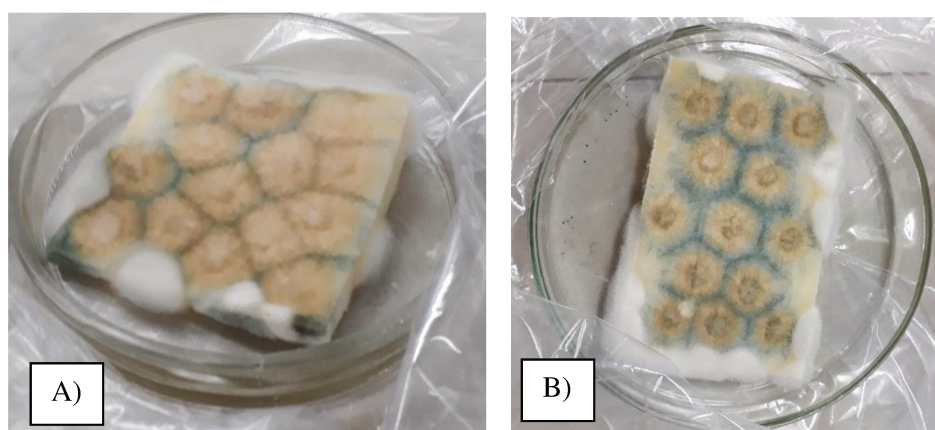


Figura 24. Ensayo de esprayado sobre la porción de queso con aceite esencial de orégano frente a *P. roqueforti* luego de 15 días a 20°C A) 2% p/v de aceite esencial de orégano base acuosa B) 5% p/v de aceite esencial de orégano base acuosa.

Una razón por la que el ensayo mediante la aplicación por esprayado no funcionó podría deberse a que el espray forma una capa muy fina y no llega a cubrir homogéneamente toda la superficie de la porción del queso a diferencia de otros métodos utilizados normalmente como inmersión o pincelado (*Zhong y col., 2014*). Ollé Resa y col. (2014) evaluaron la aplicación de natamicina en películas de almidón de tapioca sobre la superficie de quesos Port Salud (La Serenísima) de dos maneras diferentes, por aspersion (esprayado) y mediante aplicación de un film, para ver la acción antifúngica contra levaduras. Encontraron, que el método por esprayado tenía menos efectividad y que incluso luego de la aspersion de natamicina a una concentración de 5000 ppm solo se produjo una ligera reducción en las primeras 24 h, y retomó posteriormente el crecimiento. Podríamos considerar además que se podrían estar perdiendo algunos compuestos volátiles durante la aplicación del espray dentro del flujo laminar y colaborando también a la evaporación de los mismos debido a la corriente de aire durante paso de secado.

Zhong y col. (2014) utilizaron alginato de sodio como recubrimiento para queso mozzarella de baja humedad y probaron diferentes métodos de aplicación (inmersión, recubrimiento, pulverización y pulverización electrostática). Se utilizó la dureza del queso como principal factor de calidad, evaluando la pérdida de humedad. En este caso encontraron que los métodos de pulverización y pulverización electrostática presentaron los mejores resultados en cuanto a la dureza del queso tratado.

La elección del método de aplicación de un recubrimiento, debe pensarse según el tipo y tamaño del queso donde se va a aplicar. Esta elección afectará el costo y la eficiencia del recubrimiento y debe adaptarse al proceso de producción (al final de la producción, antes o después del paso de maduración) (*Ollé Resa y col., 2014; Zhong y col., 2014*).

Factores como la superficie irregular, los costos y la simplicidad hacen de la inmersión el método de elección en la industria quesera, ya que permite cubrir toda la superficie por inmersión y el exceso se elimina mediante drenaje o uso de una secadora. Aunque también es importante considerar el tipo de queso y la escala del proceso de producción donde se aplicará, por ejemplo, en una industria de pequeña dimensión se puede utilizar el método de pincelado para evitar el uso de grandes tanques para sumergir

los quesos o costosas máquinas para rociar; lo contrario sería el caso de grandes instalaciones industriales (Costa y col., 2018).

#### **4.3.2. Pincelado de la solución de aceite esencial de orégano sobre la superficie de quesos.**

La aplicación del AEO con pincelado mostró mejor eficiencia que la de esprayado cuando se almacenó a una temperatura de 10°C de incubación. Esto podría deberse a que esta forma de aplicación recubre mejor la superficie del queso y previene la volatilización de los compuestos como ocurre en la aplicación por esprayado.

#### **4.3.3. Acción inhibitoria del aceite esencial de orégano frente al *P. roqueforti* sobre la superficie de quesos con diferentes concentraciones de inóculo.**

En las Figuras 25, 26 y 27 se puede observar la acción del AEO frente a propágulos fúngicos de *P. roqueforti* a tres concentraciones diferentes (Alta, Media y Baja) sobre la superficie del queso Tybo.

En la Figura 25 se observa que a una Alta concentración de propágulos fúngicos no hubo desarrollo fúngico durante los primeros 7 días de incubación, siendo los porcentajes de inhibición del 100% para todas las concentraciones y formulaciones debido al lento crecimiento del moho a la temperatura de 10°C, tampoco hubo diferencias significativas en estos tratamientos ( $p = 1$ ). A los 15 días, las soluciones de 1% y 2% p/v de AEO tanto acuosas como etanólicas, mostraron un abundante desarrollo fúngico con inhibiciones menores al 40%. Por otro lado, la formulación al 5% p/v en base etanólica de AEO mostró un leve desarrollo fúngico (91,7% de inhibición) a diferencia de la formulación acuosa donde se observó un desarrollo moderado con un 49,6% de inhibición. Entre estas dos formulaciones existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En cuanto a los controles, durante los primeros 7 días de incubación no mostraron desarrollo fúngico. A los 15 días el control positivo (queso inoculado con Alta concentración de inóculo sin AEO) mostró un desarrollo moderado (40%). No hubo desarrollo fúngico en el control negativo (Natamicina 0,5% p/v en queso inoculado) (datos no mostrados en la figura).

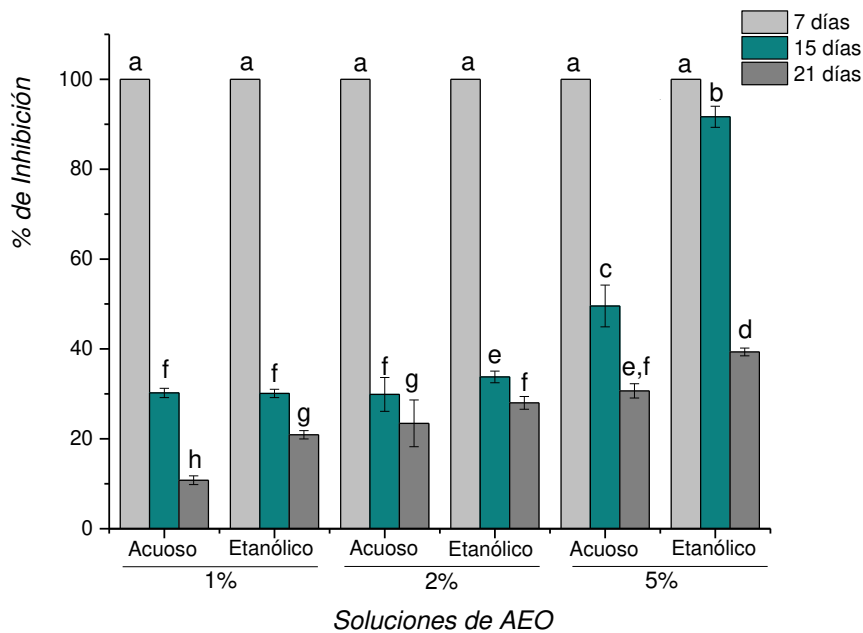


Figura 25. Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Alta de *Penicillium roqueforti* ( $10^5$ - $10^6$  propágulos fúngicos/mL) a  $10^\circ\text{C}$ . Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Luego de 21 días de incubación ninguna formulación ensayada mostró acción antifúngica, obteniendo bajos porcentajes de inhibición, siendo mayor para la formulación de 5% p/v etanólica (39,9%), seguida por 5% p/v acuosa (30,6%), 2% p/v etanólica (28%), 2% p/v acuosa (23,4%), 1% p/v etanólica (20,9%) y por último la formulación con 1% p/v acuosa (10,8%). El control positivo mostró abundante desarrollo fúngico (10%) mientras que el control negativo no mostró desarrollo fúngico (datos no mostrados en la figura).

En general esta Alta concentración ( $10^5$ - $10^6$  propágulos fúngicos/mL) del inóculo no permitiría evaluar si el AEO posee una acción antifúngica cuando se aplica en la superficie de quesos y se incuba a  $10^\circ\text{C}$ , ya que estos niveles de contaminación son poco frecuentes de encontrarse en ambientes de industrias lácteas, pero son necesarios a fin de realizar ensayos de laboratorios.

En la Figura 26 se observan los resultados obtenidos del ensayo de AEO frente *P. roqueforti* a una concentración Media de propágulos fúngicos ( $10^3$ - $10^4$  propágulos fúngicos/mL).

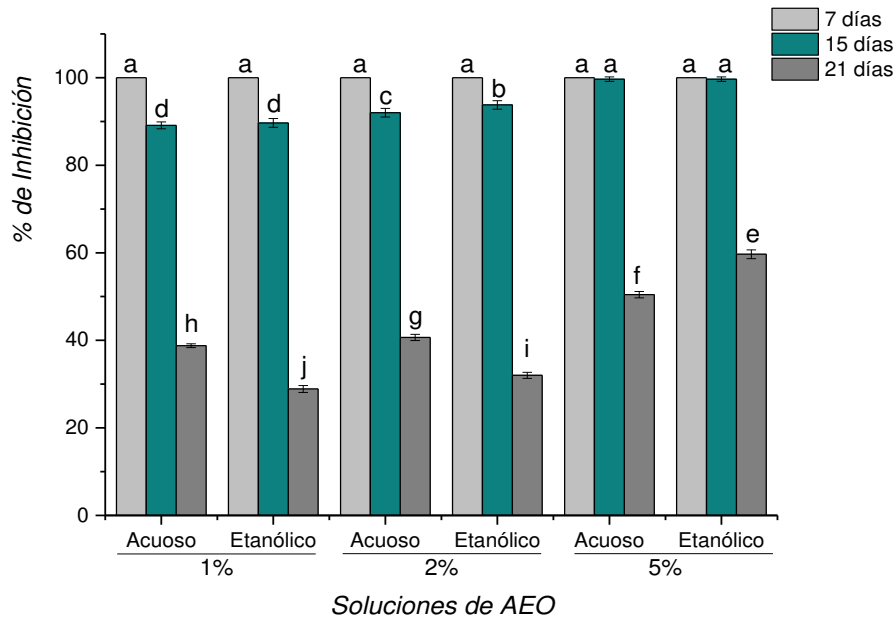


Figura 26. Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Media de *Penicillium roqueforti* ( $10^3$ - $10^4$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A los 7 días, tal como se vio anteriormente (Figura 25), tanto las soluciones etanólicas como las acuosas muestran inhibición del 100%, tampoco aquí se observan diferencias significativas ( $p = 1$ ). A los 15 días de incubación, las formulaciones de 5% p/v etanólica y acuosa mantienen altos porcentajes de inhibición (100%) donde no se observó desarrollo fúngico. Las demás concentraciones mostraron un leve desarrollo fúngico con inhibiciones del 93,7% para 2% p/v etanólica y del 92% para la versión acuosa, y un porcentaje de inhibición del 89% para las formulaciones a 1% p/v de AEO tanto acuosa como etanólica. En cuanto a los controles, durante los primeros 7 días de incubación no mostraron desarrollo fúngico y luego a los 15 días el control positivo mostró un desarrollo moderado (60%), mientras que el control negativo no presentó desarrollo fúngico (datos no mostrados en la figura).

Luego de 21 días de incubación el desarrollo del moho fue moderado para la concentración del 5% p/v de AEO tanto acuosas como etanólica con inhibiciones de entre 50% y 60%. Para las demás concentraciones y formulaciones los porcentajes de inhibición fueron menores al 40% con desarrollo fúngico importante. Se observaron diferencias estadísticas para todas las concentraciones, tanto acuosas como etanólicas ( $p < 0,05$ ). Con estos datos, se comprobó que el AEO no ejerce una acción inhibitoria frente a una concentración Media de propágulos fúngicos de *P. roqueforti* durante tres semanas



en almacenamiento. El control positivo mostró un desarrollo fúngico abundante (30%), mientras que el control negativo no presentó desarrollo fúngico (datos no mostrados en la figura).

En la Figura 27 se observan los resultados obtenidos del AEO frente a una concentración Baja de propágulos fúngicos de *P. roqueforti*, ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL). Esta concentración se asemeja a valores reales de contaminación encontrados en las industrias queseras donde se aplican BPM.

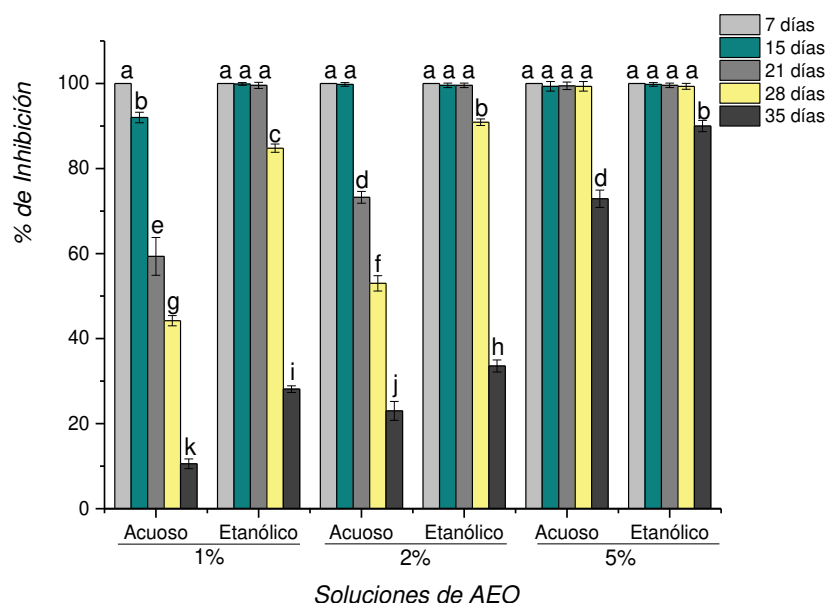


Figura 27. Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Baja de *Penicillium roqueforti* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

El ensayo se realizó durante mayor tiempo de incubación (35 días), para estudiar el comportamiento antifúngico del AEO durante tiempos de almacenamientos refrigerados más extensos.

A los 7 días no hubo desarrollo fúngico (100% de inhibición) para todas las concentraciones y formulaciones ensayadas. No hubo diferencias significativas en los tratamientos ( $p = 1$ ). Lo mismo ocurrió a los 15 y 21 días para todas las formulaciones y concentraciones excepto para 1% p/v de AEO acuoso que mostro un leve desarrollo fúngico con 92% de inhibición a los 15 días y un desarrollo moderados con 60% de inhibición a los 21 días. La formulación acuosa al 2% p/v de AEO mostró desarrollo moderado del moho con un valor de inhibición del 73,2%. El control positivo a los 7 y 15

días de incubación no mostró desarrollo fúngico. A los 21 días este control mostró un leve desarrollo (70%). El control negativo no presentó desarrollo fúngico durante los 21 días de ensayo (datos no mostrados en la figura).

A los 28 días, sólo hubo 100% de inhibición para las concentraciones de 5% p/v tanto acuoso como etanólico. Los porcentajes de inhibición de las otras concentraciones variaron en 55% para las concentraciones de 1% y 2% p/v acuosas. Para las formulaciones etanólicas de 1% y 2% p/v el desarrollo fúngico fue leve con inhibiciones del 84,7% y 90,8% respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones ( $p < 0,05$ ). El control positivo mostró un desarrollo fúngico abundante (11%), mientras que el control negativo mostró un desarrollo moderado (55%) (datos no mostrados en la figura).

A los 35 días hubo 90% de inhibición con un leve desarrollo fúngico para 5% p/v de AEO etanólico, mientras que para la formulación acuosa fue de 72,8%. Las restantes concentraciones mostraron porcentajes de inhibición que variaron entre 10% y 33% mostrando desarrollo fúngico abundante. Ambos controles mostraron un desarrollo fúngico completo (datos no mostrados en la figura). Se observaron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias en los porcentajes de inhibición podrían deberse a la acción sinérgica entre el AEO y el etanol (Dao y Dantigny, 2011).

#### **4.3.4. Acción inhibitoria del aceite esencial de orégano sobre *P. brevicompactum* sobre la superficie de quesos con diferentes concentración de inóculo.**

En cuanto a los resultados de inhibición del AEO frente al *P. brevicompactum*, las Figuras 28, 29 y 30 muestran los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones de moho estudiadas.

En la Figura 28 se observa la acción inhibitoria de AEO frente a una Alta concentración de propágulos fúngicos de *P. brevicompactum*.

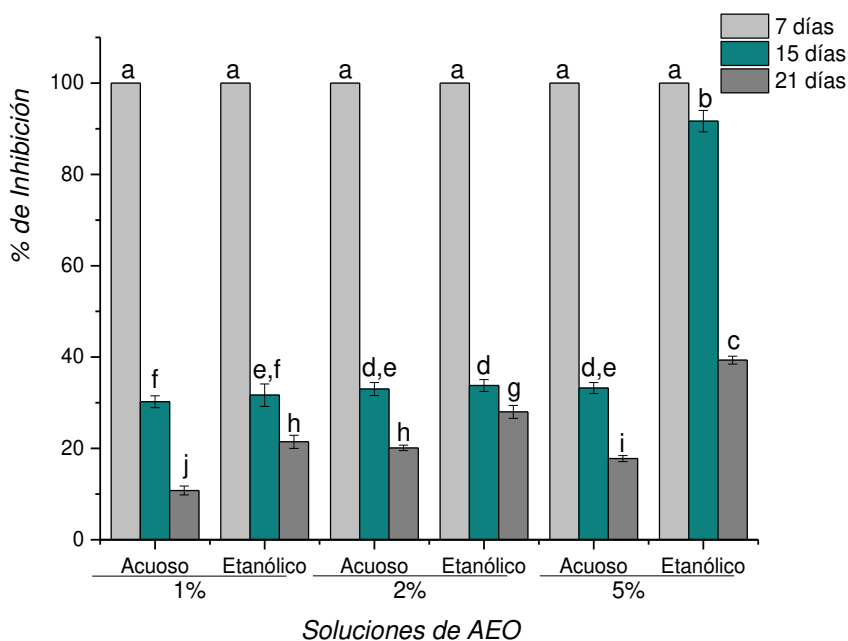


Figura 28. Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una Alta concentración de *Penicillium brevicompactum* ( $10^5$ - $10^6$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A los 7 días a 10°C no se observó desarrollo fúngico siendo una inhibición total del 100% debido a la baja temperatura, como se había observado en el ensayo con *P. roqueforti* (inciso 4.3.3.). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas y las dos formulaciones ( $p = 0,984$ ). En cuanto a los controles, durante los primeros 7 días de incubación no mostraron desarrollo fúngico.

A los 15 días, en cambio, se observó un importante desarrollo fúngico para todas las formulaciones acuosas y para las concentraciones de 1% y 2% p/v de base etanólica, con porcentajes de inhibición entre 30% y 33%. La formulación al 5% p/v de AEO en base etanólica fue la única que mostró efecto antifúngico con un porcentaje de inhibición del 91,6% con un leve desarrollo fúngico. A los 15 días el control positivo (queso inoculado con Alta concentración de inóculo sin AEO) mostró un abundante desarrollo fúngico (30%). No hubo desarrollo fúngico en el control negativo (Natamicina 0,5% p/v en queso inoculado) (datos no mostrados en la figura).

A los 21 días de incubación, tal como se observó para *P. roqueforti*, los valores de inhibición no fueron altos, observando abundante desarrollo fúngico (valores de inhibición entre 10% y 40%) con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), reforzando la idea que una concentración Alta de inóculo no es adecuado para analizar el

efecto inhibitorio del AEO en superficies de quesos durante un almacenamiento refrigerado. El control positivo mostró abundante desarrollo fúngico (10%) mientras que el control negativo no mostró desarrollo fúngico (datos no mostrados en la figura).

En la Figura 29 se observa la acción de AEO frente a una concentración Media del *P. brevicompactum*.

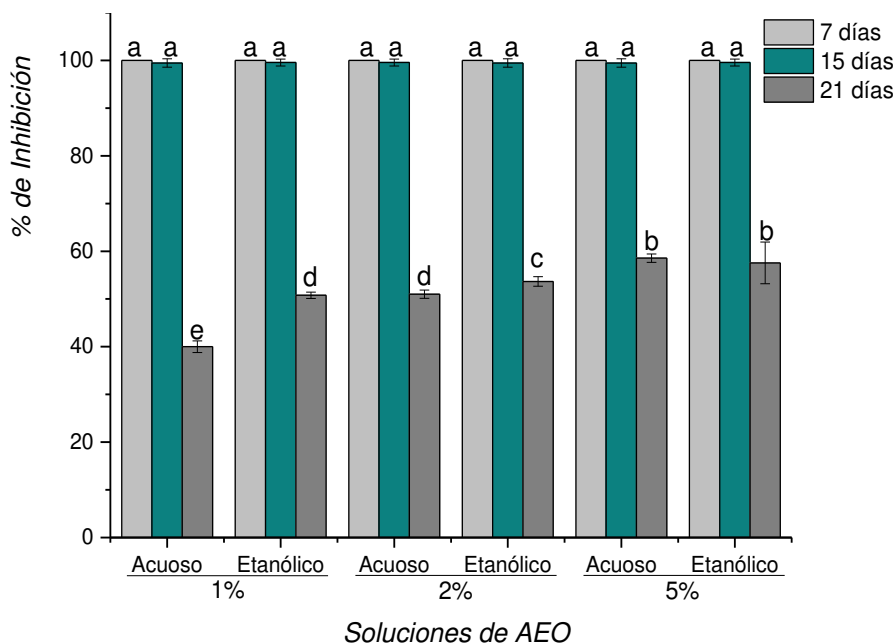


Figura 29. Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Media de *Penicillium brevicompactum* ( $10^3$ - $10^4$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A los 7 y 15 días de incubación a 10°C, el AEO logró inhibir el desarrollo fúngico (100% de inhibición) con todas las formulaciones ensayadas sobre la porción del queso. Tampoco se observaron diferencias significativas para todas las concentraciones y formulaciones ( $p > 0,900$ ). En cuanto a los controles, durante los primeros 7 días de incubación no mostraron desarrollo fúngico y luego a los 15 días el control positivo mostró un leve desarrollo (90%), mientras que el control negativo no presentó desarrollo fúngico (datos no mostrados en la figura).

A los 21 días de incubación, el efecto inhibitorio fue menor, obteniéndose un moderado desarrollo del moho, con un 40% de inhibición para la concentración de 1% p/v en base acuosa y en un rango acotado entre 50 y 60% para las demás formulaciones, siendo las formulaciones de 5% p/v de AEO acuosa y etanólicas las de mayores porcentajes de inhibición 57,6% y 58,6% respectivamente. No se observaron diferencias

significativas entre las concentraciones del 5% p/v acuosas y etanólicas pero si entre las demás concentraciones y formulaciones ( $p < 0,05$ ). El control positivo mostró un desarrollo fúngico abundante (30%), mientras que el control negativo no presentó desarrollo fúngico (datos no mostrados en la figura).

En la Figura 30 se observa la acción inhibitoria del AEO frente al *P. brevicompactum* cuando este se encuentra en una Baja concentración durante un período de 35 días.

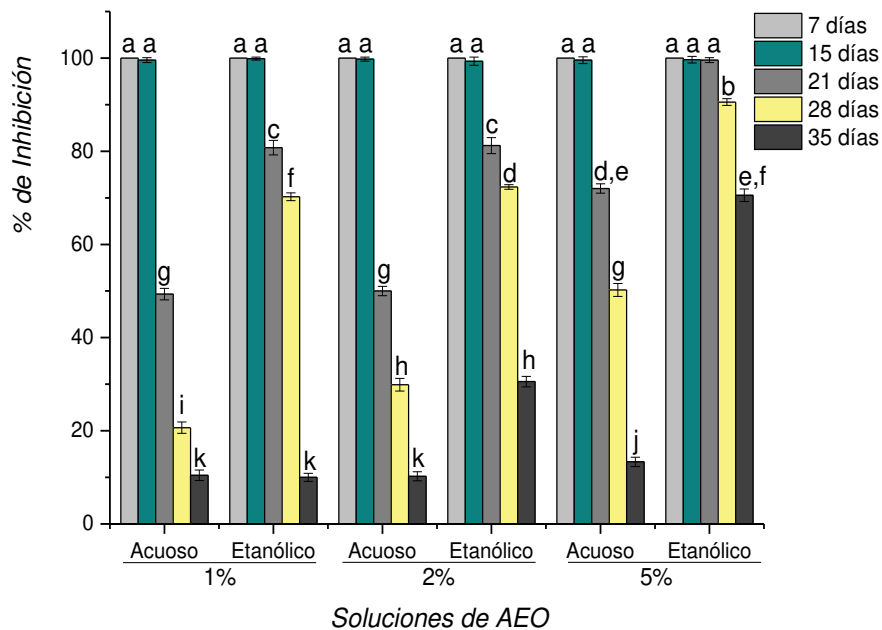


Figura 30. Acción de las formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa y etanólica frente a una concentración Baja de *Penicillium brevicompactum* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Durante los 7 y 15 días de incubación hubo un 100% de inhibición en todas las concentraciones de AEO propuestas. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones y las formulaciones ( $p > 0,50$ ). A los 21 días de incubación comenzaron a verse diferencias en la acción inhibitoria, donde las formulaciones acuosas al 1% y 2% p/v mostraron un moderado desarrollo fúngico (50% de inhibición), y para la formulación al 5% p/v un desarrollo leve (70% de inhibición). Mientras que las formulaciones etanólicas al 1% y 2% p/v de AEO presentaron un leve desarrollo con un porcentaje de inhibición cercanos al 81%. Se obtuvo una inhibición completa (100%) solamente para la concentración del 5% p/v de AEO en base etanólica. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). El control positivo a los 7 y 15

días de incubación no mostró desarrollo fúngico. A los 21 días este control mostró un abundante desarrollo (50%). El control negativo no presentó desarrollo fúngico durante los 21 días de ensayo (datos no mostrados en la figura).

A los 28 días de incubación se observa que ninguna de las formulaciones conserva su efecto inhibitorio total (100%) sobre el *P. brevicompactum*. Las formulaciones que siguen en orden de poder inhibitorio son aquellas con 5% p/v etanólica (90,6%), 2% p/v etanólica (72,3%) y 1 % p/v etanólica (70,2%) con leve desarrollo fúngico, y luego con moderado desarrollo fúngico sigue la formulación de 5% p/v acuosa (50,2%), la de 2% p/v acuosa (29,9%) y por último la formulación de 1% p/v acuosa (10,4% de inhibición). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El control positivo mostró un desarrollo fúngico completo (0%), mientras que el control negativo mostró un desarrollo moderado (50%) (datos no mostrados en la figura).

A los 35 días de incubación, los porcentajes de inhibición en las soluciones acuosas fueron muy bajos, menores a 15%, habiendo abundante desarrollo fúngico para las concentraciones ensayadas. Para las formulaciones etanólicas, las concentraciones al 1% y 2% p/v de AEO mostraron porcentajes de inhibición del 10% y 30,5% respectivamente. Para la concentración del 5% p/v de AEO etanólica la inhibición fue mayor (70,6%) con un leve desarrollo fúngico durante los 35 días de incubación a 10°C. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Ambos controles mostraron un desarrollo fúngico completo (datos no mostrados en la figura).

En las Figuras 31 y 32 se compara la acción inhibitoria del AEO en las formulaciones acuosas y etanólicas ensayadas frente a las dos especies del género *Penicillium* estudiadas a Baja concentración de propágulos fúngicos.

En la Figura 31 se observan los resultados de las formulaciones acuosas, donde hubo diferencias significativas en el comportamiento de ambas especies de *Penicillium* frente a la formulación de 5% p/v de AEO ( $p < 0,05$ ). A esta Baja concentración de propágulos fúngicos de *P. roqueforti* se logró inhibir al 100% por 28 días presentando un efecto fungistático, mientras que frente al *P. brevicompactum* solo mantuvo un 100% la inhibición durante 15 días de incubación. A los 35 días se observa un moderado desarrollo sólo en la formulación de 5% p/v frente a *P. roqueforti* (65% de inhibición), mientras que

para las otras formulaciones se observó un desarrollo fúngico mayor con porcentajes de inhibición por debajo del 35%.

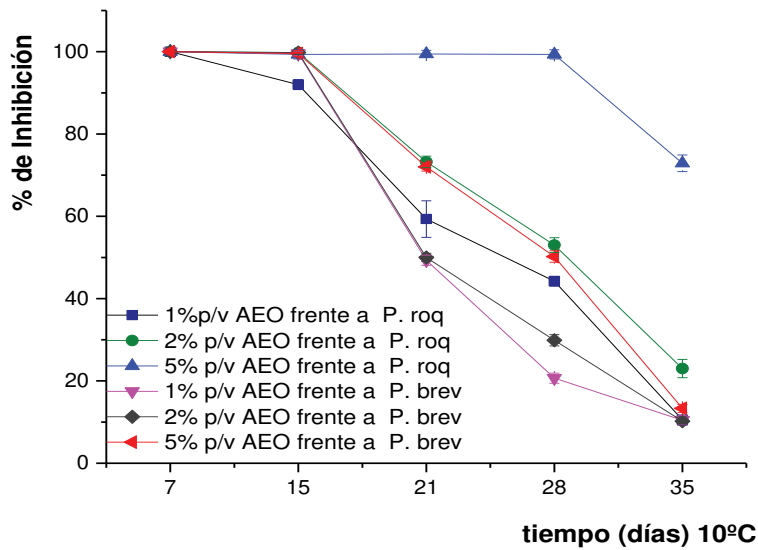


Figura 31. Comparación de la acción inhibitoria de formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base acuosa frente a una concentración Baja de propágulos fúngicos de *Penicillium roqueforti* y *P. brevicompactum* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos /mL) a 10°C.

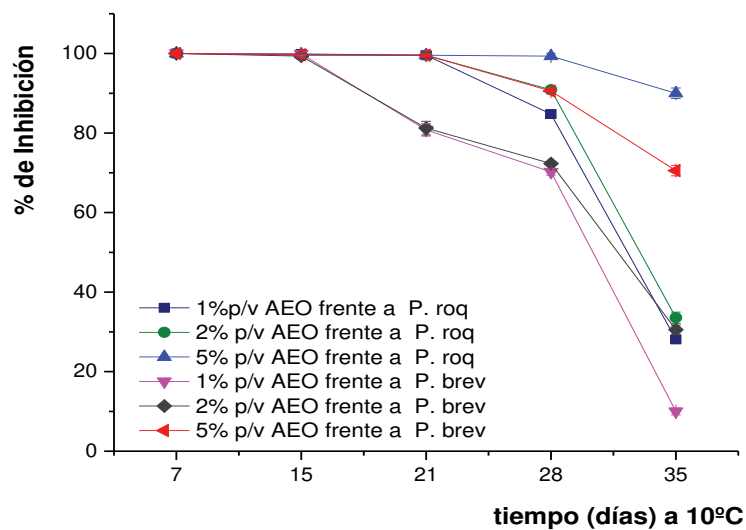


Figura 32. Comparación de la acción inhibitoria de formulaciones de aceite esencial de orégano al 1%, 2% y 5% p/v en base etanólica frente a una concentración Baja de propágulos fúngicos de *Penicillium roqueforti* y *P. brevicompactum* ( $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) a 10°C.

En la Figura 32 se observa que en las formulaciones de base etanólica, la inhibición en ambas especies de *Penicillium* fue mayor. Para el *P. roqueforti* la inhibición del desarrollo fúngico fue completo (100%) manteniendo un efecto fungistático hasta los 28 días de incubación a una concentración de 5% p/v de AEO, bajando luego al 90% a

los 35 días. Para el *P. brevicompactum* se logró una inhibición completa (100%) hasta los 21 días de incubación, luego hubo un desarrollo fúngico leve (90% de inhibición) a los 28 días.

Los mejores resultados encontrados para el *P. roqueforti* fueron aquellos donde se aplicó la formulación etanólica de 5% p/v de AEO con lo que se logró extender la vida útil del queso en refrigeración hasta 28 días en almacenamiento, que son 18 días por encima de lo esperado, ya que se recomienda almacenar la porción del queso no más de 10 días luego de su fraccionado. Para las concentraciones etanólicas de 1% y 2% p/v se logró extender 11 días la vida útil en refrigeración cuando se somete la superficie del queso a una concentración Baja de inóculo de  $10^2$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL.

Se pudo observar que la especie *P. brevicompactum* resultó ser más resistente al AEO, ejerciendo este aceite una inhibición menor sobre esta especie, mientras que en el *P. roqueforti* fue afectado su desarrollo en mayor medida.

Estos resultados son difíciles de comparar con los expuestos por otros investigadores ya que no se ha encontrado bibliografía donde se aplique el AEO sobre la superficie del queso de manera similar a la planteada en este trabajo de tesis. Sí hay buenos resultados cuando se incorpora en la preparación del queso un porcentaje bajo de AEO, como lo realizado por Leonelli Pire de Campo y col. (2022), quienes durante la preparación de queso Minas, que es similar al Tybo utilizado en este trabajo, agregan 0,02% p/p de un AEO con una composición de carvacrol similar a la nuestra (71%) y lo inoculan con bacterias y mohos, entre ellos un *Penicillium* (*P. citrinum*) y encontraron que durante 15 días de maduración en cámara (10-16°C) la presencia de AEO evitó la germinación de las esporas, además de no alterar propiedades sensoriales, intrínsecas (pH), y la acción de las bacterias lácticas propias de este tipo de queso.

También hubo interés por parte de otros autores de investigar si el agregado de AE sería beneficioso incorporarlo en la leche cruda, antes de todo el proceso necesario para elaborar diferentes tipos de quesos. Moro y col. (2015) añadieron AER a leche de oveja y encontraron que tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre *Clostridium spp.* sin afectar el crecimiento de bacterias ácido lácticas en el queso fortificado. Moosavy y col. (2013) evaluaron la incorporación de AE de *Mentha spicata* en la leche cruda de oveja en concentraciones de 2% y 2,5% (p/v) con la que luego elaboraban queso



tradicional Lighvan y encontraron que podría inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* durante 60 días a 14°C.

Los resultados obtenidos *in vitro* pueden verse afectados por la complejidad de la matriz alimentaria, siendo difícil extrapolar los mismos al alimento debido a la presencia de factores intrínsecos y extrínsecos que interfieren en la bioactividad de los compuestos. Uno de los factores intrínsecos que alteran la efectividad de los agentes antimicrobianos naturales es el contenido de lípidos y proteínas del alimento que puede proteger al microorganismo, resultando en la formación de una barrera física que impide el contacto con los compuestos bioactivos, reduciendo así su efectividad. Además, la mayor disponibilidad de nutrientes en las matrices alimentarias en comparación con los medios de laboratorio utilizados en estudios *in vitro*, pueden permitir que los microorganismos reparen las células dañadas más rápido o resistan el estrés ambiental (Christaki y col., 2021). Por lo tanto, en general se requieren concentraciones más altas de AE para alcanzar el mismo efecto encontrado *in vitro* en un ensayo en alimento. Sin embargo, esto se ve desafiado por el impacto del olor y el sabor (Ahmed y col., 2021).

#### **4.4. Análisis sensorial de los quesos tratados con aceite esencial de orégano**

Debido a que los mejores resultados fueron con la mayor concentración del AEO (5% p/v base etanólica), se le otorgó a cada jurado tres muestras de queso de 30 gramos incubados durante 21 días en heladera, una de queso sin tratar y las otras dos tratadas con una solución etanólica de AEO al 2% y 5% de p/v aplicada mediante la técnica de pincelado. Además, se les consultó a los consumidores si comprarían o no el producto.

Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 9 como un promedio de las puntuaciones otorgadas. El tratamiento a una concentración del 5% p/v de AEO se percibe como un sabor fuerte y persistente en este producto. Las muestras tratadas con solución etanólica al 2% p/v de AEO tuvieron una mejor aceptación, indicando que el sabor del AEO es bien recibido por los consumidores, pero cuando se aumenta la concentración del mismo, resulta demasiado fuerte para este producto, mostrando un picor en el paladar y persistencia del aroma a orégano en la nariz.

Tabla 9. Resultados promedio de la evaluación sensorial para la prueba de aceptabilidad de quesos Tybo tratados con aceite esencial de orégano.

| Atributo   | Tratamiento con AEO (%p/v) |     |         |
|------------|----------------------------|-----|---------|
|            | 2%                         | 5%  | Control |
| Apariencia | 4.7                        | 4.3 | 4.9     |
| Olor/aroma | 4.8                        | 4.1 | 5       |
| Sabor      | 4.1                        | 2.7 | 4.7     |
| Textura    | 5                          | 5   | 5       |

|                             |     |     |      |
|-----------------------------|-----|-----|------|
| SI comprarían este producto | 90% | 20% | 100% |
|-----------------------------|-----|-----|------|

Escala hedónica de cinco puntos con los extremos de (1) me desagrada muchísimo y (5) me gusta muchísimo. Los porcentajes corresponden a las personas que contestaron Sí en la opción de compra del producto.

Es necesario determinar la mínima concentración de los AE con el nivel sensorial aceptable para evaluar su perspectiva y posibilidad de aplicación en la industria alimentaria (*Ahmed y col., 2021*), sobre todo teniendo en cuenta que tanto para el AEO como para sus compuestos el umbral de sabor es extremadamente bajo (umbral de olor = 2,29 µg/mL, umbral de sabor = 5 µg/mL) (*Gaur y col., 2018*).

Otro punto a tener en cuenta a la hora de evaluar la incorporación en un alimento es que los compuestos de AEO se evaporan fácilmente y se pueden descomponer u oxidar durante la formulación, el procesamiento y el almacenamiento debido a la exposición al calor, la presión, la luz o el oxígeno (*Gaur y col., 2018*) como también el costo de su incorporación (*Hou y col., 2022*). Si bien el sabor y aroma aportado por el AE depende del tipo y concentración utilizada, también debe evaluarse que la presencia del mismo no este enmascarando algún tipo de defecto del alimento o proceso de descomposición (*Osimani y col.; 2022*), razón por la cual se recomienda utilizar la menor concentración posible del AE de mejor calidad encontrado, que otorgue el beneficio buscado.

#### 4.5. Utilización de un recubrimiento como vehículo del aceite esencial de orégano

Para este ensayo se utilizó el AEO en dos de las concentraciones estudiadas anteriormente, al 1% y 5% p/v para evaluar el comportamiento del recubrimiento. Los resultados que se muestran en la Figura 33 y en la Figura 34 son los realizados para el *P. roqueforti*, a dos concentraciones de inóculos, Baja y Alta ( $10^2$ - $10^3$  y  $10^5$ - $10^6$  propágulos fúngicos/mL), incubados en heladera a  $10^\circ\text{C}$  durante cuatro semanas. El ensayo también fue realizado para *P. brevicompactum* (los resultados no se muestran) pero debido a una resistencia mayor de esta especie de *Penicillium* ante el AEO no se pudo obtener una conclusión sobre su comportamiento ni como era afectado por el revestimiento o la presencia del AEO.

Se realizaron muestras controles que contenían el recubrimiento más el 1% o 5% p/v del AEO pero sin inoculación de propágulos fúngicos, otro control con recubrimiento sin inocular propágulos fúngicos y sin agregado de AEO, y por último los controles del moho donde se inocularon Baja y Alta concentración de propágulos fúngicos sobre el queso sin tratar con AEO (ANEXO III). En la Figura 33 se observan los resultados de los controles realizados.

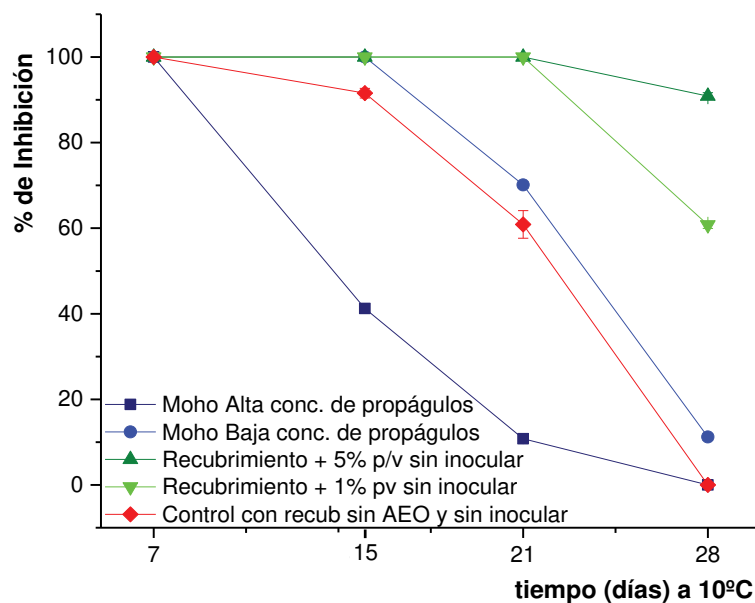


Figura 33. Porcentaje de inhibición en función del tiempo de almacenamiento a  $10^\circ\text{C}$  de los controles realizados en el ensayo con queso Tybo con recubrimiento más aceite esencial de orégano frente a Baja y Alta concentración de propágulos fúngicos de *P. roqueforti*.

En la Figura 33 se puede observar que las muestras con recubrimiento y AEO, tanto con 1% p/v como con 5% p/v obtuvieron los mejores efectos inhibitorios cuando no se inoculó *P. roqueforti* donde durante los primeros 21 días la inhibición fue completa (100%). A los 28 días se observó que con la muestra con recubrimiento + 5% p/v de AEO obtuvo un porcentaje de inhibición de 90,9% correspondiente a un leve desarrollo fúngico; mientras que para la muestra con recubrimiento + 1% p/v de AEO el porcentaje de inhibición fue de 60,7%, correspondiente a un moderado desarrollo del moho. Hubo diferencias significativas entre estas dos concentraciones ( $p < 0,05$ ).

La muestra con recubrimiento sin AEO y sin inoculación de propágulos fúngicos a los 7 días mostró una inhibición del 100% decayendo a 91,6% con un leve desarrollo fúngico a los 15 días y luego a un 60,9% de inhibición con un moderado desarrollo del moho a los 21 días, llegando a 0% de inhibición a los 28 días.

La muestra control con Alta concentración de propágulos fúngicos mostró un porcentaje del 100% de inhibición a los 7 días, para luego mostrar un desarrollo moderado del moho con un 41,2% de inhibición a los 15 días, un abundante desarrollo a los 21 días (10,7% de inhibición) y a los 28 días un desarrollo completo (0%).

En la muestra control con Baja concentración de propágulos fúngicos se observó un 100% de inhibición hasta los 15 días, para luego decaer a 70,1% mostrando un desarrollo fúngico leve, y luego un desarrollo del moho completo con 11% de inhibición a los 28 días.

En la Figura 34 se observan los resultados obtenidos para las dos concentraciones de propágulos fúngicos inoculados. Los puntos ensayados fueron los siguientes:

- **Recubrimiento con 1% y 5% p/v de AEO frente a Alta concentración  $10^5$  propágulos fúngicos/mL.**
- **Recubrimiento con 1% y 5% p/v de AEO frente a Baja concentración  $10^2$  propágulos fúngicos/mL.**

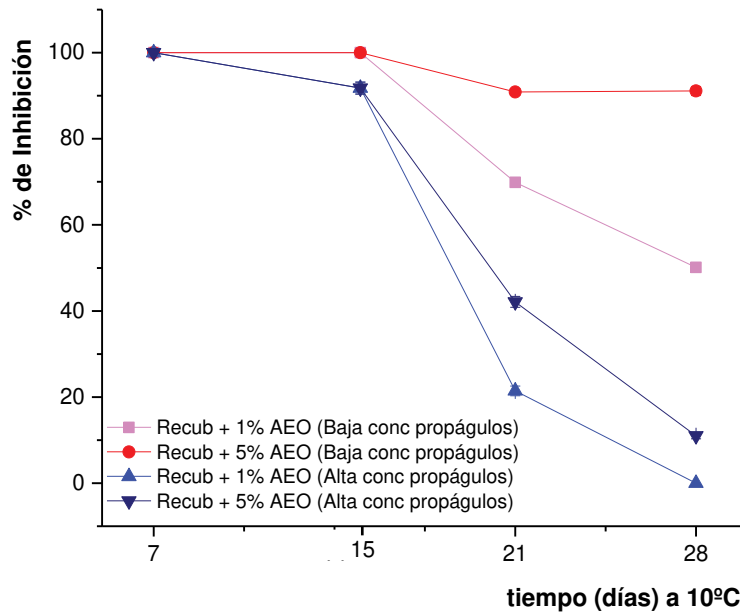


Figura 34. Porcentaje de inhibición en función del tiempo (días) de almacenamiento a 10°C del queso Tybo con recubrimiento como vehículo del AEO frente a Baja y Alta concentración de propágulos fúngicos de *P. roqueforti*.

En la Figura 34 se puede observar, en consistencia con lo observado en los ensayos realizados en esta tesis, que no hubo desarrollo fúngico durante los primeros siete días de incubación a 10°C, debido al efecto retardador de crecimiento que tiene la temperatura de almacenamiento y que tampoco hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,961$ ).

A los 15 días no hubo desarrollo fúngico para las muestras que tenían recubrimiento y la adición de 1% y 5% p/v de AEO frente a una Baja concentración de propágulos fúngicos. Por el contrario, para las muestras con recubrimiento y agregado de 1% y 5% p/v de AEO inoculadas con Alta concentración de propágulos fúngicos, se observa un leve desarrollo (91,7% de inhibición), por encima de la muestra control de Alta carga de propágulos fúngicos que presentó un desarrollo fúngico mayor (41,2% de inhibición). Hubo diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

A los 21 días de incubación ninguna de las muestras estudiadas presentó el 100% de inhibición, pero sí hubo un 90,8% de inhibición para las muestras con recubrimiento y 5% p/v de AEO frente a Baja concentración de propágulos fúngicos y un 69,8% de inhibición para la formulación con 1% p/v de AEO. En los puntos inoculados con Alta concentración de propágulos fúngicos a los 21 días, el desarrollo fúngico fue mucho

mayor, con un 42,1% de inhibición para el recubrimiento con 5% p/v de AEO y un 20% para el de 1% p/v de AEO. Hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Luego de los 28 días de almacenamiento, sólo mostró un leve desarrollo (90,8%) las muestras tratadas con recubrimiento y 5% p/v de AEO inoculadas con Baja concentración de propágulos fúngicos; mientras que en la muestra tratada con recubrimiento y 1% p/v de AEO la inhibición fue menor (50,2%). En aquellas muestras ensayadas con Alta concentración de propágulos fúngicos se observó abundante desarrollo fúngico con valores de porcentaje de inhibición por debajo del 20%, para aquella muestra inoculada con Alta concentración de propágulos fúngicos. Hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El análisis estadístico de estos datos (ver ANEXO IV) reflejan que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras inoculadas con Alta concentración de propágulos fúngicos y aquellas inoculadas con Baja concentración, reforzando el hecho de que contaminaciones fúngicas altas son muy difíciles de frenar con la aplicación de tratamientos basados en conservantes naturales.

Analizando en conjuntos los resultados obtenidos, el recubrimiento evaluado con el agregado de 1% y 5% p/v de AEO posee una acción antifúngica del 100% contra el *P. roqueforti* cuando este se encuentra a una concentración Baja de propágulos fúngicos durante 15 días a 10°C y frena el desarrollo fúngico a un 90,8% de inhibición cuando se encuentra en Alta concentración de propágulos fúngicos, ejerciendo una mejora del 50% cuando se compara con el queso inoculado con una Alta carga contaminante. Para que este recubrimiento sea útil durante mayor tiempo, la carga fúngica debe ser Baja ya que a los 21 días de incubación hubo una inhibición total (100%) solo en los puntos controles de 1% y 5% p/v de AEO sin inocular (Figura 33). A los 28 días de incubación sólo el ensayo con recubrimiento adicionado con 5% p/v de AEO frenó a un 90% el desarrollo de la biota normal o ambiental del queso.

Si comparamos estos resultados con los encontrados en el ensayo de acción inhibitoria del AEO sobre *P. roqueforti* a Baja concentración de propágulos fúngicos en queso Tybo en el apartado 4.3.3. (Figura 27), hemos encontrado mejores resultados sin la necesidad del uso del recubrimiento.

Otros grupos de investigación han estudiado utilizar un recubrimiento con el agregado de AEO para ser aplicado en quesos para evaluar la extensión de su vida útil durante la maduración o fraccionado. Si bien en la bibliografía no se encontró hasta el momento algo similar a lo realizado en este trabajo de tesis tanto por las diferentes concentraciones de AEO utilizadas y por los microorganismos analizados, se han encontrado trabajos que utilizaban el almacenamiento a temperaturas similares a las seleccionadas en esta tesis. Cano Embuena y col. (2016) probaron recubrir quesos semiduros de cabra por doble inmersión (se sumerge, se espera y se vuelve a sumergir) de soluciones líquidas de quitosano que contenían 0,75% p/p de AEO. El recubrimiento doble logró evitar pérdida de peso, mejorar la seguridad microbiana y reducir la actividad lipolítica y proteolítica durante la maduración del queso. El análisis sensorial reveló que los quesos con doble recubrimiento de quitosano y AE obtuvieron una buena aceptación. Kuorwel y col. (2013) incorporaron moléculas que se encuentran en AE como linalol, carvacrol y timol en un recubrimiento a base de almidón y luego lo aplicaron sobre la superficie de queso Cheddar, encontrando actividad antifúngica contra *A. niger*. El recubrimiento que contenía timol al 2,38% mostró una gran disminución en el crecimiento microbiológico luego de 35 días de almacenamiento a 15 °C. Artiga-Artigas y col. (2017) incorporaron AEO en nanoemulsiones con alginato de sodio, Tween 80 y fibra de mandarina, para luego probarlo en queso bajo en grasa fraccionado (10 g). El uso de una concentración del 2 % de AEO redujo el crecimiento de *S. aureus* en 2 log (UFC/g) en comparación con el control luego de 15 días de almacenamiento a 4°C. El uso de concentraciones de 2,5% de AEO también inhibió bacterias psicrófilas durante 6 días y mohos y levaduras durante 24 días de almacenamiento. Asensio y col. (2020) realizaron nanoemulsiones con AEO y encontraron que *E. coli* y *L. monocytogenes* fueron sensibles a la formulación de 160 mg de AEO por gramo de la nanoemulsión, demostrando una acción antimicrobiana mayor del AEO emulsionado que en estado puro.

Además, se ha investigado en los últimos años el recubrimiento con AE en otros alimentos obteniendo buenos resultados, como los de Karabagias y col. (2011) que estudiaron el uso de AE derivados de limoncillo, orégano y tomillo en combinación con un envasado en atmósferas modificadas (MAP) para estudiar la inhibición de la población total de bacterias mesófilas en brotes de repollo y rábano, encontrando un efecto inhibitor casi perfecto contra la población de bacterias. En un estudio realizado por Pedrós-Garrido y col. (2020) se evaluaron conservantes naturales (AE y ácidos orgánicos) en pescado

fresco (salmón y bacalao) señalando al ácido láctico y al orégano como los agentes más efectivos contra *Listeria spp.*

Debido a todo lo expuesto en este trabajo de tesis, podemos resumir que hemos encontrado una técnica para determinar la acción antifúngica de AE y cómo buscar en futuras muestras compuestos con características antimicrobianas, antioxidantes y antifúngicos de interés en AE. Hemos extendido la vida útil durante el almacenamiento a 10°C de porciones fraccionadas de queso Tybo con el agregado, mediante la aplicación por pincelado, de AEO entre 10 a 28 días según la concentración aplicada de AEO, aunque no pasa desapercibida en el análisis sensorial y puede ser un factor de rechazo por los consumidores.



## 5. CONCLUSIONES

En tres industrias queseras de la provincia de Santa Fe se aislaron ocho géneros de mohos *Alternaria sp.*, *Aspergillus spp.*, *Chaetomium sp.*, *Cladoporium spp.*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium spp.*, *Paecilomyces sp.* y *Penicillium spp.* De las cuales se identificaron macro y microscópicamente las siguientes especies de *Penicillium*: *P. roqueforti*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. commune* y *P. citrinum*.

En el estudio in vitro de la acción antifúngica, mediante el método de difusión en agar con pozo, de tres AE de orégano (AEO), de tomillo (AET) y romero (AER), se encontró que el AEO tiene una acción inhibitoria mayor que el AET. Mientras que el AER utilizado no mostró ninguna acción antifúngica. El AEO inhibió el desarrollo de las cinco especies del género *Penicillium* aisladas, en las concentraciones de 5% y 10% p/v. La concentración de 1% p/v de AEO mostró tener acción inhibitoria frente a *P. roqueforti* y *P. brevicompactum*, y no frente a *P. commune*, *P. glabrum* y *P. citrinum*. No se encontró acción antifúngica in vitro del AEO frente al *P. roqueforti* en concentraciones por debajo del 1% de p/v. El AET mostró solamente acción inhibitoria frente a *P. roqueforti*, *P. brevicompactum* y *P. commune* en las concentraciones de 5% y 10% p/v.

Mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC-MS) se corroboró la presencia de moléculas con propiedades antifúngicas en el AEO y AET, principalmente de Timol y Carvacrol. En la composición del AEO se pudo observar que contiene en mayor medida carvacrol (73,3%), seguido por o-cimeno (12,9%),  $\gamma$ -terpinen y butilhidroxitolueno (4,7%) y por ultimo de linalool en bajo porcentaje (1,9%). En la composición del AET las principales moléculas fueron el acetato de borneol (13,6%), borneol (11,6%),  $\alpha$ -Terpineol (11%), seguido de eucaliptol y canfor (10,9% y 10,6%), de eugenol (9,8%) y timol (7,9%), de isoborneol (6,8%), limonene (5,5%), linalool (4,5%) y por ultimo 1R- $\alpha$ -Pinene, L- $\beta$ -pinene y butilhidroxitolueno (3,9%, 2,9% y 0,5%).

Los ensayos de acción antifúngica del AEO frente a *P. roqueforti* y *P. brevicompactum* en matriz alimentaria fue dependiente del método de aplicación de la solución, obteniendo mejores resultados mediante una aplicación por pincelado y no por esprayado de las soluciones. A su vez, la concentración de propágulos fúngicos utilizados en los ensayos: Alta ( $10^6$ - $10^5$  propágulos fúngicos/mL), Media ( $10^4$ - $10^3$  propágulos fúngicos/mL) y Baja ( $10^3$ - $10^2$  propágulos fúngicos/mL), fue también un factor

determinante a la hora de evaluar la acción inhibitoria del desarrollo fúngico del AEO en soluciones acuosas y etanólicas a 1%, 2% y 5% p/v.

Se encontró que el AEO aplicado sobre la porción de queso Tybo a una concentración de 5% p/v de AEO de base etanólica y frente a una concentración de propágulos fúngicos Alta tanto de *P. roqueforti* y de *P. brevicompactum* tuvo una acción antifúngica del 90% durante los primeros 15 días de almacenamiento, siendo una concentración de mohos muy alta para evaluar la acción del aceite en las otras formulaciones.

Se encontró que el AEO aplicado sobre la porción de queso Tybo enfrentado a una concentración Media de propágulos fúngicos de *P. roqueforti* tuvo más del 90% de acción antifúngica los primeros 15 días de incubación en todas las formulaciones y, particularmente al 5% p/v tanto en soluciones de base acuosa o etanólica, mostró una inhibición completa. Ante una concentración Media de propágulos fúngicos de *P. brevicompactum*, la acción inhibitoria fue en todas las formulaciones realizadas de AEO, sin diferencia estadística significativa ( $p=0,939$ ) entre formulaciones acuosas y etanólicas.

Los mejores resultados se encontraron con el AEO aplicado sobre la porción de queso Tybo enfrentado a una concentración Baja de propágulos fúngicos de *P. roqueforti*, donde se observó una acción inhibitoria total durante 28 días de incubación para las formulaciones de 5% p/v en base acuosa y etanólica, y del 90% de inhibición durante 35 días para la formulación etanólica de mayor concentración. En las concentraciones menores de AEO se obtuvo durante 21 días de incubación una inhibición completa para las formulaciones de 1% y 2% p/v etanólicas, y para esta última una inhibición del 90% a los 28 días. Los resultados obtenidos indican que el AEO funciona como antifúngico frente al *P. roqueforti* extendiendo la vida útil de una porción de queso Tybo fraccionado y almacenado en refrigeración (10°C) durante 21 a 35 días según la concentración utilizada.

Los resultados de la aplicación de AEO en queso Tybo enfrentado a *P. brevicompactum* fueron diferentes a los encontrados para la otra especie de *Penicillium* evaluada, mostrando ser más resistente a la acción del AEO que el *P. roqueforti*. Se obtuvo una acción inhibitoria total (100%) solo durante 21 días y un 90 % durante 28 días

para la formulación etanólica de mayor concentración de AEO (5% p/v). Los demás formulaciones sólo retrasaron el desarrollo fúngico durante 15 días.

El análisis sensorial realizado arrojó que el AEO utilizado tiene una mejor aceptación al 2% p/v por parte del 90% de los entrevistados; mientras que al 5% p/v el sabor a orégano resultó muy invasivo para el 80% de los evaluadores quienes no comprarían un producto de estas características.

Los resultados del ensayo donde se utiliza un recubrimiento como vehículo del AEO a dos concentraciones 1% y 5% p/v frente a Baja y Alta concentración de propágulos fúngicos de *P. roqueforti* no mostraron una acción inhibitoria superior a los valores obtenidos en el ensayo anterior sin agregar el recubrimiento. A Baja concentración de propágulos fúngicos de este moho frente a 1% p/v de AEO se obtuvo una inhibición completa durante 15 días de incubación y con 5% p/v a los 21 días se llegó a una inhibición del 90%. Mientras que a Alta concentración de propágulos fúngicos ambas formulaciones llegaron solo al 90% de inhibición luego de 15 días a 10°C.

A futuro se podría estudiar el agregado de menores concentraciones de este AEO en los pasos de elaboración del queso, es decir en la masa, para ver su acción inhibitoria y cómo afecta esto las características sensoriales. Se continúa la búsqueda de conservantes naturales y amigables con el medio ambiente en cuanto a su obtención, procesamiento y descarte, que den respuesta al creciente interés de los consumidores por variantes saludables a los conservantes sintéticos utilizados durante tantos años.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Abbaszadeh S., Sharifzadeh A., Shokri H., Khosravi A.R., Abbaszadeh A. (2014). *Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi*. Journal de Mycologie Médicale, 24 (2), 51-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>

Adel F. A., Fatma A. K. A., Zhenhua L., Changqin L., Jinfeng W., Wenyi K. (2019). *Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (Ocimum basilicum L.) plants*. Food Science and Human Wellness, 8, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004>

Ahmed L.I. y Nehal I., Abdel-Salam A.B., Mogahed Fahim G. (2021). *Potential application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial safety and sensory characteristics*. Elsevier, Food Bioscience, 42, 101-177. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101177>

Al-ansari, M. M., Andeejani, A. M. I., Alnahmi, E., AlMalki, R. H., Masood, A., Vijayaraghavan, P., Rahman, A. A., Choi K. C. (2021) *Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from Lavandula latifolia L. and its deterrent effects on Euphoria leucographa*. Elsevier, Industrial Crops & Products; 170, 113740. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113740>

Almeida P., Blanco-Pascual N., Rosolen D., Cisilotto J., Creczynski-Pasa T., Laurindo J. (2021). *Antioxidant and antifungal properties of essential oils of oregano (Origanum vulgare) and mint (Mentha arvensis) against Aspergillus flavus and Penicillium commune for use in food preservation*. Food Science and Technology, Campinas, 42, e64921. <https://doi.org/10.1590/fst.64921>

Amaral G.P., Mizdal C.R., Silvio Stefanello T., Sebastian A., Mendez L., Puntel R.L., Matiko M., de Campo A., Alexandre F., Soares A., Fachineto R. (2019). *Antibacterial and antioxidant effects of Rosmarinus officinalis L. extract and its fractions*. ScienceDirect, Journal of Traditional and Complementary Medicine, 9(4), 383-392. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.006>

Amouretti M.C. y Comet G. (1993). *Des hommes et des plantes: plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens*. Étudent Rurales, Université de Provence, Marseille. 190-192.

Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. (2006). *Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of Lavandula stoechas L. ssp. Stoechas essential oils from stem/leaves and flowers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(12), 4364-4370.

Artiga-Artigas M., Acevedo-Fani A., Martín-Belloso O. (2017) *Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber*. Food Control, 76, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.001>

Asensio C.M., Nepote V., Grosso N.R. (2012) *Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant*. J Food Science; 77 (9), 294-301. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02841.x>

Asensio C.M., Quiroga P.R., Al-Gburi A., Huang Q., Grosso N. (2020) *Rheological Behavior, Antimicrobial and Quorum Sensing Inhibition Study of an Argentinean Oregano Essential Oil Nanoemulsion*. Frontiers in Nutrition; 7; art. 569913. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.569913>

Aysegul M., Dilara D., Dilara Nur D., Funda K., Esra C. (2020) *Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review*. Molecules, 25 (20), 4711. <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>

Banjara N., Suhr M., Hallen-Adams H. (2015). *Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types*. Current Microbiology, 70, 792-800.

Baranauskienė R., Venskutonis P.R., Dambrauskienė E., Viškelis P. (2013) *Harvesting time influences the yield and oil composition of Origanum vulgare L. ssp. vulgare and ssp. hirtum*. ScienceDirect, Industrial Crops and Products, 49, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.024>

Bills G. F., Christensen M., Powell M., Thorn G. (2004) *Saprobic soil fungi. In Biodiversity of Fungi*. Academic Press, 271-302.

Birtić S., Dussort P., Pierre F.X., Bily A.C., Roller M. (2015) *Carnosic acid*. Elsevier, *Phytochemistry*. 115, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.026>

Boudin L., Louaste B., Eloutassi N., Chami N., Chami N., Remmal A. (2016) *Antifungal activity of oregano essential oil and thymol against some fungi isolated from corn grains*. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, ISSN 2028-9324, 17(4), 1120-1124.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G. (2006). *Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(5), 1822-1828.

Burt S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods*. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Cano Embuena A.I., Cháfer Nácher M., Chiralt Boix A., Molina Pons M.P., Borrás Llopis M., Beltran Martines M.C., Gonzáles Martinez C. (2016) *Quality of goat's milk cheese as affected by coating with edible chitosan-essential oil films*. *International Journal of Dairy Technology*, 70 (1). <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12306>

Carocho M., Morales P., Ferreira I. (2015). *Natural food additives: Quo Vadis?*. *Trends in Food Science and Technology* 45(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>

Chaturvedia, T., Kumara, A., Kumarb, A., Vermaa, R. S., Padaliac, R. C., Sundaresanb, V., Chauhanc, A., Saikiaa, D., Singha, V. R., Venkatesha K. (2018) *Chemical composition, genetic diversity, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of*

*camphor-basil (Ocimum kilimandscharicum Guerke)*. Elsevier, Industrial Crops & Products; 118, 246–258. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.050>

Christaki S., Moschakis T., Kyriakoudi A., Costas Biliaderis G., Mourtzinis I. (2021) Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. Elsevier Trends in Food Science & Technology, 116, 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.029>

Codex Alimentarius <https://www.fao.org/3/a0369s/a0369s.pdf>

Código Alimentario Argentino <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>

Costa M.J., Maciela L.C., Teixeira J.A., Vicente A.A., Cerqueira M.A. (2018) *Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges*. Food Research International 107, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>

Dao T. y Dantigny P. (2011) *Control of food spoilage fungi by ethanol*. ScienceDirect. Food Control 22, 360e368. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.019>

de Sousa D.P., Nóbrega F.F.F., Santos C.C.M.P., de Almeida R.N. (2010) *Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence*. Natural Products Communications 5(12), 1847–1851. PMID: 21299105.

de Souza E.L., Lima E., Freire K.R., Sousa C.P. (2005) *Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods*. Brazilian Archives of Biology and Technology; 48, 2; 245-250. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200011>

Deans S.G. y Ritchie G. (1987). *Antibacterial properties of plant essential*. Elsevier International Journal of Food Microbiology, 5, 165-180.

Decontardi S., Mauro A., Lima N., Battilani P. (2017). *Survey of Penicillia associated with Italian grana cheese*. International Journal of Food Microbiology 246, 25-31.

Dobson A.D.W. (2017) *Mycotoxins in cheese*. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, fourth ed. Elsevier Ltd, New York, 595–601.

Dorneles L.N.S., Goneli A.L.D., Cardoso C.A.L., da Silva C.B., Hauth M.R., Oba G.C., Schoeninger V. (2019) *Effect of air temperature and velocity on drying kinetics and essential oil composition of Piper umbellatum L. leaves*. *Industrial Crops and Products*, 142, 111846. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111846>

Dutra da Silva B., Campos Bernardes P., Fontes Pinheiro P., Fantuzzi E., Domenici C. (2021) *Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products*. Elsevier, *Meat Science* 176, 108463. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>

ESCOP (2003) *ESCOP Monographs. The scientific Foundation for Herbal Medicinal Products*, 2nd edn. European Scientific Cooperative on Phytotherapy and Thieme, Exter (UK).

F.D.A. (Food & Drug Administration U.S.) Center for Food Safety & Applied Nutrition (2001) *Bacteriological Analytical Manual Online: Yeasts, Molds and Mycotoxins*. 18, 260-261

Farooqi A. y Sreeramu B.S. (2001) *Cultivation of medicinal and aromatic crops*. University of Agricultural Sciences, Bangalore, India Press. ISBN: 8173712514, 23–25.

Filtenborg O., Frisvad J., Thrane U. (1996). *Moulds in food spoilage*. *International Journal of Food Microbiology* 33(1), 85-102.

Finos M.B., Deseta M.L, Sponton O.E., Frisón L.N., Musumeci M.A., Santiago L.G., Perez A.A. (2021) *Evaluation of ovalbumin nanocarriers to promote the vehiculization and antifungal properties of cinnamaldehyde in aqueous media*. *LWT - Food Science and Technology* 151; 112224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112224>



Finne Kure C. y Skaar I. (2019). *The fungal problem in cheese industry*. Elsevier. Current Opinion in Food Science 29,14-19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>

Frisón L., Colomba P., Aríngoli E., Basílico J. (2012). *Diversidad fungica en ambientes de industrias alimentarias*. Revista FABICIB 16, 79- 83. <https://doi.org/10.14409/fabicib.v16i1.899>

Gaur S., Lopez E.C., Ojha A., Andrade J.E. (2018) *Functionalization of lipid-based nutrient supplement with  $\beta$ -Cyclodextrin inclusions of oregano essential oil*. Journal of Food Science, 83(6). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14178>

Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R., Nerín C. (2009). *Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils*. Food Chemistry 116(4), 982-989. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.058>

Griffin S., Falzond O., Camilleric K., Valdramidisa V.P. (2020) *Bacterial and fungal contaminants in caprine and ovine cheese: A metaanalysis assessment*. Food Research International 137, 109445. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109445>

Hammer M. y Junghanns W. (2020). *Rosmarinus officinalis L.: Rosemary*. In: Novak, J., Blüthner, WD. (eds) Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Handbook of Plant Breeding, 15. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_15)

Hou T., Sankar S., Li H., Xing Y., Nanda A., Netala V.R., Zhang Z. (2022). *Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review*. Elsevier, Food Bioscience, 47, 101716. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>

Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. (2012). *Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components*. Frontiers in Microbiology, 3, 1-24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

Jassal, K., Kaushal S., Rani Rashmi, Rani Reetu (2021) *Antifungal potential of guava (Psidium guajava) leaves essential oil, major compounds: beta-caryophyllene and*

*caryophyllene oxide*. Archives of Phytopathology and Plant Protection; 54, 19-20, 2034-2050. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1968287>

Johnson M. (2001). *Applied dairy microbiology*. 2da ed. Revisado y expandido. Ed. por Marth E.H. y Steele J.L., New York, Marcel Dekker Inc., 345-384.

Kandasamy S., Park W.S., Yoo J., Yun J., Kang H.B., Seol K-H., Oh M-H., Ham J.S. (2020). *Characterization of fungal contamination sources for use in quality management of cheese production farms in Korea*. Asian-Australas Journal Animal Science, 33(6), 1002-1011. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0553>

Karabagias I., Badeka A., Kontominas M. (2011). *Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging*. Meat Science, 88, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.010>

Khorshidian N., Yousefi M., Khanniri E., Mortazavian A. M. (2018). *Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 45, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.020>

Klaric S. Kosalec I., Mastelic J., Pieckova´ E., Pepeljnak S. (2006). *Antifungal activity of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings*. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 44, 36–42. ISSN 0266-8254. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02032.x>

Klich M. y Pitt, J. (1998). *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. CSIRO Division of Food Processing. Australia.

Koksal O., Gunes E., Orkan Ozer O., Ozden M. (2010). *Analysis of effective factors on information sources at Turkish oregano farms*. African Journal of Agricultural Research, 5(2), 142-149. <https://doi.org/10.5897/AJAR09.598>

Kosakowska O., Węglarz Z., Bączek K. (2019). *Yield and quality of ‘Greek oregano’ (Origanum vulgare L. subsp. hirtum) herb from organic production system in temperate*

*climate*. Elsevier. *Industrial Crops y Products*, 141, 111782.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111782>

Kosse D., Seiler H., Amann R., Ludwig W., Scherer S., Kosse D. (1997). *Identification of yoghurt- spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes*. *Systematic and Applied Microbiology* 20(3), 468-480.

Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A. (2007) *Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes*. *Z Naturforsch C J Bioscience*; 62(7-8), 507-13.  
<https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-808>

Kuorwel K.K., Cran M. J., Sonneveld K., Miltz J., Bigger S.W. (2013). *Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films*. *Journal of Food Science*, 76(9), R164-R177. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x>

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. (2001). *A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>.

Leonelli Pires de Campo A.C., Saldanha Nandi R.D., Scandorieiro S., Chue Gonçalves M., Fonseca Reis G., Dibo M., Pinto Medeiros L., Aparecido Panagio L., Fagan E.P., Katsuko Takayama Kobayashi R., Nakazato G. (2022). *Antimicrobial effect of Origanum vulgare (L.) essential oil as an alternative for conventional additives in the Minas cheese manufacture*. *LWT - Food Science and Technology* 157, 113063.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113063>

Li Y., Erhunmwunsee F., Liu M., Yang K., Zheng W., Tian J. (2022) *Antimicrobial mechanisms of spice essential oils and application in food industry*. Elsevier, *Food Chemistry* 382,132312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132312>

Lima R.C., de Carvalho A., Vieira C.P., Moreira R.V., Conte-Junior C.A. (2021) *Green and Healthier Alternatives to Chemical Additives as Cheese Preservative: Natural*

*Antimicrobials in Active Nanopackaging/Coatings*. *Polymers*, 13, 2675. <https://doi.org/10.3390/polym13162675>

Liu Q., Meng X., Li Y., Zhao X-Y., Tang G-T, Li H-B. (2017) *Antibacterial and Antifungal Activities of Spices*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1283. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>

López-Expósito I., Amigo L., Recio I. (2012). *A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides*. *Dairy Science & Technology* 92(5), 419-438.

Lucera A., Costa C., Conte A., Del Nobile M. (2012). *Food applications of natural antimicrobial compounds*. *Frontiers in Microbiology* 3 (287), 1-13.

Lukas B. y Novak J. (2020). *Origanum vulgare L. and Origanum onites L. (Oregano)*. In: Novak, J., Blüthner, WD. (eds) *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Handbook of Plant Breeding*, 12, 419-433. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_12)

Machado, Q. M., Paulo I., Hariharakrishnan S., Rocha, D., Pereira, C. C., Barbosa, N., Bordado, J. M., Teixeira, J. P., Galhano dos Santos, R. (2021) *Auto-Disinfectant Acrylic Paints Functionalised with Triclosan and Isoborneol—Antibacterial Assessment*. *Polymers*; 13, 2197. <https://doi.org/10.3390/polym13132197>

Marcial G., Gerez C., De Kairuz M., Araoz V., Schuff, C., De Valdez, G. (2016). *Influence of oregano essential oil on traditional Argentinean cheese elaboration: Effect on lactic starter cultures*. *Revista Argentina de Microbiología* 48(3), 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.006>

Marth E., Capp C., Hasenzahl L., Jackson H., Hussong R. (1966). *Degradation of Potassium Sorbate by Penicillium Species*. *Journal of Dairy Science* 49 (10), 1197-1205.

Masotti V., Juteau F., Bessièrè J., Viano J. (2003). *Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species Artemisia molinieri and its biological*

*activities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (24), 7115-7121.  
<https://doi.org/10.1021/jf034621y>

Meena M., Prajapati P., Ravichandran C. (2021). *Natamycin: a natural preservative for food applications - a review*. Springer, Food Science and Biotechnology, 30, 1481–1496.  
<https://doi.org/10.1007/s10068-021-00981-1>

Megawati Fardhyanti D. S., Sediawan W. B., Hisyam A. (2019). *Kinetics of mace (Myristicae arillus) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: Effect of microwave power*. Industrial Crops and Products, 131, 315–322.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.067>

Míguez Pérez J. (2014). *Estudio del efecto de diferentes compuestos antifúngicos para la aplicación en superficie de quesos madurados*. Tesis para Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos, Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, TMF-L 251.  
<http://uvadoc.uva.es/handle/10324/15094>

Monnet C., Landaud S., Bonnarne P., Swennen D. (2014). *Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface*. FEMS Microbiology Letters 263, 1-9.

Moosavy M-H., Esmaeili S., Mostafavi E. (2013). *Antibacterial effect of Mentha spicata essential oil on Listeria monocytogenes in traditional Lighvan Cheese*. Journal of Food Safety, 33(4), 509–514. <https://doi.org/10.1111/jfs.12083>

Morcía, C., Malnati, M., Terzi, V. (2013) *In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens*. Food Additives & Contaminants: Part A, 29:3, 415-422.  
<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>

Moro A., Librán C. M., Berruga M. I., Carmona M., Zalacain A. (2015) *Dairy matrix effect on the transference of rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil compounds during cheese making*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 9 (7), 1507–1513.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6853>

Muñoz-Tebar N., González-Navarro E.J., López-Díaz T.M., Santos J.A., Elguea-Culebras G.O., García-Martínez M.M., Molina A., Carmona M., Berruga M.I. (2021) *Biological activity of extracts from aromatic plants as control agents against spoilage molds isolated from sheep cheese*. MDPI, *Foods*, 10, 1576. <https://doi.org/10.3390/foods10071576>

Nájera A.I., Nieto S., Barron L.J.R., Albisu M. (2021) *A review of the preservation of hard and semi-hard cheeses: quality and safety*. MDPI, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 9789. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189789>

Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013). *Effect of essential oils on pathogenic bacteria*. *Pharmaceuticals* 6 (12), 1451-1474.

Nevarez L., Vasseur V., Debaets S., Barbier G. (2010). *Use of response surface methodology to optimise environmental stress conditions on Penicillium glabrum, a food spoilage mould*. *Fungal biology* 114, 490-497. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.03.011>

Olivier Bernardi A., Valle Garcia M., Venturini Copetti M. (2019). *Food industry spoilage fungi control through facility sanitization*. Elsevier. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>

Ollé Resa C.P., Jagus R.J., Gerschenson L.N. (2014). *Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces*. Elsevier. *Food Control* 35, 101e108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.049>

Osimani A., Garofalo C., Harasym J., Aquilanti L. (2022) *Use of essential oils against foodborne spoilage yeasts: advantages and drawbacks*. *Current Opinion in Food Science*, 45, 100821. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100821>

Panda S., Naskar S., Sivakumar P., Ray R. (2009). *Lactic acid fermentation of anthocyanin-rich sweet potato (Ipomoea batatas L.) into lacto-juice*. *International journal*

of food science and technology 44(2), 288-296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01692.x>

Pedros-Garrido S., Clemente I., Calanche J. B., Condón-Abanto S., Beltrán J. A., Lyng J.G., Whyte P. (2020). *Antimicrobial activity of natural compounds against Listeria spp. and their effects on sensory attributes in salmon (Salmo salar) and cod (Gadus morhua)*. Food Control, 107, 106768. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106768>

Pitt J. y Hocking A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3º Ed. Springer. New York. EEUU.

Ramos-Pereyra J., Marezeb J., Patrinoia E., Santarosa J.A. López-Díaza T.M. (2019). *Polyphasic identification of Penicillium spp. isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses*. Elsevier. Food Microbiology 84, 103253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103253>

Robinson R., Tamime A., Wszolek M. (2002). *Microbiology of fermented milks*. In. *Dairy microbiology handbook, the microbiology of milk and milk products*. Ed. por Robinson R., New York, Wiley Interscience, 376–430.

Sadeh D., Nitzan N., Chaimovitsh D., Shachter A., Ghanim M., Dudai N. (2019). *Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*. Industrial Crops and Products, 138, 111419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.068>

Sakkas H. y Papadopoulou C. (2017). *Antimicrobial activity of Basil, Oregano, and Thyme essential oils*. Journal of Microbiology Biotechnology, 27(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

Saladino F., Quiles J., Mañes J., Fernández - Frazón M., Bittencourt, F., Meca G. (2017). *Dietary exposure to mycotoxins through the consumption of commercial bread loaf in Valencia, Spain*. LWT – Food Science and Technology 75, 697-701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.029>

Samson R., Hoekstra E., Thrane U., Frisvad J., Andersoen B. (2010). *Food and indoor fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Laboratory manual series. Uthecht, The Netherlands, 390.

Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibáñez E., Senoráns F.J., Reglero G. (2006). *Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: determination of optimal extraction parameters*. Journal of food protection, 69(2), 369-75. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.2.369>

Satyral P., Murray B.L., McFeeters R.L., Setzer W.N. (2016). *Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations*. MDPI, Foods 5(4), 70. <https://doi.org/10.3390/foods5040070>

Sharma S. H., Thulasingham S., Nagarajan S. (2017). *Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives*. ScienceDirect, European Journal of Pharmacology, 795, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.008>

Shi, Y., Si, H., Wang, P., Chen, S., Shang, S., Song, Z., Wang, Z., Liao, S. (2019) *Derivatization of Natural Compound –Pinene Enhances Its In Vitro Antifungal Activity against Plant Pathogens*. MPDI, Molecules; 24, 3144 <https://doi.org/10.3390/molecules24173144>

Siler, B. T., Tanapichatsakul, C., Khruengsai, S., Pripdeevech, P. (2020). *In vitro and in vivo antifungal activity of *Cuminum cyminum* essential oil against *Aspergillus aculeatus* causing bunch rot of postharvest grapes*. Plos One, 15(11), Article e0242862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242862>

Singh S., Hans S., Fatima Z., Hameed S. (2017). *Overcoming fungal multidrug resistance by natural compounds targeting efflux pumps*. Front Anti-Infect Drug Discovery, 7, 2466–260. <http://doi.org/10.2174/9781681085623118070008>

Sobrero S., Frisón L., Chiericatti C., Aríngoli E., Basílico J.C. y Basísico M. de la L. (2013). *Parámetros cinéticos como herramienta para la caracterización de aislados de*



*Aspergillus sección Nigri*. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 4(2), 146-156.

Somrani, M., Ingles, M. C., Debbabi, H., Abidi, F., & Palop, A. (2020). *Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against Listeria monocytogenes*. Foods, 9 (5). <https://doi.org/10.3390/foods9050567>

Souza T.P., Evangelista S.R., Passamani F.R., Bertechini R., Abreu L.R., Batista L.R. (2021). *Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality*. International Dairy Journal 120, 105085. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105085>

Tajkarimi M., Ibrahim S., Cliver D. (2010). *Antimicrobial herb and spice compounds in food*. Food Control 21(9), 1199-1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>

Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Editions Lavoisier, Paris.

Tremmel G.J. (2021). *Potencial utilización de fosfatos como antimicrobianos en la industria láctea. Especialización en leche y productos lácteos*. UNL, FIQ. <https://hdl.handle.net/11185/6388>

Varela B.G., Bosco P., Ganopol M.J., Agostinelli L., Gurni A.A. (2014). *Morpho-anatomical analysis for the quality evaluation in "oregano" commercial samples of Buenos Aires City (Argentina)*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas 13, 20–30.

Vouillamoiz J.F. y Christ B. (2020). *Thymus vulgaris L.: Thyme*. Novak, J., Blüthner, WD. (eds) Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Handbook of Plant Breeding, 12. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_18)

Zantar S., Yedri F., Mrabet R., Laglaoui A., Bakkali M., Zerrouk M. (2014). *Effect of Thymus vulgaris and Origanum compactum essential oils on the shelf-life of fresh goat cheese*. Journal of Essential Oil Research 26 (2), 76-84. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.871673>

Zhong Y., Cavender G., Zhao Y. (2014) *Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on mozzarella cheese*. LWT – Food Science and Technology, 56(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.006>

**7. ANEXO I: Composición de los Medios de Cultivo**

| <u>Agar creatina sacarosa (CREA)</u>                |         |
|---|---------|
| Creatina  | 3 g     |
| Sacarosa  | 30 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O   | 1,3 g   |
| Bromocresol púrpura                                 | 0,05 g  |
| KCl   | 0,5 g   |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                 | 0,5 g   |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                 | 0,01 g  |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                 | 0,01 g  |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                 | 0,005 g |
| Agar  | 15 g    |
| Agua destilada c.s.p.                               | 1 L     |
| pH final: Ajustar a $8,0 \pm 0,2$ con ácido láctico |         |
| Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C        |         |

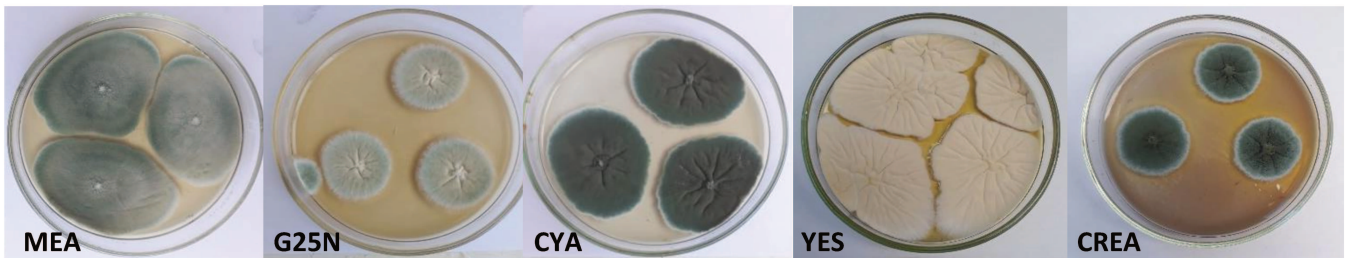
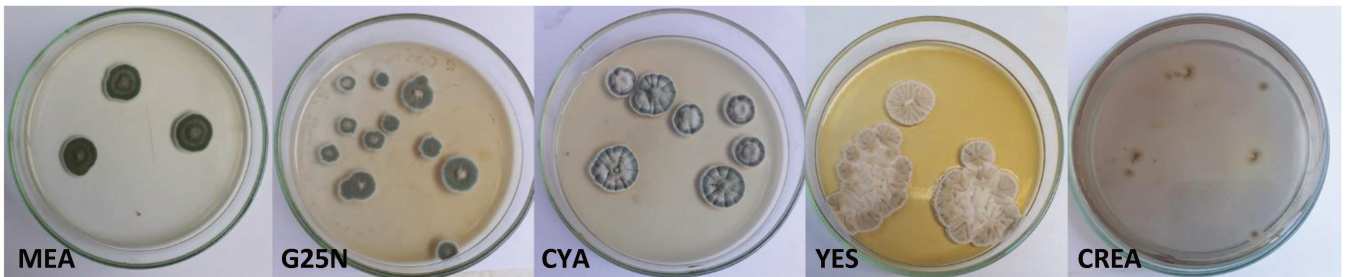
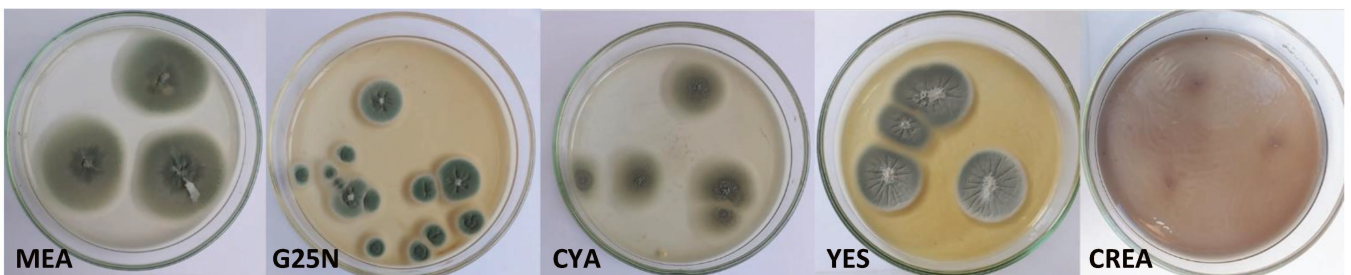
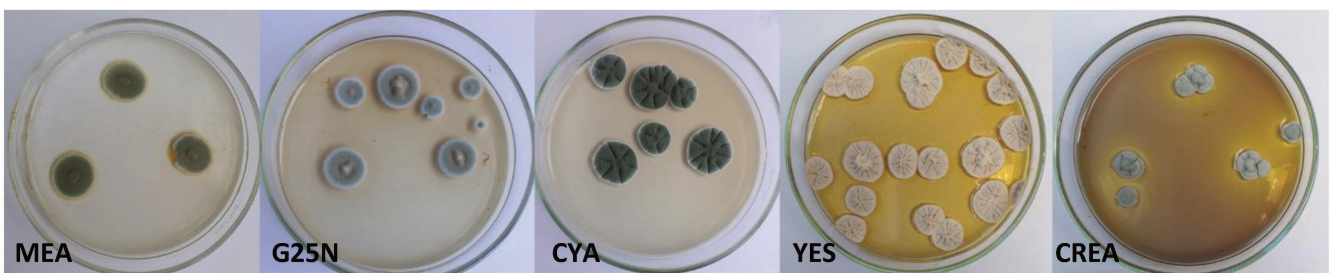
| <u>Agar extracto de levadura Czapek (CYA)</u>       |       |
|---|-------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 1 g   |
| Czapek concentrado                                  | 10 mL |
| Solución de metal traza                             | 1 mL  |
| Extracto de levadura                                | 5 g   |
| Sacarosa  | 30 g  |
| Agar  | 15 g  |
| Agua destilada c.s.p.                               | 1 L   |
| pH final: Ajustar a $6,7 \pm 0,2$ con ácido láctico |       |
| Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C        |       |

| <u>Agar extracto de levadura sacarosa (YES)</u> |       |
|---|-------|
| Extracto de levadura                            | 20 g  |
| Sacarosa  | 150 g |
| Agar  | 20 g  |
| Agua destilada c.s.p.                           | 1 L   |
| Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C    |       |

| <u>Agar extracto de malta (MEA):</u>                |      |
|---|------|
| Malta extracto                                      | 20 g |
| Peptona de caseína                                  | 1 g  |
| Glucosa   | 20 g |
| Agar  | 20 g |
| Agua destilada c.s.p.                               | 1 L  |
| pH final: Ajustar a $5,4 \pm 0,2$ con ácido láctico |      |
| Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C        |      |

| <u>Agar nitrato glicerol al 25% (G25N)</u>          |        |
|---|--------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,75 g |
| Czapek concentrado                                  | 7,5 mL |
| Extracto de levadura                                | 3,7 g  |
| Glicerol. Grado analítico                           | 250 g  |
| Agar  | 12 g   |
| Agua destilada c.s.p.                               | 750 mL |
| pH final: Ajustar a $7,0 \pm 0,2$ con ácido láctico |        |
| Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C        |        |

| <u>Czapek concentrado (Czapek)</u>                  |       |
|---|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 1 g   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1 g   |
| NaCl  | 0,3 g |
| Agua destilada c.s.p.                               | 1L    |
| pH final: Ajustar a $5,6 \pm 0,2$ con ácido láctico |       |
| Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C        |       |

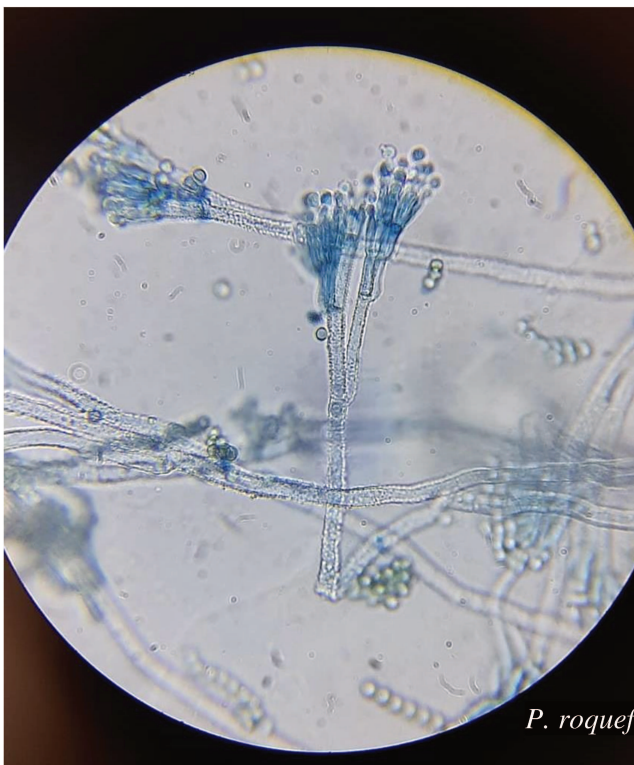
**8. ANEXO II: Imágenes de especies y géneros identificados.*****Penicillium roqueforti* (25°C)*****Penicillium brevicompactum* (25°C)*****Penicillium glabrum* (25°C)*****Penicillium commune* (25°C)**



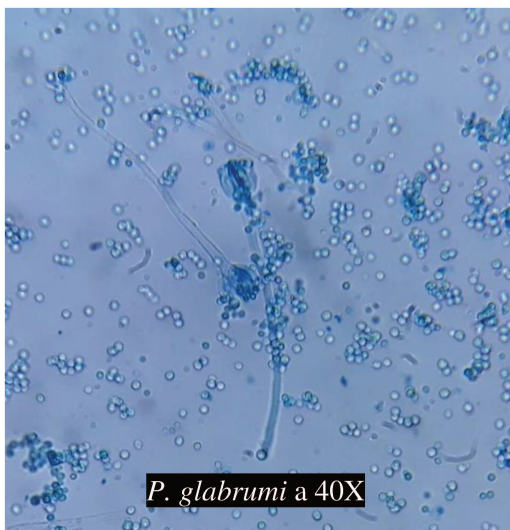
*Penicillium citrinum* (25°C)



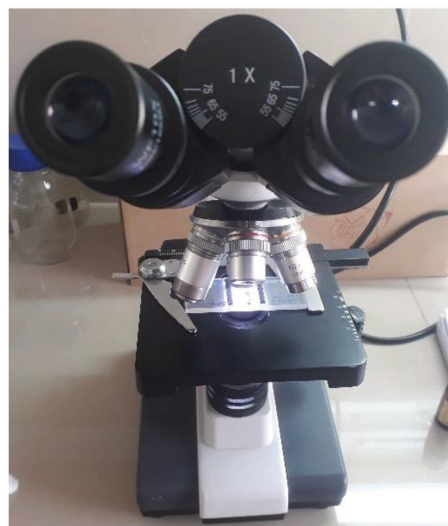
Identificación microscópica



*P. roqueforti* a 40X



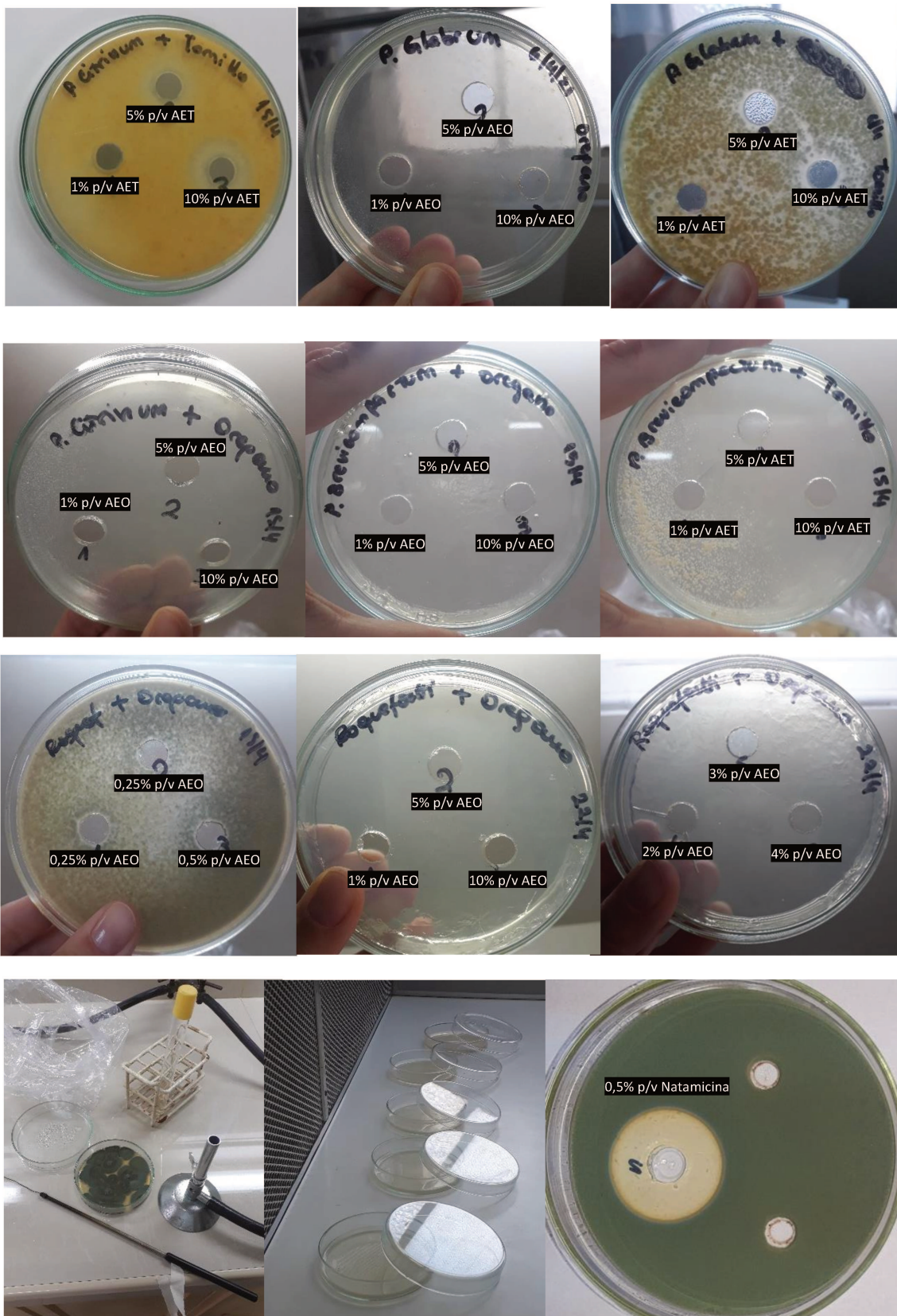
*P. glabrum* a 40X





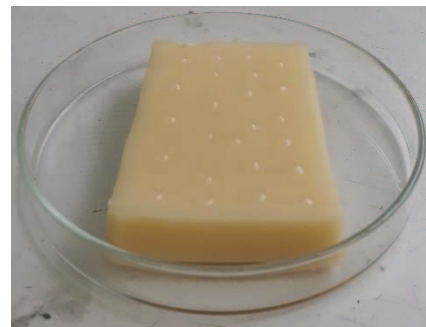
9. ANEXO III: Registro fotográfico de los ensayos con los AE realizados

A continuación se muestran algunas imágenes representativas de los ensayos de inhibición de los AE *in vitro* realizado.

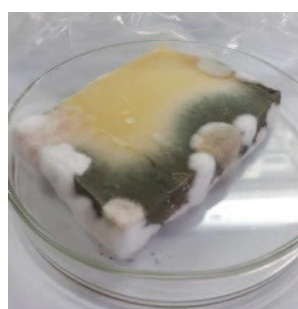




A continuación se muestran algunas imágenes representativas de los ensayos de inhibición de los AE sobre porciones de queso Tybo.



Incubación en estufa (28°C)

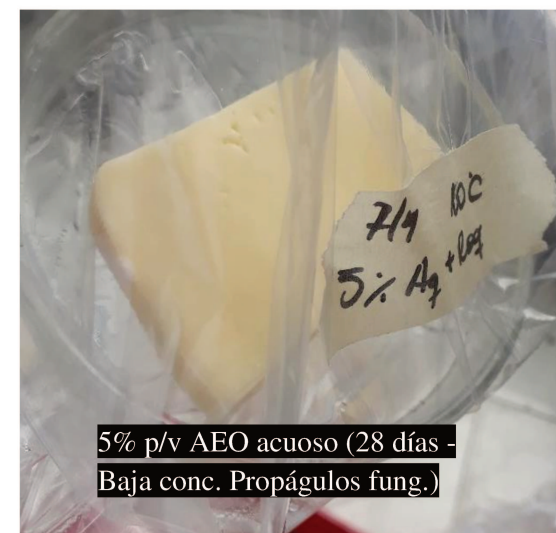
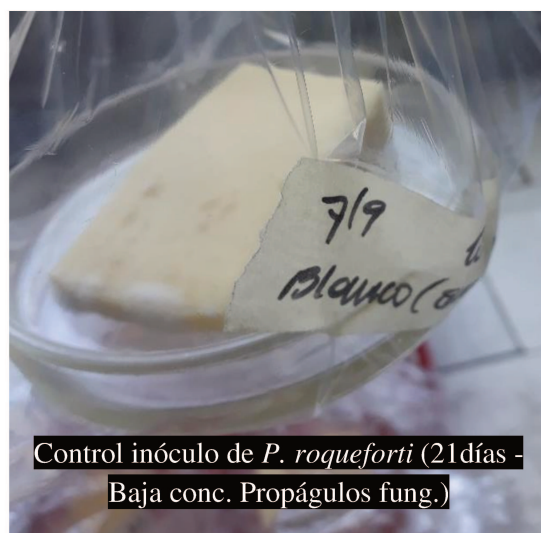
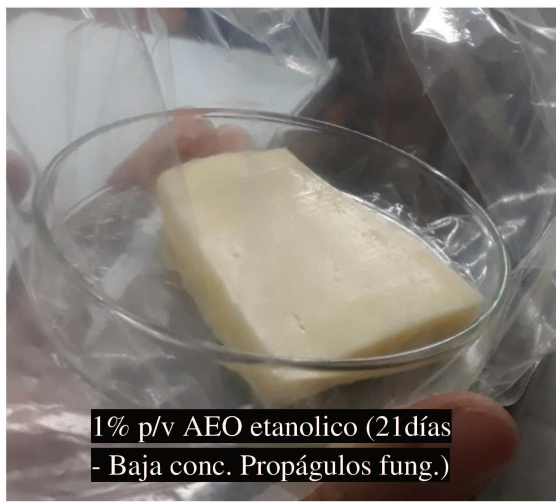
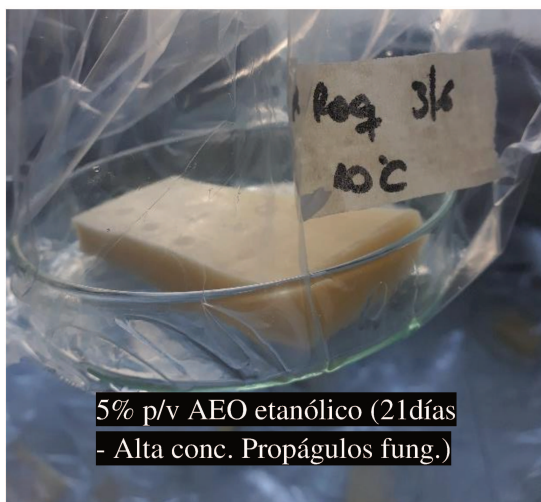
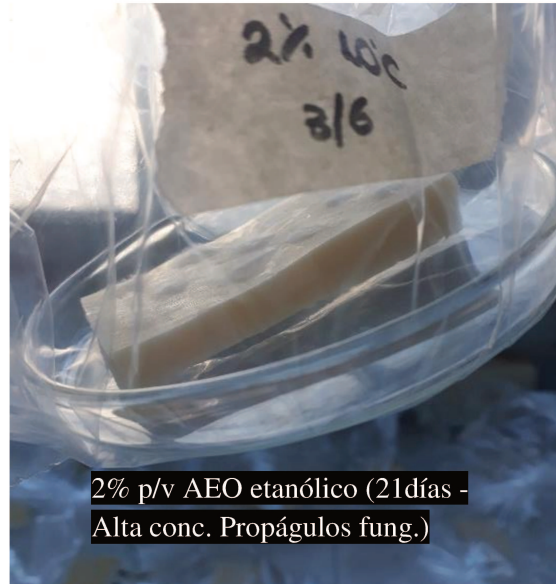
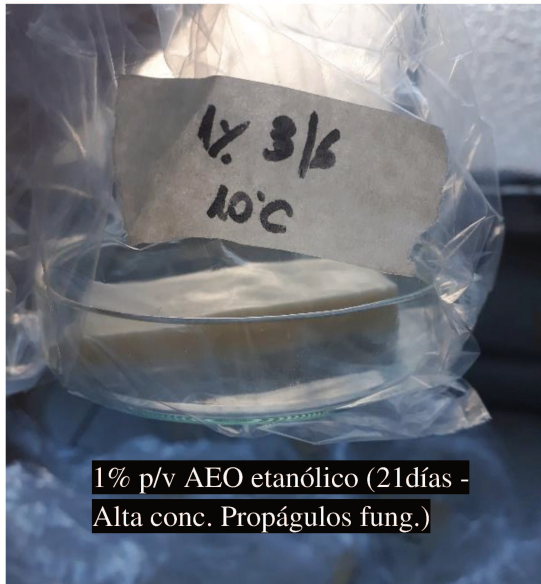


Incubación en conservadora (20°C)

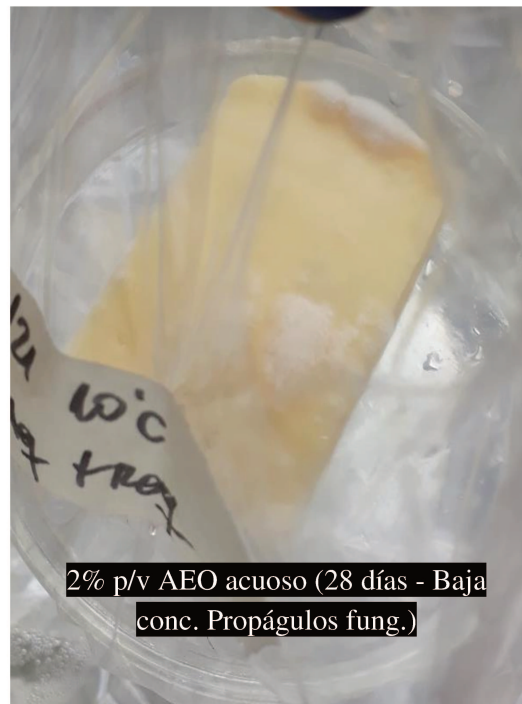




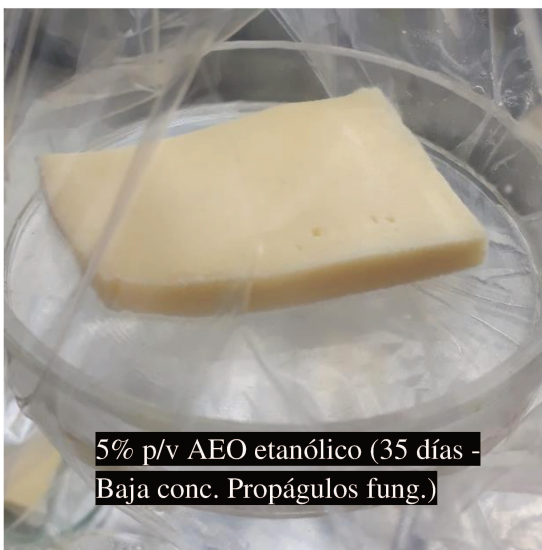
A continuación se muestran algunas imágenes representativas de los ensayos de inhibición de AEO frente a *P. roqueforti* incubados a 10°C (heladera).



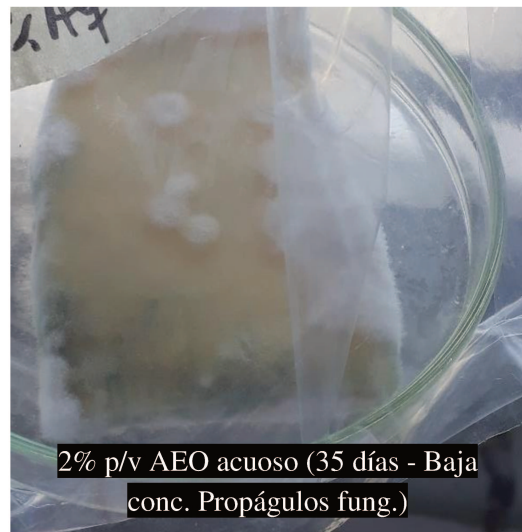




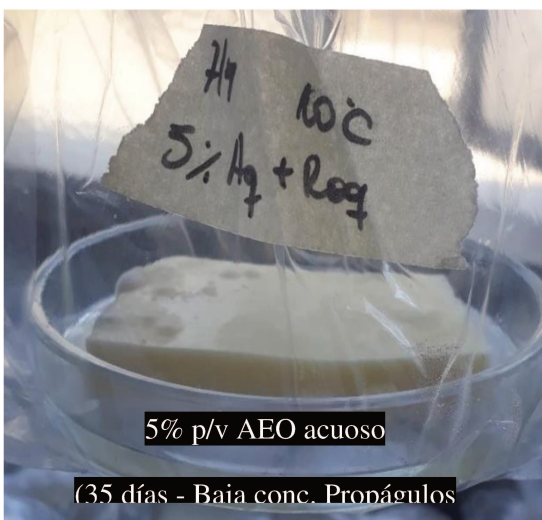
2% p/v AEO acuoso (28 días - Baja conc. Propágulos fung.)



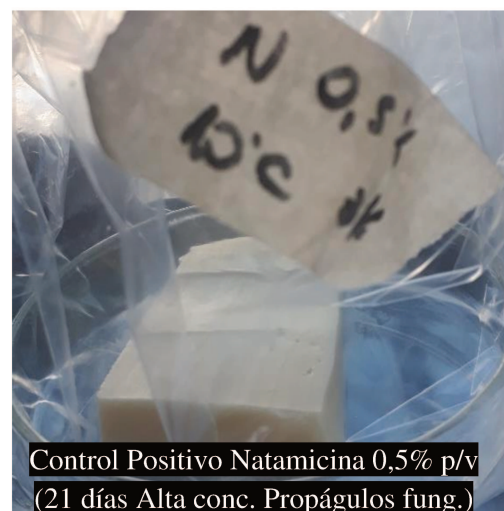
5% p/v AEO etanólico (35 días - Baja conc. Propágulos fung.)



2% p/v AEO acuoso (35 días - Baja conc. Propágulos fung.)



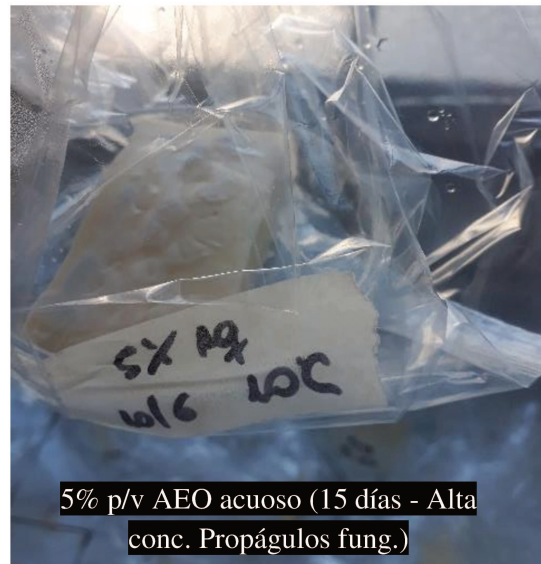
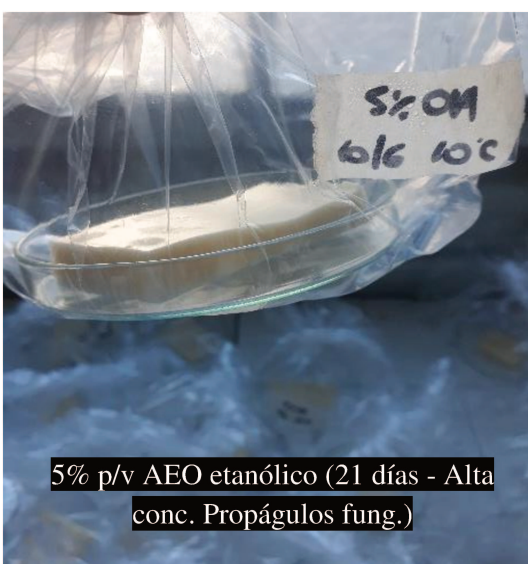
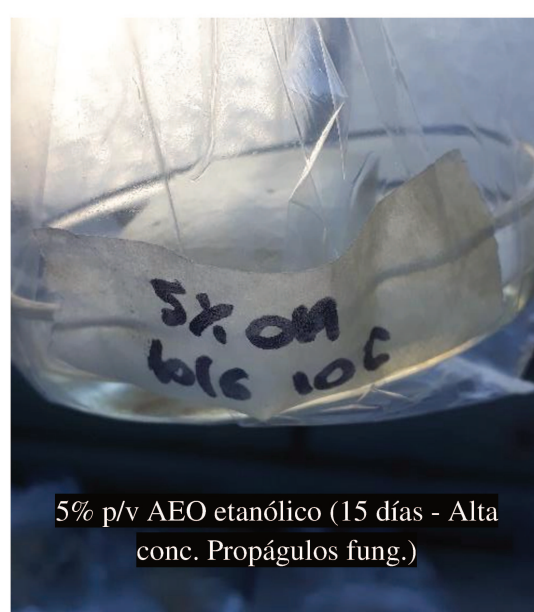
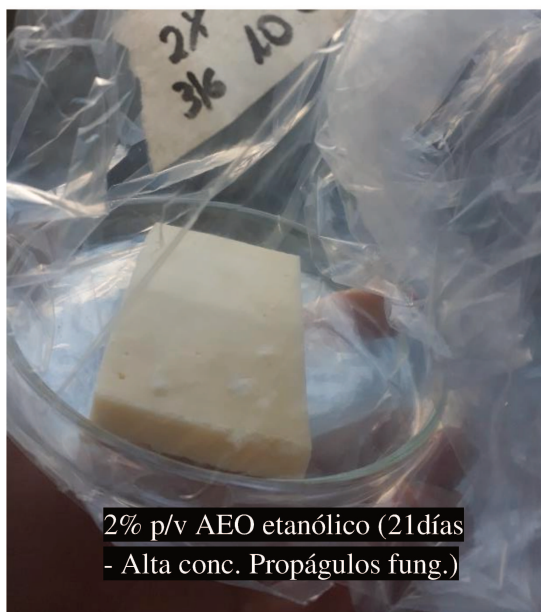
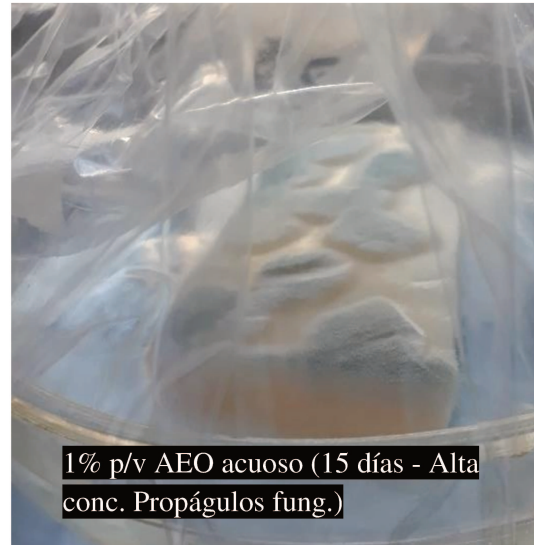
5% p/v AEO acuoso  
(35 días - Baja conc. Propágulos)

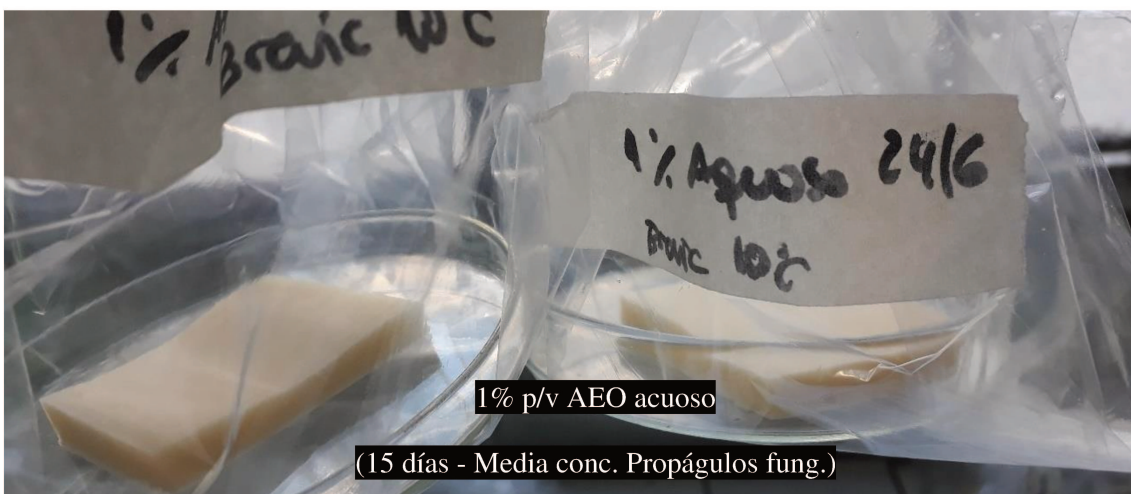
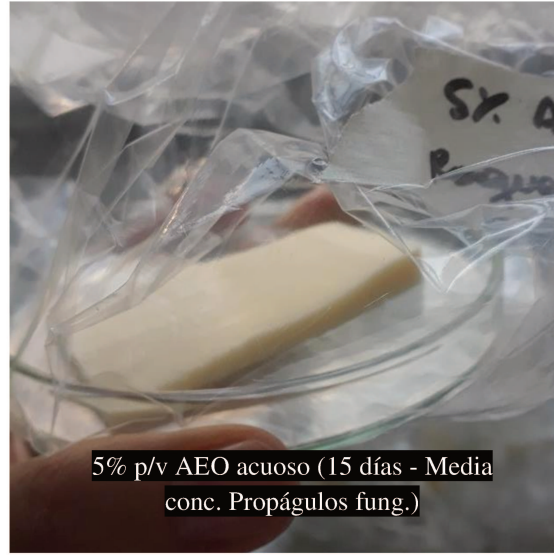
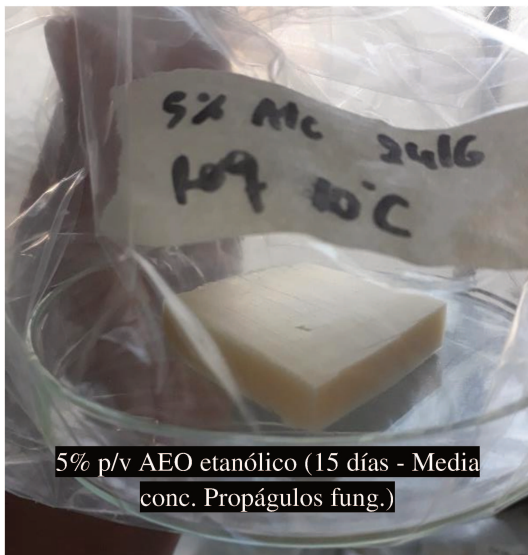
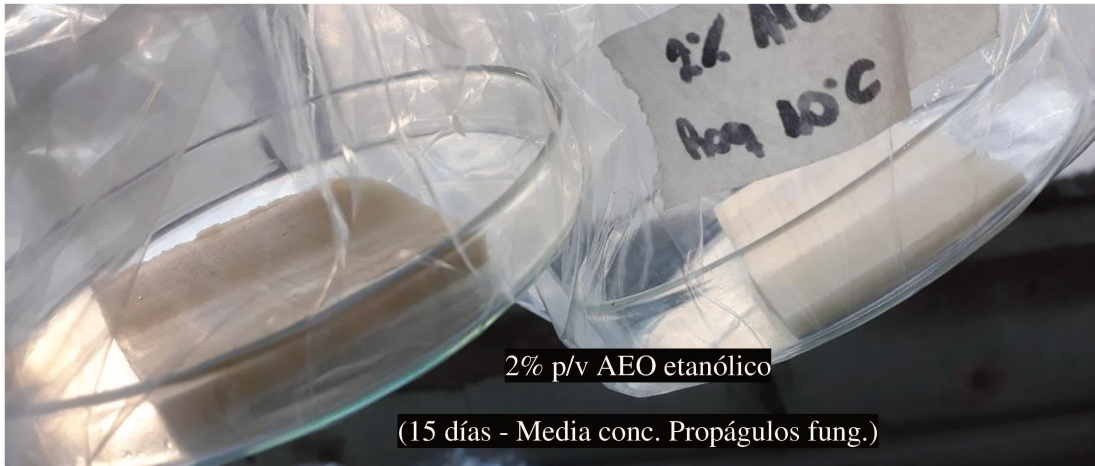


Control Positivo Natamicina 0,5% p/v  
(21 días Alta conc. Propágulos fung.)

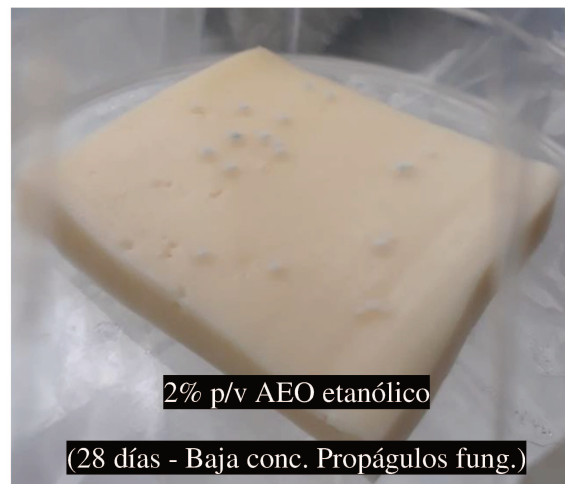
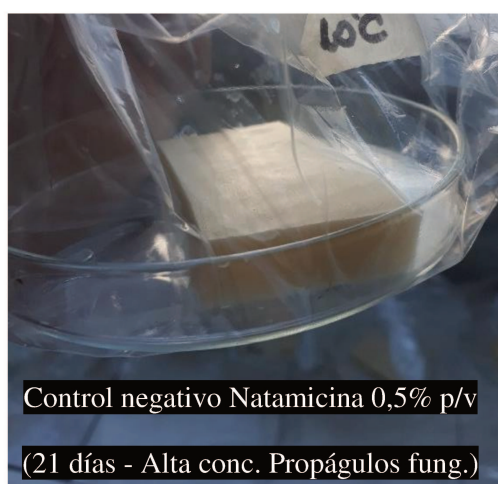
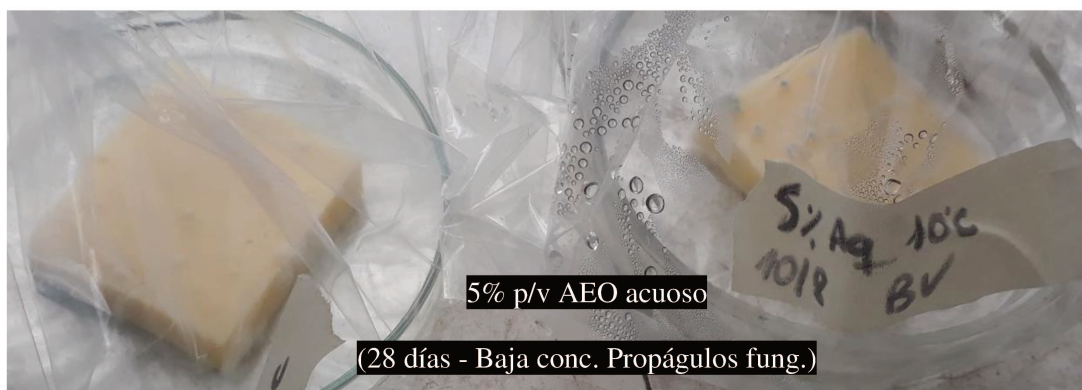
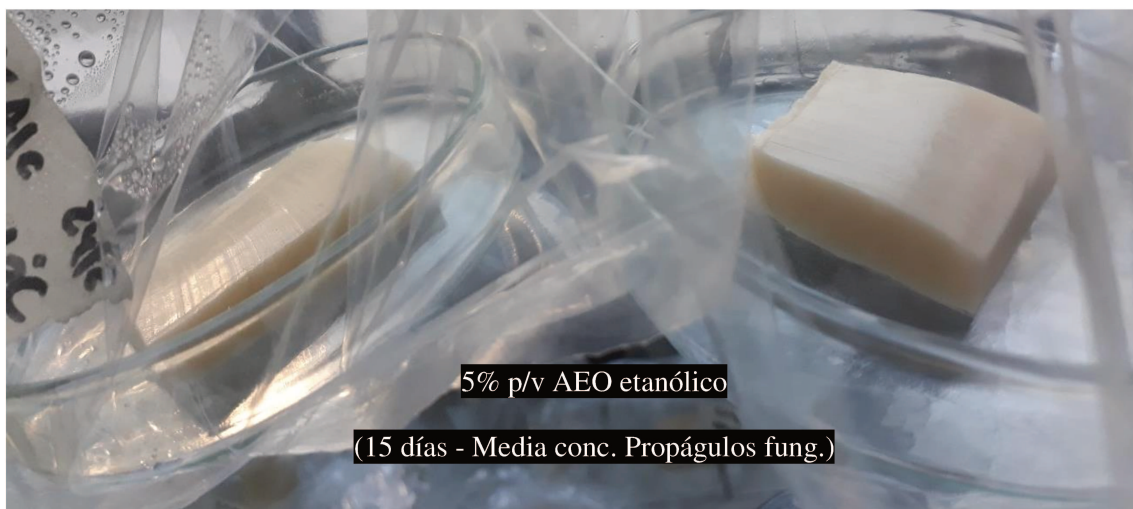
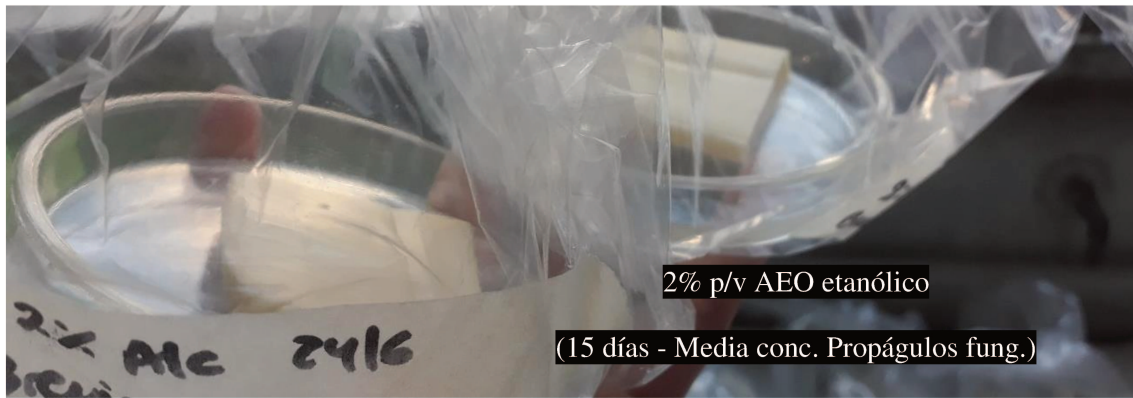


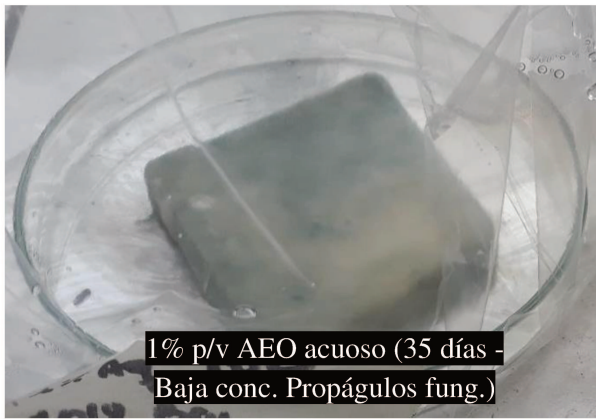
A continuación se muestran algunas imágenes representativas de los ensayos de inhibición de AEO frente a *P. brevicompactum* incubados a 10°C (heladera).



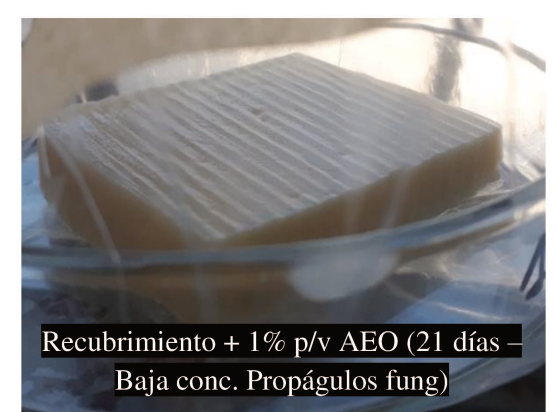
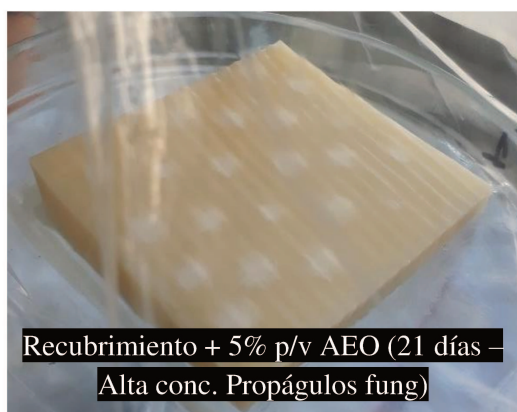
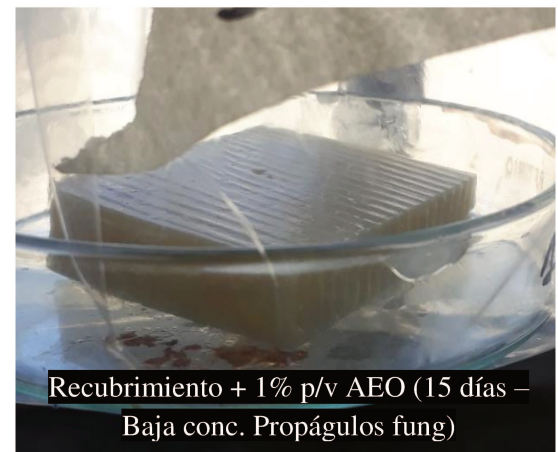
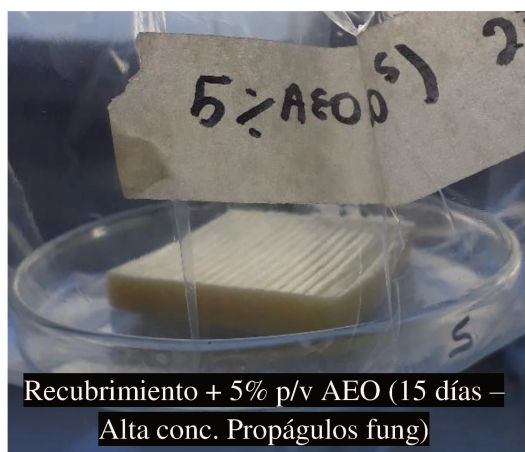
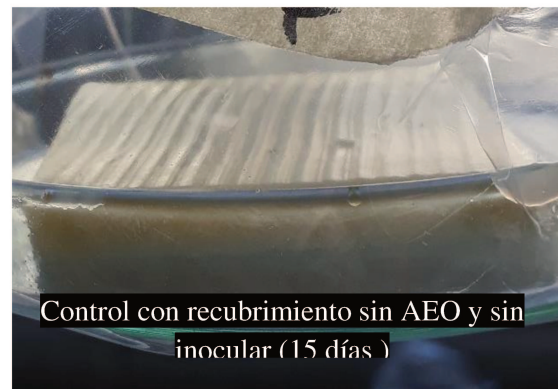
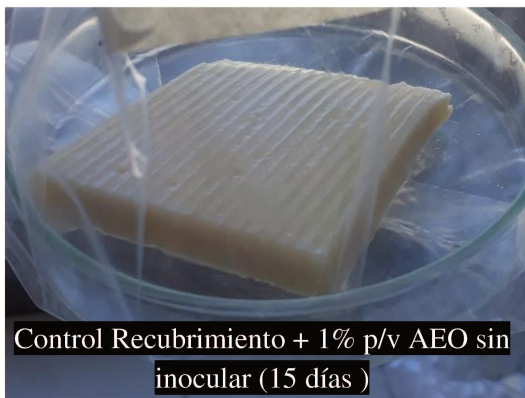




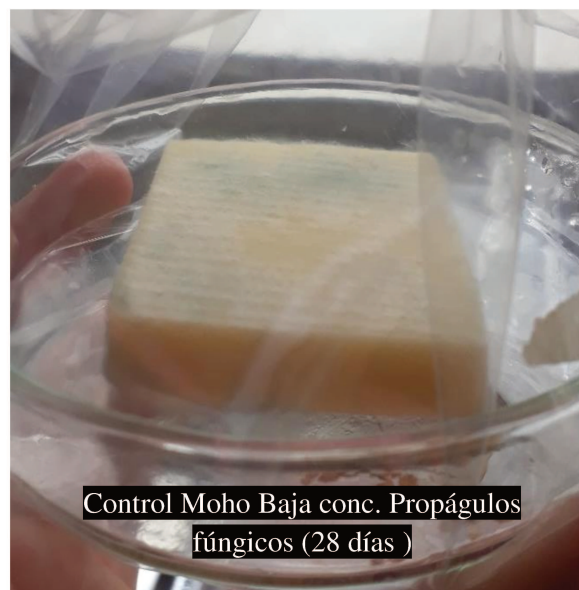
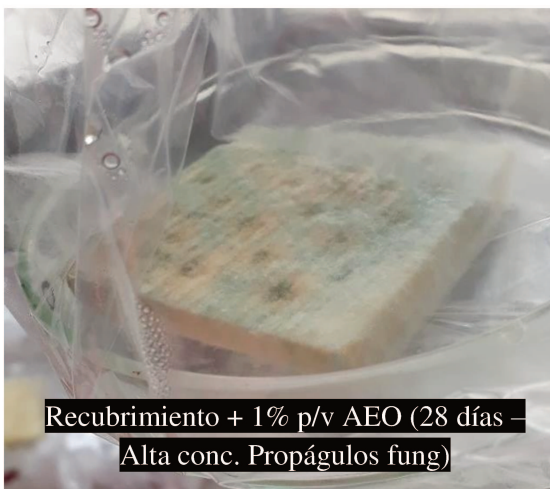
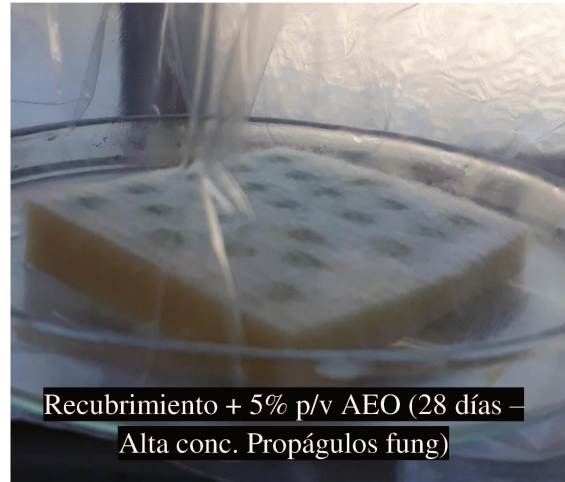




A continuación se muestran algunas imágenes representativas de los ensayos de inhibición en quesos con recubrimiento más AEO frente a *P. roqueforti* incubados a 10°C (heladera).







## 10. ANEXO IV: Análisis estadístico

### 7. Análisis del comportamiento inhibitorio de diferentes formulaciones de aceites esencial de orégano frente al *P. roqueforti* a una concentración Alta de propágulos fúngicos. (Figura 25)

Método

Hipótesis nula                      Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna                  Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia     $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor   Niveles   Valores  
 C1            18   1 1% ac; 1 1% etan; 1 2% ac; 1 2% etan; 1 5% ac; 1 5% etan; 2  
 1% ac; 2 1% etan; 2 2% ac; 2 2% etan; 2 5% ac; 2 5% etan; 3 1% ac; 3 1% etan;  
 3 2% ac; 3 2% etan; 3 5% ac; 3 5% etan

Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|---------|---------|
| C1     | 17  | 193278    | 11369,3   | 2575,08 | 0,000   |
| Error  | 144 | 636       | 4,4       |         |         |
| Total  | 161 | 193914    |           |         |         |

Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 2,10122 | 99,67%  | 99,63%             | 99,59%         |

Medias

| C1        | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|-----------|---|--------|-----------|------------------|
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 98,6; 101,4)   |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 98,6; 101,4)   |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 98,6; 101,4)   |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 98,6; 101,4)   |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 98,6; 101,4)   |
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 98,6; 101,4)   |
| 2 1% ac   | 9 | 30,222 | 1,302     | (28,838; 31,607) |
| 2 1% etan | 9 | 30,111 | 0,928     | (28,727; 31,496) |
| 2 2% ac   | 9 | 29,89  | 3,76      | ( 28,50; 31,27)  |
| 2 2% etan | 9 | 33,778 | 1,302     | (32,393; 35,162) |
| 2 5% ac   | 9 | 49,56  | 4,64      | ( 48,17; 50,94)  |
| 2 5% etan | 9 | 91,667 | 2,345     | (90,282; 93,051) |
| 3 1% ac   | 9 | 10,778 | 0,972     | ( 9,393; 12,162) |
| 3 1% etan | 9 | 20,889 | 0,928     | (19,504; 22,273) |
| 3 2% ac   | 9 | 23,44  | 5,20      | ( 22,06; 24,83)  |
| 3 2% etan | 9 | 28,000 | 1,414     | (26,616; 29,384) |
| 3 5% ac   | 9 | 30,667 | 1,581     | (29,282; 32,051) |
| 3 5% etan | 9 | 39,333 | 0,866     | (37,949; 40,718) |

Desv.Est. agrupada = 2,10122

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1 | N | Media | Agrupación |
|----|---|-------|------------|
|----|---|-------|------------|

|           |   |        |     |  |
|-----------|---|--------|-----|--|
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | A   |  |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | A   |  |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | A   |  |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | A   |  |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | A   |  |
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | A   |  |
| 2 5% etan | 9 | 91,667 | B   |  |
| 2 5% ac   | 9 | 49,56  | C   |  |
| 3 5% etan | 9 | 39,333 | D   |  |
| 2 2% etan | 9 | 33,778 | E   |  |
| 3 5% ac   | 9 | 30,667 | E F |  |
| 2 1% ac   | 9 | 30,222 | F   |  |
| 2 1% etan | 9 | 30,111 | F   |  |
| 2 2% ac   | 9 | 29,89  | F   |  |
| 3 2% etan | 9 | 28,000 | F   |  |
| 3 2% ac   | 9 | 23,44  | G   |  |
| 3 1% etan | 9 | 20,889 | G   |  |
| 3 1% ac   | 9 | 10,778 | H   |  |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de valores por semanas**

**ROQ Alta 7 días**

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 7 d 1% ac; 7 d 1% et; 7 d 2% ac; 7 d 2% et; 7 d 5% ac; 7 d 5% et

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,00000   | 0,000000  | 0,00    | 1,000   |
| Error  | 48 | 5,33333   | 0,111111  |         |         |
| Total  | 53 | 5,33333   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,333333 | 0,00%   | 0,00%              | 0,00%          |

Medias

| Factor    | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 7 d 1% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 1% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |

Desv.Est. agrupada = 0,333333

**ROQ Alta 15 días**

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 15 d 1% ac\_1; 15 d 1% et\_1; 15 d 2% ac\_1; 15 d 2% et\_1; 15 d 5% ac\_1; 15 d 5% et\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 26901,6   | 5380,33   | 711,23  | 0,000   |
| Error  | 48 | 363,1     | 7,56      |         |         |
| Total  | 53 | 27264,8   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 2,75042 | 98,67%  | 98,53%             | 98,31%         |

## Medias

| Factor       | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|--------------|---|--------|-----------|------------------|
| 15 d 1% ac_1 | 9 | 30,222 | 1,302     | (28,379; 32,066) |
| 15 d 1% et_1 | 9 | 30,111 | 0,928     | (28,268; 31,954) |
| 15 d 2% ac_1 | 9 | 29,89  | 3,76      | ( 28,05; 31,73)  |
| 15 d 2% et_1 | 9 | 33,778 | 1,302     | (31,934; 35,621) |
| 15 d 5% ac_1 | 9 | 49,56  | 4,64      | ( 47,71; 51,40)  |
| 15 d 5% et_1 | 9 | 91,667 | 2,345     | (89,823; 93,510) |

Desv.Est. agrupada = 2,75042

**ROQ Alta 21 días**

## Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 21 d 1% ac_1_1; 21 d 1% et_1_1; 21 d 2% ac_1_1; 21 d 2% et_1_1; 21 d 5% ac_1_1; 21 d 5% et_1_1 |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 4198,8    | 839,763   | 147,83  | 0,000   |
| Error  | 48 | 272,7     | 5,681     |         |         |
| Total  | 53 | 4471,5    |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 2,38339 | 93,90%  | 93,27%             | 92,28%         |

## Medias

| Factor         | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|----------------|---|--------|-----------|------------------|
| 21 d 1% ac_1_1 | 9 | 10,778 | 0,972     | ( 9,180; 12,375) |
| 21 d 1% et_1_1 | 9 | 20,889 | 0,928     | (19,292; 22,486) |
| 21 d 2% ac_1_1 | 9 | 23,44  | 5,20      | ( 21,85; 25,04)  |
| 21 d 2% et_1_1 | 9 | 28,000 | 1,414     | (26,403; 29,597) |
| 21 d 5% ac_1_1 | 9 | 30,667 | 1,581     | (29,069; 32,264) |
| 21 d 5% et_1_1 | 9 | 39,333 | 0,866     | (37,736; 40,931) |

Desv.Est. agrupada = 2,38339

## 8. Análisis del comportamiento inhibitorio de diferentes formulaciones de aceites esencial de orégano frente al *P. roqueforti* a una concentración Media de propágulos fúngicos. (Figura 26)

### Método

Hipótesis nula                    Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna                Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia         $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor Niveles Valores  
 C1                    18    1 1% ac; 1 1% etan; 1 2% ac; 1 2% etan; 1 5% ac; 1 5% etan; 2  
 1% ac; 2 1% etan; 2 2% ac; 2 2% etan; 2 5% ac; 2 5% etan; 3 1% ac; 3 1% etan;  
 3 2% ac; 3 2% etan; 3 5% ac; 3 5% etan

### Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F  | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|---------|
| C1     | 17  | 117873    | 6933,68   | 16891,06 | 0,000   |
| Error  | 144 | 59        | 0,41      |          |         |
| Total  | 161 | 117932    |           |          |         |

### Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,640698 | 99,95%  | 99,94%             | 99,94%         |

### Medias

| C1        | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,6; 100,4)    |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,6; 100,4)    |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,6; 100,4)    |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,6; 100,4)    |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,6; 100,4)    |
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,6; 100,4)    |
| 2 1% ac   | 9 | 89,111 | 0,782     | (88,689; 89,533)  |
| 2 1% etan | 9 | 89,667 | 1,000     | (89,245; 90,089)  |
| 2 2% ac   | 9 | 92,000 | 1,000     | (91,578; 92,422)  |
| 2 2% etan | 9 | 93,778 | 0,972     | (93,356; 94,200)  |
| 2 5% ac   | 9 | 99,667 | 0,500     | (99,245; 100,089) |
| 2 5% etan | 9 | 99,667 | 0,500     | (99,245; 100,089) |
| 3 1% ac   | 9 | 38,778 | 0,441     | (38,356; 39,200)  |
| 3 1% etan | 9 | 28,889 | 0,782     | (28,467; 29,311)  |
| 3 2% ac   | 9 | 40,667 | 0,707     | (40,245; 41,089)  |
| 3 2% etan | 9 | 32,000 | 0,707     | (31,578; 32,422)  |
| 3 5% ac   | 9 | 50,444 | 0,726     | (50,022; 50,867)  |
| 3 5% etan | 9 | 59,667 | 1,000     | (59,245; 60,089)  |

Desv.Est. agrupada = 0,640698

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1        | N | Media | Agrupación |
|-----------|---|-------|------------|
| 1 5% etan | 9 | 100,0 | A          |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0 | A          |
| 1 2% etan | 9 | 100,0 | A          |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0 | A          |

|           |   |        |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|---|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | A |   |   |   |   |   |   |   |
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | A |   |   |   |   |   |   |   |
| 2 5% etan | 9 | 99,667 | A |   |   |   |   |   |   |   |
| 2 5% ac   | 9 | 99,667 | A |   |   |   |   |   |   |   |
| 2 2% etan | 9 | 93,778 |   | B |   |   |   |   |   |   |
| 2 2% ac   | 9 | 92,000 |   |   | C |   |   |   |   |   |
| 2 1% etan | 9 | 89,667 |   |   |   | D |   |   |   |   |
| 2 1% ac   | 9 | 89,111 |   |   |   |   | D |   |   |   |
| 3 5% etan | 9 | 59,667 |   |   |   |   |   | E |   |   |
| 3 5% ac   | 9 | 50,444 |   |   |   |   |   |   | F |   |
| 3 2% ac   | 9 | 40,667 |   |   |   |   |   |   |   | G |
| 3 1% ac   | 9 | 38,778 |   |   |   |   |   |   |   | H |
| 3 2% etan | 9 | 32,000 |   |   |   |   |   |   |   | I |
| 3 1% etan | 9 | 28,889 |   |   |   |   |   |   |   | J |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de valores por semanas**

**ROQ Media 7 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 7 d 1% ac; 7 d 1% et; 7 d 2% ac; 7 d 2% et; 7 d 5% ac; 7 d 5% et |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,00000   | 0,000000  | 0,00    | 1,000   |
| Error  | 48 | 5,33333   | 0,111111  |         |         |
| Total  | 53 | 5,33333   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,333333 | 0,00%   | 0,00%              | 0,00%          |

Medias

| Factor    | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 7 d 1% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 1% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |

Desv.Est. agrupada = 0,333333

**ROQ Media 15 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 15 d 1% ac_1; 15 d 1% et_1; 15 d 2% ac_1; 15 d 2% et_1; 15 d 5% ac_1; 15 d 5% et_1 |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 998,54    | 199,707   | 295,46  | 0,000   |
| Error  | 48 | 32,44     | 0,676     |         |         |
| Total  | 53 | 1030,98   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|----------|---------|-----------------------|-------------------|
| 0,822147 | 96,85%  | 96,53%                | 96,02%            |

## Medias

| Factor       | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|--------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 15 d 1% ac_1 | 9 | 89,111 | 0,782     | (88,560; 89,662)  |
| 15 d 1% et_1 | 9 | 89,667 | 1,000     | (89,116; 90,218)  |
| 15 d 2% ac_1 | 9 | 92,000 | 1,000     | (91,449; 92,551)  |
| 15 d 2% et_1 | 9 | 93,778 | 0,972     | (93,227; 94,329)  |
| 15 d 5% ac_1 | 9 | 99,667 | 0,500     | (99,116; 100,218) |
| 15 d 5% et_1 | 9 | 99,667 | 0,500     | (99,116; 100,218) |

Desv.Est. agrupada = 0,822147

**ROQ Baja 21 días**

Factor 6 21 d 1% ac\_1\_1; 21 d 1% et\_1\_1; 21 d 2% ac\_1\_1; 21 d 2% et\_1\_1; 21 d 5% ac\_1\_1; 21 d 5% et\_1\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 6003,70   | 1200,74   | 2161,33 | 0,000   |
| Error  | 48 | 26,67     | 0,56      |         |         |
| Total  | 53 | 6030,37   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|----------|---------|-----------------------|-------------------|
| 0,745356 | 99,56%  | 99,51%                | 99,44%            |

## Medias

| Factor         | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|----------------|---|--------|-----------|------------------|
| 21 d 1% ac_1_1 | 9 | 38,778 | 0,441     | (38,278; 39,277) |
| 21 d 1% et_1_1 | 9 | 28,889 | 0,782     | (28,389; 29,388) |
| 21 d 2% ac_1_1 | 9 | 40,667 | 0,707     | (40,167; 41,166) |
| 21 d 2% et_1_1 | 9 | 32,000 | 0,707     | (31,500; 32,500) |
| 21 d 5% ac_1_1 | 9 | 50,444 | 0,726     | (49,945; 50,944) |
| 21 d 5% et_1_1 | 9 | 59,667 | 1,000     | (59,167; 60,166) |

Desv.Est. agrupada = 0,745356

9. Análisis del comportamiento inhibitorio de diferentes formulaciones de aceites esencial de orégano frente al *P. roqueforti* a una concentración Baja de propágulos fúngicos. (Figura 27)

## Método

Hipótesis nula                    Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna                Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia         $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor Niveles Valores  
 C1                    30    1 1% ac; 1 1% etan; 1 2% ac; 1 2% etan; 1 5% ac; 1 5% etan; 2 1% ac; 2 1% etan; 2 2% ac; 2 2% etan; 2 5% ac; 2 5% etan; 3 1% ac; 3 1% etan; 3 2% ac; 3 2% etan; 3 5% ac; 3 5% etan; 4 1% ac; 4 1% etan; 4 2% ac; 4 2% etan; 4 5% ac; 4 5% etan; 5 1% ac; 5 1% etan; 5 2% ac; 5 2% etan; 5 5% ac; 5 5% etan.

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|---------|---------|
| C1     | 29  | 201245    | 6939,48   | 4175,29 | 0,000   |
| Error  | 240 | 399       | 1,66      |         |         |
| Total  | 269 | 201644    |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,28920 | 99,80%  | 99,78%             | 99,75%         |

## Medias

| C1        | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 2 1% ac   | 9 | 92,000 | 1,225     | (91,153; 92,847)  |
| 2 1% etan | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,042; 100,735) |
| 2 2% ac   | 9 | 99,778 | 0,441     | (98,931; 100,624) |
| 2 2% etan | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,709; 100,402) |
| 2 5% ac   | 9 | 99,333 | 1,118     | (98,487; 100,180) |
| 2 5% etan | 9 | 99,778 | 0,441     | (98,931; 100,624) |
| 3 1% ac   | 9 | 59,33  | 4,44      | ( 58,49; 60,18)   |
| 3 1% etan | 9 | 99,556 | 0,726     | (98,709; 100,402) |
| 3 2% ac   | 9 | 73,222 | 1,394     | (72,376; 74,069)  |
| 3 2% etan | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,709; 100,402) |
| 3 5% ac   | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,598; 100,291) |
| 3 5% etan | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,709; 100,402) |
| 4 1% ac   | 9 | 44,222 | 1,202     | (43,376; 45,069)  |
| 4 1% etan | 9 | 84,778 | 0,972     | (83,931; 85,624)  |
| 4 2% ac   | 9 | 53,000 | 1,803     | (52,153; 53,847)  |
| 4 2% etan | 9 | 90,889 | 0,782     | (90,042; 91,735)  |
| 4 5% ac   | 9 | 99,333 | 1,118     | (98,487; 100,180) |



|           |   |        |       |                   |
|-----------|---|--------|-------|-------------------|
| 4 5% etan | 9 | 99,333 | 0,707 | (98,487; 100,180) |
| 5 1% ac   | 9 | 10,556 | 1,130 | ( 9,709; 11,402)  |
| 5 1% etan | 9 | 28,111 | 0,782 | (27,265; 28,958)  |
| 5 2% ac   | 9 | 23,000 | 2,236 | (22,153; 23,847)  |
| 5 2% etan | 9 | 33,556 | 1,424 | (32,709; 34,402)  |
| 5 5% ac   | 9 | 72,889 | 2,028 | (72,042; 73,735)  |
| 5 5% etan | 9 | 90,000 | 1,323 | (89,153; 90,847)  |

Desv.Est. agrupada = 1,28920

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1        | N | Media  | Agrupación |
|-----------|---|--------|------------|
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 2 1% etan | 9 | 99,889 | A          |
| 2 5% etan | 9 | 99,778 | A          |
| 2 2% ac   | 9 | 99,778 | A          |
| 3 5% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 3 2% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 3 1% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 2 2% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 3 5% ac   | 9 | 99,444 | A          |
| 4 5% etan | 9 | 99,333 | A          |
| 4 5% ac   | 9 | 99,333 | A          |
| 2 5% ac   | 9 | 99,333 | A          |
| 2 1% ac   | 9 | 92,000 | B          |
| 4 2% etan | 9 | 90,889 | B          |
| 5 5% etan | 9 | 90,000 | B          |
| 4 1% etan | 9 | 84,778 | C          |
| 3 2% ac   | 9 | 73,222 | D          |
| 5 5% ac   | 9 | 72,889 | D          |
| 3 1% ac   | 9 | 59,33  | E          |
| 4 2% ac   | 9 | 53,000 | F          |
| 4 1% ac   | 9 | 44,222 | G          |
| 5 2% etan | 9 | 33,556 | H          |
| 5 1% etan | 9 | 28,111 | I          |
| 5 2% ac   | 9 | 23,000 | J          |
| 5 1% ac   | 9 | 10,556 | K          |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de valores por semanas**

### **ROQ Baja 7 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 7 d 1% ac; 7 d 1% et; 7 d 2% ac; 7 d 2% et; 7 d 5% ac; 7 d 5% et |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,00000   | 0,000000  | 0,00    | 1,000   |
| Error  | 48 | 5,33333   | 0,111111  |         |         |
| Total  | 53 | 5,33333   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|----------|---------|-----------------------|-------------------|
| 0,333333 | 0,00%   | 0,00%                 | 0,00%             |

## Medias

| Factor    | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 7 d 1% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 1% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |

Desv.Est. agrupada = 0,333333

**ROQ Baja 15 días**

## Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 15 d 1% ac_1; 15 d 1% et_1; 15 d 2% ac_1; 15 d 2% et_1; 15 d 5% ac_1; 15 d 5% et_1 |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 442,61    | 88,5222   | 150,56  | 0,000   |
| Error  | 48 | 28,22     | 0,5880    |         |         |
| Total  | 53 | 470,83    |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|----------|---------|-----------------------|-------------------|
| 0,766787 | 94,01%  | 93,38%                | 92,41%            |

## Medias

| Factor       | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|--------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 15 d 1% ac_1 | 9 | 92,000 | 1,225     | (91,486; 92,514)  |
| 15 d 1% et_1 | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,375; 100,403) |
| 15 d 2% ac_1 | 9 | 99,778 | 0,441     | (99,264; 100,292) |
| 15 d 2% et_1 | 9 | 99,556 | 0,527     | (99,042; 100,069) |
| 15 d 5% ac_1 | 9 | 99,333 | 1,118     | (98,819; 99,847)  |
| 15 d 5% et_1 | 9 | 99,778 | 0,441     | (99,264; 100,292) |

Desv.Est. agrupada = 0,766787

**ROQ Baja 21 días**

## Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 21 d 1% ac_1_1; 21 d 1% et_1_1; 21 d 2% ac_1_1; 21 d 2% et_1_1; 21 d 5% ac_1_1; 21 d 5% et_1_1 |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 14134,9   | 2826,98   | 720,08  | 0,000   |
| Error  | 48 | 188,4     | 3,93      |         |         |
| Total  | 53 | 14323,3   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,98139 | 98,68%  | 98,55%             | 98,33%         |

## Medias

| Factor         | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|----------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 21 d 1% ac_1_1 | 9 | 59,33  | 4,44      | ( 58,01; 60,66)   |
| 21 d 1% et_1_1 | 9 | 99,556 | 0,726     | (98,228; 100,884) |
| 21 d 2% ac_1_1 | 9 | 73,222 | 1,394     | (71,894; 74,550)  |
| 21 d 2% et_1_1 | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,228; 100,884) |
| 21 d 5% ac_1_1 | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,116; 100,772) |
| 21 d 5% et_1_1 | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,228; 100,884) |

Desv.Est. agrupada = 1,98139

**ROQ Baja 28 días**

## Información del factor

Factor Niveles Valores  
 Factor 6 28 d 1% ac\_1\_1\_1; 28 d 1% et\_1\_1\_1; 28 d 2% ac\_1\_1\_1; 28 d 2% et\_1\_1\_1; 28 d 5% ac\_1\_1\_1; 28 d 5% et\_1\_1\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 25975,0   | 5195,01   | 3896,26 | 0,000   |
| Error  | 48 | 64,0      | 1,33      |         |         |
| Total  | 53 | 26039,0   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,15470 | 99,75%  | 99,73%             | 99,69%         |

## Medias

| Factor           | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|------------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 28 d 1% ac_1_1_1 | 9 | 44,222 | 1,202     | (43,448; 44,996)  |
| 28 d 1% et_1_1_1 | 9 | 84,778 | 0,972     | (84,004; 85,552)  |
| 28 d 2% ac_1_1_1 | 9 | 53,000 | 1,803     | (52,226; 53,774)  |
| 28 d 2% et_1_1_1 | 9 | 90,889 | 0,782     | (90,115; 91,663)  |
| 28 d 5% ac_1_1_1 | 9 | 99,333 | 1,118     | (98,559; 100,107) |
| 28 d 5% et_1_1_1 | 9 | 99,333 | 0,707     | (98,559; 100,107) |

Desv.Est. agrupada = 1,15470

**ROQ Baja 35 días**

## Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 35 d 1% ac\_1\_1\_1\_1; 35 d 1% et\_1\_1\_1\_1; 35 d 2% ac\_1\_1\_1\_1;  
35 d 2%  
et\_1\_1\_1\_1; 35d 5% ac\_1\_1\_1\_1; 35 d 5% et\_1\_1\_1\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 43792,8   | 8758,55   | 3556,10 | 0,000   |
| Error  | 48 | 118,2     | 2,46      |         |         |
| Total  | 53 | 43911,0   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,56938 | 99,73%  | 99,70%             | 99,66%         |

## Medias

| Factor             | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|--------------------|---|--------|-----------|------------------|
| 35 d 1% ac_1_1_1_1 | 9 | 10,556 | 1,130     | ( 9,504; 11,607) |
| 35 d 1% et_1_1_1_1 | 9 | 28,111 | 0,782     | (27,059; 29,163) |
| 35 d 2% ac_1_1_1_1 | 9 | 23,000 | 2,236     | (21,948; 24,052) |
| 35 d 2% et_1_1_1_1 | 9 | 33,556 | 1,424     | (32,504; 34,607) |
| 35d 5% ac_1_1_1_1  | 9 | 72,889 | 2,028     | (71,837; 73,941) |
| 35 d 5% et_1_1_1_1 | 9 | 90,000 | 1,323     | (88,948; 91,052) |

Desv.Est. agrupada = 1,56938

## 10. Análisis del comportamiento inhibitorio de diferentes formulaciones de aceites esencial de orégano frente al *P. brevicompactum* a una concentración Alta de propágulos fúngicos. (Figura 28)

## Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente  
Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

| Factor | Niveles | Valores   |
|--------|---------|---|
| C1     | 18      | 1 1% ac; 1 1% etan; 1 2% ac; 1 2% etan; 1 5% ac; 1 5% etan; 2 1% ac; 2 1% etan; 2 2% ac; 2 2% etan; 2 5% ac; 2 5% etan; 3 1% ac; 3 1% etan; 3 2% ac; 3 2% etan; 3 5% ac; 3 5% etan. |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|---------|---------|
| C1     | 17  | 204482    | 12028,3   | 8708,78 | 0,000   |
| Error  | 144 | 199       | 1,4       |         |         |
| Total  | 161 | 204681    |           |         |         |

## Resumen del modelo

|  |         |         |                       |                   |
|--|---------|---------|-----------------------|-------------------|
|  | S       | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|  | 1,17523 | 99,90%  | 99,89%                | 99,88%            |

## Medias

| C1        | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|-----------|---|--------|-----------|------------------|
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)   |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)   |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)   |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)   |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)   |
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)   |
| 2 1% ac   | 9 | 30,222 | 1,302     | (29,448; 30,997) |
| 2 1% etan | 9 | 31,667 | 2,449     | (30,892; 32,441) |
| 2 2% ac   | 9 | 33,000 | 1,414     | (32,226; 33,774) |
| 2 2% etan | 9 | 33,778 | 1,302     | (33,003; 34,552) |
| 2 5% ac   | 9 | 33,222 | 1,202     | (32,448; 33,997) |
| 2 5% etan | 9 | 91,667 | 2,345     | (90,892; 92,441) |
| 3 1% ac   | 9 | 10,778 | 0,972     | (10,003; 11,552) |
| 3 1% etan | 9 | 21,444 | 1,424     | (20,670; 22,219) |
| 3 2% ac   | 9 | 20,111 | 0,601     | (19,337; 20,885) |
| 3 2% etan | 9 | 28,000 | 1,414     | (27,226; 28,774) |
| 3 5% ac   | 9 | 17,778 | 0,667     | (17,003; 18,552) |
| 3 5% etan | 9 | 39,333 | 0,866     | (38,559; 40,108) |

Desv.Est. agrupada = 1,17523

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1        | N | Media  | Agrupación |
|-----------|---|--------|------------|
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 2 5% etan | 9 | 91,667 | B          |
| 3 5% etan | 9 | 39,333 | C          |
| 2 2% etan | 9 | 33,778 | D          |
| 2 5% ac   | 9 | 33,222 | D E        |
| 2 2% ac   | 9 | 33,000 | D E        |
| 2 1% etan | 9 | 31,667 | E F        |
| 2 1% ac   | 9 | 30,222 | F          |
| 3 2% etan | 9 | 28,000 | G          |
| 3 1% etan | 9 | 21,444 | H          |
| 3 2% ac   | 9 | 20,111 | H          |
| 3 5% ac   | 9 | 17,778 | I          |
| 3 1% ac   | 9 | 10,778 | J          |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de valores por semanas**

#### **BV Alta 7 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 7 d 1% ac; 7 d 1% et; 7 d 2% ac; 7 d 2% et; 7 d 5% ac; 7 d 5% et |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,1481    | 0,02963   | 0,13    | 0,984   |
| Error  | 48 | 10,6667   | 0,22222   |         |         |
| Total  | 53 | 10,8148   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,471405 | 1,37%   | 0,00%              | 0,00%          |

## Medias

| Factor    | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 7 d 1% ac | 9 | 99,778 | 0,667     | (99,462; 100,094) |
| 7 d 1% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,573; 100,205) |
| 7 d 2% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,573; 100,205) |
| 7 d 2% et | 9 | 99,778 | 0,667     | (99,462; 100,094) |
| 7 d 5% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,573; 100,205) |
| 7 d 5% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,573; 100,205) |

Desv.Est. agrupada = 0,471405

**BV Alta 15 días**

Factor Niveles Valores

Factor 6 15 d 1% ac\_1; 15 d 1% et\_1; 15 d 2% ac\_1; 15 d 2% et\_1; 15 d 5% ac\_1; 15 d 5% et\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 26437,7   | 5287,54   | 1730,47 | 0,000   |
| Error  | 48 | 146,7     | 3,06      |         |         |
| Total  | 53 | 26584,4   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,74801 | 99,45%  | 99,39%             | 99,30%         |

## Medias

| Factor       | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|--------------|---|--------|-----------|------------------|
| 15 d 1% ac_1 | 9 | 30,222 | 1,302     | (29,051; 31,394) |
| 15 d 1% et_1 | 9 | 31,667 | 2,449     | (30,495; 32,838) |
| 15 d 2% ac_1 | 9 | 33,000 | 1,414     | (31,828; 34,172) |
| 15 d 2% et_1 | 9 | 33,778 | 1,302     | (32,606; 34,949) |
| 15 d 5% ac_1 | 9 | 33,222 | 1,202     | (32,051; 34,394) |
| 15 d 5% et_1 | 9 | 91,667 | 2,345     | (90,495; 92,838) |

Desv.Est. agrupada = 1,74801

**BV Alta 21 días**

Información del factor

Factor Niveles Valores  
 Factor 6 21 d 1% ac\_1\_1; 21 d 1% et\_1\_1; 21 d 2% ac\_1\_1; 21 d 2% et\_1\_1; 21 d 5% ac\_1\_1; 21 d 5% et\_1\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 4312,31   | 862,463   | 792,73  | 0,000   |
| Error  | 48 | 52,22     | 1,088     |         |         |
| Total  | 53 | 4364,54   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,04305 | 98,80%  | 98,68%             | 98,49%         |

## Medias

| Factor         | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|----------------|---|--------|-----------|------------------|
| 21 d 1% ac_1_1 | 9 | 10,778 | 0,972     | (10,079; 11,477) |
| 21 d 1% et_1_1 | 9 | 21,444 | 1,424     | (20,745; 22,144) |
| 21 d 2% ac_1_1 | 9 | 20,111 | 0,601     | (19,412; 20,810) |
| 21 d 2% et_1_1 | 9 | 28,000 | 1,414     | (27,301; 28,699) |
| 21 d 5% ac_1_1 | 9 | 17,778 | 0,667     | (17,079; 18,477) |
| 21 d 5% et_1_1 | 9 | 39,333 | 0,866     | (38,634; 40,032) |

Desv.Est. agrupada = 1,04305

## 11. Análisis del comportamiento inhibitorio de diferentes formulaciones de aceites esencial de orégano frente al *P. brevicompactum* a una concentración Media de propágulos fúngicos. (Figura 29)

## Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor Niveles Valores  
 C1 18 1 1% ac; 1 1% etan; 1 2% ac; 1 2% etan; 1 5% ac; 1 5% etan; 2 1% ac; 2 1% etan; 2 2% ac; 2 2% etan; 2 5% ac; 2 5% etan; 3 1% ac; 3 1% etan; 3 2% ac; 3 2% etan; 3 5% ac; 3 5% etan.

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|---------|---------|
| C1     | 17  | 84351,7   | 4961,87   | 3257,64 | 0,000   |
| Error  | 144 | 219,3     | 1,52      |         |         |
| Total  | 161 | 84571,1   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---|---------|--------------------|----------------|
|   |         |                    |                |

1,23416    99,74%    99,71%    99,67%

## Medias

| C1        | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,2; 100,8)    |
| 2 1% ac   | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,631; 100,258) |
| 2 1% etan | 9 | 99,556 | 0,726     | (98,742; 100,369) |
| 2 2% ac   | 9 | 99,556 | 0,726     | (98,742; 100,369) |
| 2 2% etan | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,631; 100,258) |
| 2 5% ac   | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,631; 100,258) |
| 2 5% etan | 9 | 99,556 | 0,726     | (98,742; 100,369) |
| 3 1% ac   | 9 | 40,000 | 1,225     | (39,187; 40,813)  |
| 3 1% etan | 9 | 50,778 | 0,667     | (49,965; 51,591)  |
| 3 2% ac   | 9 | 51,000 | 0,866     | (50,187; 51,813)  |
| 3 2% etan | 9 | 53,667 | 1,000     | (52,854; 54,480)  |
| 3 5% ac   | 9 | 58,556 | 0,882     | (57,742; 59,369)  |
| 3 5% etan | 9 | 57,56  | 4,36      | ( 56,74; 58,37)   |

Desv.Est. agrupada = 1,23416

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1        | N | Media  | Agrupación |
|-----------|---|--------|------------|
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 2 5% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 2 2% ac   | 9 | 99,556 | A          |
| 2 1% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 2 5% ac   | 9 | 99,444 | A          |
| 2 2% etan | 9 | 99,444 | A          |
| 2 1% ac   | 9 | 99,444 | A          |
| 3 5% ac   | 9 | 58,556 | B          |
| 3 5% etan | 9 | 57,56  | B          |
| 3 2% etan | 9 | 53,667 | C          |
| 3 2% ac   | 9 | 51,000 | D          |
| 3 1% etan | 9 | 50,778 | D          |
| 3 1% ac   | 9 | 40,000 | E          |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de valores por semanas**

#### **BV Media 7 días**

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor            6    7 d 1% ac; 7 d 1% et; 7 d 2% ac; 7 d 2% et; 7 d 5% ac; 7 d 5% et

Análisis de Varianza



| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,1667    | 0,03333   | 0,12    | 0,987   |
| Error  | 48 | 13,3333   | 0,27778   |         |         |
| Total  | 53 | 13,5000   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,527046 | 1,23%   | 0,00%              | 0,00%          |

Medias

| Factor    | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 7 d 1% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,536; 100,242) |
| 7 d 1% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,536; 100,242) |
| 7 d 2% ac | 9 | 99,778 | 0,667     | (99,425; 100,131) |
| 7 d 2% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,536; 100,242) |
| 7 d 5% ac | 9 | 99,778 | 0,667     | (99,425; 100,131) |
| 7 d 5% et | 9 | 99,778 | 0,667     | (99,425; 100,131) |

Desv.Est. agrupada = 0,527046

### BV Media 15 días

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 15 d 1% ac_1; 15 d 1% et_1; 15 d 2% ac_1; 15 d 2% et_1; 15 d 5% ac_1; 15 d 5% et_1 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,1667    | 0,03333   | 0,05    | 0,998   |
| Error  | 48 | 31,3333   | 0,65278   |         |         |
| Total  | 53 | 31,5000   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,807947 | 0,53%   | 0,00%              | 0,00%          |

Medias

| Factor       | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|--------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 15 d 1% ac_1 | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,903; 99,986)  |
| 15 d 1% et_1 | 9 | 99,556 | 0,726     | (99,014; 100,097) |
| 15 d 2% ac_1 | 9 | 99,556 | 0,726     | (99,014; 100,097) |
| 15 d 2% et_1 | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,903; 99,986)  |
| 15 d 5% ac_1 | 9 | 99,444 | 0,882     | (98,903; 99,986)  |
| 15 d 5% et_1 | 9 | 99,556 | 0,726     | (99,014; 100,097) |

Desv.Est. agrupada = 0,807947

### BV Media 21 días

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 21 d 1% ac_1_1; 21 d 1% et_1_1; 21 d 2% ac_1_1; 21 d 2% et_1_1; 21 d 5% ac_1_1; 21 d 5% et_1_1 |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 2007,7    | 401,541   | 102,52  | 0,000   |
| Error  | 48 | 188,0     | 3,917     |         |         |
| Total  | 53 | 2195,7    |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,97906 | 91,44%  | 90,55%             | 89,16%         |

## Medias

| Factor         | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|----------------|---|--------|-----------|------------------|
| 21 d 1% ac_1_1 | 9 | 40,000 | 1,225     | (38,674; 41,326) |
| 21 d 1% et_1_1 | 9 | 50,778 | 0,667     | (49,451; 52,104) |
| 21 d 2% ac_1_1 | 9 | 51,000 | 0,866     | (49,674; 52,326) |
| 21 d 2% et_1_1 | 9 | 53,667 | 1,000     | (52,340; 54,993) |
| 21 d 5% ac_1_1 | 9 | 58,556 | 0,882     | (57,229; 59,882) |
| 21 d 5% et_1_1 | 9 | 57,56  | 4,36      | ( 56,23; 58,88)  |

Desv.Est. agrupada = 1,97906

## 12. Análisis del comportamiento inhibitorio de diferentes formulaciones de aceites esencial de orégano frente al *P. brevicompactum* a una concentración Baja de propágulos fúngicos. (Figura 30)

## Método

|                        |                                     |
|------------------------|-------------------------------------|
| Hipótesis nula         | Todas las medias son iguales        |
| Hipótesis alterna      | Por lo menos una media es diferente |
| Nivel de significancia | $\alpha = 0,05$                     |

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| C1     | 30      | 1 1% ac; 1 1% etan; 1 2% ac; 1 2% etan; 1 5% ac; 1 5% etan; 2 1% ac; 2 1% etan; 2 2% ac; 2 2% etan; 2 5% ac; 2 5% etan; 3 1% ac; 3 1% etan; 3 2% ac; 3 2% etan; 3 5% ac; 3 5% etan; 4 1% ac; 4 1% etan; 4 2% ac; 4 2% etan; 4 5% ac; 4 5% etan; 5 1% ac; 5 1% etan; 5 2% ac; 5 2% etan; 5 5% ac; 5 5% etan |

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F  | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|---------|
| C1     | 29  | 296646    | 10229,2   | 12113,51 | 0,000   |
| Error  | 240 | 203       | 0,8       |          |         |
| Total  | 269 | 296849    |           |          |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|----------|---------|-----------------------|-------------------|
| 0,918937 | 99,93%  | 99,92%                | 99,91%            |

## Medias

| C1        | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 2 1% ac   | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,952; 100,159) |
| 2 1% etan | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,285; 100,492) |
| 2 2% ac   | 9 | 99,778 | 0,441     | (99,174; 100,381) |
| 2 2% etan | 9 | 99,333 | 0,866     | (98,730; 99,937)  |
| 2 5% ac   | 9 | 99,556 | 0,726     | (98,952; 100,159) |
| 2 5% etan | 9 | 99,667 | 0,707     | (99,063; 100,270) |
| 3 1% ac   | 9 | 49,333 | 1,225     | (48,730; 49,937)  |
| 3 1% etan | 9 | 80,778 | 1,563     | (80,174; 81,381)  |
| 3 2% ac   | 9 | 50,000 | 1,000     | (49,397; 50,603)  |
| 3 2% etan | 9 | 81,222 | 1,716     | (80,619; 81,826)  |
| 3 5% ac   | 9 | 72,000 | 1,000     | (71,397; 72,603)  |
| 3 5% etan | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,952; 100,159) |
| 4 1% ac   | 9 | 20,667 | 1,225     | (20,063; 21,270)  |
| 4 1% etan | 9 | 70,222 | 0,833     | (69,619; 70,826)  |
| 4 2% ac   | 9 | 29,889 | 1,364     | (29,285; 30,492)  |
| 4 2% etan | 9 | 72,333 | 0,500     | (71,730; 72,937)  |
| 4 5% ac   | 9 | 50,222 | 1,394     | (49,619; 50,826)  |
| 4 5% etan | 9 | 90,556 | 0,726     | (89,952; 91,159)  |
| 5 1% ac   | 9 | 10,444 | 1,130     | ( 9,841; 11,048)  |
| 5 1% etan | 9 | 10,000 | 0,866     | ( 9,397; 10,603)  |
| 5 2% ac   | 9 | 10,222 | 0,972     | ( 9,619; 10,826)  |
| 5 2% etan | 9 | 30,556 | 1,130     | (29,952; 31,159)  |
| 5 5% ac   | 9 | 13,333 | 1,000     | (12,730; 13,937)  |
| 5 5% etan | 9 | 70,556 | 1,333     | (69,952; 71,159)  |

Desv.Est. agrupada = 0,918937

**Comparaciones en parejas de Tukey**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1        | N | Media  | Agrupación |
|-----------|---|--------|------------|
| 1 5% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 5% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 2% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% etan | 9 | 100,0  | A          |
| 1 1% ac   | 9 | 100,0  | A          |
| 2 1% etan | 9 | 99,889 | A          |
| 2 2% ac   | 9 | 99,778 | A          |
| 2 5% etan | 9 | 99,667 | A          |
| 3 5% etan | 9 | 99,556 | A          |
| 2 5% ac   | 9 | 99,556 | A          |
| 2 1% ac   | 9 | 99,556 | A          |
| 2 2% etan | 9 | 99,333 | A          |
| 4 5% etan | 9 | 90,556 | B          |
| 3 2% etan | 9 | 81,222 | C          |
| 3 1% etan | 9 | 80,778 | C          |
| 4 2% etan | 9 | 72,333 | D          |
| 3 5% ac   | 9 | 72,000 | D E        |
| 5 5% etan | 9 | 70,556 | E F        |

|           |   |        |   |
|-----------|---|--------|---|
| 4 1% etan | 9 | 70,222 | F |
| 4 5% ac   | 9 | 50,222 | G |
| 3 2% ac   | 9 | 50,000 | G |
| 3 1% ac   | 9 | 49,333 | G |
| 5 2% etan | 9 | 30,556 | H |
| 4 2% ac   | 9 | 29,889 | H |
| 4 1% ac   | 9 | 20,667 | I |
| 5 5% ac   | 9 | 13,333 | J |
| 5 1% ac   | 9 | 10,444 | K |
| 5 2% ac   | 9 | 10,222 | K |
| 5 1% etan | 9 | 10,000 | K |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de valores por semanas**

**BV Baja 7 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 7 d 1% ac; 7 d 1% et; 7 d 2% ac; 7 d 2% et; 7 d 5% ac; 7 d 5% et |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,00000   | 0,000000  | 0,00    | 1,000   |
| Error  | 48 | 5,33333   | 0,111111  |         |         |
| Total  | 53 | 5,33333   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,333333 | 0,00%   | 0,00%              | 0,00%          |

Medias

| Factor    | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------|---|--------|-----------|-------------------|
| 7 d 1% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 1% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 2% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% ac | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |
| 7 d 5% et | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,665; 100,112) |

Desv.Est. agrupada = 0,333333

**BV Baja 15 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 15 d 1% ac_1; 15 d 1% et_1; 15 d 2% ac_1; 15 d 2% et_1; 15 d 5% ac_1; 15 d 5% et_1 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|

|        |    |        |        |      |       |
|--------|----|--------|--------|------|-------|
| Factor | 5  | 1,704  | 0,3407 | 0,87 | 0,511 |
| Error  | 48 | 18,889 | 0,3935 |      |       |
| Total  | 53 | 20,593 |        |      |       |

Resumen del modelo

|  |          |         |                       |                   |
|--|----------|---------|-----------------------|-------------------|
|  | S        | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|  | 0,627311 | 8,27%   | 0,00%                 | 0,00%             |

Medias

| Factor       | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|--------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 15 d 1% ac_1 | 9 | 99,556 | 0,527     | (99,135; 99,976)  |
| 15 d 1% et_1 | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,468; 100,309) |
| 15 d 2% ac_1 | 9 | 99,778 | 0,441     | (99,357; 100,198) |
| 15 d 2% et_1 | 9 | 99,333 | 0,866     | (98,913; 99,754)  |
| 15 d 5% ac_1 | 9 | 99,556 | 0,726     | (99,135; 99,976)  |
| 15 d 5% et_1 | 9 | 99,667 | 0,707     | (99,246; 100,087) |

Desv.Est. agrupada = 0,627311

### **BV Baja 21 días**

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 21 d 1% ac\_1\_1; 21 d 1% et\_1\_1; 21 d 2% ac\_1\_1; 21 d 2% et\_1\_1; 21 d 5% ac\_1\_1; 21 d 5% et\_1\_1

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 17271,5   | 3454,30   | 2260,99 | 0,000   |
| Error  | 48 | 73,3      | 1,53      |         |         |
| Total  | 53 | 17344,8   |           |         |         |

Resumen del modelo

|  |         |         |                       |                   |
|--|---------|---------|-----------------------|-------------------|
|  | S       | R-cuad. | R-cuad.<br>(ajustado) | R-cuad.<br>(pred) |
|  | 1,23603 | 99,58%  | 99,53%                | 99,46%            |

Medias

| Factor         | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|----------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 21 d 1% ac_1_1 | 9 | 49,333 | 1,225     | (48,505; 50,162)  |
| 21 d 1% et_1_1 | 9 | 80,778 | 1,563     | (79,949; 81,606)  |
| 21 d 2% ac_1_1 | 9 | 50,000 | 1,000     | (49,172; 50,828)  |
| 21 d 2% et_1_1 | 9 | 81,222 | 1,716     | (80,394; 82,051)  |
| 21 d 5% ac_1_1 | 9 | 72,000 | 1,000     | (71,172; 72,828)  |
| 21 d 5% et_1_1 | 9 | 99,556 | 0,527     | (98,727; 100,384) |

Desv.Est. agrupada = 1,23603

### **BV Baja 28 días**

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor 6 28 d 1% ac\_1\_1\_1; 28 d 1% et\_1\_1\_1; 28 d 2% ac\_1\_1\_1; 28 d 2% et\_1\_1\_1; 28 d 5% ac\_1\_1\_1; 28 d 5% et\_1\_1\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 32634,1   | 6526,82   | 5777,84 | 0,000   |
| Error  | 48 | 54,2      | 1,13      |         |         |
| Total  | 53 | 32688,3   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,06284 | 99,83%  | 99,82%             | 99,79%         |

## Medias

| Factor           | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|------------------|---|--------|-----------|------------------|
| 28 d 1% ac_1_1_1 | 9 | 20,667 | 1,225     | (19,954; 21,379) |
| 28 d 1% et_1_1_1 | 9 | 70,222 | 0,833     | (69,510; 70,935) |
| 28 d 2% ac_1_1_1 | 9 | 29,889 | 1,364     | (29,177; 30,601) |
| 28 d 2% et_1_1_1 | 9 | 72,333 | 0,500     | (71,621; 73,046) |
| 28 d 5% ac_1_1_1 | 9 | 50,222 | 1,394     | (49,510; 50,935) |
| 28 d 5% et_1_1_1 | 9 | 90,556 | 0,726     | (89,843; 91,268) |

Desv.Est. agrupada = 1,06284

**BV Baja 35 días**

## Información del factor

Factor Niveles Valores  
 Factor 6 35 d 1% ac\_1\_1\_1\_1; 35 d 1% et\_1\_1\_1\_1; 35 d 2% ac\_1\_1\_1\_1; 35 d 2% et\_1\_1\_1\_1; 35d 5% ac\_1\_1\_1\_1; 35 d 5% et\_1\_1\_1\_1

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 26041,9   | 5208,39   | 4446,68 | 0,000   |
| Error  | 48 | 56,2      | 1,17      |         |         |
| Total  | 53 | 26098,1   |           |         |         |

## Resumen del modelo

| S       | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 1,08226 | 99,78%  | 99,76%             | 99,73%         |

## Medias

| Factor             | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|--------------------|---|--------|-----------|------------------|
| 35 d 1% ac_1_1_1_1 | 9 | 10,444 | 1,130     | ( 9,719; 11,170) |
| 35 d 1% et_1_1_1_1 | 9 | 10,000 | 0,866     | ( 9,275; 10,725) |
| 35 d 2% ac_1_1_1_1 | 9 | 10,222 | 0,972     | ( 9,497; 10,948) |
| 35 d 2% et_1_1_1_1 | 9 | 30,556 | 1,130     | (29,830; 31,281) |
| 35d 5% ac_1_1_1_1  | 9 | 13,333 | 1,000     | (12,608; 14,059) |
| 35 d 5% et_1_1_1_1 | 9 | 70,556 | 1,333     | (69,830; 71,281) |

Desv.Est. agrupada = 1,08226

13. Análisis del comportamiento inhibitorio de un recubrimiento con agregado de aceites esencial de oregano frente al *P. roqueforti* a una concentración Baja y Alta de propágulos fúngicos. (Figura 33 y 34)

## Método

Hipótesis nula                      Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna                  Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia     $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor Niveles Valores  
 C1                      36 1 1%AEO Alta con Rec; 1 1%AEO Baja con Rec; 1 5%AEO Alta con Rec; 1 5%AEO Baja con Rec; 1 Control 1% sin inoc; 1 Control 5% sin inoc; 1 Control Alta; 1 Control Baja; 1 Control Recub sin Inóculo; 2 1%AEO Alta con Rec; 2 1%AEO Baja con Rec; 2 5%AEO Alta con Rec; 2 5%AEO Baja con Rec; 2 Control 1% sin inoc; 2 Control 5% sin inoc; 2 Control Alta; 2 Control Baja; 2 Control Recub sin Inóculo; 3 1%AEO Alta con Rec; 3 1%AEO Baja con Rec; 3 5%AEO Alta con Rec; 3 5%AEO Baja con Rec; 3 Control 1% sin inoc; 3 Control 5% sin inoc; 3 Control Alta; 3 Control Baja; 3 Control Recub sin Inóculo; 4 1%AEO Alta con Rec; 4 1%AEO Baja con Rec; 4 5%AEO Alta con Rec; 4 5%AEO Baja con Rec; 4 Control 1% sin inoc; 4 Control 5% sin inoc; 4 Control Alta; 4 Control Baja; 4 Control Recub sin Inóculo.

## Análisis de Varianza

| Fuente | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F  | Valor p |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|---------|
| C1     | 35  | 419713    | 11991,8   | 16071,76 | 0,000   |
| Error  | 288 | 215       | 0,7       |          |         |
| Total  | 323 | 419928    |           |          |         |

## Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,863795 | 99,95%  | 99,94%             | 99,94%         |

## Medias

| C1                          | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|-----------------------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 1 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 Control 1% sin inoc       | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 Control 5% sin inoc       | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 Control Alta              | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 Control Baja              | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 1 Control Recub sin Inóculo | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 2 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 91,778 | 1,394     | ( 91,211; 92,344) |
| 2 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 2 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 91,778 | 1,394     | ( 91,211; 92,344) |
| 2 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 2 Control 1% sin inoc       | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |
| 2 Control 5% sin inoc       | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,4; 100,6)    |

|                             |   |          |          |             |           |
|-----------------------------|---|----------|----------|-------------|-----------|
| 2 Control Alta              | 9 | 41,222   | 1,093    | ( 40,656;   | 41,789)   |
| 2 Control Baja              | 9 | 100,0    | 0,0      | ( 99,4;     | 100,6)    |
| 2 Control Recub sin Inóculo | 9 | 91,556   | 1,130    | ( 90,989;   | 92,122)   |
| 3 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 21,444   | 1,130    | ( 20,878;   | 22,011)   |
| 3 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 69,889   | 0,928    | ( 69,322;   | 70,456)   |
| 3 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 42,111   | 1,269    | ( 41,544;   | 42,678)   |
| 3 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 90,889   | 0,782    | ( 90,322;   | 91,456)   |
| 3 Control 1% sin inoc       | 9 | 100,0    | 0,0      | ( 99,4;     | 100,6)    |
| 3 Control 5% sin inoc       | 9 | 100,0    | 0,0      | ( 99,4;     | 100,6)    |
| 3 Control Alta              | 9 | 10,778   | 0,833    | ( 10,211;   | 11,344)   |
| 3 Control Baja              | 9 | 70,111   | 0,782    | ( 69,544;   | 70,678)   |
| 3 Control Recub sin Inóculo | 9 | 60,89    | 3,22     | ( 60,32;    | 61,46)    |
| 4 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 0,000000 | 0,000000 | (-0,566717; | 0,566717) |
| 4 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 50,111   | 0,928    | ( 49,544;   | 50,678)   |
| 4 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 11,000   | 0,707    | ( 10,433;   | 11,567)   |
| 4 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 91,111   | 1,054    | ( 90,544;   | 91,678)   |
| 4 Control 1% sin inoc       | 9 | 60,778   | 0,833    | ( 60,211;   | 61,344)   |
| 4 Control 5% sin inoc       | 9 | 90,889   | 0,782    | ( 90,322;   | 91,456)   |
| 4 Control Alta              | 9 | 0,000000 | 0,000000 | (-0,566717; | 0,566717) |
| 4 Control Baja              | 9 | 11,222   | 0,833    | ( 10,656;   | 11,789)   |
| 4 Control Recub sin Inóculo | 9 | 0,000000 | 0,000000 | (-0,566717; | 0,566717) |

Desv.Est. agrupada = 0,863795

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| C1                          | N | Media    | Agrupación |
|-----------------------------|---|----------|------------|
| 3 Control 5% sin inoc       | 9 | 100,0    | A          |
| 3 Control 1% sin inoc       | 9 | 100,0    | A          |
| 2 Control Baja              | 9 | 100,0    | A          |
| 2 Control 5% sin inoc       | 9 | 100,0    | A          |
| 2 Control 1% sin inoc       | 9 | 100,0    | A          |
| 2 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0    | A          |
| 2 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0    | A          |
| 1 Control Recub sin Inóculo | 9 | 100,0    | A          |
| 1 Control Baja              | 9 | 100,0    | A          |
| 1 Control Alta              | 9 | 100,0    | A          |
| 1 Control 5% sin inoc       | 9 | 100,0    | A          |
| 1 Control 1% sin inoc       | 9 | 100,0    | A          |
| 1 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0    | A          |
| 1 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 100,0    | A          |
| 1 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 100,0    | A          |
| 1 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 100,0    | A          |
| 2 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 91,778   | B          |
| 2 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 91,778   | B          |
| 2 Control Recub sin Inóculo | 9 | 91,556   | B          |
| 4 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 91,111   | B          |
| 4 Control 5% sin inoc       | 9 | 90,889   | B          |
| 3 5%AEO Baja con Rec        | 9 | 90,889   | B          |
| 3 Control Baja              | 9 | 70,111   | C          |
| 3 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 69,889   | C          |
| 3 Control Recub sin Inóculo | 9 | 60,89    | D          |
| 4 Control 1% sin inoc       | 9 | 60,778   | D          |
| 4 1%AEO Baja con Rec        | 9 | 50,111   | E          |
| 3 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 42,111   | F          |
| 2 Control Alta              | 9 | 41,222   | F          |
| 3 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 21,444   | G          |
| 4 Control Baja              | 9 | 11,222   | H          |
| 4 5%AEO Alta con Rec        | 9 | 11,000   | H          |
| 3 Control Alta              | 9 | 10,778   | H          |
| 4 Control Recub sin Inóculo | 9 | 0,000000 | I          |
| 4 Control Alta              | 9 | 0,000000 | I          |
| 4 1%AEO Alta con Rec        | 9 | 0,000000 | I          |



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

- **Análisis de los valores por semanas**

**A los 7 días**

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 0,09259   | 0,01852   | 0,20    | 0,961   |
| Error  | 48 | 4,44444   | 0,09259   |         |         |
| Total  | 53 | 4,53704   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,304290 | 2,04%   | 0,00%              | 0,00%          |

Medias

| Factor               | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%         |
|----------------------|---|--------|-----------|-------------------|
| 1 1%AEO Alta con Rec | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,685; 100,093) |
| 1 5%AEO Alta con Rec | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,685; 100,093) |
| 1 Control Alta       | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,685; 100,093) |
| 1 1%AEO Baja con Rec | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,685; 100,093) |
| 1 Control Baja       | 9 | 99,889 | 0,333     | (99,685; 100,093) |
| 1 5%AEO Baja con Rec | 9 | 100,0  | 0,0       | ( 99,8; 100,2)    |

Desv.Est. agrupada = 0,304290

**A los 15 días**

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores  |
|--------|---------|--|
| Factor | 6       | 2 1%AEO Alta con Rec; 2 5%AEO Alta con Rec; 2 Control Alta; 2 1%AEO Baja con |
|        |         | Rec; 2 Control Baja; 2 5%AEO Baja con Rec                                    |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 23822,8   | 4764,55   | 5623,73 | 0,000   |
| Error  | 48 | 40,7      | 0,85      |         |         |
| Total  | 53 | 23863,4   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,920447 | 99,83%  | 99,81%             | 99,78%         |

Medias

| Factor               | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|----------------------|---|--------|-----------|------------------|
| 2 1%AEO Alta con Rec | 9 | 91,778 | 1,394     | (91,161; 92,395) |
| 2 5%AEO Alta con Rec | 9 | 91,778 | 1,394     | (91,161; 92,395) |

|                      |   |        |       |                  |
|----------------------|---|--------|-------|------------------|
| 2 Control Alta       | 9 | 41,222 | 1,093 | (40,605; 41,839) |
| 2 1%AEO Baja con Rec | 9 | 100,0  | 0,0   | ( 99,4; 100,6)   |
| 2 Control Baja       | 9 | 100,0  | 0,0   | ( 99,4; 100,6)   |
| 2 5%AEO Baja con Rec | 9 | 100,0  | 0,0   | ( 99,4; 100,6)   |

Desv.Est. agrupada = 0,920447

### A los 21 días

Información del factor

Factor Niveles Valores  
 Factor 6 3 1%AEO Alta con Rec; 3 5%AEO Alta con Rec; 3 Control Alta; 3  
 1%AEO Baja con Rec; 3 Control Baja; 3 5%AEO Baja con Rec

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Factor | 5  | 43950,8   | 8790,15   | 9307,22 | 0,000   |
| Error  | 48 | 45,3      | 0,94      |         |         |
| Total  | 53 | 43996,1   |           |         |         |

Resumen del modelo

| S        | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|----------|---------|--------------------|----------------|
| 0,971825 | 99,90%  | 99,89%             | 99,87%         |

Medias

| Factor               | N | Media  | Desv.Est. | IC de 95%        |
|----------------------|---|--------|-----------|------------------|
| 3 1%AEO Alta con Rec | 9 | 21,444 | 1,130     | (20,793; 22,096) |
| 3 5%AEO Alta con Rec | 9 | 42,111 | 1,269     | (41,460; 42,762) |
| 3 Control Alta       | 9 | 10,778 | 0,833     | (10,126; 11,429) |
| 3 1%AEO Baja con Rec | 9 | 69,889 | 0,928     | (69,238; 70,540) |
| 3 Control Baja       | 9 | 70,111 | 0,782     | (69,460; 70,762) |
| 3 5%AEO Baja con Rec | 9 | 90,889 | 0,782     | (90,238; 91,540) |

Desv.Est. agrupada = 0,971825

### A los 25 días

Información del factor

Factor Niveles Valores  
 Factor 6 4 1%AEO Alta con Rec; 4 5%AEO Alta con Rec; 4 Control Alta; 4  
 1%AEO Baja con Rec; 4 Control Baja; 4 5%AEO Baja con Rec

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F  | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|----------|---------|
| Factor | 5  | 59462,5   | 11892,5   | 22533,17 | 0,000   |
| Error  | 48 | 25,3      | 0,5       |          |         |
| Total  | 53 | 59487,9   |           |          |         |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---|---------|--------------------|----------------|
|   |         |                    |                |

0,726483    99,96%    99,95%    99,95%

## Medias

| Factor               | N | Media    | Desv.Est. | IC de 95%             |
|----------------------|---|----------|-----------|-----------------------|
| 4 1%AEO Alta con Rec | 9 | 0,000000 | 0,000000  | (-0,486897; 0,486897) |
| 4 5%AEO Alta con Rec | 9 | 11,000   | 0,707     | ( 10,513; 11,487)     |
| 4 Control Alta       | 9 | 0,000000 | 0,000000  | (-0,486897; 0,486897) |
| 4 1%AEO Baja con Rec | 9 | 50,111   | 0,928     | ( 49,624; 50,598)     |
| 4 Control Baja       | 9 | 11,222   | 0,833     | ( 10,735; 11,709)     |
| 4 5%AEO Baja con Rec | 9 | 91,111   | 1,054     | ( 90,624; 91,598)     |

Desv.Est. agrupada = 0,726483