



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**“CALIDAD MICROBIOLÓGICA, QUÍMICA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS  
EN LA DESHIDRATACIÓN DE ALBAHACA Y ORÉGANO”**

**ALFRICIA ADRIANA DE LOS SANTOS VILLAMIL**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITOS PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

***DOCTORA EN CIENCIAS***

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2016**

La presente tesis, "Calidad microbiológica, química y compuestos bioactivos en la deshidratación de albahaca y orégano", realizada por la alumna: "Alfricia Adriana de los Santos Villamil" bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

  
DRA. SOCORRO ANAYA ROSALES

DIRECTORA DE TESIS:

  
DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESORA:

  
DRA. MA. DE LOURDES ARÉVALO GALARZA

ASESOR:

  
DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR:

  
DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

ASESORA:

  
DRA. MA. TERESA SANTILLAN GALICIA

Montecillo, Texcoco, México, Agosto de 2016.

# CALIDAD MICROBIOLÓGICA, QUÍMICA Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA DESHIDRATACIÓN DE ALBAHACA Y ORÉGANO

Alfricia Adriana de los Santos Villamil, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN

En esta investigación se determinó el efecto de diferentes métodos de deshidratación en la conservación de compuestos bioactivos, estabilidad del color, rendimiento y composición química de los aceites esenciales, y calidad microbiológica en hojas de *Ocimum basilicum* y *Origanum vulgare*. El material vegetal se colectó en cultivos comerciales ubicados en San Gregorio Zacatechpan, Puebla, México. Ambas especies se deshidrataron a temperatura ambiente (DA), solar con cubierta (DSC) y por convección con aire caliente (DC) a 40, 45 y 50 °C. El contenido y actividad de los compuestos bioactivos se evaluaron considerando su actividad antioxidante (CI<sub>50</sub>), contenido de pigmentos fotosintéticos, fenoles y flavonoides. Además se determinó el rendimiento y la composición química de los aceites esenciales de estas especies. La calidad sanitaria e inocuidad del producto fue monitoreada por la presencia de microorganismos indicadores y patógenos. *Ocimum basilicum* fue la más sensible al calor, los mejores métodos de deshidratación fueron la DA y DC a 40 y 45 °C, donde se observó una mejor estabilidad de los compuestos bioactivos, color y aceites esenciales. Para *Origanum vulgare*, el método DSC mostró una mejor preservación de fenoles y flavonoides totales; mientras la DC a 50 °C mantuvo el color verde oscuro. Los aceites esenciales no mostraron diferencias entre los métodos de deshidratación. Ninguno de los métodos de deshidratación evaluados garantizan la calidad sanitaria ni la inocuidad de los productos deshidratados de *Ocimum basilicum* y *Origanum vulgare*.

**Palabras clave:** *Ocimum basilicum*; *Origanum vulgare*; actividad antioxidante; compuestos bioactivos; deshidratación solar.

# MICROBIOLOGICAL QUALITY, CHEMISTRY AND BIOACTIVE COMPOUNDS IN THE DEHYDRATION OF BASIL AND OREGANO

Alfricia Adriana de los Santos Villamil, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## Abstract

The aim of this research was to determine the effect of different dehydration methods on bioactive compounds content, color stability, essential oils content and their chemical composition, and microbiological quality in leaves from *Ocimum basilicum* and *Origanum vulgare*. The plant material was sampled from commercial crops at San Gregorio Zacapechpan, Puebla, Mexico. Both species were dried at room temperature (RT), Solar with cover (SWC), hot air convection (HAC) at 40, 45 and 50°C. The bioactive compounds content and activity were evaluated on regard to photosynthetic pigments, total phenols, total flavonoids and antioxidant activity. Furthermore, the essential oil yield and chemical composition from these species were determined. Sanitary and microbiological safety was monitored by the presence of indicators and pathogenic microorganisms. *Ocimum basilicum* was more sensitive to hot methods; the best dehydration methods were HAC at 40 and 45 °C, where a better stability of the bioactive compounds, color and essential oils were observed. For *Origanum vulgare*, the SWC method showed a good total phenols and flavonoids preservation, meanwhile HAC at 50 °C showed a conservation for dark green color. Essential oils did not show differences among dehydration methods. None of the dehydration tested methods ensure the Sanitary and microbiological safety for *Ocimum basilicum* and *Origanum vulgare* dry products production.

**Key words:** *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, antioxidant activity, bioactive compounds, solar dehydration.

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que a través del pago de sus impuestos contribuyen a la beca que nos otorga CONACyT.

Le doy las gracias especialmente a la Dra Adriana Delgado Alvarado y al Dr. Edgar Herrera Cabrera por haberme apoyado incondicionalmente durante toda la investigación.

A todo el equipo de trabajo Dra. Socorro Anaya Rosales, Dra. Ma. De Lourdes Arévalo Galarza, Dr. Marcos Soto Hernández, Dr. Gabriel Leyva Ruelas, Dra. Ma. Teresa Santillan y al Dr. Amado Enrique Navarro Frómeta. Gracias por sus enseñanzas y contribuciones al trabajo de investigación.

A la Dra. Patricia Ramírez Carrasco, a la cDra. Alma Cuellar Sánchez, al M.C. Luis Francisco Salomé Abarca a la Ing. Alejandra Daniel, a la Ing. Valeria Téllez y al M.C. Jorge Antonio Herrera Cárdenas por su valioso apoyo en el laboratorio.

A todos los maestros que contribuyeron durante toda mi formación académica, les agradezco su paciencia y las enseñanzas brindadas.

A mis compañeros y amigos que hicieron que el trabajo en el laboratorio fuera ameno Diego Ibarra, Paula Fuentes, Guadalupe Andrade, Reyna Xochipa, Gabriela Mendoza, Iván Lenin y Berenice.

Al Dr. Rafael Ambríz Cervantes, M.A. José Luis Arizmendi Bahena y al Dr. Jaime Poblete Vargas por su valioso apoyo y comprensión.

Al personal del Campus Puebla especialmente a Ma. de Lourdes Rivas y a las Secretarias Irene Meza y Silvia Colín del Campus Montecillo por brindarme su valioso apoyo en los momentos más requeridos.

## *Dedicatoria*

*Todo el esfuerzo realizado lo dedico con todo cariño a:*

*A Dios y a toda su hueste celestial por darme paciencia, comprensión, fortaleza y la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos.*

*A mis padres Alfredo y Leticia por todo su amor y esfuerzos brindados.*

*A todos mis ancestros y familiares Celia, Julio†, Julio Tomas, Federico, Margarita, Margarita I., Alan, J. Leonel, Maritza, Irene y Bartolome†.*

*A Rodrigo Venancio, por su amor comprensión y paciencia*

*A mis amigos (as) la Sra. Lulú, Alma Noir, Paty, Petra A. O., Luis Francisco S. A., Josúe Napoleón, Yair Barrales, Alma Rosa S.B., Jahzeel, M. Vinicio, Diana Reyna, Patricia Landa, Ricardo Castro, José Manuel P. y Marcos Ventura, con los que compartimos momentos inolvidables.*

## CONTENIDO

RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos	3
1.2 Hipótesis	4
<b>CAPÍTULO II. MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>5</b>
2.1 Hierbas aromáticas	5
2.1.1 Importancia económica de albahaca y orégano	5
2.1.2 Descripción botánica	6
2.1.3 Composición química de albahaca y orégano	7
2.1.4 Calidad y manejo postcosecha	8
2.2 Deshidratación	8
2.2.1 Tipos de deshidratación	9
2.2.2 Cambios físicos y químicos que ocurren en la deshidratación	13
2.2.2.1 Crecimiento de microorganismos	13
2.2.2.2 Reacciones enzimáticas	14
2.2.2.3 Reacciones no enzimáticas	14
2.2.2.4 Reacciones de oxidación lipídica	15
2.2.2.5 Degradación de vitaminas	16
2.2.2.6 Encogimiento y rugosidad	16
2.2.2.7 Propiedades reológicas	17
2.2.2.8 Evaporación de compuestos volátiles	18
2.2.2.9 Incremento en la concentración de los solutos	19
2.2.2.10 Cambios en color	19
2.3 Literatura citada	21
<b>CAPÍTULO III. EFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESHIDRATACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES DE HIERBAS AROMÁTICAS</b>	<b>25</b>
3.1 Introducción	25

3.2 Materiales y métodos	27
3.2.1 Material vegetal	27
3.2.2 Deshidratación	27
3.2.3 Evaluación de color	28
3.2.4 Preparación del extracto	29
3.2.5 Actividad antioxidante	29
3.2.6 Determinación de fenoles totales	30
3.2.7 Determinación de flavonoides totales	30
3.2.8 Determinación de pigmentos fotosintéticos	30
3.2.9 Análisis estadísticos	31
3.3 Resultados y discusión	32
3.3.1 Tipos de deshidratación	32
3.3.2 Color	36
3.3.3 Actividad antioxidante	37
3.3.4 Fenoles totales	38
3.3.5 Flavonoides totales	40
3.3.6 Pigmentos fotosintéticos	40
3.4 Conclusión	41
3.5 Literatura citada	42

**CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE SECADO EN ALBAHACA (*O. basilicum*) Y ORÉGANO (*O. vulgare*) EN EL CONTENIDO DE ACEITES ESENCIALES**

	45
4. 1 Introducción	45
4.2 Materiales y métodos	47
4.2.1 Deshidratación	47
4.2.2 Extracción de aceites esenciales	47
4.2.3 Preparación de la muestra para cromatografía de gases masa	48
4.2.4 Análisis estadístico	49
4.3 Resultados y discusión	49
4.3.1 Rendimiento de aceites esenciales	49
4.3.2 Compuestos volátiles de la albahaca	51
4.3.3 Compuestos volátiles del orégano	54
4.4 Conclusiones	58
4.5 Literatura citada	60

## **CAPÍTULO V. CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN HOJAS DE ALBAHACA Y ORÉGANO DESHIDRATADAS**

5.1	Introducción	62
5.2	Materiales y métodos	62
5.2.1	Origen de la muestra	63
5.2.2	Deshidratación	64
5.2.3	Análisis microbiológico	65
5.2.3.1	Preparación de la muestra	65
5.2.3.2	Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias (BMA)	65
5.2.3.3	Cuantificación de hongos y levaduras	65
5.2.3.4	Cuantificación de coliformes totales (CT)	65
5.2.3.5	Cuantificación de coliformes fecales (CF)	66
5.2.3.5.1	Identificación y caracterización bioquímica de <i>E. coli</i>	66
5.2.3.6	Detección de <i>Salmonella</i> spp.	67
5.3	Resultados y discusión	68
5.3.1	Bacterias mesófilas aerobias	68
5.3.2	Hongos y levaduras	70
5.3.3	Coliformes totales y fecales	72
5.3.4	Presencia de <i>E. coli</i>	73
5.3.5	Presencia de <i>Salmonella</i> spp.	75
5.4	Conclusión	79
5.5	Literatura citada	80
	<b>CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>84</b>
6.1	Conclusiones generales	90
6.2	Literatura citada	91

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1.</b> Tiempo de deshidratación, porcentaje de humedad y actividad de agua (Aw) a las diferentes temperaturas de deshidratación en hojas de albahaca, orégano y perejil.	34
<b>Cuadro 3.2.</b> Medias de actividad antioxidante, fenoles totales, flavonoides totales y pigmentos fotosintéticos de albahaca, orégano y perejil en hojas frescas y deshidratadas.	39
<b>Cuadro 4.1.</b> Composición química de los aceites esenciales de albahaca después de ser sometidos a procesos de deshidratación (Porcentaje de área).	52
<b>Cuadro 4. 2.</b> Composición química de los aceites esenciales de orégano después de ser sometidos a procesos de deshidratación (Porcentaje de área).	55
<b>Cuadro 5.1.</b> Relación de tratamientos de deshidratación para ambas muestras vegetales.	63
<b>Cuadro 5.2.</b> Análisis microbiológico de hojas albahaca en fresco y después de ser sometidas a diferentes procesos de deshidratación.	76
<b>Cuadro 5.3</b> Análisis microbiológico de hojas de orégano en fresco y después de ser sometidas a diferentes procesos de deshidratación.	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Transición vítrea en función con la humedad y temperatura (Bonazzi y Dumoulin, 2011).	17
<b>Figura 3.1.</b> Cinéticas de deshidratación de albahaca, orégano y perejil.	33
<b>Figura 3.2.</b> Índice de color (IC) de los diferentes métodos de deshidratación de hojas de albahaca, orégano y perejil.	37
<b>Figura 4.1.</b> Rendimiento de aceites esenciales obtenidos de las hojas deshidratadas de albahaca y orégano.	50
<b>Figura 6.1.</b> Dispersión de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de albahaca, basadas en los primeros tres componentes principales, respecto a las variables fitoquímicas y microbiológicas.	84
<b>Figura 6.2.</b> Dendograma de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de albahaca /variables fitoquímicas y microbiológicas.	86
<b>Figura 6.3.</b> Dispersión de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de orégano, basadas en los primeros tres componentes principales, respecto a las variables fitoquímicas y microbiológicas.	88
<b>Figura 6.4.</b> Dendograma de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de orégano /variables fitoquímicas y microbiológicas.	89

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las hierbas aromáticas tienen una gran diversidad de usos, entre los que destacan la industria alimentaria y farmacéutica, perfumería, como biocidas, entre otras (Lubbe y Verpoorte, 2011). En México se cultivan alrededor de 30 especies, entre las que destacan por su valor económico el albahaca y el orégano, por su demanda en los mercados de USA y países de la Unión Europea ((Juárez-Rosete *et al.*, 2013). Verdugo y Flores, 2012).

Debido a que las hierbas aromáticas y las especias son altamente perecederas después de la cosecha necesitan ser preservadas para evitar el deterioro biológico (Cantwell y Reid, 1993). La refrigeración y la deshidratación (Delgado y Silva, 2014) son técnicas que incrementan la vida de anaquel, no obstante en general afectan la calidad del producto, provocando pérdida de compuestos volátiles, sabor, color y textura característicos así como la disminución en el valor nutricional, contrastando con la demanda creciente de los consumidores a comprar productos con las características originales (Arijana *et al.*, 2014).

La albahaca y el orégano se comercializan principalmente en estado fresco, y muy poco en forma deshidratada. Existen muchos estudios relacionados al manejo postcosecha de hierbas finas, que se enfocan a temperaturas de refrigeración y atmósferas controladas (Lopresti y Tomkins., 1997). Sin embargo, existe poca información con respecto a la calidad nutracéutica y microbiológica de la albahaca y el orégano después de ser sometidas a un proceso de deshidratación.

La deshidratación es probablemente el método de conservación de alimentos más antiguo y más frecuentemente usado (Hayta, 2002). Actualmente es una técnica

generalizada y versátil en la industria de alimentos. Existen diversos métodos de deshidratación entre los que se encuentra el solar, osmótico, uso de microondas, el vacío, por convección, por congelación con vapor supercaliente, por aspersion entre otros (Sagar y Kummar, 2010). Cada uno tiene sus propias características de manejo y en algunos casos está determinado para ciertos productos. La deshidratación es un método de conservación de alimentos que reduce el contenido de agua y con ello, disminuye la actividad enzimática e inhibe el crecimiento microbiano, aumentando la vida de anaquel del producto (Delgado y Silva, 2014). Sin embargo, en la última década se han reportado brotes de *Salmonella* spp. en especias deshidratadas (Zweifel y Stephan, 2012). Este tipo de bacteria causa pérdidas económicas debido al retiro de especias en el mercado (Vij *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta lo anterior se requiere conocer la calidad nutracéutica y microbiológica de las hojas de albahaca y orégano después de ser sometidas a procesos de deshidratación

## **1.1 OBJETIVOS**

### **General**

Analizar el efecto de tres métodos de secado (secado a temperatura ambiente, deshidratación solar y deshidratación por convección), desde el punto de vista fitoquímico y microbiológico para la deshidratación de albahaca y orégano.

### **Específicos**

1. Determinar el efecto de los procesos y condiciones de secado, en el contenido y calidad química de los compuestos bioactivos de orégano y albahaca.
2. Estimar el contenido y composición de los aceites esenciales de albahaca y orégano después de ser sometidos a los diferentes procesos de secado.
3. Evaluar la calidad sanitaria de las hojas de albahaca y orégano deshidratadas por los tres diferentes métodos.

## 1.2 HIPÓTESIS

### **General**

La deshidratación solar preserva los compuestos bioactivos de la albahaca y el orégano, en comparación con la deshidratación por convección y a temperatura ambiente.

### **Específicas**

1. La deshidratación altera la concentración de los compuestos bioactivos en las hojas deshidratadas de albahaca y orégano.
2. Los procesos de deshidratación modifican el contenido y la composición de los aceites esenciales de la albahaca y orégano.
3. El método de deshidratación influye en la carga microbiológica las hojas deshidratadas de albahaca y el orégano.

## CAPITULO II. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 Hierbas aromáticas

Las hierbas aromáticas son plantas anuales o perenes que se distinguen por sus hojas y tallos suaves de olor y sabor característico entre las que se encuentran el cilantro, perejil, menta, orégano, mejorana, albahaca, romero entre otras (Schweiggert *et al.*, 2007). Los principales usos de éstas son el culinario y medicinal, en ambos casos se valora el color, aroma y sabor, siendo muchas de ellas son comercializadas de manera deshidratada. Las hojas secas de albahaca son ampliamente usadas para mejorar el sabor de los alimentos tales como salsas, ensaladas, pastas y pizzas. En México se han identificado 5,000 especies de hierbas aromáticas y medicinales, empleadas desde tiempos prehispánicos para combatir diversos tipos de dolencias e impartir aroma a los platillos, entre otros usos. De ahí su importancia sociocultural y económica (Juárez- Rosete *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Importancia económica de albahaca y orégano

En las últimas décadas se han presentado efectos nocivos a la salud por el abuso de sustancias químicas (aditivos alimentarios y agroquímicos), aunado al estilo de vida más ajetreado, por consiguiente los individuos buscan alternativas, de consumo enfocados a productos naturales. Ante este escenario, las plantas aromáticas tienen un potencial de uso a desarrollar, ya que han mostrado tener propiedades bactericidas, fungicidas y bioinsecticidas.

Las hierbas aromáticas han ganado cada vez más atención por los consumidores, y la comunidad científica, debido a las propiedades medicinales atribuido a su capacidad antioxidante. La albahaca es una hierba aromática

ampliamente conocida a nivel mundial, la clasifican entre el segundo y tercer lugar en el mercado de hierbas finas (Arijana *et al.*, 2014). En México se cultiva en los estados de Baja California Norte (194.5 Ton) Baja California Sur (2,126 Ton), Nayarit (650.88 Ton), Puebla (270 Ton) y Morelos (263.49 Ton). En tanto, el orégano ocupa el quinto lugar en la producción de hierbas aromáticas y se cultiva principalmente en los estados de Baja California Norte (4.5 Ton), Baja California Sur (28.7 Ton), Estado de México (27.75 Ton), Puebla y Morelos, aunque en estos dos últimos no se reportan cifras (SIAP, 2014).

### **2.1.2. Descripción botánica**

La albahaca pertenece al género *Ocimum* tiene más de 150 especies, se distribuye ampliamente en diversas regiones geográficas con clima templado, tropical y subtropical. Existen alrededor de seis variedades de albahaca entre las que se encuentran *O. americanum*, *O. canum*, *O. basilicum*, *O. gratissimum*, *O. kilimandscharicum*, *O. viride* (Vasudevan *et al.*, 1999) *O. lactucaefolium* (Sánchez *et al.*, 2000) y *O. sanctun* L. (albahaca morada) (Deás *et al.*, 1997). Es muy valorada en la industria de perfumería y cosméticos, la alimentaria y la farmacéutica. (Sánchez *et al.*, 2000).

*Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca) perteneciente a la familia Lamiaceae, es una planta herbácea de 20 a 50 cm de altura con tallo erecto. Las hojas son opuestas, amplias, ovaladas y puntiagudas, sus flores son bilabiadas blancas. Su habitat es de climas cálidos y templados, se propaga por semilla durante todo el año (Jiménez, 2011).

El orégano pertenece al género *Origanum* es miembro de la familia Laminaceae el cual está conformado por 43 especies. Las especies que destacan son: orégano

mejorana (*O. mejorana*), orégano de Creta (*O. dictamnus*), orégano Italiano (*O. onites*), orégano griego (*O. heracleoticum*), orégano silvestre de Turquía (*O. vulgare*) y orégano de Siria (*O. syriacum*) (Krishnakumar y Potty, 2012). El *O. vulgare* es una planta aromática herbácea crece alrededor de 30 a 60 cm de altura; sobre el tallo se desarrollan un gran número de hojas elípticas pequeñas (21 X 11 mm.), con margen entero y presenta pubescencia. Sus flores son pequeñas, de color blanco (Krishnakumar y Potty, 2012). Se desarrolla en altitudes de 0 a 1,900 m.s.n.m. con temperaturas entre los 13 y 18 °C (ICA, 2011).

### **2.1.3 Composición química de albahaca y orégano**

Las especies y las hierbas tienen una gran diversidad histológica y química (Peter, 2001; Tainter y Grenis, 2001). Las especies de la familia Lamiaceae son valoradas debido a sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo el aceite de sus hojas es utilizado como antioxidante. Muchos estudios científicos muestran que el extracto de albahaca es un fuerte captador de radicales libres y puede ser considerado como un buen antioxidante natural (Leal *et al.*, 2008). Javanmardi y colaboradores (2003) sugieren que la capacidad antioxidante de la albahaca no es únicamente de los compuestos fenólicos sino que también se debe a la presencia de metabolitos secundarios, tales como aceites volátiles, carotenoides, vitaminas y otros compuestos. Ellos muestran que el extracto de albahaca tiene efecto sinérgico antioxidante entre ácido rosmarínico y  $\alpha$ -tocoferol. Otro trabajo demostró que los extractos acuosos tienen una acción en el sistema cardiovascular y los extractos alcohólicos tienen una actividad similar a la atropina (Leal *et al.*, 2008). El albahaca tiene compuestos fenólicos (especialmente por el ácido rosmarínico y ácido cafeíco) que son caracterizados por su alta capacidad antioxidante (Calín-Sánchez *et al.*, 2012).

En orégano se han encontrado flavonoides (apigenina y luteolina), alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. También ácidos como: coumérico, ferulico, caféico, p-hidrobencóico y vainillínico (Arcila-Lozano *et al.*, 2004). El aceite esencial de *O. vulgare* contiene carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno,  $\rho$ -cimeno, limoneno entre otros (Figiel *et al.*, 2010).

#### **2.1.4 Calidad y manejo postcosecha**

Las plantas después de ser cortadas o cosechadas son muy susceptibles a sufrir daños por la manipulación, la senescencia y posibles problemas microbiológicos. Las hierbas frescas de la familia Lamiaceae presentan senescencia acelerada por alta intensidad respiratoria. El manejo de estas plantas se ha enfocado al cultivo (fertilización, etapa fenológica y hora de corte entre otros) y en postcosecha a la selección de empaques, tratamientos con atmósferas modificadas y controladas, manejo de la temperatura y la humedad relativa durante su almacenamiento (Yahia, 2006).

#### **2.2 Deshidratación**

La deshidratación es una técnica generalizada y versátil en la industria de alimentos, también es un tema de continuo interés para la investigación. Las propiedades físicas y químicas de plantas aromáticas y medicinales son determinadas por su contenido de humedad (Rocha *et al.*, 2001). El término deshidratación se refiere a un proceso basado en la transferencia de calor y movimiento de aire en un sistema cerrado, donde hay una remoción de humedad de un material con el objetivo de reducir la actividad microbiana y deterioro del producto. En adición a la conservación, se reduce peso y volumen de los productos deshidratados, disminuyendo los costos de manipulación, empaque y transporte. Además la

mayoría de productos alimentación son deshidratados para mejorar la molienda o las características de mezclado en su posterior procesamiento. Los mejores productos a deshidratar son los polvos para bebidas instantáneas, mezclas de sopas secas, especias, café e ingredientes usados en la transformación de alimentos (Hayta, 2002).

### **2.2.1 Tipos de deshidratación**

La amplia variedad de métodos para la deshidratación de alimentos, permite la elección de un sistema óptimo que ayude a mantener la calidad del producto, disminuya costos, eficiente y reduzca los tiempos de secado (Hayta, 2002).

#### **2.2.1.1 Deshidratado solar**

La importancia de la deshidratación solar va en aumento a nivel mundial, especialmente es una ventaja donde el uso es abundante, renovable y la energía solar es limpia (Sagar y Kummar, 2010). La elección del método de deshidratación depende de varios factores como el tipo de producto, el costo, la calidad final del producto seco, la higiene, consumo de energía (Sagar y Kummar, 2010) condiciones ambientales donde se realizara el proceso.

El deshidratado solar es una buena alternativa por ser económico y bajo algunas consideraciones higiénicas es altamente recomendable pues reduce el uso de combustibles fósiles y energía eléctrica. Sin embargo, esta tiene algunas limitaciones como escaso o nulo control sobre los parámetros de secado, clima incierto, requiere áreas amplias para secar, infestación por insectos, contaminación con polvos sucios u otros materiales indeseables (Hayta, 2002; Jimoh *et al.*, 2010; Sagar y Kummar, 2010).

### **2.2.1.2 Deshidratado por convección**

Es uno de los métodos más frecuentemente usados (Jimoh *et al.*, 2010), involucra la exposición de un alimento, tales como granos, frutas o vegetales a altas temperaturas (80 °C) por largos periodos de tiempo, lo cual induce un número de cambios fisicoquímicos en el producto, que se refleja en cambios al sabor, color y calidad de los nutrientes del alimento tratado (Vadivambal y Jayas, 2007). Tiene muchos inconvenientes como cambios y pérdidas de propiedades físicas y químicas de un alimento, afecta el color, la estructura, el aroma, los tejidos celulares entre otras características (Sagar y Kummar, 2010). Además los productos deshidratados tienen poco margen para la rehidratación y poca calidad. Una de las principales causas del deterioro de la calidad es el uso de altas temperaturas. Si se reducen las temperaturas de los procesos se puede mejorar la calidad de los del producto deshidratado. Sin embargo, tales condiciones, el tiempo de operación, pueden resultar incosteables económicamente (Sagar y Kummar, 2010).

### **2.2.1.3 Deshidratación osmótica**

Es un proceso parcial del secado. Aunque no remueve la suficiente humedad para ser considerada como un deshidratado. Este es un pre-tratamiento que se le da al alimento antes de ser deshidratado por cualquier método. La solución hipertónica (muy concentrada), proporciona una fuerza que conduce un desplazamiento de agua que se encuentra en el interior del tejido, por la solución osmótica, aumentando la concentración en la célula, mientras algunos constituyentes de los tejidos son esparcidos al medio circundante. Esto con lleva a que los ácidos orgánicos, los azúcares y otros compuestos originales del alimento son remplazados por azúcar (Lewicki y Lukaszuk, 2000). La transferencia de masa en este pre-tratamiento es baja, la presión hidrostática es alta, pulsos de campo eléctrico son de alta intensidad.

(Sagar y Kummar, 2010). Todo ello, hace que la composición química del tejido de la planta se modifique; así como también sus propiedades físicas. Cuando se combina la solución osmótica a bajas concentraciones con la deshidratación por convección resulta una estructura porosa, mientras que las propiedades mecánicas también son modificadas por la sustancia osmótica (azúcares) (Lewicki y Lukaszuk, 2000).

En este sentido, hay varios aspectos que se consideran como las concentraciones de los agentes osmóticos, temperatura, relación de muestra con la solución, agitación del alimento con el jarabe, tamaño y forma de la muestra, el método de deshidratación a emplear entre otros factores. Las ventajas de la deshidratación osmótica es que se reduce de 20 a 30 % el consumo de energía, acorta los tiempos de secado y reduce los daños en el producto. Si una fuerza centrífuga (64 g) es aplicada durante la deshidratación osmótica se puede obtener hasta un 15 % de transferencia de masa. (Sagar y Kummar, 2010).

#### **2.2.1.4 Liofilización**

Método de deshidratación que consta de tres etapas: a) congelación del alimento, b) sublimación del hielo a baja presión c) secado secundario se evapora el agua no congelada, que se encuentra absorbida por los componentes del alimento (Vega-Mercado, *et al.*, 2001). La liofilización preserva las características del alimento fresco, por lo que se obtienen productos de alta calidad en comparación con otros métodos de secado. Sin embargo, el equipo es costoso y consume mucha energía, lo que limita su aplicación (Arijana *et al.*, 2014).

#### **2.2.1.5 Alta presión hidrostática**

La aplicación de alta presión hidrostática daña la estructura de la pared celular y esto provoca cambios significativos en la arquitectura del tejido, dejando las células

más permeables, de tal manera que facilita la pérdida de humedad (Sagar y Kummar, 2010).

#### **2.2.1.6 Campo eléctrico pulsado**

Este tratamiento se usa como un pre-tratamiento de secado causa un incremento en la permeabilidad de las células de las plantas. Además induce un daño en las células reblandeciendo el tejido, el cual pierde la turgencia, que conduce a una reducción resistencia a la compresión. El coeficiente de difusión efectivo del agua y soluto incrementa exponencialmente con la intensidad del campo eléctrico. Este también se atribuye a un incremento en la permeabilidad de la pared celular, la cual facilita el transporte de agua y solutos (Sagar y Kummar, 2010). En paprika, los tiempos de secado se reducen un 25 % y en manzana deshidratada se incrementa la velocidad de rehidratación siempre y cuando se seque a una máxima de 45 °C (Taiwo *et al.*, 2003).

#### **2.2.1.7 Deshidratación por microondas**

La industria de los alimentos se está enfocando a usar energía de microondas, para el secado de pastas, e ingredientes para galletas. La deshidratación con microondas crea una transferencia de humedad conduciendo un gradiente en la presión de vapor de agua entre la superficie y la parte interna del material como en un método convencional de secado. Las aplicaciones con microondas a vegetales tiene varias ventajas como reducir significativamente el tiempo de secado, distribución de la energía de manera homogénea en el material y un producto deshidratado con buenas características visuales y de aroma (Oscan, y Akbudak, 2005; Vadivambal y Jayas, 2007). Otra modalidad es el vacío- microondas (VM) se utiliza como un pre-tratamiento de la deshidratación por convección, está

combinación resulta ser una técnica muy eficiente, ya que reduce costos totales y mejora la calidad comercial del producto deshidratado. Durante el proceso de VM, la energía de microonda es absorbida por las moléculas de agua localizadas en todo el material a deshidratar. Cuando baja la presión induce una evaporación muy rápida del agua contenida en el material con una baja temperatura. Las pérdidas de compuestos volátiles y apariencia, que se originan durante la deshidratación con microondas varían considerablemente de una especie a otra, aunque también hay incremento en algunos compuestos tales como monoterpenos y sesquiterpenos, por ejemplo el timol en tomillo y orégano (Calín-Sánchez *et al.*, 2012). Una desventaja del microondas es que la instalación es relativamente cara (Sagar y Kummar, 2010).

### **2.2.2 Cambios físicos y químicos que ocurren en la deshidratación**

Todas las reacciones bioquímicas están vinculados a la composición del producto, temperatura y a la disponibilidad de agua ( $A_w$ ). Todas ocurren de manera simultánea, pero para su mejor comprensión se describirán por separado.

#### **2.2.2.1 Crecimiento de microorganismos**

La sobrevivencia de microorganismos provoca sabores indeseables y deterioro del producto. La actividad de agua ( $A_w$ ) es un aspecto primordial en el crecimiento microbiano y producción de toxinas. La mayoría de las bacterias, levaduras y hongos no pueden crecer por debajo de un  $A_w = 0.90$ ,  $0.80$  y  $0.70$  respectivamente (Forsythe, 2003).

### **2.2.2.2 Reacciones enzimáticas**

Las reacciones enzimáticas en alimentos se inhiben con una  $A_w$  menor a 0.75 y depende de la temperatura, ya que las puede promover o inhibir. Estas reacciones afectan la calidad de los nutrientes, color y sabor en los productos. La polifenoloxidasa, es la principal responsable del pardeamiento de frutas y verduras cuando son expuestos al  $O_2$ . Por otro lado, la fosfolipasa causa una hidrólisis en almidón. Otro ejemplo, son las lipasas y oxidasas que degradan a los pigmentos fotosintéticos, provocan cambios de color bronceado y disminuyen a compuestos bioactivos como la clorofila y licopeno. Pero los pre-tratamientos de escaldado pueden inactivarlas y reducir los efectos de degradación (Barbosa- Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

### **2.2.2.3 Reacciones no enzimáticas**

Estas se pueden clasificar en dos tipos de reacciones: caramelización y Maillard. Las reacciones de caramelización se promueven por calentamiento directo de carbohidratos o azúcares, seguida de una condensación; esto provoca una isomerización de aldosas a cetosas, alteraciones en los anillos estructurales, ruptura de enlaces glucosídicos y formación de nuevos enlaces. El pardeamiento, también puede provocarlo el pH, presencia de  $O_2$ , metales, fosfatos y dióxido de azufre (Barbosa- Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

Las reacciones de Maillard, provocan pardeamiento, pérdidas del valor nutritivo y formación de olores y sabores indeseables. Son producidas por una serie de reacciones complejas entre el grupo amino libre de la lisina unida a una proteína y otros aminoácidos o azúcares reductores (grupos carbonilo). Pero para que se desencadene esta serie de reacciones la  $A_w$  debe estar en un rango de 0.65 a 0.70. Se

desarrollan en cinco etapas: condensación, cuando reacciona una aldosa o cetosa con un grupo amino primario (péptido o proteína), se producen glicosilaminas, luego se da la reacción de reordenamiento Amadori provocando la descomposición de cetosaminas, aldosaminas o cetoseaminas. Después sigue la degradación Strecker como resultado de la formación de volátiles orgánicos y compuestos de sabor, por último se da una condensación de los compuestos formados, lo que conduce a la formación de co-polímeros y polímeros marrones nitrogenados, conocidos como melanoidinas (pigmentos). El comportamiento de las reacciones de Maillard responden a los máximos y mínimos de la disponibilidad de agua, a medida que se incrementa la humedad también se acelera la velocidad de pardeamiento y viceversa, se dice que el agua juega un doble papel en la cinética de la reacción de Maillard, como solvente y reactivo, en este punto el problema es la dilución de los compuestos del alimento, causando una disminución en los nutrientes. Además, la temperatura tiene efectos en la velocidad de pardeamiento, en modelos descritos mencionan que por cada 10°C que aumente la temperatura, el pardeamiento aumenta al doble o triple (Bonazzi y Dumoulin, 2011).

#### **2.2.2.4 Reacciones de oxidación lipídica**

Es la responsable de la rancidez, induce sabores desagradables, se pueden perder vitaminas liposolubles y pérdidas de pigmentos en los alimentos secos. Estas reacciones inician con calor, luz, iones metálicos activados, radicales libres y peróxidos. Esta reacción está en función del tipo de lípidos que constituyan al alimento y de la  $A_w$ , la auto-oxidación de ácidos grasos insaturados puede darse con una  $A_w$  menor a 0.2, esto causa sabores rancios. La porosidad del alimento seco desempeña un papel importante, por el contacto con el  $O_2$ , de tal manera que cuando se usa la liofilización recomiendan dar un pre-tratamiento con antioxidantes

(tocoferoles, fenoles como BHA o BHT), con el objetivo de proteger las grasas. Se recomienda empacar al vacío o gas inerte, para prolongar la vida de anaquel.

#### **2.2.2.5 Degradación de vitaminas**

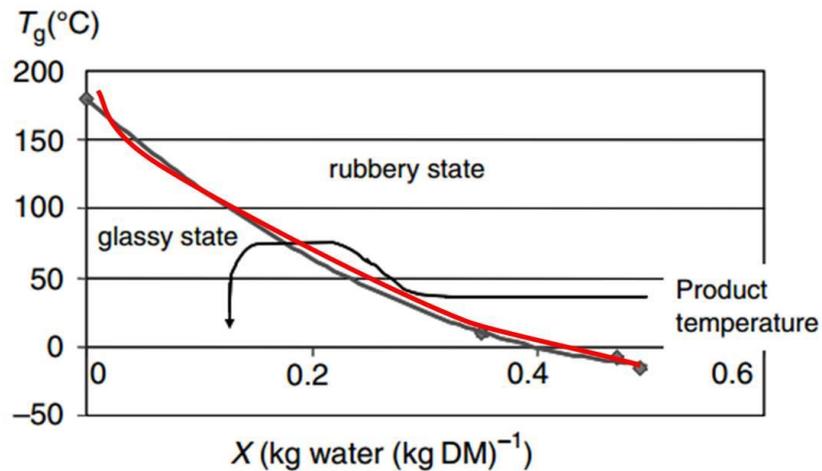
En general las altas temperaturas degradan vitaminas, la vitamina C es un parámetro de calidad, se oxida y se convierte en ácido dehidroascorbico, esta reacción está influenciada por presencia de O<sub>2</sub>, temperatura y la Aw; con la deshidratación disminuye considerablemente. Se dice que cuanto más prolongado es el período de secado (bajas temperaturas, alta humedad relativa, productos de espesor), menor será la retención de ácido ascórbico (Santos y Silva, 2008). La liofilización proporciona una alta retención de vitamina C, debido a las bajas temperaturas, reducen la movilidad de los reactivos, y la reducción de la presión parcial de O<sub>2</sub>. De igual manera los procesos de secado bajo atmósfera inerte (O<sub>2</sub> reducido) mejora la retención de vitamina C.

#### **2.2.2.6 Encogimiento y rugosidad**

El encogimiento y la rugosidad se dan por varias razones, la principal es la pérdida de agua, ya que modifica la estructura celular. Al perder agua las células epidermales y parenquimatosas se colapsan, otras se deforman e incluso pueden llegar a fracturarse, lo que causa el encogimiento de tejido vegetal. Estos cambios dependen del método de deshidratación, generalmente cuando se deshidrata con microondas o por convección con aire caliente, hay ruptura y colapso celular, a medida que se incremente la temperatura o la potencia mayor es el daño (De Bruijn y Bórquez, 2014). En otros casos, como la liofilización hay una elongación celular, con mayores espacios intracelulares, lo que brinda un producto menos plegado y más crujiente (Laurienzo *et al.*, 2013).

### 2.2.2.7 Propiedades reológicas

La gomosidad o cristalinidad de un alimento deshidratado está íntimamente relacionado con la temperatura de transición vítrea  $T_g$ , a la cual un sólido amorfo convierte a cristalino o gomoso (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Transición vítrea en función con la humedad y temperatura (Bonazzi y Dumoulin, 2011).

La  $T_g$  está influenciada por la composición y pesos moleculares del alimento en cuestión, y determinar la fragilidad, la dureza, transparencia, volumen y estabilidad de un producto; el cual, está determinado por el contenido de humedad en el alimento y la temperatura de exposición. Si un alimento se encuentra por debajo de la curva de  $T_g$ , es más estable por un prolongado tiempo. Un cambio en la humedad es importante, ya que incrementa el volumen molecular, la capacidad de calentamiento, aumentan los coeficientes de expansión térmica y el dieléctrico, lo que provoca un cambio en las propiedades de viscosidad. Por encima de la curva de  $T_g$ , la viscosidad de la matriz decrece, los cristales y polímeros orgánicos se vuelven

suaves, por lo que el alimento puede adquirir características no deseables. En esta etapa la movilidad molecular se incrementa de dos maneras, incrementan los cambios físico-químicos (colapso, pegajoso, apelmazamiento, pérdida de compuestos volátiles) y de oxidación. Así que el control de la fase de transición es fundamental para mantener la estabilidad de un producto seco (Bonazzi y Dumoulin, 2011).

#### **2.2.2.8 Evaporación de compuestos volátiles**

Algunos compuestos aromáticos se pueden perder al momento de ser deshidratados, por incremento en la temperatura y la velocidad de secado, ya que al evaporarse el agua, también se evaporan muchos compuestos volátiles. Sin embargo, muchos de ellos permanecen, porque también depende de la presión vapor de sus moléculas, pero hay tres explicaciones al respecto, la primera es la difusión y la difusividad de las moléculas aromáticas decrece más rápido que el agua, así que al disminuir el contenido de humedad también disminuye. La retención de los compuestos aromáticos incrementa con el contenido de materia seca. La segunda se refiere a que dichos compuestos quedan atrapados en microrregiones, por ejemplo en la liofilización de azúcares, se forman cristales amorfos en ciertas regiones donde quedan atrapados los compuestos aromáticos por medio de puentes de hidrogeno. La tercera es interacciones específicas con el sustrato, es decir, los componentes aromáticos pueden estar compartiendo enlaces covalentes con otros grupos funcionales o compuestos (proteínas). También, la estructura influye en la retención de los compuestos aromáticos, estructuras cristalinas rechazan estos compuestos (Bonazzi y Dumoulin, 2011).

### **2.2.2.9 Incremento en la concentración de los solutos**

Los cambios en las concentraciones de productos volátiles durante los procesos de deshidratación dependen de factores tales como el método de secado, características biológicas de plantas y composición de sus volátiles. Por ejemplo, para hojas de laurel la técnica de deshidratación en horno el contenido de compuestos volátiles es menor o similar a aquellas secadas a temperatura ambiente aunque las pérdidas importantes son también observadas durante el secado frío. A pesar que los cambios son observados durante el secado frío y otras especies como tomillo y salvia. (Díaz-Maroto *et al.*, 2004). Por todo lo anterior, se dice que los alimentos deshidratados son sólidos amorfos sobresaturados.

### **2.2.2.10 Cambios en color.**

El color de frutas, hortalizas, plantas aromáticas y especias se debe a la presencia de pigmentos (carotenoides, clorofilas, antocianinas, betalaínas). Estos pigmentos son susceptibles a degradación enzimática y no enzimática, pueden ser inducidas por secado y durante el almacenamiento. Las clorofilas son pigmentos verdes, que bajo calor e iones  $H^+$  inducen la formación de feofitina, esta degradación provoca un cambio de color de verde a gris-marrón, además, puede metabolizar compuestos metabólicamente activos a compuestos incoloros.

Los carotenoides también son pigmentos liposolubles de color naranja y amarillo y se dividen en dos grupos: los carotenos y xantofilas, son estables con una  $A_w = 0.12$ . Los carotenoides pueden oxidarse con el  $O_2$ , son sensibles a la luz y altas temperaturas, aunque pueden tolerar la deshidratación a  $45\text{ }^\circ\text{C}$ , sin embargo, no toleran tiempos prolongados de secado ( $40\text{ }^\circ\text{C}$ ). El deshidratado solar, por convección, al vacío y por liofilización, además de pre-tratamientos, minimizan estos

daños, por ejemplo, el escaldado inactiva enzimas (lipasas y peroxidasas) que son causantes de la degradación. Otro tratamiento que reduce la pérdida de estos compuestos es la inmersión en soluciones con ácido cítrico, cloruro de calcio y sodio, el ácido cítrico actúa como un antioxidante, mientras que el cloruro de calcio y el sodio fortalecen la pared celular lo que ayuda a resistir los procesos de deshidratación.

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, que se encuentran en frutos, verduras y granos, brindan colores azules, rosa, rojo y violeta. Además de color proporcionan alta capacidad antioxidante. En general son estables a pH bajo, pueden ser oxidados en presencia de hidroperóxidos, perdiendo su color azul a rosa malva. Las betalaínas son pigmentos rojo púrpura, con alta capacidad antioxidante, se degradan a compuestos marrones en presencia de luz y oxígeno, alta temperatura y pH neutro (Bonazzi y Dumoulin, 2011).

## 2.3 LITERATURA CITADA

- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Uribe, S. y González de Mejía, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1): 100-111.
- Arijana B., Vojvodić A., Komes D., Akkermans C., Belščak-Cvitanović A., Stolk M. and Hofl. G. 2014. Comparative evaluation of CO<sub>2</sub> drying as an alternative drying technique of basil (*Ocimum basilicum* L.). The effect on bioactive and sensory properties. *Food Research International*, 64: 34-42.
- Barbosa-Cánova. H. y Vega-Mercado G.V. 2000. *Deshidratación de alimentos*. Ed Acribia, Zaragoza España p 67-81.
- Calín-Sánchez, Á., Lech, K; Szumny, A., Figiel A. and Carbonell-Barrachina Á. A. 2012. Volatile composition of sweet basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by drying method. *Food Research International*, 48(1): 217-225.
- Cantwell M. I. and Reid, M. S. 1993. Postharvest physiology and handling of fresh culinary herbs. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 1(3): 93-127.
- De Bruijn J. and Bórquez R. 2014. Quality retention in strawberries dried by emerging dehydration methods. *Food Research International*, 63: 42-48.
- Deás Rodríguez M., Seuc Jo A. y González Suárez R. M. 1997. Estudio del efecto hipoglicemiante del *Ocimum sanctum* L. (albahaca morada) con el uso de un ensayo biológico en ratones. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1):15-18.
- Di Cesare L. F., Forni E., Viscardi D., and Nani R. C. 2003. Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12): 3575-3581.

- Figiel A., Szumny A., Gutiérrez-Ortíz A., and Carbonell-Barrachina Á. A. 2010. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 98(2): 240-247.
- Forsythe S. J. 2003. *Alimentos Seguros: Microbiología* Acribia Editorial. pp 387
- Hayta M. 2002. Bulgur quality as affected by drying methods. *Journal of Food Science* 67 (6): 2241-2244.
- ICA. 2011. *Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos Medidas para la temporada invernal*. Bogotá, Colombia. 47 p
- Jiménez M. A. 2011. *Herbolaria mexicana*. Colegio de Postgraduados. México. 531p.
- Jimoh, K. O., Olurin, T. O and Aina, J. O. 2010. Effect of drying methods on the rheological characteristics and colour of yam flours. *African Journal of Biotechnology*, 8(10).
- Juárez-Rosete C.R., Aguilar-Castillo, Juárez-Rosete ME, Bugarín-Montoya R., Juárez-López P. y Cruz-Crespo E. 2013. Hierbas aromáticas y Medicinales en México: Tradición e innovación. *Revista Biociencias (artículo de revisión)*.119-129.
- Khraisheh M. A. M., McMinn W. A. M. and Magee T. R. A. 2004. Quality and structural changes in starchy foods during microwave and convective drying. *Food Research International*, 37(5): 497-503.
- Krishnakumar V. and Potty S. N. 2012. Marjoram. *Handbook of herbs and spices*. Central Plantation Crops Research Institute (ICAR), India. (2): 336-365.
- Leal F. P., Nilson, Quirino B. M., Carmello A. C., Cathatino R. R., Eberlin M. N., and Meireles. 2008. Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) extracts obtained by Supercritical fluid extraction (SFE): Global yields chemical composition, antioxidant activity, and estimation of the cost of manufacturing. *Food Bioprocess Technology* 1:326-338.

- Lewicki P. and Lukaszuk A. 2000. Effect of osmotic dewatering on rheological properties of Apple subjected to convective drying. *Journal of Food Engineering* 45: 119-126.
- Oskan A., Akbudak B. and Akbudak N. 2007. Microwave drying characteristics of spinach. *Journal of Food Engineering* 78: 577-583.
- Peter K.V. 2001. *Handbook of Herbs and Spices*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited
- Raghavan G.S.V., Rennie T.J., Sunjka P.S. Orsat V., Phaphuangwitayakul W. and Terdtoon P. 2005. Overview of new techniques for drying biological materials with emphasis on energy aspects. *Brazilian Journal Chemical Engineering*.22: 195-201.
- Rocha R. P., Melo E. C. and Radünz L. L. 2001. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (33): 7076-7084.
- Sagar V. R. and Kumar P. S. 2010. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of food science and technology*. 47(1): 15-26.
- Sánchez, Govín E., López I. M., Fuentes, Hernández L. y Rodríguez F. C.A. 2000. Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). *Revista Cubana de Farmacia* 34(3):187-95.
- Santos P. H. and Silva M. A. 2008. Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables a review. *Drying Technology* 26(12): 1421–1437.
- Schweiggert U., Reinhold C. and Schieber A. 2007. Conventional and alternative processes for spice production a review. *Food Science and Technology*. 18: 260-268.
- Tainter D. R. and Grenis A. T. 2001. *Spices and Seasonings*. A Food Technology Handbook, 2nd edn, John Wiley & Sons Inc., Publications

- Taiwo K. A., Angersbach A. and Knorr D. 2003. Effects of pulsed electric field on quality factors and mass transfer during osmotic dehydration of apples. *Journal Food Process Engineering* 26: 31-48.
- Vadivambal R. and Jayas D. S. 2007. Changes in quality of microwave-treated agricultural products a review. *Biosystems engineering*. 98(1): 1-16.
- Vasudevan P., Suman K. and Satyawati S. 1999. Bioactive botanicals from Basil (*Ocimum* sp.). *Journal of Scientific and Industrial Research*. 58: 332 – 338.
- Vij V., Ailes E., Wolyniak C., Angulo F. J. and Klontz K. C. 2006. Recalls of spices due to bacterial contamination monitored by the US Food and Drug Administration: the predominance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*, 69(1): 233-237.
- Yahia E. M. 2006. Postharvest handling of aromatic and medicinal plants. Conference: Herbal, aromatic and medicinal plants Symposium, At Djerba, Tunisia, 2-4 November.
- Zweife C. y Stephan R. 2012. Spices and herbs as source of *Salmonella* related foodborne diseases. *Food Research International*, 45(2):765-769.

# CAPITULO III. EFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESHIDRATACIÓN EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES DE HIERBAS AROMÁTICAS

## 3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años el uso de hierbas aromáticas deshidratadas ha incrementado en todo el mundo, debido a su empleo como especias en diversos tipos de comida, además de su uso en terapias herbarias; lo que hace necesario identificar los métodos más adecuados para su deshidratación, y evitar la pérdida de la calidad. En las plantas aromáticas es muy importante la conservación de los compuestos que confieren las propiedades nutraceuticas, como los antioxidantes, fenoles, flavonoides, fenilpropanoides, entre otros. Por ejemplo, la albahaca (*Ocimum basilicum*) tiene compuestos bioactivos como monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, antocianinas, ácidos fenólicos (Makri y Kintzios, 2008), flavonoides y otros componentes nutricionales como son las vitaminas (Vasudevan *et al.*, 1999), los cuales le confieren propiedades como planta medicinal, bioinsecticida, bactericida y fungicida. El orégano (*Origanum vulgare*) contiene principios bioactivos tales como el timol y carvacrol, así como también idterpineno y  $\alpha$ -cimeno (Santoro *et al.*, 2006), de alta capacidad antioxidante. El orégano tiene múltiples usos como conservador y aromatizante de alimentos, así como de desinfectante, expectorante, carminativo, antioxidante, antimicrobial, antitumoral, diurético, estimulante, sudorífico, digestivo, tónico, fungicida, bactericida, antiespasmódico y cicatrizante (Muñoz, 1996). Por su parte el perejil (*Petroselinum crispum*) contiene furanocumarinas y flavonoides, entre los que destacan compuestos antioxidantes como apina, luteolina y apigenina. El aceite esencial de perejil contiene el apiol y la miristicina, alto contenido de hierro,  $\beta$ -caroteno, tiamina, riboflavina, calcio y vitaminas A y C (Popović *et al.*, 2007).

Puesto que la vida de anaquel se incrementa al reducir la humedad de los alimentos, la selección de un método de deshidratación de las hierbas aromáticas es muy importante para conservar sus características sensoriales y nutraceuticas. Al respecto existen diversos métodos de deshidratación, entre los que se encuentra el solar, el osmótico, microondas, vapor supercaliente, vacío, convección, por congelación, y aspersión. Cada uno de éstos, tiene sus propias características de manejo y en algunos casos está determinado para ciertos productos, sin embargo, la temperatura y la velocidad del secado son los factores más importantes que afectan la calidad de los productos deshidratados (Rocha *et al.*, 2011). Así, la deshidratación osmótica se utiliza para frutas y verduras (Lewicki y Lukaszuk, 2000). La deshidratación por convección es bastante utilizada, sin embargo, las altas temperaturas (50 °C) pueden dañar a los compuestos de valor nutraceutico del producto (Vadivambal y Jayas, 2007; Jimoh *et al.*, 2010). La deshidratación solar es una buena alternativa por ser un método económico, ecológico y versátil, renovable y limpio (Hayta, 2002; Sagar y Kummar, 2010). El inconveniente de este método es la falta de control sobre las variaciones climáticas (temperatura y humedad) en el lugar a lo largo del año. Finalmente la deshidratación a temperatura ambiente se usa a nivel doméstico, en algunas empresas rurales y laboratorios para el secado de muestras; en este metodo no hay cambios bruscos de temperatura, ni gasto de combustible; no obstante, al igual que el deshidratado solar, sus limitaciones son la falta de control sobre la humedad relativa que afecta el tiempo de secado (Jimoh *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes métodos de deshidratación (temperatura ambiente, solar y por convección con aire caliente (40, 45, 50 y 80 °C), sobre la calidad y conservación de los compuestos bioactivos (la actividad antioxidante, fenoles totales, flavonoides totales y pigmentos fotosintéticos)

de albahaca, orégano y perejil (la última especie solo se estudió para la primera parte del trabajo).

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Material vegetal

El material vegetal se obtuvo de un huerto comercial en la localidad de San Gregorio Zacapechpan, Cholula Puebla. Las plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare*) y perejil (*Petroselinum crispum*) se cosecharon y deshojaron. Posteriormente las hojas se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.01 % por 15 min, en seguida se enjuagaron nuevamente con agua potable y se procedió a realizar la deshidratación del material.

### 3.2.2 Deshidratación

*Deshidratación con aire caliente (DC):* Se utilizaron 110 g de hojas frescas de cada especie y se secaron en una estufa de aire forzado (Shel Lab, Mod. 1370FX) a 40, 45, 50 y 80 °C ( $\pm 2$ ). Durante el proceso de deshidratación se registraron la temperatura y humedad relativa con un datalogger (HOBO®). El proceso finalizó cuando las muestras alcanzaron una humedad entre 7 y 10 % ( $\pm 1$ ), determinada con una termobalanza (OHAUS, MB 45). Finalmente, las hojas secas se empacaron en bolsas de polipapel metalizado.

*Deshidratación solar:* Se evaluó bajo dos modalidades: 1) sol directo en la cámara de secado (DS) con una variación entre 20 y 60 °C que dependió de la hora del día (10:00 am a 5:00 pm) y 2) con forro de papel aluminio en la cámara de secado (DSC), para bloquear la incidencia solar durante la deshidratación, en un intervalo de 20 a 47 °C en el lapso del día de 10:00 am a 5:00 pm. Con base en la capacidad de este

equipo, se colocaron 110 g de hojas frescas de cada especie. Ambas modalidades emplearon el mismo deshidratador de acero inoxidable y lámina galvanizada. El deshidratador dispone de un panel solar donde se capta la radiación solar y concentra el calor, que distribuye el aire caliente a la cámara de deshidratación, con un ventilador de 12 V, mismo que funciona como un extractor de humedad. La cámara de secado tiene una rejilla reticulada de acero inoxidable, protegida por una cubierta de policarbonato blanco movable, donde se coloca el material para deshidratar.

*Deshidratado a temperatura ambiente (DA).* Se pesaron por separado, 160 g de hojas frescas de cada especie, con una humedad inicial de 89 ( $\pm 0.2$ ), 83 ( $\pm 0.2$ ), 84 ( $\pm 0.2$ ) % para albahaca, orégano y perejil respectivamente. Enseguida las hojas se colocaron sobre una manta cielo, dentro de un cuarto oscuro, y se giraron periódicamente cada 24 h.

Para cada tratamiento se realizaron isotermas de secado. En cada muestra se midió la pérdida de peso cada 30 minutos, para la deshidratación con aire caliente y con el deshidratador solar. Debido a que la deshidratación en sombra es un proceso más lento, las mediciones se realizaron cada 12 h. Se determinó la actividad de agua ( $A_w$ ) con un medidor con sensor de punto de rocío AQUALAB 3 TE®.

### 3.2.3 Evaluación de color

Con base en la escala CIELAB de color, se midieron las variables "L", "a" y "b" con un colorímetro ColorFlex (Mod A60-1010-615) Con los valores de L, a y b se calculó el índice de color (IC) de acuerdo con lo reportado por Vignoni *et al.* (2006).

$$IC = \frac{a * 1000}{L * b}$$

### 3.2.4 Preparación del extracto

Se pesó 5 g de la muestra en estado fresco y deshidratado. Las hojas se trituraron en mortero con 10 mL de metanol (J.T. Baker, 9070-03). Posteriormente los extractos se cavitaron durante 15 min, a 4 °C. Se dejaron reposar 24 h a -20 °C, y se volvieron a cavitar y se filtró al vacío. El sobrenadante se llevó a 10 mL con metanol y se almacenó a -20 °C hasta el momento de evaluar la actividad antioxidante, fenoles y flavonoides totales.

### 3.2.5 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se midió *in vitro*, con el método modificado de Antolovich *et al.* (2002) con base al CI<sub>50</sub>, que es la concentración requerida de una muestra para inhibir o neutralizar en 50 % los radicales libres del DPPH. Cada ensayo se realizó 3 veces y su a vez cada muestra se determinó por triplicado. Para calcular la concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>) se prepararon para albahaca, orégano y perejil cuatro concentraciones diferentes en función de la especie, que variaron en un intervalo de 0. 2 a 300 mg mL<sup>-1</sup>, 50 μL de cada solución se mezclaron con 200 μL de la disolución de DPPH a 0.1 mM. Inmediatamente se tomaron lecturas de absorbancia a 520 nm, cada minuto durante 30 minutos a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pozos en un espectrofotómetro lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labasytem, Thermo). Con los valores de absorbancia se calculó el porcentaje de inhibición que corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \% I = [(A - A_1)/A](100)$$

A = Absorbancia del DPPH

A<sub>1</sub> = Absorbancia de la muestra

### 3.2.6 Determinación de fenoles totales

Se realizó de acuerdo al método descrito por Makkar *et al.* (1993). Una alícuota del extracto en metanol (50  $\mu$ L) se mezcló con 450  $\mu$ L de agua destilada y 250  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Life Science, 47641) al 50 %. La mezcla se dejó reposar 8 min. A continuación a cada tubo se le añadió 1.25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma, S2127-500G,) al 5 % y se agitó en vortex. Después de reposar por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó la absorbancia a 725 nm. Se obtuvo una curva estándar ( $y = 1.9393x - 0.0006$ ;  $R^2 = 0.999$ ), utilizando ácido tánico como estándar. Los análisis fueron realizados por triplicado y los resultados se calcularon en mg de equivalente de ácido tánico por gramo de peso seco y se expresaron en porcentaje en base seca.

### 3.2.7 Determinación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó de acuerdo a Chang *et al.* (2002). Una alícuota de extracto en metanol (500  $\mu$ L) se mezcló con 1.5 mL de etanol al 80 %, 100  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> al 10 %, 100  $\mu$ L de acetato de potasio 1 M y de 2.8 mL de agua destilada. Después de 30 min a temperatura ambiente se realizó la lectura de absorbancia a 415 nm. La concentración se obtuvo de una curva estándar basada en quercetina. Los resultados se calcularon como mg de equivalentes de quercetina por gramo de peso seco y se expresaron en porcentaje en base seca.

### 3.2.8 Determinación de pigmentos fotosintéticos

Muestras de 1 g de hojas de frescas y 0.5 g de tejido deshidratado se trituraron en un mortero frío, con 10 mL de acetona fría al 80 % en agua (80:20 V:V), con 0.1 g de MgCl<sub>2</sub> y arena de mar purificada. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 2350 g a 5 °C. El sobrenadante se llevó a 10 mL con

acetona al 80 %. La absorbancia se determinó a 470, 646 y 663 nm en un espectrofotómetro (UV-visible Evolution 300, Thermo). La concentración de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), xantofilas y carotenoides (x+c) se determinó en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de materia seca de acuerdo a las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler y Wellburn (1983) y se expresó en porcentaje en base seca:

$$\text{Cl a} = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Cl b} = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$x+c = \frac{1000 A_{470} - 3.27 \text{Cl a} - 107 \text{Cl b}}{}$$

229

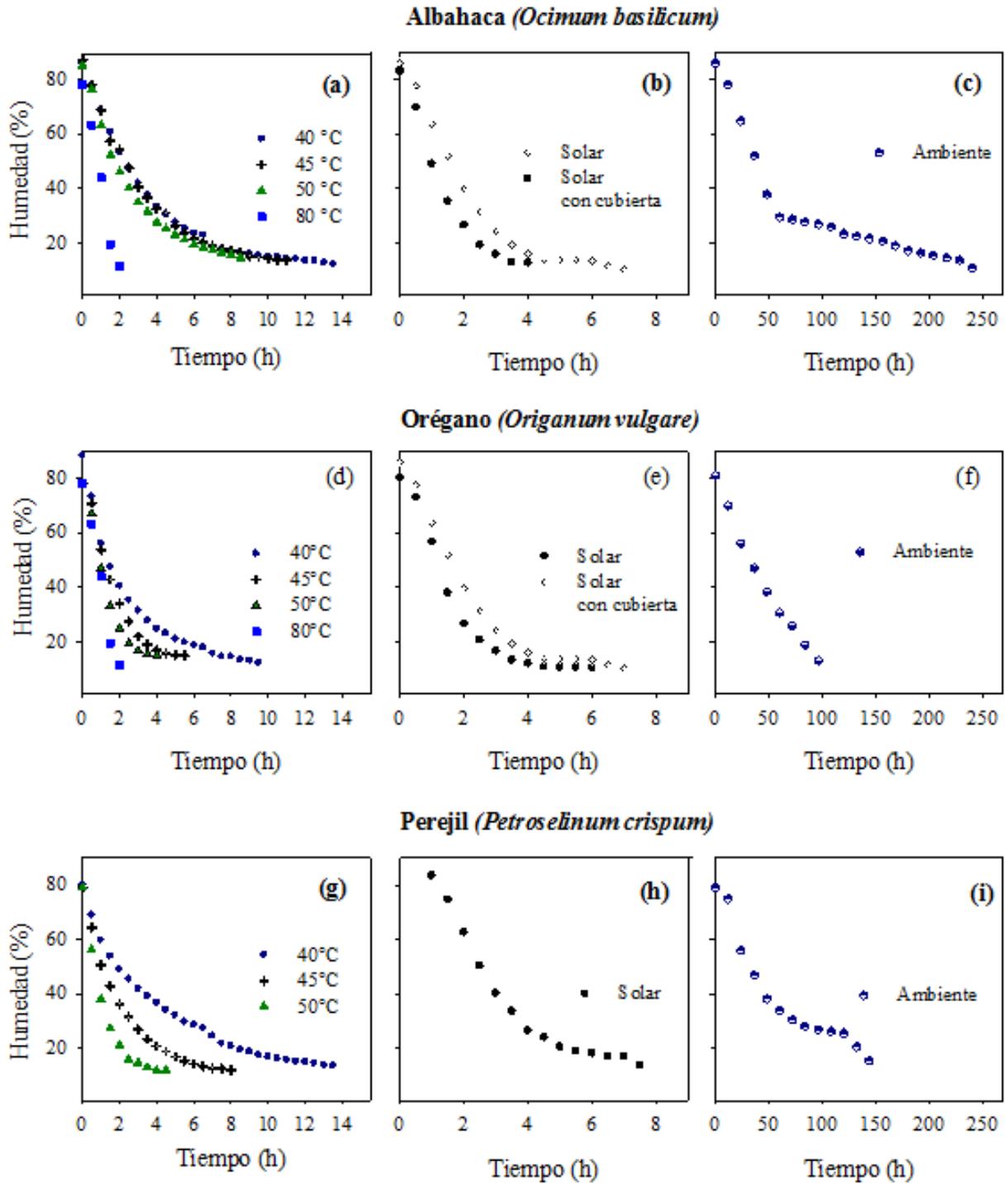
### 3.2.9 Análisis estadísticos

Cada experimento se realizó por triplicado, la unidad de muestra fue de 110 g de hojas. Para el análisis de datos se hizo un análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey para, DC, DS, DSC y DA, mediante un diseño de bloques al azar, donde cada bloque corresponde a un tratamiento: DC, DS, DSC y DA para cada especie. Se utilizó el sistema SAS<sup>®</sup> para Windows versión 9.

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 Tipos de deshidratación

El contenido de humedad inicial de las hojas osciló entre 81 y 88 % para albahaca, 74 a 81 % en orégano, 81 a 85 % en perejil, esta variación se atribuye a diversos factores, como la etapa fenológica de la hoja, la especie y el número de corte de la planta. La figura 1 muestra las isotermas de la DC (40, 45, 50 y 80 °C), se observa que en la primera hora hay un proceso de estabilización de las condiciones, las hojas se equilibran con el aire de deshidratación y alcanza su temperatura de evaporación. Después hay una fase de declive, en esta etapa se evapora el agua libre de las hojas y se refleja con la pérdida de peso en 50 %, en las siguientes dos horas. A medida que continúa el secado, el proceso se hace más lento y su velocidad depende del mecanismo del movimiento de la humedad dentro de la célula vegetal. Mientras que en la DS está en función de la temperatura, la intensidad de la radiación solar, la humedad relativa del ambiente y la hora del día, con un tiempo de secado de 4 a 12 h (Cuadro 3.1). Cuando la cámara del deshidratador solar alcanzó una temperatura de  $45 \pm 5$  °C, las hojas tardaron aproximadamente 50 min en perder 50 % de su peso; pero en días nublados o con poca radiación solar ésta se prolongó hasta 2 h. Mientras que la DA tardó alrededor de 24 h en perder 50 % de su peso.



**Figura 3.1** Cinéticas de deshidratación de albahaca, orégano y perejil. a), d) y g) Deshidratación por convección (DC); b), e) y h) Deshidratación solar (DS y DSC); c), f) y i) Deshidratación a temperatura ambiente (DA).

Respecto al tiempo de deshidratación, el método DC a 80 °C fue el más rápido (Figura 3.1), con un tiempo de deshidratación aproximado de 2 h para la albahaca y el orégano (Figura 1a y 1d). Mientras que en la deshidratación a 50 °C el tiempo se incrementó y varió en función de la especie. Orégano y perejil tuvieron un tiempo de 4.5 h (Figura 3.1d y 1g) y albahaca de 8.5 h (Figura 3.1a) (Cuadro 3.1). La respuesta se atribuye a que el aire caliente circula y transfiere el calor a las hojas del material vegetal, lo cual causa que incremente la temperatura en el interior de la misma y evapore el agua de los tejidos, provocando la deshidratación de las hojas. El tratamiento con mayor tiempo de deshidratación fue a temperatura ambiente con 168 h para albahaca y orégano (Figura 3.1c y 1f), en tanto que para perejil fue de 144 h (Figura 3.1i).

**Cuadro 3.1** Tiempo de deshidratación, porcentaje de humedad (% Humedad) y actividad de agua ( $A_w$ ) a las diferentes temperaturas de deshidratación en hojas de albahaca, orégano y perejil.

	Tratamiento	Tiempo (h)	Humedad (%)	$A_w$
<b>Albahaca</b>	Fresco	0	87.2	0.94
	DA (20 ± 2 °C)	168.0	11.0	0.61
	DS (50 ± 20 °C)	4 a 10	4.5	0.36
	DSC (43 ± 5 °C)	7 a 12	5.0	0.40
	DC (40 °C)	12.5	7.0	0.40
	DC (45 °C)	11.5	10.6	0.49
	DC (50 °C)	8.6	8.8	0.43
	DC (80 °C)	2.0	7.2	0.64
<b>Orégano</b>	Fresco	0	84.5	0.94
	DA (20 ± 2 °C)	168.0	9.3	0.42
	DS (48 ± 10 °C)	3.5 a 7.0	9.5	0.41
	DSC (45 ± 10 °C)	4.5 a 11	5.7	0.44
	DC (40 °C)	8.5	8.2	0.45
	DC (45 °C)	6.0	6.0	0.54
	DC (50 °C)	4.5	7.0	0.40

<b>Perejil</b>	DC (80 °C)	2.0	6.5	0.53
	Fresco	0	86.0	0.90
	DA (20 ± 1 °C)	144	9.0	0.40
	DS (40 ± 10 °C)	8.6 a 10.5	5.5	0.39
	DC (40 °C)	14.5	7.4	0.38
	DC (45 °C)	8.0	9.6	0.42
	DC (50 °C)	4.5	7.0	0.39

Nota: DA: deshidratación a temperatura ambiente; DS: deshidratación solar; DSC: deshidratación solar con cubierta; DC: deshidratación con aire caliente.

El mecanismo de deshidratación es un fenómeno complejo, que depende de método de deshidratación, la temperatura, el tiempo y la velocidad de secado, tipo y la composición química del alimento (Carrín y Crapiste, 2009) El tejido vegetal se considera una estructura porosa, por tener conductos entre las células y en el interior de las mismas, por lo que, durante el proceso de deshidratación, el agua contenida en el interior de la célula comienza a ser removida, ésta será más lenta (DA) o más rápida (DC a 80 °C), dependiendo de la temperatura y la velocidad de secado. Así mismo, las células van sufriendo una deformación hasta provocar el colapso celular (Sancho-Knapik *et al.*, 2011).

El término de los tres procesos de deshidratación estuvo determinado por el porcentaje de humedad final de las hojas, el cual quedó en un intervalo entre 6 y 11 % (Cuadro 3.1), valor dentro de lo recomendado para la mantener la textura y porosidad de las plantas aromáticas (8 a 12 %) (Lewicki, 2006; Rocha *et al.*, 2011).

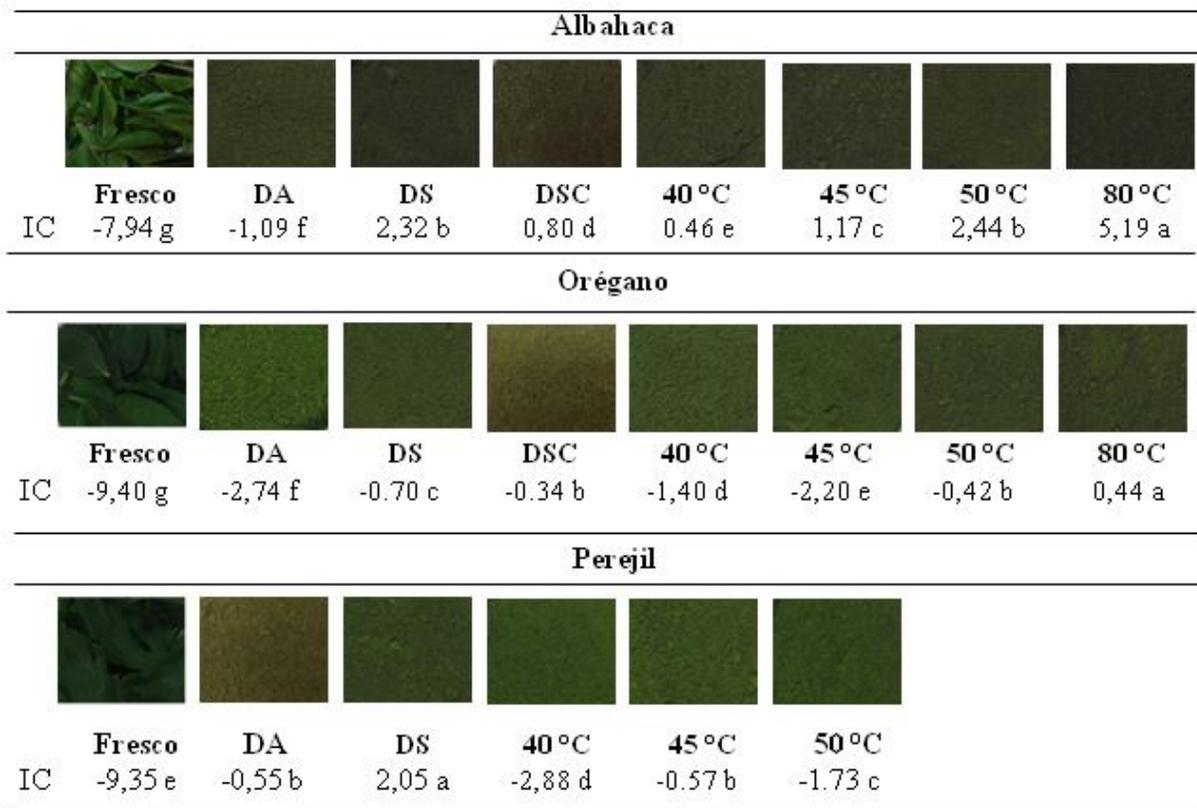
La actividad de agua ( $A_w$ ) se ubicó en valores de 0.362 y 0.649, la dificultad para la remoción de esta agua se atribuye a los tipos de enlace de los compuestos bioquímicos con la célula (Sagar y Kumar, 2010). La  $A_w$  determina la estabilidad y calidad de un producto seco, puesto que indica la disponibilidad de agua en un

alimento para presenten las reacciones bioquímicas, de oscurecimiento, oxidación lipídica y actividad enzimática; que se detienen a una  $A_w$  entre 0.2 y 0.3.

### 3.3.2 Color

El color es un atributo sensorial, que determina en gran medida la aceptación y la calidad del producto deshidratado. Los IC en los tratamientos aplicados fueron estadísticamente diferentes. La albahaca fresca tuvo un IC= -7.94, el cual corresponde a un color verde profundo, siendo el mejor tratamiento el de la DA con IC= -1.09 que corresponde a un color amarillo verdoso, mientras que los tratamientos a altas temperaturas como la DC a 50 y 80 °C junto con la DS, reportaron valores de IC de 5.19, 2.44 y 2.32 respectivamente, con tonalidades amarillo intenso y/o café que afectan considerablemente la apariencia del producto (Figura 3.2). En orégano fresco el IC reportado fue de -9.35, siendo el mejor tratamiento el de la DA y la DC a 45°C (IC de -2.74 y -2.02 respectivamente), mientras que el tratamiento menos favorable fue la DA a 80 °C con un IC = 0.4 que corresponde a un café oscuro (Figura 2). El perejil fresco tuvo un IC= -9.35 el cual se ubica dentro de verde intenso, y de igual forma el tratamiento a DC a 40 °C y 50 °C tuvieron valores de IC de -2.88 y -1.73 respectivamente. El peor tratamiento fue la DA con un IC = 2.05, el cual corresponde a amarillo pálido.

La albahaca y el orégano son especies más sensibles al calor, ya que al estar expuestas a altas temperaturas (DC a 50 y 80 °C) se observó una pérdida de color, comparándolo con los IC en estado fresco, debido a la degradación de pigmentos fotosintéticos.



**Figura 3.2** Índice de color (IC) de los diferentes métodos de deshidratación de hojas de albahaca, orégano y perejil deshidratadas. DA: Deshidratación a temperatura ambiente. DS: Deshidratación solar sin cubierta. DSC: Deshidratación solar con cubierta. IC: índice de color. Letras diferentes en cada fila por especie, indican diferencia significativa ( $p=0,05$ ).

### 3.3.3 Actividad antioxidante

El potencial antioxidante es inversamente proporcional al valor de  $CI_{50}$  con diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 3.2). Por ejemplo mientras la albahaca fresca tuvo un  $CI_{50}$  de  $1.37 \text{ mg mL}^{-1}$  en base seca, los valores de los tratamientos de deshidratación estuvieron en un intervalo de  $1.35 \text{ (mg mL}^{-1})$  a  $2.88 \text{ (mg mL}^{-1})$ , y se formaron cinco grupos todos con alta actividad, donde destacaron los

tratamientos DC a 40 y 45 °C que presentaron la mayor actividad antiradical. La capacidad antioxidante de los tratamientos fue:  $CI_{50}$ : DC a 50 °C < DSC < DS < DC a 80 °C, lo cual sugiere que en esta especie la temperatura influyo de manera directa y proporcional sobre la actividad antioxidante. En orégano, los tratamientos de deshidratación formaron dos grupos, uno con valores entre 1.82 mg mL<sup>-1</sup> a 2.01 mg mL<sup>-1</sup>, que incluyo el tratamiento DC a 45 °C, 50 °C y 80 °C, el DA y el DSC; y otro grupo con el tratamiento DS y DC a 40 °C. Estos resultados sugieren que la actividad antioxidante del orégano, que se atribuye a la presencia de ácido románico y ácido cafeico (Kaurinovic *et al.*, 2011) no tuvieron relación directa con las condiciones de deshidratación. En perejil, no se presentó diferencia entre los tratamientos. La poca sensibilidad del perejil al efecto de la temperatura, podría deberse a los compuestos fenólicos y la apigenina que es un flavonoide con fuerte actividad antiradical, que incrementa la actividad antioxidante de las enzimas afines, y disminuye el daño oxidativo en los tejidos (Popović *et al.*, 2007).

### 3.3.4 Fenoles totales

En albahaca, los fenoles se conservaron mejor en los tratamientos DC a 45 °C (0.47 %) y DA (0.41 %), (Cuadro 3.2). Pero cuando las hojas se deshidrataron a 50 y 80 °C hubo una disminución drástica en el contenido de compuestos fenólicos (0.22 y 0.07 % respectivamente). De igual manera ocurre con el tratamiento DSC (0.18 % de fenoles), debido probablemente a que alcanzó una temperatura de 50°C. Mientras que en la DS (sin cubierta) la temperatura máxima fue de 47°C. En orégano, el tratamiento DSC fue el que conservó mejor los fenoles, sin diferencia estadística con la albahaca fresca, en contraste el tratamiento DS que estuvo expuesto a la radiación solar directa fue el que tuvo el porcentaje menor de fenoles (0.76 %). El tratamiento DA y el DC a todas las temperaturas evaluadas tuvieron una concentración similar.

En perejil no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres tipos de deshidratación (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.2** Medias de actividad antioxidante, fenoles totales, flavonoides totales y pigmentos fotosintéticos de albahaca, orégano y perejil en hojas frescas y deshidratadas

Producto	Actividad Antioxidante (CI <sub>50</sub> ) (mg mL <sup>-1</sup> )		Fenoles (%)	Flavonoides (%)	Cl a (%)	Cl b (%)	C+x (%)	Cl a/Cl b						
<b>Albahaca</b>														
Fresco	1.37	e	2.57	a	0.55	a	21.9	a	10.52	a	5.17	a	2.92	a
DA	1.89	d	0.41	b	0.36	c	5.30	b	2.00	b	1.46	a	3.07	b
DS	2.62	b	0.34	c	0.54	a	4.73	b	1.61	b	1.55	a	3.28	b
DSC	2.20	c	0.18	d	0.40	b	3.60	b	1.06	b	2.01	a	6.8	b
40°C	1.38	e	0.25	c	0.25	c	2.73	b	0.81	b	0.96	b	3.52	b
45°C	1.35	e	0.47	b	0.33	c	3.69	b	0.89	b	1.28	b	4.28	b
50°C	2.12	c	0.22	c	0.30	c	6.34	b	3.10	a	1.32	b	2.61	b
80°C	2.88	a	0.07	e	0.32	c	4.66	b	1.62	b	1.38	a	3.31	b
<b>Orégano</b>														
Fresco	0.76	c	4.38	a	0.44	c	21.2	a	13.43	a	3.56	a	2.05	a
DA	1.84	b	1.39	b	0.74	a	6.70	b	3.06	b	1.50	a	2.22	b
DS	2.16	a	0.76	c	0.69	b	5.25	b	2.08	b	1.60	a	2.74	b
DSC	2.01	a	2.76	a	0.88	a	5.41	b	3.05	b	2.18	a	1.85	b
40°C	2.20	a	1.55	b	0.65	b	4.89	b	1.58	b	1.61	a	3.24	b
45°C	1.82	b	2.27	b	0.74	a	4.26	b	1.30	b	1.42	a	3.45	b
50°C	1.93	b	1.55	b	0.79	a	4.23	b	1.88	b	1.14	a	2.93	b
80°C	1.93	b	1.46	b	0.71	a	5.17	b	1.71	b	1.56	a	3.25	b
<b>Perejil</b>														
Fresco	36.7	a	0.63	a	0.41	a	23.1	a	14.86	a	3.43	a	13.6	a
DA	2.05	b	0.20	b	0.58	a	1.18	b	0.15	b	2.21	a	7.86	a
DS	1.70	b	0.15	b	0.35	a	4.56	b	1.90	b	1.55	a	2.63	a
40°C	1.71	b	0.12	b	0.49	a	6.24	b	2.57	b	1.55	a	2.63	a
45°C	2.12	b	0.09	b	0.49	a	5.04	b	2.92	b	1.20	a	2.2	b
50°C	1.69	b	0.12	b	0.50	a	5.66	b	2.56	b	1.41	a	2.82	a

Nota: Cl a: clorofila a; Cl b: clorofila b; C+x: carotenos y xantofilas. Letras diferentes en cada columna por especie, indican diferencia significativa ( $P=0,05$ ).

### 3.3.5 Flavonoides totales

Los flavonoides al igual que los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, que se degradan con temperaturas elevadas. En este trabajo se encontró que en albahaca la DS (temperatura máxima de 47 °C) preservó mejor estos compuestos (0.54 %), en tanto que el resto de los tratamientos los redujeron significativamente (Cuadro 3.2). En orégano, la DSC conservó mejor los flavonoides con un valor de 0.88 %, seguido de la DA y la DC (45, 50 y 80 °C) (Cuadro 3.2). Por el contrario, la DS y la DC a 40 °C fueron los tratamientos menos convenientes para conservar los flavonoides. Con respecto a perejil, no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos de deshidratación y el testigo (fresco) (Cuadro 3.2). Asimismo, tanto en orégano como en perejil se encontró una relación directa y positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de flavonoides totales. En el caso del orégano, la capacidad antioxidante se relacionó principalmente con los flavonoides como lo indica el valor  $R^2=0.924$ . En perejil aunque esta correlación es menor ( $R^2=0.704$ ) también es directa y positiva.

### 3.3.6 Pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofilas Cl a y Cl b fue mayor en estado fresco, para las tres especies. (Cuadro 3.2). Los tratamientos de deshidratación no presentaron diferencias estadísticas en el contenido de Cl a y b (Cuadro 3.2). En orégano los mejores tratamientos para la conservación Cl a y b fueron la DA y DSC, mientras que para carotenos y xantofilas, no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos de deshidratación (Cuadro 3.2). Camacho *et al.* (2011) reportan una pérdida de clorofilas al deshidratar la hojas de orégano de 10.29 y 4.27 mg mL<sup>-1</sup>, para Cl a y Cl b y a 1.92 y 0.34 mg mL<sup>-1</sup> después de ser deshidratadas en un deshidratador

solar. Con respecto a perejil, no se encontraron diferencias estadísticas en cuanto al contenido de clorofilas, carotenos y xantofilas.

Existe una pérdida de color por los tratamientos de deshidratación, de modo que hay una degradación de las clorofilas “a” y “b” con el proceso térmico, lo que provoca un cambio de color de verde brillante a un verde oliva de las feofitinas a y b, debido a la pérdida de  $Mg^{2+}$ . También, la relación “Cl a/Cl b”, es un indicador del cambio de color de verde a verde-amarillo debido a los daños por calor. Otra causa, es la descomposición de la clorofila por la pérdida del fitol, catalizado por la clorofilasa, formando clorofilidos que son más sensibles a la pérdida de  $Mg^{2+}$  lo que da un pigmento café ( Di Cesare *et al.*, 2003).

En las tres especies estudiadas hay una correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de clorofila total, carotenos y xantofilas. El orégano presentó la correlación más alta tanto con la clorofila total ( $R^2= 0.927$ ), como con los carotenos y xantofilas ( $R^2= 0.868$ ), con una correlación altamente significativa ( $r=0.88$ ;  $\alpha=0.001$ ) entre  $CI_{50}$  y los pigmentos fotosintéticos (CT).

### 3.4 CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que para conservar las características organolépticas de la albahaca puede ser secada a temperatura ambiente bajo sombra o bien por deshidratación con aire caliente a temperatura de 40 y 45 °C. En orégano, el método por DSC preserva mejor la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos y flavonoides al igual que el color. En perejil, no se detectó diferencias entre los tipos de deshidratación, pero si hubo diferencia en el color del producto deshidratado. Por lo anterior para mantener el color y compuestos nutraceuticos de las tres hierbas aromáticas se recomienda utilizar la DC a 40 y 50 °C, y la DS.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. and Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198
- Camacho D. B., López I., Sojo C., Linares O., Martínez C. M., Pantaleón D. G. y Álvarez M. M. 2011. Efecto de extractos de orégano (*Origanum vulgare* L.) ante la oxidación en aceite vegetal comestible. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 28(1):628-635.
- Carrín M. E. and Crapiste G. H. 2009. Convective drying of foods. *Advances in Food Dehydration*. CRC Press, Boca Raton, pp 123–151.
- Chang C., Yang M. Wen H. and Chern J. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Analysis*, 10: 176-182.
- Di Cesare L. F., Forni E., Viscardi D. and Nani R. C. 2003. Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12): 3575-3581.
- Hayta M. 2002. Bulgur quality as affected by drying Methods. *Journal of Food Science*, 67 (6): 2241-2244.
- Jimoh K. O., Olurin T. O., and Aina J. O. 2010. Effect of drying methods on the rheological characteristics and colour of yam flours. *African Journal of Biotechnology*, 8(10): 2325-2328.
- Kaurinovic B., Popović M., Vlaisavljevic S. and Trivic S. 2011. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. Extracts. *Journal Molecules*, 16: 7401-7414.

- Lewicki P. P. and Lukaszuk A. 2000. Effect of osmotic dewatering on rheological properties of apple subjected to convective drying. *Journal of Food Engineering*, 45: 119-126.
- Lewicki P. P. 2006. Design of hot air drying for better foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17(4): 153-163.
- Lichtenthaler H.K. and Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603:591– 592.
- Makkar H. P. S., Blummel M., Borowy N. K. and Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 61: 161-165.
- Makri O. and Kintzios S. 2008. *Ocimum* sp. (basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 13(3): 123-150.
- Muñoz F. 1996. *Plantas Medicinales y Aromáticas; estudio, cultivo y procesado*. 2da Reimpresión. Editorial Mundi Prensa S.A, Madrid España. pp 15, 247, 267, 311, 312, 316, 320.
- Popović M., Kaurinović B., Jakovljević V., Mimica-Dukic N. and Bursać M. 2007. Effect of parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with CCl<sub>4</sub>. *Phytotherapy Research*, 21(8): 717-723.
- Rocha R. P., Melo E. C. and Radünz L. 2011. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33): 7076-7084.

- Sagar V. R. and Kumar P. S. 2010. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(1): 15-26.
- Sancho-Knapik D., Álvarez-Arenas T. G., Peguero-Pina J. J., Fernández V. and Gil-Pelegrín E. 2011. Relationship between ultrasonic properties and structural changes in the mesophyll during leaf dehydration. *Journal of Experimental Botany*, 62(10): 3637-3645.
- Santoro G. F., Gracas C. D., M., Guimaraes L. G., Salgado A.P., Menna-Barreto R.F and Soares M.J. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100 (4): 783-90.
- Vadivambal R. and Jayas D.S. 2007. Changes in quality of microwave-treated agricultural products a review. *Biosystems Engineering*, 98(1): 1-16.
- Vasudevan P., Suman K. and Satyawati S. 1999. Bioactive botanicals from Basil (*Ocimum* sp.). *Journal of Scientific and Industrial Research*, 58: 332-338.
- Vignoni L.A., Cesari R. M., Forte M. and Mirabile M.L. 2006. Determinación de índice de color en ajo picado. *Información Tecnológica*, 17(6): 63-67.

**CAPITULO IV. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE SECADO EN *Ocimum basilicum* Y *Origanum vulgare* SOBRE EL CONTENIDO DE ACEITES ESENCIALES.**

**4. 1 INTRODUCCIÓN**

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (compuestos fenólicos y ácidos orgánicos) aislados de plantas (Giani *et al.*, 2006). Generalmente, estos se extraen por destilación, extracción con solvente, presión en frío, maceración o extracción supercrítica con bióxido de carbono. La calidad y la cantidad de aceite extraído de la planta depende de varios factores tales como: estación del año, método de extracción, estado fisiológico del material vegetal, clima y tipo de suelo (Rocha *et al.*, 2011).

Los aceites esenciales contienen compuestos bioactivos, los cuales tienen influencia en la inhibición del metabolismo de los insectos, por ejemplo, alteran su crecimiento, desarrollo, reproducción u orientación. Entre los principales compuestos se encuentran los monoterpenos (Digilio *et al.*, 2007). Muchos estudios muestran que tienen amplio espectro de efecto farmacológico con propiedades antibacteriales, antivirales, anti helmínticas y anti protozoarias. Estas características posiblemente están relacionadas en función a los compuestos de la planta (Giani *et al.*, 2006). Por ejemplo, el aceite esencial de albahaca (*O. basilicum*) funciona como repelente para *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. También, tiene efecto insecticida en *Zabrotes sub fasciatus* (Vasudevan *et al.*, 1999) para *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus* (López *et al.*, 2008). También la albahaca (*O. sanctorum*) es ampliamente usada en el sistema de medicina ayurvédica, por su capacidad de bajar glucosa en sangre (Raseetha *et al.*, 2009). La fumigación por 24 h con vapores de aceite de albahaca u orégano reduce la fecundidad de las hembras de

*Acanthoscelides obtectus*, de igual manera sucede con *Acyrtosiphon pisum* y *Myzus persicae* (Papachristos y Stamopoulos, 2002).

El aceite esencial de orégano (*O. vulgare*) tiene amplia actividad biológica, ya que puede retardar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Este presenta fuerte actividad antimicrobiana, que se atribuye a la presencia de terpenos ( $\alpha$ .terpineno y  $\alpha$ .cimeno) y compuestos fenólicos (timol y carvacrol) (Giani *et al.*, 2006). El aceite esencial de orégano es buen repelente de *Leptinotarsa decemlineata* (Pavela, 2004). Baricevic *et al.*, (2001) reportan al aceite esencial de orégano como insecticida potencial contra plagas de granos almacenados como *Acanthoscelides obtectus*, *Sitophilus granarius* y *S. oryzae*; aunque la efectividad del orégano depende de la estación del año y tipo de secado (Ignatowicz, 1997). Además los vapores de los aceites esenciales de orégano tienen efecto tóxico contra de *Tetranychus urticae* (ninfas y adultos) y *Bemisia tabaci* (adultos) (Onder *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la composición y concentración de los aceites esenciales dependen de numerosos factores agroclimáticos que ocurren durante el desarrollo de la planta. Aunado a esto, el proceso de deshidratación conlleva diversos cambios en la composición química, donde los compuestos volátiles son afectados marcadamente, el grado de afectación varía en función del método de secado, características biológicas del material vegetal y composición de sus volátiles. Por ejemplo, cuando las hojas de laurel son deshidratadas en horno, el tipo y concentración de los compuestos volátiles disminuyen en comparación con las secadas a temperatura ambiente; de igual modo ocurren importantes pérdidas de volátiles cuando se usa el secado frío, esto se ha observado en tomillo, salvia y otras especies (Díaz-Maroto *et al.*, 2004).

Por lo anterior se puede considerar a los aceites esenciales como bioinsecticidas seguros, efectivos, biodegradables, además de cumplir con los requerimientos de inocuidad y seguridad alimentaria, que se establecen en el mercado internacional de frutas frescas. Por ello, esta investigación tuvo como objetivo conocer el efecto del secado sobre los compuestos químicos de la albahaca y el orégano después de ser sometidos a procesos de deshidratación.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Deshidratación**

Se deshidrataron hojas de albahaca y orégano procedentes de San Gregorio Zacapechpan, Cholula, Puebla. Por tres métodos de deshidratación: 1) convección de aire caliente a 40, 45 y 50 °C, 2) deshidratado solar y 3) temperatura ambiente bajo sombra (21±2 °C).

### **4.2.2 Extracción de aceites esenciales**

Los productos obtenidos se sometieron a hidrodestilación por 3 h, la separación del aceite esencial de la fase acuosa se realizó con 35 mL de cloruro de metileno (®Baker, 9324-07) con tres extracciones consecutivas. Posteriormente, se concentró en rotavapor para eliminar el disolvente. Las muestras obtenidas se conservaron en viales ámbar con capacidad 500 µL y fueron almacenadas a -20°C hasta ser analizadas.

### 4.2.3 Preparación de la muestra para cromatografía de gases masa

Los aceites esenciales de albahaca y orégano se llevaron a una concentración de 0.23% con cloruro de metileno (®Baker, 9324-07). Para analizar los aceites se utilizó un cromatógrafo marca Agilent Technologies, acoplado a un detector de masas HP 5973, con una columna HP5/30 m x 0.225 mm de diámetro interno. Se utilizó helio como gas acarreador con pureza de 99.9 %. Las condiciones de corrida para el cromatógrafo fueran las siguientes:

ALBAHACA. La temperatura del horno comenzó en 40 °C por 3 min, después aumento 10 °C min<sup>-1</sup> hasta 64 °C, a continuación fue incrementando 5 °C min<sup>-1</sup> hasta 95°C y se mantuvo por un minuto; luego aumento 5 °C min<sup>-1</sup> hasta 130 °C, finalmente incremento 3 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar una temperatura de 168 °C; el flujo constante fue de 1.33 mL min<sup>-1</sup>; el inyector estuvo en modo “splitless”. La energía de ionización fue de 70 eV.

ORÉGANO. La temperatura del horno comenzó en 40 °C, después aumento 9 °C min<sup>-1</sup> hasta 82 °C, a continuación se incrementó 5 °C min<sup>-1</sup> hasta 131 °C; por último aumento 4 °C min<sup>-1</sup> hasta 185 °C. El flujo se trabajó en modo de rampas, inició con 1.3 mL min<sup>-1</sup> durante 11 min, después disminuyó a velocidad hasta 1 mL min<sup>-1</sup> hasta 0.5 mL, el cual se mantuvo por 2 min; en seguida se incrementó a la misma velocidad hasta 1.5 mL min<sup>-1</sup> y se mantuvo por 2 min, finalmente el flujo se redujo a 0.7 mL min<sup>-1</sup> por el resto del tiempo de detección (12 min). La energía de ionización fue de 70 eV.

La abundancia de cada compuesto es expresada como porcentaje de la suma del área total de todos los picos en el cromatograma. La identidad de los compuesto se hizo mediante la comparación de sus índices de Kovats (Hübschmann, 2015) con

índices reportados en la literatura, comparación de espectros con los de la biblioteca NIST V. 2008, y comparación de su índice de Kovats con el de estándares comerciales de  $\beta$ -terpineno,  $\rho$ -cimeno, linalol, eugenol, p-timol,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno (Sigma-Aldrich®).

#### 4.2.4 Análisis estadístico

Con los pesos de los aceites esenciales obtenidos de cada tratamiento, se hizo un análisis de varianza y la prueba de medias según Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con el sistema (SAS®) para Windows versión 9. Para el análisis de los cronogramas se hizo un análisis cualitativo y se comparó con lo reportado en la literatura.

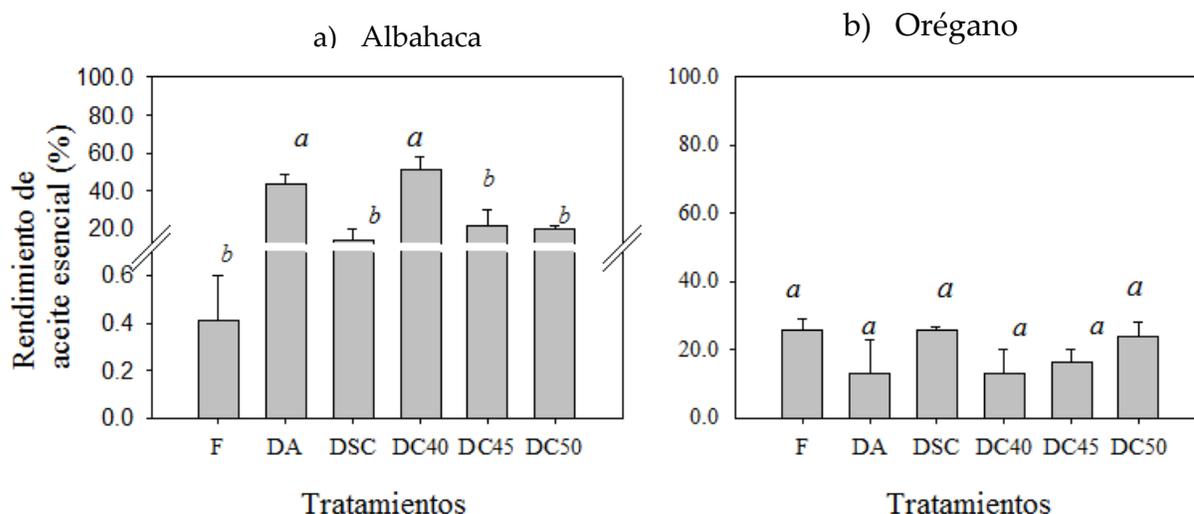
### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1 Rendimiento de aceites esenciales

La deshidratación de plantas aromáticas tuvo efecto significativo en el contenido y composición de sus aceites esenciales según el análisis de medias. En albahaca los tratamientos con mayor rendimiento de aceite esencial fueron: deshidratación por convección (DC) a 40 °C y deshidratación a temperatura ambiente (DA) (51 y 44 % materia seca respectivamente), los cuales no mostraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). La DC a 45 °C tuvo un rendimiento de 21 %, seguida por el de 50 °C (20 %), la DS (14 %) y el rendimiento más bajo se obtuvo con hojas frescas de albahaca (0.42 %) (Figura 4.1A). Estos resultados coinciden con los encontrados por Pirbalouti *et al.* (2013), quienes mencionan que incrementos en la temperatura disminuye significativamente el contenido de aceite esencial de albahaca, mientras que las hojas de albahaca secadas bajo condiciones de sombra, presentan un mejor

rendimiento de aceite esencial en comparación con los secados a altas temperaturas (60 °C).

En orégano el rendimiento se encontró en un intervalo de 13 a 26 % y los tratamientos no presentaron diferencias significativas. Los tratamientos que tuvieron mayor rendimiento fueron: DSC (26 %), F (26 %) y DC a 50 °C (23 %), por el contrario la DC a 40 y 45 °C la cantidad de aceite esencial disminuyó (13 y 16.5 %, respectivamente) (Figura 4.1B). El rendimiento y la composición química de los aceites esenciales de plantas medicinales están relacionados con factores internos y externos, incluyendo el proceso de deshidratación (Rocha *et al.*, 2001; Calvo-Irabien *et al.*, 2009).



**Figura 4.1** Rendimiento de aceite esencial obtenido de hojas deshidratadas en base a 100 g de materia seca de A) Albahaca y B) Orégano. F= hoja fresca, DA= hoja secada a temperatura ambiente, DSC= secado solar cubierto, DC40= hoja deshidratada por convección a 40 °C, DC45= hoja deshidratada a 45 °C, DC50= hoja deshidratada a 50 °C. Barras con letras iguales por especie indica que no hay diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ).

### 4.3.2 Compuestos volátiles de la albahaca

El cuadro 4.1 muestra los compuestos volátiles identificados con el índice de Kovats (IK) en estado fresco y deshidratado de albahaca. La deshidratación trae consigo la pérdida de compuestos volátiles o la oxidación de algunos de ellos, por ejemplo en la albahaca fresca (AF) se encontraron 31 compuestos, 36 compuestos en la DS, 21 compuestos en el tratamiento de DA, en la DC a 40, 45 y 50 °C se registraron 22, 18 y 27 compuestos respectivamente. En la literatura reportan que el método de secado está asociado con cambios significativos en el perfil de los aceites esenciales, dado que algunos monoterpenos se pierden durante el proceso de deshidratación, otros compuestos surgen como productos de oxidación que se da durante el secado (Jerković *et al.*, 2001); y solo algunos no se ven afectados con este proceso y se logran preservar, tal es el caso del estragol (metilchavicol), no obstante es afectado con altas temperaturas (60 °C).

**Cuadro 4.1.** Composición química de los aceites esenciales de albahaca después de ser sometidos a procesos de deshidratación (Porcentaje de área).

Compuesto	Tratamientos						
	IK	F	DC40	DC45	DC50	DSC	DA
Ac. Cinámico, metilester	1004	6.72	55.02	76.2	5.84	8.86	10.7
2-Hidroxi-1,8-cineol	1010	0.12	0	0	0	0.06	0
Artemisia trieno	1033	0.1	0	0	0	0.05	0
Trans-geraniol	1053	0.68	0.68	0.24	0.19	0.53	0.26
Cinamato de metilo	1056	0	0	0	28.1	0	0
Eugenol	1058	39.91	1.11	0.71	1.9	0.42	4.49
Borneol	1066	0.28	0.48	0	0.17	0.33	0.37
Epoxi linalol	1073	0.58	0	0.53	0.37	0.38	0
1-terpinen-4-ol	1077	0.32	0.35	0	0	0.34	0.68
Ester metílico del ácido cinámico	1083	30.91	10.67	6.76	41.5	58.9	54
Cis-linalol	1086	0.28	1.38	0	1.7	1.49	0.39
Terpineol	1090	0.91	0.78	0.21	0.37	0.55	1.01
Estragol	1097	0	0.44	0	0	0.33	0
Linalol	1098	5.35	0	0.44	3.72	10.59	17.14
Exo- acetato hidroxí cineol	1240	0.34	0.34	0.24	0.31	0.3	0.32
Acetato Exo-2-hidroxícineol	1262	0.33	0.34	0	0	0.08	0
Acetato de bornilo	1285	0.18	0.47	0	0.16	0.6	0.48
Jasmonato de metilo	1345	0.26	0	0	0	0.13	0
Epi-biciclo sesqui felandreno	1439	6.85	6.01	8.69	5.31	5.74	3.61
$\delta$ -guaïeno	1509	0.3	0.52	0	0.17	0.39	0.34
$\alpha$ -cubebeno	1514	0.78	0	0	0.96	0.89	0.51
$\beta$ -gurjuneno	1519	0	0	0	0	0.17	0
$\alpha$ -amorfenol	1524	1.3	2.48	1.39	4.27	1.88	1.45
Spatulenol	1525	0	0	0	0.51	0	0
$\alpha$ -amorfenol	1526	0	0	0	0.54	0	0
$\alpha$ -bergamoteno	1534	0.5	0.27	0	0.16	0.4	1.1
$\alpha$ -guaïeno	1537	0.13	0.27	0	0	0.2	0.22
L-calameneno	1539	0.23	0	0.25	0.2	0.33	0.23
$\beta$ -elemeno	1540	0	0	0	0	0.14	0
(-) Spatulenol	1547	0.2	1.06	1.34	0.93	1.25	0.45
$\beta$ -eudesmol	1548	0.2	0	0.34	0.29	0.33	0
Cedreno	1552	0	0.93	1.36	0	0.18	0
$\alpha$ -cardinol	1553	0.4	0.34	0.5	0.32	0.42	0
$\alpha$ -cariofileno	1553	0.14	0	0	0	0.18	0
$\beta$ -cubebeno	1562	0.18	0	0	0.13	0.24	0.23
D-germacreno	1581	0.28	0.47	0.21	0.82	0.37	0
$\beta$ -Ionone	1584	0	0	0.28	0.25	0.37	0
(-) $\beta$ - elemeno	1592	0.66	0.93	0.42	0.41	0.69	0.57
B-germacreno	1596	0.33	0	0	0	0.31	0

NOTA: IK: índice de Kovats, F= hoja fresca, DA= hoja secada a temperatura ambiente, DSC= secado solar cubierto, DC40= hoja deshidratada por convección a 40 °C, DC45= hoja deshidratada a 45 °C, DC50= hoja deshidratada a 50 °C.

Después de someter la albahaca a los diferentes tratamientos de deshidratación, se observaron cuatro grupos de compuestos volátiles: compuestos que aumentaron, estables, de comportamiento variable y los que disminuyeron.

En la DS y la DA, la albahaca preservó mejor el óxido-*cis*-linalol, linalol y borneol, en comparación con los tratamientos por convección. Mientras que el  $\alpha$ -amorfeno, *L*-calameneno,  $\delta$ -guaiano,  $\beta$ -elemeno y  $\beta$ -cubebeno se mantuvieron estables en los diferentes métodos de secado. Algunos compuestos incrementaron únicamente con la DA, entre los que se encuentran: el 1-terpinen-4-ol, germacreno y acetato de bornilo. Los compuestos que disminuyeron en todos los tratamientos fueron el *trans*-geraniol y eugenol, en este último se detectaron solo trazas en las hojas deshidratadas. En cambio, el borneol y terpineol se degradaron a 45 y 50 °C, éste último compuesto se redujo hasta en 80 %. Compuestos con comportamiento variable fueron el (-)-spatulanol,  $\alpha$ -germacreno (disminuyen en todos los tratamientos por convección, pero aumenta con la DA) y el cinamato de metilo (incrementan solo en la DS, DC a 50 °C y DA). El terpineol disminuyó en todos los tratamientos, pero aumentó en la DA, mientras que el cinamato de metilo únicamente se encontró en la DSC. Los resultados concuerdan con otros estudios que señalan que un incremento en la temperatura causa mayor pérdida de compuestos volátiles en albahaca, el eugenol disminuye con el tratamiento de deshidratado a 40 °C (Calín-Sánchez *et al.*, 2012).

Los principales compuestos encontrados en albahaca fueron eugenol, cinamato de metilo, 1,8 cineol y linalol (Cuadro 4.1), responsables del aroma típico de la

albahaca y con buenas propiedades antioxidantes (Arijana *et al.*, 2014). Zamfirache *et al.* (2011) reportaron como principales compuestos al linalol, eugenol, tau-cadinol,  $\alpha$ -bergamoteno y D-germacreno, para esta misma especie en fresco. El proceso de deshidratación conlleva diversos cambios químicos, uno de los más afectados es la concentración de productos volátiles, esta varía en función del método de secado, características biológicas de las plantas y composición de sus volátiles. Por ejemplo, cuando las hojas de laurel son deshidratadas en horno los compuestos volátiles disminuyen en comparación con las secadas a temperatura ambiente, de igual modo ocurren importantes pérdidas de volátiles cuando se usa el secado frío, esto se observó en tomillo, salvia y otras especies (Díaz-Maroto *et al.*, 2004).

#### 4.3.3 Compuestos volátiles del orégano

El cuadro 4.2 muestra los principales compuestos identificados de orégano con el IK, en las hojas frescas de orégano se detectaron 20 compuestos, y dependiendo el tipo de deshidratación el número de ellos varió considerablemente. Por ejemplo, en los tratamientos de DC a 40 °C y DS se encontraron 17 compuestos, en la DA, 22 compuestos y por DC a 45 y 50 °C, 23 compuestos. Esta heterogeneidad en el número de compuestos puede ser debido a que el material fresco contiene un alto porcentaje de agua y con la deshidratación su composición se altera, hay evaporación de agua y junto con esta se da una pérdida de compuestos volátiles, los cuales se evaporan, pero al mismo tiempo puede haber un incremento de la concentración de algunos monoterpenos y sesquiterpenos, por ejemplo, el timol en tomillo y orégano. (Calín-Sánchez *et al.*, 2012).

Los principales compuestos encontrados fueron timol, terpineno 4-ol y  $\beta$ -cisterpineol. Figiel *et al.* (2010) reportan al timol, carvacrol y  $\delta$ -terpineno como compuestos mayoritarios. Esta diferencia se explica porque la composición química

del aceite esencial de hierbas y especies varía dependiendo del químiotipo (Krishnakumar y Potty, 2012) la región geográfica, variedad, edad de la planta y método de secado (Jerković *et al.*, 2001).

**Cuadro 4. 2.** Composición química de los aceites esenciales de orégano después de ser sometidos a procesos de deshidratación (Porcentaje de área).

Compuestos	Tratamientos							
	IK	F	DC40	DC45	DC50	DSC	DA	
1-Octen-3-ol	876	0.42	0	0.92	0.94	0.77	1.11	
P-Timol/O- cimeno 5- ol	1000	33.21	56.51	27.38	23.24	25.77	26.28	
Cis-piperitol	1002	0.53	0.87	0.57	0.42	0.28	0.26	
Acetato de octen-1-ol	1009	0	0	0.17	0	0	0.22	
$\alpha$ -terpineno	1016	0	0	0	0	0.22	0.31	
Trans-p-methen-2-en-1-ol	1017	1.02	0.97	1.4	1.24	0.92	1	
$\beta$ -Cimeno	1021	0	0.43	0.22	0.16	0	0	
<i>p</i> -cimeno	1024	0	0	0	0	0	0.31	
$\alpha$ -Tujeno	1024	0	0	0	0	0.37	0.35	
$\beta$ -terpineno	1028	0	0	0	0	0	0.16	
Camfeno	1033	1.23	0.46	0	1.15	1.15	1.25	
Borneol	1067	0.52	0.51	0.49	0.5	0.5	0.43	
Cis- $\beta$ -terpineol	1067	1.18	0	1.05	1.88	2.06	2.41	
$\beta$ -terpineno	1071	0	0	0	0.27	0.55	0.46	
Terpinen-4-ol	1079	22.93	24.81	33.09	26.04	15.48	17.72	
Ac. Cinamico, metilester	1081	0.55	0	0	0	0	0	
<i>p</i> -Cimeno-8-ol	1086	0	0.45	0.3	0	0	0	
Terpinoleno	1088	0	0	0	0	0	0.18	
$\alpha$ -Terpineol	1092	4.1	6.71	4.88	4.52	4.28	3.35	
Trans-piperitol	1096	0.47	0.39	0.45	0.53	0.09	0.09	
Cis- $\beta$ -terpineol	1098	16.3	2.46	10.41	18.52	29.52	25.27	
Éter metil isotimol	1141	8.17	0.4	8.35	9.67	6.59	6.09	
Bergamiol	1252	0	0	0.27	0.27	0.28	0.24	
Acetato de bornilo	1285	0.21	0	0.2	0.17	0	0.12	
Cariofileno	1520	3.39	1.11	3.24	4.07	4.46	4.36	
$\alpha$ -Cariofileno	1555	0.71	0	0.65	0.87	0.84	0.9	
$\tau$ -elemeno	1558	0	0	0.39	0.36	0.45	0.87	
D-Germacreno	1582	1.51	0.61	1.08	1.33	1.54	1.76	
$\beta$ -Germacreno	1597	2.64	1.19	2.13	2.66	2.74	2.98	

NOTA: IK: índice de Kovats, F= hoja fresca, DA= hoja secada a temperatura ambiente, DSC= secado solar cubierto, DC40= hoja deshidratada por convección a 40 °C, DC45= hoja deshidratada a 45 °C, DC50= hoja deshidratada a 50 °C.

En orégano todos los compuestos identificados con el IK presentaron comportamiento variable ante la deshidratación, es decir, algunos compuestos se mantuvieron estables, otros disminuyeron o aumentaron con la deshidratación. El timol aumenta 20 % cuando se deshidrata por convección (40 °C), pero con los demás tratamientos disminuye con respecto al fresco (28 %). El  $\beta$  y D-germacreno se mantienen en todos los tratamientos aunque disminuye a 40 °C. El *cis*- $\beta$ -terpineol se mantiene con tratamientos de deshidratación por convección (40 y 45 °C) e incrementa con la DC a 50 °C, DS y DA. El bergamiol y camfeno solo se encontraron en algunos tratamientos (DC a 50 °C, DS y DA). El acetato de bornilo desaparece con la DS y la DC 40 °C, pero en los demás tratamientos se conserva. El  $\alpha$ -terpineol se mantiene constante.

El comportamiento variable de los compuestos químicos en los aceites esenciales se atribuye a diversos factores como: 1) los compuestos volátiles pueden ser arrastrados por el agua hacia la superficie de la hoja causando su evaporación (Rocha *et al.*, 2011) total o parcialmente; los compuestos más afectados son los fenilpropanoides, monoterpenos oxigenados y monoterpenos hidrocarbonados.

Estos compuestos aromáticos tienen bajo peso molecular comparado con los sesquiterpenos, esto hace que sean más fácilmente evaporados, durante la deshidratación (Pirbalouti *et al.*, 2013). Se ha observado el mismo efecto en la deshidratación por convección a 60 °C en tomillo y salvia, donde se reportan pérdidas significativas en los compuestos monoterpenos no oxigenados (Venskutonis, 1997). 2) las altas temperaturas (60 °C) alteran la epidermis de las hojas, provocando una ruptura en las glándulas sebáceas y con ello la pérdida de aceites esenciales (Díaz-Maroto *et al.*, 2004). 3) con la temperatura y la exposición al aire se pueden inducir cambios en la estructura química, debido a la interacción entre los

componentes volátiles, la naturaleza hidrófoba de las sustancias, entre otros elementos (Figiel *et al.*, 2010); que dan lugar a la formación de nuevos compuestos, es decir, la naturaleza de los aceites esenciales (hidrocarburos, esteroides, terpenos, lactonas, fenoles, aldehídos, ácidos, alcoholes, cetonas, y esteroides, entre otros compuestos oxigenados) influye en la oxidación de sus componentes, ya que, algunos son más estables que otros. Por ejemplo, los compuestos insaturados, monoterpenos y sesquiterpenos, tienden a oxidarse y ranciarse en presencia de aire y luz (ICSHT, 2008). Tal vez por esta razón, se encontraron más compuestos en los aceites esenciales de albahaca obtenidos del tratamiento de DS, donde las hojas tuvieron un mayor tiempo exposición al sol o luz comparando con los demás tratamientos. Por otro lado, en la DC el material vegetal se expuso a un gran volumen de aire caliente que fluyó a través de él, por más de 3 h, siendo este uno de los precursores de los procesos de oxidación. 4) es posible una reestructuración de compuestos, algunos estudios señalan que los monoterpenos alcoholes como el *cis*-sabineno (también llamado *cis*-thujan-4-ol), *trans*-sabineno y el acetato de *cis*-sabineno son muchos de los constituyentes de la fracción volátil del aceite de orégano, que se reestructura durante la hidrodestilación formando terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol y  $\gamma$ -terpineno (Pushpangadan y Amity, 2012).

El efecto de los tratamientos varió considerablemente de una especie a otra, mientras en albahaca la DC a 50 °C provoca pérdidas de compuestos volátiles, en orégano no es afectado. Se especula que esto se debe a la naturaleza de compuestos presentes en cada especie, como en albahaca se tiene: fenilpropanoides (metilchavicol, eugenol), alcoholes monoterpenos (linalol, geraniol) y cinamato de metilo (Bakkali *et al.*, 2008). También están presentes flavonoides, ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos entre otros (Javanmardi *et al.*, 2003). Por su parte orégano tiene alcoholes monoterpenos (terpineno-4-ol), monoterpenos hidrocarbonados (*cis*- $\beta$ -terpineol,  $\alpha$ -terpineol) y monoterpenos fenólicos (timol) (Kulisic *et al.*, 2004); además,

las hojas de orégano contienen polifenoles y flavonas como 4,5,7-trihidroxi3,6,8-trimetoxilflavona y diosmetina (Krishnakumar y Potty, 2012). La mezcla de los diferentes compuestos (fenoles, flavonas, terpenos entre otro) que se encuentra en las hojas de albahaca u orégano, puede que ejerzan un efecto sinérgico que permita conservar o no los componentes de los aceites esenciales para cada especie.

#### 4.4 CONCLUSIÓN

Albahaca y el orégano tuvieron un comportamiento diferente ante los procesos de deshidratación. Siendo la albahaca más sensible que el orégano al calor, ya que se obtuvo mayor rendimiento a temperatura menor o igual de 40 °C. Las hojas deshidratadas de la albahaca pierden algunos compuestos como el jasmonato de metilo y el eugenol, mientras que el linalol se pierde a 40° C, pero se conserva cuando es deshidratado a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). El rendimiento de los aceites esenciales de orégano no presentó diferencias entre los diferentes métodos de deshidratación. Los dos compuestos principales de orégano, timol y terpinen-4-ol no se ven afectados con los procesos de deshidratación evaluados.

#### 4.5 LITERATURA CITADA

- Arijana B., Vojvodić A., Komes D., Akkermans C., Belščak-Cvitanović A., Stolk M. and Hofland G. 2014. Comparative evaluation of CO<sub>2</sub> drying as an alternative drying technique of basil (*Ocimum basilicum* L.). The effect on bioactive and sensory properties. *Food Research International*, 10 (64): 34–42.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2): 446-475.
- Calín-Sánchez Á., Lech K., Szumny A., Figiel A., and Carbonell-Barrachina Á. A. 2012. Volatile composition of sweet basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by drying method. *Food Research International*, 48(1): 217-225.
- Calvo-Irabien, Yam-Puc, Dzib, Escalante-Erosa and Peña-Rodríguez. 2009. Effect of Postharvest Drying on the Composition of Mexican Oregano (*Lippia graveolens*) Essential Oil. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 15(3): 281-287.
- Díaz-Maroto M. C., Sánchez P. E., Castro L., Viñas G. and Pérez-Coello M. S. 2004. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L) during drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15):2070-2076.
- Digilio M. C., Mancini E. Voto E. And De Feo V. 2008. Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions*, 3(1):17-23.
- Figiel A., Szumny A., Gutiérrez-Ortíz A. and Carbonell-Barrachina Á. A. 2010. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 98(2): 240-247.
- Hübschmann H. J. 2015. *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons.

- Ignatowicz S. 1997. Powdered herbs of the mint family (Lamiaceae) as insect repellents for protection of stored wheat grain. *Polskie Pismo Entomologiczne*, 66(1/2): 135-149.
- Jerković J., Mastelić J. and Miloš. M. 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(6): 649–654
- Krishnakumar V. and Potty S. N. 2012. Marjoram. *Handbook of herbs and spices*. Second edition Central Plantation Crops Research Institute India, 1: 337-362.
- Kulisic T., Radonic A., Katalinic V and Milos M. 2004. Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4): 633-640
- López M., Jordán M., and Pascual-Villalobos M. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research*, 44(3): 273–278.
- Onder C., 'Irfan A. and Fikrettin S. 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Journal Industrial Crops and Products*, 23:140–146.
- Papachristos and Stamopoulos. 2002. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 38: 117–128.
- Pavela R. 2004. Repellent effect of ethanol extracts from plants of the family Lamiaceae on Colorado Potato Beetle adults (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *National Academy Science Letters*, 27(5/6): 195-203.
- Pirbalouti A. G., Mahdad E., and Craker L. 2013. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. *Food Chemistry*, 141(3): 2440-2449.

- Pushpangadan P. and Amity G. 2012. Basil. Handbook of herbs and spices. Second edition. Institute for Herbal and Biotech Products Development, and Institute of Phytochemistry and Phytomedicine, India. (1): 56-72.
- Rasetha V., Cheng S.F. and Chuah C. 2009. Comparative study of volatile compounds from genus *Ocimum*. American Journal of Applied Sciences, 6(3):523-528.
- Rocha R. P., Melo E. C. and Radunz L. L. 2011. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. Journal of Medicinal Plants Research, 5(33): 7076-7084.
- Sellami I. H., Maamouri E., Chahed T., Wannas W. A., Kchouk M. E., and Marzouk B. 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). Industrial Crops and Products, 30(3): 395-402.
- Vasudevan P., Suman K. and Satyawati S. 1999. Bioactive botanicals from Basil (*Ocimum* sp.). Journal of scientific and industrial research, 58: 332 – 338.
- Venskutonis P.R. 1997. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). Food Chemistry, 59 (2): 219–227.
- Vera R. R., and Chane-Ming J. 1999. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. Food Chemistry, 66(2): 143-145.
- Zamfirache M. M., Padurariu C., Burzo I., Olteanu Z., Boz I., and Lamban C. 2011. Research regarding the chemical composition of the volatile oil of some taxa belonging to the genus *Ocimum*. Analele Stiintifice ale Universitatii" Al. I. Cuza" din Iasi, 57(1): 31.

## CAPITULO V. CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN HOJAS DE ALBAHACA Y ORÉGANO DESHIDRATADAS POR DIFERENTES PROCESOS

### 5.1 INTRODUCCIÓN

La deshidratación es un método de conservación de alimentos, que reduce el contenido de agua, con ello, disminuye la actividad enzimática e inhibe el crecimiento microbiano, aumentando la vida de anaquel del producto (Delgado y Silva, 2014). Una baja actividad de agua en alimentos ( $A_w < 0.7$ ) se pensaba que era microbiológicamente segura (Joshua *et al.*, 20014). Sin embargo, en las últimas dos décadas ha incrementado el número de infecciones e intoxicaciones transmitidas por alimentos deshidratados (Schweiggert *et al.*, 2007), como leche, chocolate (Zweifel y Stephan, 2012), té (Koch *et al.*, 2005), chiles (Little *et al.*, 2003) y especias, siendo *Salmonella* spp. la principal bacteria causante de estos brotes.

Las verduras de hoja verde, incluidas las hierbas frescas son las que tienen más riesgo, ya que su manejo es complejo porque se encuentran expuestas a una amplia gama de contaminantes microbianos durante el cultivo, pre y post-cosecha, y son comercializadas en grandes volúmenes (Sagoo *et al.*, 2009; Delbeke *et al.*, 2015). Las hierbas culinarias se han asociado a numerosos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Cuando un producto es contaminado con *Salmonella* es difícil de erradicar, ya que esta enterobacteria es capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo (Komitopoulou y Peñaloza, 2009). Este hecho perjudica la calidad de alimentos y causa pérdidas económicas debido al retiro de especias en el mercado (Vij *et al.*, 2006).

Existe poca información con respecto a la calidad sanitaria de la albahaca y el orégano después de ser sometidas a un proceso de deshidratación. Por lo que el

presente trabajo tuvo como objetivo conocer la calidad microbiológica de las hojas de albahaca y orégano después de ser sometidas a diferentes procedimientos de deshidratación como son el solar, por convección y a temperatura ambiente.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Origen de la muestra

El material vegetal se adquirió en la central de abastos de Puebla, Puebla, y provenían de la localidad de San Gregorio Zacapechpan, San Andres Cholula. Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico estériles de 50 X 40 cm y transportadas al laboratorio del Colegio de Postgraduados del *Campus* Puebla para ser analizadas. Los tallos se deshojaron manualmente de manera aséptica y se lavaron con agua potable y se procedió a realizar la deshidratación del material mediante los tres métodos que se describen a continuación: 1) convección de aire caliente a 40, 45 y 50 °C, 2) deshidratación solar con cubierta y 3) a temperatura ambiente bajo sombra (21±2 °C) (Cuadro 5.1).

**Cuadro 5.1** Relación de tratamientos de deshidratación para ambas muestras vegetales.

Tratamientos	
Temperatura ambiente (22± 2°C)	DA
Solar con cubierta (43±10°C)	DSC
Convección a 40°C	DC40
Convección a 45°C	DC45
Convección a 50°C	DC50

Se hicieron tres repeticiones por tratamiento (fresco y deshidratado) y para cada uno se tomaron 125 g de hojas frescas para el análisis microbiológico y 500 g para cada método de deshidratación.

Para cada tratamiento se determinó la actividad de agua ( $A_w$ ) con un medidor con sensor de punto de rocío AQUALAB 3 TE®.

### 5.2.2 Deshidratación

*Deshidratación por convección con aire caliente (DC):* Las hojas frescas de cada especie se secaron en una estufa de aire forzado (Shel Lab, Mod. 1370FX) a 40, 45 y 50 °C ( $\pm 2$ ). Durante el proceso de deshidratación se evaluaron la temperatura y humedad relativa con un datalogger (HOBO®). El proceso finalizó cuando las muestras alcanzaron una humedad entre 7 y 10 % ( $\pm 1$ ), la cual se determinó con una termobalanza (OHAUS, MB 45). Posteriormente, las hojas secas se empacaron en bolsas de polipapel estéril.

*Deshidratación solar con cubierta (DSC):* Se utilizó un secador solar SSB-2008, que dispone de un panel solar que capta la radiación solar y concentra el calor, un ventilador de 12 V que distribuye el aire caliente a la cámara de deshidratación, mismo que funciona como un extractor de humedad. La cámara de secado tiene una rejilla reticulada de acero inoxidable (previamente sanitizada con un producto comercial Lysol®), donde se colocó el material a deshidratar, y está protegida por una cubierta de policarbonato blanco movable. Las temperaturas registradas en el equipo estuvieron en un intervalo de 20 a 52 °C.

*Deshidratado a temperatura ambiente (DA):* Las hojas frescas de cada especie, se colocaron sobre una superficie lisa previamente sanitizada con Lysol® dentro de un cuarto oscuro y se giraron periódicamente con pinzas estériles cada 24 h.

### **5.2.3 Análisis microbiológico**

#### **5.2.3.1 Preparación de la muestra**

Para cada muestra se pesaron aseptícamente 25 g (fresca o deshidratada), los cuales se mezclaron con 225 mL de agua con peptona al 0.1%, en un vaso metálico estéril de licuadora, se homogeneizó a baja velocidad por 1 minuto y se colocó en un frasco de vidrio estéril. Después se prepararon diluciones decimales hasta  $10^{-6}$  con agua peptonada al 0.1% (Bioxon®).

#### **5.2.3.2 Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias (BMA)**

Para la determinación de BMA se eligieron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , a partir de estas se sembró (0.1 mL) por difusión en placas con agar nutritivo (Difco®); los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente, se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) de BMA  $g^{-1}$  de muestra (Maturin y Peerler, 2001; NOM-092-SSA1-1994).

#### **5.2.3.3 Cuantificación de hongos y levaduras**

El mismo procedimiento descrito anteriormente se realizó para la cuantificación de hongos y levaduras. Incluyendo en este caso el medio de cultivo YMA (agar extracto de levadura y malta). Las placas se incubaron a 22 °C por 48 y 72 h bajo condiciones de obscuridad (NOM-111-SSA1-1994; Tournas *et al.*, 2001).

#### **5.2.3.4 Cuantificación de coliformes totales (CT)**

La cuantificación de coliformes se realizó por la técnica NMP (NOM-112-SSA1-1994). Para la etapa presuntiva se seleccionaron las diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  se inoculó 1 mL en cada tubo con caldo lauril sulfato triptosa (CLST) (Difco®), y

fueron incubados a 37 °C por 48 h pasado este tiempo, se seleccionaron los tubos positivos (presencia de gas en tubos Durham), para pasar a la etapa de confirmación. Con este propósito se prepararon tubos de ensaye con caldo bilis verde brillante (CBVB) (Difco®), que fueron inoculados con asa bacteriológica, a partir de los tubos positivos de la etapa anterior y se incubaron a 37 °C por 48 h. Considerando la relación de tubos positivos en esta fase se obtuvo el número de CT g<sup>-1</sup> de muestra en tablas NMP (NOM-112-SSA1-1994).

#### **5.2.3.5 Cuantificación de coliformes fecales (CF)**

Para la determinación de CF, se siguió el mismo procedimiento descrito para CT, con la diferencia que en la etapa confirmativa se utilizó caldo *Escherichia coli* (CEC) (BBL®). Se incubaron los tubos a 44.5 °C por 48 h. Posteriormente, se contabilizaron los tubos positivos, (con producción de gas) y se calculó el NMP en tablas por gramo de muestra (Feng *et al.*, 2002).

##### **5.2.3.5.1 Identificación y caracterización bioquímica de *Escherichia coli***

El aislamiento de *E. coli*. se hizo a partir de los tubos positivos con CBVB y CEC se sembraron placas por estría con agar eosina azul de metileno (EMB) (Bioxon®), se incubaron a 37 °C por 24 h. Las colonias típicas de coliformes en este medio son oscuras con brillo metálico, después se verificó la morfología microscópica, mediante la tinción de Gram (bacilos cortos, Gram negativos). Se realizó una selección de cepas sospechosas de *E. coli*, y para su confirmación se sometieron a una caracterización a través de pruebas bioquímicas IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskawer, Citrato de Simons) (NOM-112-SSA1-1994; Koneman *et al.*, 2008).

### 5.2.3.6 Detección de *Salmonella* spp.

Para la etapa de pre-enriquecimiento se utilizó el homogeneizado de las muestras y se incubó a 37 °C por 48 h. A partir de éste se inocularon (1 mL) tubos con caldo selenito de cistina (CSC) y caldo tetracionano (CT) (Difco®) para la fase de enriquecimiento, se incubaron a 37 °C por 48 h. En el aislamiento de *Salmonella* se sembraron placas con los siguientes medios: agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (Bioxon®), agar sulfito de bismuto (ASB) (Difco®) y agar entérico hecktoen (HA) (Bioxon®) y se incubaron a 37 °C de 48 a 72 h. Las colonias típicas de *Samonella* spp. en estos medios de cultivo se sometieron a la tinción de Gram, para corroborar las características microscópicas de esta bacteria (bacilos Gram negativo). Las cepas sospechosas de *Salmonella* se purificaron en los mismos medios, para su posterior identificación bioquímica en: agar triple azúcar hierro (TSI)(Bioxon®), agar lisina hierro (LIA) (Bioxon®) y caldo urea (Bioxon®), los cuales fueron incubados a 37 °C por 48h (NOM-114-SSA1-1994; Feldsine *et al.*, 2003; Koneman *et al.*, 2008).

### 5.2.3.7 Análisis estadístico

El experimento constó de cinco tratamientos con tres repeticiones, para analizar los resultados en este experimento. Se realizó un análisis de varianza y para definir diferencia entre tratamientos se uso la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con el sistema (SAS®) para Windows versión 9.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1 Bacterias mesófilas aerobias

La población promedio de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en albahaca fresco fue de  $5.3 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de muestra. Después del proceso de deshidratación, el método que mostró mayor descenso en la población de BMA's, fue la DC a 45 °C y 50 °C con un 34 %, mientras que con DA ( $20 \pm 2$  °C), DS ( $40 \pm 2$  °C) y DC a 40 °C, disminuyeron un 25 %.

En orégano fresco tuvo una población promedio de BMA de  $2.3 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de muestra. En función de los resultados obtenidos, el mejor método para deshidratar las hojas de orégano fue la DC a 50 °C, por mostrar una disminución del 44.3 %, seguido de la DS ( $45 \pm 3$  °C) con 39 % y DC a 45 °C con 28 % de BMA. Mientras que con la DA y la DC a 40 °C, la reducción de estas bacterias fue menor (26 %) (Cuadro 5.2).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Sospedra *et al.* (2010), reportan que las hierbas aromáticas frescas y/o deshidratadas pueden contener un alto número de microorganismos dada su compleja producción en cadena, la mayoría de estas se cultivan en campo abierto con riego por aspersión o por goteo, motivo que las hace susceptibles a la contaminación microbiana (Delbeke *et al.*, 2015), con bacterias originarias del campo, durante su manejo postcosecha y transporte (Elviss *et al.*, 2009).

Otro caso similar ocurrió con hierbas medicinales secas (malva, ruda, manzanilla, menta, boldo y estigmas de maíz), según Sánchez *et al.* (2006)

encontraron cuentas de BMA de  $5.3 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ , en los que identificaron los siguientes géneros de bacterias: *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Bacillos* spp. y bacilos Gram (+).

Cabe señalar que las BMA estiman la flora total de la muestra comprenden un amplio grupo de bacterias que pueden ser aerobios estrictos o facultativos (patógenos y no patógenos) todas ellas tienen la característica de crecer en condiciones térmicas intermedias ( $31 \pm 1$  °C) (García *et al.*, 2014). También involucran las bacterias que forman endosporas como *Bacillus*, las cuales, se han detectado en cereales, verduras, especias y lácteos (De Bellis *et al.*, 2015). Estas son capaces de sobrevivir a tratamientos térmicos de 80 °C por 10 min; tal es el caso *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*. Sin embargo, las esporas de *B. cereus* pueden resistir hasta los 100 °C por 7 min, estas pueden causar intoxicaciones alimentarias (Ziane *et al.*, 2014).

Ahora bien, la temperatura juega un papel primordial en la sobrevivencia de las BMA's, tanto las bacterias esporuladas como las enterobacterias crecen en un rango de temperaturas de 4.4 a 46.5 °C, aunque hay heterogeneidad respecto a su sobrevivencia (Ziane *et al.*, 2014). Este hecho explica la sobrevivencia de la población de BMA's después de aplicar los diferentes tratamientos de deshidratación, los cuales se encontraron en un rango de temperatura de 20 a 50 °C, razón por la cual, el 40 % de la población inicial sobrevivió. Otro factor importante para el crecimiento y desarrollo de bacterias es la  $A_w$  0.99 ~ 0.8 (Bonazzi y Dumoulin, 2011), puesto que estas toman el "agua libre" para llevar a cabo su metabolismo (El Pozo *et al.*, 2006). En las hojas deshidratadas de albahaca y orégano se registró una  $A_w=0.4$  en todos los tratamientos, teóricamente las bacterias no podrían subsistir; sin embargo, se sabe que *Salmonella* es capaz de sobrevivir gracias a su capacidad para formar biopelículas (Spector y Kenyon, 2012) y filamentos, los cuales les permiten una mayor tolerancia a

la desecación en comparación con las células no filamentosas además de protegerlas de desinfectantes (Stackhouse *et al.*, 2012).

Aunque, un número bajo de BMA's no asegura que el producto se encuentre libre de patógenos o sus toxinas, de igual manera, un recuento elevado no significa presencia de flora patógena (García *et al.*, 2014).

La población promedio de BMA fue de  $5.3 \times 10^5$  y  $2.3 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de muestra, para albahaca y orégano en fresco, respectivamente. Estos valores sobrepasan los límites establecidos por la norma de calidad sanitaria e inocuidad para especies y condimentos ( $5 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  de muestra) y la NMX-F-233-1982 para especias y alimentos deshidratados (100 000 UFC  $g^{-1}$ ). Por tanto las muestras de albahaca y orégano en fresco no cumplen con las normas antes mencionadas para el parámetro de BMA's. Por otro lado, la albahaca deshidratada también se encuentra fuera de norma, a excepción de los deshidratados por DC a 45 y 50 °C (reducción de 2 Log). En contraste orégano todos los tratamientos de deshidratación evaluados si cumplen con la norma antes mencionada, para el parámetro de BMA's.

### 5.3.2 Hongos y levaduras

La albahaca fresca tuvo una población promedio de hongos de  $2.6 \times 10^3$  UFC  $g^{-1}$  de muestra, y después del deshidratado (DA y DS) la población se incrementó en 138 %. Mientras que con DC a 40 °C la carga se mantuvo constante. Los mejores tratamientos fueron la DC a 45 y 50 °C, ya que redujeron la población de hongos en un 32 y 36 %, respectivamente. La población de levaduras en las hojas de albahaca, no varió después de haberse deshidratado a temperatura ambiente. En cambio, se observó una disminución en el número de levaduras cuando se sometieron a DS y la DC a 40 °C, en un 24 y 22 %, respectivamente. La mayor reducción en la población de

levaduras se presentó en las hojas deshidratadas de albahaca cuando se sometieron a 45 y 50 °C con 59 y 41 %, respectivamente

La población de hongos en la hojas de orégano fresco fue de  $1.5 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> de muestra, y después de haberse deshidratado al ambiente DA se detectó un incremento de 1.3 % en la carga de estos microorganismos. Lo anterior se explica porque las muestras estuvieron expuestas al ambiente durante 8 ( $\pm 2$ ) días, periodo requerido para el secado de las hojas. En contraste, se observó que cuando las muestras se sometieron a DC a 45 y 50 °C, la reducción en la población de hongos fue de 36 %.. En tanto que, la DC a 40 °C tuvo un 34 % y con la DS sólo el 15 %. En todas las muestras de orégano la población de levaduras disminuyó después de haberse sometido a los distintos métodos de deshidratación; la mayor reducción se observó cuando se utilizó la DC a 45 y 50 °C (con un 44.5 y 43.6 %, respectivamente) y la menor disminución se detectó con la DA y la DC a 40 °C con 21.5 % y 18.2 %, respectivamente (Cuadro 5.3).

Aunque algunos microorganismos son destruidos durante el proceso de deshidratación, éste no es letal para todos los microorganismos; tal es el caso, de los hongos y levaduras. En general, se recomienda una  $A_w = 0.65$  a  $0.7$ , para productos deshidratados, pero en este experimento la albahaca y el orégano registraron valores de  $A_w = 0.4$ . La literatura menciona que las levaduras requieren para crecer valores mínimos de  $A_w = 0.7$  y los hongos una  $A_w = 0.62$  (Bonazzi y Dumoulin, 2011), por consiguiente, la población de hongos y levaduras no crece en los productos deshidratados de albahaca y orégano, sin embargo, el incremento en el número de estos microorganismos se debe a una contaminación ambiental.

Se debe evitar la contaminación y/o proliferación de hongos en los productos secos, porque se ha comprobado que estos microorganismos producen metabolitos secundarios, conocidos como micotoxinas, las cuales resultan tóxicas cuando son

consumidas por humanos y animales (Peraica *et al.*, 2000); además afectan la calidad de los alimentos lo que lleva a pérdidas económicas. Esto sería poco probable que aconteciera en albahaca y orégano, porque la limitante para que crezcan los hongos es el bajo  $a_w=0.4$ , pero si se puede presentar este fenómeno, cuando estas especias se encuentran estado fresco. Sin embargo, en algunos estudios reportaron un brote en frutos secos (pasas, dátiles e higos), de micotoxinas (aflatoxina B1) de 23 especies de hongos pertenecientes a 15 géneros, entre ellos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium chrysogenum* y *Rhizopus stolonifer* (Alghalibi y Shater, 2004) En hierbas aromáticas y especias se han encontrado hongos productores de micotoxinas, por ejemplo *Aspergillus flavus* o *A. parasiticus* (aflatoxinas), *A. ochraceus*, *A. carbonarius* o *Penicillium verrucosum* (ocratoxina) (CODEX, 2005). Las especias (pimienta negra, jengibre, pimentón rojo y comino) son altamente susceptibles al desarrollo de micotoxinas (Mckee, 1995). La producción de micotoxinas puede producirse con bajos contenidos de humedad (12 a 13 %).

De acuerdo a los resultados que se muestran en el Cuadro 5.2 y 5.3, los valores de hongos y levaduras, hallados en la albahaca y el orégano deshidratado sobrepasan el límite de 100 UFC  $g^{-1}$  de muestra, establecido por la NMX-F-233-1982 de especias y condimentos, por lo que, los productos secos se encuentran fuera de dicha norma.

### 5.3.3 Coliformes totales y fecales

Cuando las muestras de albahaca se sometieron a la DA las cuentas de CT y CF se incrementaron de manera significativa, por ejemplo las hojas frescas de albahaca contenían 22 NMP  $g^{-1}$  de muestra de CT y ausencia de CF, y después de estar expuestos al ambiente por  $8 \pm 3$  días a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, la población de coliformes totales se elevó a 1100 NMP  $g^{-1}$  de muestra y los CF pasaron de 0 a 560 NMP  $g^{-1}$  de muestra. En las muestras de albahaca sometidas a DS la población de CT

no cambio de manera significativa, en contraste, las hojas de albahaca tratadas con la DC a 50 °C, las CT y CF se redujeron en 94 y 99 % respectivamente.

En orégano todos los tratamientos de deshidratación disminuyeron la población de coliformes. Los tratamientos más eficientes fueron la DC y DA, por reducir en su totalidad, el número de CT y CF. Con la DS las CT decrecieron un 80 % y no se detectaron CF.

Los resultados en este ensayo muestran que la albahaca y el orégano en fresco estuvieron contaminados por coliformes (Cuadros 5.2 y 5.3); lo anterior coincide con lo reportado por Alholy *et al.* (2013) y Aycicek *et al.* (2006) donde mencionan que las verduras de hoja verde y/o hierbas frescas como cilantro, perejil, eneldo y lechuga, pueden contener varios grupos de coliformes, debido al inadecuado procesamiento agrícola y de manufactura, que trae como consecuencia una alta probabilidad de contaminación por microorganismos patógenos.

La norma mexicana para especias y condimentos deshidratados, especifica que el número máximo para coliformes es de 25 UFC g<sup>-1</sup> de muestra, (NMX-F-233-1982). Por con siguiente, todos los tratamientos de deshidratación evaluados en albahaca, no cumplen con la norma, porque sobrepasan con los límites establecidos. En cuanto al orégano, únicamente las hojas deshidratadas por el método de convección si cumplen con esta norma.

#### **5.3.4 Presencia de *E. coli***

En las hojas frescas de albahaca se encontró la presencia de *E. coli* en un 60 % de las muestras evaluadas, la cual logró sobrevivir con los tratamientos de DA, DS y DC a 45 °C. Con el tratamiento de DC a 50 °C, *E. coli* estuvo ausente antes y después de la deshidratación, mientras que con la DC a 40 °C, *E. coli* no logró sobrevivir.

En orégano fresco se encontró a *E. coli* en un 20 % de las muestras analizadas y después de la deshidratación hubo una ausencia total de ésta enterobacteria. La presencia de *E. coli* es un claro indicador de contaminación fecal, dado que *E. coli* procede del tracto intestinal de animales de sangre caliente y del hombre. A diferencia de las coliformes totales estas son menos precisas, ya que este grupo incluye especies de origen no fecal (Delbeke *et al.*, 2015). Es importante destacar, la respuesta de *E. coli* a la desecación, debido a que esta bacteria tiene un amplio grupo de serotipos, algunos de ellos poseen plásmidos que les confieren una mayor adaptabilidad y resistencia a la desecación. Por ejemplo, el plásmido pO113 les permite formar biopelículas en diferente tipo de superficies y sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones de desecación (Cordier y Sofos, 2013). Por ejemplo, en Alemania se reportó un brote a causa de *E. coli* O104:H4 (cepa particularmente virulenta), con 3816 casos (54 muertes) cuando se prepararon comidas con semillas de fenogreco contaminadas, fue capaz de sobrevivir dos años de almacenamiento (Frank *et al.*, 2011). Existen varios reportes vinculados al consumo de hierbas contaminadas, en Dinamarca se presentó un brote a casusa de *E. coli* enterotoxigénica asociado con albahaca (Pakalniskiene *et al.*, 2009). Mientras que en orégano la información es escasa, sin embargo, no se descartar la posibilidad de encontrar a esta bacteria.

Existen dos normas que establecen que *E. coli* debe estar ausente en las hierbas deshidratadas, la NMX-F-233-1982 y la norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria para alimentos de consumo humano; por consiguiente, la albahaca deshidratada no cumplió con las normas para *E. coli* a excepción cuando se sometió a la DC a 50 °C. Por otra parte, las hojas deshidratadas de orégano, si cumplieron con las normas anteriormente señaladas, independientemente del método de deshidratación.

### 5.3.5 Presencia de *Salmonella* spp.

En las hojas de albahaca fresco se encontró a *Salmonella* spp. en 80 % de las muestras analizadas y logro sobrevivir a la DA, la DC 40 °C, 45°C y 50 °C. Con la DS la albahaca se contaminó durante el proceso de secado (Cuadro 5.2).

En orégano, *Salmonella* spp. estuvo presente en 60 % de las muestras frescas analizadas. El mejor tratamiento fue la DC a 50 °C, porque *Salmonella* spp. no logro sobrevivir, mientras que con la DA y por DC a 40 y 45 °C, *Salmonella* se mantuvo presente. (Cuadro 5.3).

Los resultados concuerdan con Delbeke *et al.* (2015) hallaron a *Samonella* y *E. coli* en muestras de albahaca y cilantro en fresco. Otro reporte fue en el 2006, hojas de albahaca, cilantro y curry, cultivadas en la India y Tailandia se encontraron contaminadas por *Salmonella* (Elviss *et al.*, 2009). En Inglaterra y Gales hubo un brote de *Salmonella* Senftenberg asociada a albahaca fresca (Pezzoli *et al.*, 2008). Una de las razones por la que las hierbas finas y verduras de hoja fresca son susceptibles a la contaminación microbiana, es por la forma de producción, ya que la mayoría son cultivadas en campo abierto donde están expuestas a vientos, insectos y otros contaminantes. Además la prevalencia de *Salmonella* en las hojas frescas podría verse afectada por la estacionalidad, debido a la temperatura, precipitación, actividad de agentes transmisores de este patógeno (Delbeke *et al.*, 2015) y otros como *E. coli*.

**Cuadro 5.2** Análisis microbiológico de hojas albahaca en fresco (F) y después de ser sometidas a diferentes procesos de deshidratación (D).

Tratamiento		BMA (UFC g <sup>-1</sup> )	HG (UFC g <sup>-1</sup> )	LV (UFC g <sup>-1</sup> )	CT (NMP)	CF (NMP)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
TA	F	1.5 X 10 <sup>5c</sup>	8.8 X 10 <sup>1b</sup>	1.8 X 10 <sup>4b</sup>	22 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	si	si
	D	6 X 10 <sup>3c</sup>	5.1 X 10 <sup>2a</sup>	1.4 X 10 <sup>4a</sup>	1100 <sup>b</sup>	560 <sup>a</sup>	si	si
S	F	7.5X 10 <sup>5b</sup>	6.7 X 10 <sup>1b</sup>	3.1 X 10 <sup>3b</sup>	2400 <sup>a</sup>	2400 <sup>a</sup>	si	no
	D	1.9 X 10 <sup>4a</sup>	4.0 X 10 <sup>2a</sup>	4.4 X 10 <sup>2c</sup>	2400 <sup>a</sup>	1680 <sup>a</sup>	si	si
DC40	F	6.7 X 10 <sup>4c</sup>	7.4 X 10 <sup>2b</sup>	1.2 X 10 <sup>4b</sup>	15 <sup>d</sup>	9.7 <sup>b</sup>	si	si
	D	4.9 X 10 <sup>3c</sup>	2.4 X 10 <sup>2a</sup>	1.5 X 10 <sup>3b</sup>	121 <sup>c</sup>	6.3 <sup>b</sup>	no	si
DC45	F	9.0 X 10 <sup>4c</sup>	2 X 10 <sup>3b</sup>	3.0 X 10 <sup>4b</sup>	119 <sup>c</sup>	2400 <sup>a</sup>	si	si
	D	2 X 10 <sup>2d</sup>	1.6 X 10 <sup>2a</sup>	7.7 X 10 <sup>1c</sup>	90 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	si	si
DC50	F	1.6 X 10 <sup>6a</sup>	1.0 X 10 <sup>4a</sup>	1.5 X 10 <sup>6a</sup>	1100 <sup>b</sup>	1967 <sup>a</sup>	no	si
	D	1.2 X 10 <sup>4b</sup>	3.6 X 10 <sup>2a</sup>	3.6 X 10 <sup>3b</sup>	70.3 <sup>c</sup>	7 <sup>b</sup>	no	si

Medias con la misma letra en cada variable por columna no son estadísticamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ). TA: deshidratación a temperatura ambiente S: deshidratación solar, DC40: deshidratación por convección a 40 °C, DC45: deshidratación por convección a 45 °C, DC50: deshidratación por convección a 50 °C, F: hojas frescas, D: deshidratado, BMA: bacterias mesófilas aerobias, HG: hongos, LV: levaduras, CT: coliformes totales, CF: coliformes fecales, UFC g<sup>-1</sup>: unidades formadoras de colonias por gramo NPM: número más probable.

**Cuadro 5.3** Análisis microbiológico de hojas de orégano en fresco y después de ser sometidas a diferentes procesos de deshidratación.

Tratamiento		BMA (UFC g <sup>-1</sup> )	HG (UFC g <sup>-1</sup> )	LV (UFC g <sup>-1</sup> )	CT (NMP)	CF (NMP)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
TA	F	8.4 X 10 <sup>5a</sup>	3.7 X 10 <sup>3a</sup>	3.0 X 10 <sup>4a</sup>	2400 <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	no	si
	D	4.3 X 10 <sup>3a</sup>	4.2 X 10 <sup>3a</sup>	3.2 X 10 <sup>3a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	no	si
S	F	1.3 X 10 <sup>5a</sup>	1.2 X 10 <sup>3b</sup>	1.1 X 10 <sup>4b</sup>	1967 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>	si	no
	D	5.7 X 10 <sup>3a</sup>	4.2 X 10 <sup>2b</sup>	2.8 X 10 <sup>2b</sup>	374 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	no	si
DC40	F	6.8 X 10 <sup>4a</sup>	7.0 X 10 <sup>2b</sup>	6.4 X 10 <sup>3b</sup>	13 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	no	no
	D	3.8 X 10 <sup>3a</sup>	7.7 X 10 <sup>1b</sup>	1.3 X 10 <sup>3b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	no	no
DC45	F	3.0 X 10 <sup>4a</sup>	6.8 X 10 <sup>2c</sup>	7 X 10 <sup>2c</sup>	6 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	no	si
	D	1.6 X 10 <sup>3a</sup>	6.5 X 10 <sup>1b</sup>	3.8 X 10 <sup>1b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	no	si
DC50	F	7.1X 10 <sup>5a</sup>	7.7 X 10 <sup>2b</sup>	2.6 X 10 <sup>3c</sup>	1533 <sup>a</sup>	210 <sup>a</sup>	no	si
	D	1.8 X 10 <sup>3a</sup>	6.6 X 10 <sup>1b</sup>	5.5 X 10 <sup>2b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	no	no

Medias con la misma letra en cada variable por columna no son estadísticamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ). TA: deshidratación a temperatura ambiente S: deshidratación solar, DC40: deshidratación por convección a 40 °C, DC45: deshidratación por convección a 45 °C, DC50: deshidratación por convección a 50 °C, F: fresco, D: deshidratado, BMA: bacterias mesófilas aerobias, HG: hongos, LV: levaduras, CT: coliformes totales, CF: coliformes fecales, UFC g<sup>-1</sup>: unidades formadoras de colonias por gramo NPM: número más probable.

Los resultados encontrados para *Salmonella* con respecto al tratamiento a 50 °C son contrastantes, debido a que en las hojas deshidratadas de albahaca se encontró a *Salmonella* y en las hojas de orégano no se pudo recuperar dicha bacteria. La Aw registrada fue similar para ambas especies, la albahaca registró una Aw=0.43 y el orégano una Aw=0.45. Esta diferencia entre especies, podría explicarse debido al número inicial de células viables que se encontraban en las hojas frescas, probablemente las hojas de albahaca tuvieran una mayor carga de *Samonella*, comparada con las hojas de orégano. Por otra parte, investigaciones sobre temperaturas letales señalan que *Salmonella* y *Staphylococci* mueren a temperaturas de

pasteurización (50-65 °C) con una  $A_w=0.8$  (Jay *et al.*, 2005). Aunque las hojas deshidratadas tenían una  $A_w=0.4$  y fueron expuestas a 50 °C por 4 h, *Salmonella* logro sobrevivir, éste hecho, pudo deberse a la capacidad que tiene este microorganismo para formar biopelículas (Le Magrex-Debar *et al.*, 2000; Shen y Fang, 2012) mismo, que les permite sobrevivir ante condiciones adversas.

A pesar que no existen normas específicas para la albahaca y el orégano deshidratado, el Codex solo establece prácticas de higiene específica que las especias y las hierbas secas deben estar libres de microorganismos patógenos que puedan representar un riesgo para la salud del consumidor (Codex Alimentarius, 1995). También los manuales de buenas prácticas agrícolas y los códigos de prácticas de higiene específica para especias y hierbas aromáticas secas (CAC/RCP 42-1995), indican ausencia total de *Salmonella* ya que representan un peligro para la salud. Según la asociación de especias europea (ESA), especifican que *Salmonella* debe estar ausente por cada 25 g de especie. Por consiguiente, la albahaca no cumple con estos lineamientos de inocuidad, ya que *Salmonella* spp. logró sobrevivir en las hojas después de ser sometidas a los distintos métodos de deshidratación evaluados. Del mismo modo, ocurrió en orégano donde se observó una respuesta similar a excepción, de la deshidratación por convección a 50 °C, donde *Salmonella* spp. no consiguió subsistir.

Ahora bien, con este experimento se pudo constatar que los tratamientos evaluados detienen el crecimiento microbiano, pero no elimina a los microorganismos. Décadas anteriores se creía que alimentos con baja humedad ( $A_w<0.7$ ) eran microbiológicamente seguros. Sin embargo, han reportado diversos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos con baja  $A_w$  (cereales, especias, chocolate, té, entre otros) (Joshua *et al.*, 2014). Además dependiendo del método de

deshidratación la presencia de microorganismos se altera, con deshidratación a temperatura ambiente y la deshidratación solar pueden incrementar la carga microbiológica del producto, esto puede ser debido a su exposición con los polvos del ambiente que lo rodean y la presencia de insectos (Eswara y Ramakrishnarao, 2013). Mientras que con la deshidratación por convección a 45 y 50 °C, aplicada a las hojas de albahaca y orégano, mostró mayor reducción en las poblaciones de BMA's, hongos y levaduras.

#### **5.4 CONCLUSIONES**

Ninguno de los métodos de deshidratación evaluados en esta investigación garantiza la calidad sanitaria ni la inocuidad de los productos obtenidos.

La albahaca y el orégano fresco presentaron una alta incidencia de microorganismos indicadores y patógenos, por lo que no cumplen con las normas en lo relacionado a la calidad e inocuidad del producto.

La deshidratación por convección resultó ser el mejor método para la reducción de las poblaciones de BMA's, hongos y levaduras, coliformes totales y fecales, tanto en albahaca como en orégano, preferentemente a 50 °C.

## 5.5 LITERATURA CITADA

- Alghalibi S. M. and Shater A. R. 2004. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic. Association of University Bulletin on Environmental Research 7:19–27.
- Aycicek H., Oguz U. and Karci K. 2006. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. International Journal of Hygiene and Environmental Health 209:197–201.
- Bonazzi C. and Dumoulin E. 2011. Quality changes in food materials as influenced by drying processes. Product Quality and Formulation, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 3 1-20.
- CAC/RCP 42-1995. Código de prácticas de higiene para especias y plantas aromáticas desecadas
- Calvo-Irabien, Yam-Puc, Dzib, Escalante-Erosa and Peña- Rodríguez. 2009. Effect of Postharvest Drying on the Composition of Mexican Oregano (*Lippia graveolens*) Essential Oil. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 15(3): 281-287.
- Codex Alimentarius Commission. 1995. Code of hygienic practice for spices and dried aromatic plants CAC/RCP 42-1995
- Cordier J. L. and Sofos J. 2013. New research on ensuring safety in dry processing environments. Advances in Microbial Food Safety (15):305-320.
- De Bellis P., Minervini F., Di Biase M., Valerio F., Lavermicocca P. and Sisto A. 2015. Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients. International Journal of Food Microbiology, 197:30-39.
- Delgado J. M. and Silva M. V. 2014. Food Dehydration: Fundamentals, Modelling and Applications. In Transport Phenomena and Drying of Solids and Particulate Materials 69-94.

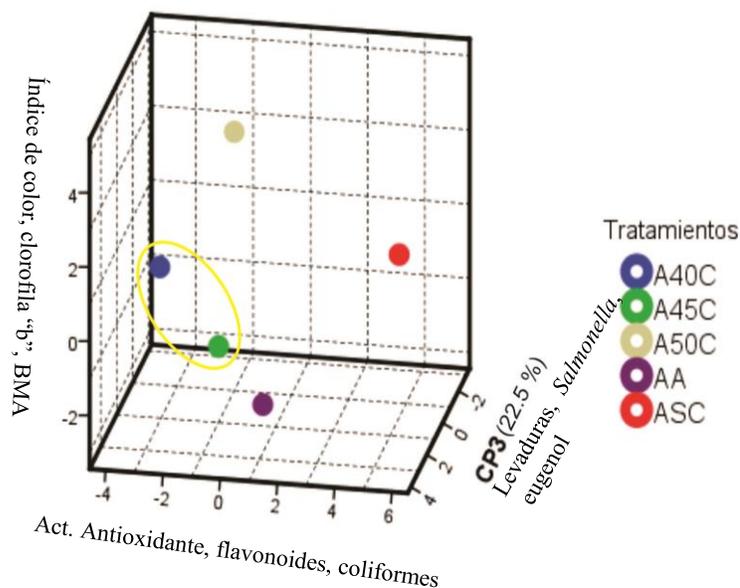
- Jay J. M., Loessner M. J. and Golden D. A. 2005. Protection of Foods by Drying .  
Modern Food Microbiology. pp 443-456
- El Pozo P. and Argentina S. F. 2006. Análisis microbiológico de hierbas medicinales y su contaminación por especies de *Aspergillus* toxicogénicos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(1), 89-94
- Elviss N. C., Little C. L., Hucklesby L., Sagoo S., Surman-Lee S., De Pinna E. and Threlfall E. J. 2009. Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1): 83-88.
- Elviss, N.C., Little, C.L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., de Pinna, E. and Threlfall, E. J. 2009. Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology* 134:83–88.
- Eswara A. R. and Ramakrishnarao M. 2013. Solar energy in food processing a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 50(2): 209-227.
- Feng P., Weagant S. D., Grant M. A. and Burkhardt W. 2002. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual*
- Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M. and Faber M. 2011. Epidemic profile of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*, 365:1771-1780.
- García P. A., Rodríguez W., Gómez E. K. C. and Zambrano A. A. 2015. Estudio microbiológico y fisicoquímico de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) frescos y deshidratados. *Ingenierías and Amazonia*, 7(1).
- Guzmán R., Torán R., Guzmán P. y Casares R. 2006. Método Simplificado para Estimar la Actividad del Agua en Deshidratación de Hortalizas. *Revista Investigación y Desarrollo* 27: 1-9.

- Juárez R. C., Aguilar C. A, Juárez R.E, Bugarín M. R., Juárez L. P. y Cruz C. E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación. *BioCiencias*, 2(3):119-129.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. and Winn W.C. 2008. "Diagnóstico Microbiológico". 6ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.
- Le Magrex-Debar, E., Lemoine J., Gellé M. P., Jacquelin L. F. and Choisy C. 2000. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1):239-243.
- Lopresti J. and Tomkins B. 1997. Rural Industries Research and Development Corporation. Postharvest Handling and Packaging of Fresh Herbs. Rural Industries Research and Development Corporation Barton, A.C.T
- Lubbe A., and Verpoorte R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34(1):785-801.
- Maturin L. and James T. P. 2001. Chapter 3 Aerobic Plate Count. *Bacteriological Analytical Manual*
- McKee L. H. 1995. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Lebensmittel-Wissenschaft and. Technologie*. 28:1-11.
- Pakalniskiene J., Falkenhorst G., Lisby M., Madsen S. B., Olsen K.E.P., Nielsen E.M., Mygh A., Boel J. and Molbak K. 2009. A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. Coli* and *Salmonella* Anatum infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiology and. Infection*. 137:396-401.
- Peraica M., Radic B., Lucic A. and Pavlovic M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *World Health Organization*. 77:754-766.
- Pezzoli L., Elson R., Little C.L., Yip H., Fisher I., Yishai R., Anis E., Valinsky L., Biggerstaff M., Patel N., Mather H., Brown D.J., Coia J.E., Van Pelt W., Nielsen E.M., Ethelberg S., de Pinna E., Hampton M.D., Peters T., and Threlfall J. 2008.

- Packed with *Salmonella* investigation of an international outbreak of *Salmonella* Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007. *Foodborne Pathogens Disease*, 5:661–668.
- Shen S. and Fang F. C. 2012. Integrated stress responses in *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3): 75-81.
- Sospedra I., Soriano J. M. and Jordi M. 2010. Assessment of the Microbiological Safety of Dried Spices and Herbs Commercialized in Spain. *Plant Foods Human Nutrition* 65:364–368.
- Spector M. P. and Kenyon W. J. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45:455–481.
- Stackhouse R. R., Faith N. G., Kaspar C.W., Czuprynski C. J. and Wong A. C. L. 2012. Survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis filaments induced by reduced water activity. *Applied Environmental Microbiology*, 78:2213–2220.
- Verdugo C. S. y Flores J. M. L. 2012. Nichos de mercado de especies aromáticas orgánicas tipo gourmet.
- Vij V., Ailes E., Wolyniak C., Angulo F. J. and Klontz K. C. 2006. Recalls of spices due to bacterial contamination monitored by the US Food and Drug Administration: the predominance of Salmonellae. *Journal of Food Protection*, 69(1): 233-237.
- Ziane M., Desriac N., Le Chevalier P., Couvert O., Moussa-Boudjema and Leguerinel I. 2014. Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic sporeforming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food Control*, 45:16–21.
- Zweifel C. and Stephan R. 2012. Spices and herbs as source of *Salmonella* related foodborne diseases. *Food Research International*, 45(2):765-769.

## CAPITULO VI. DISCUSIÓN GENERAL

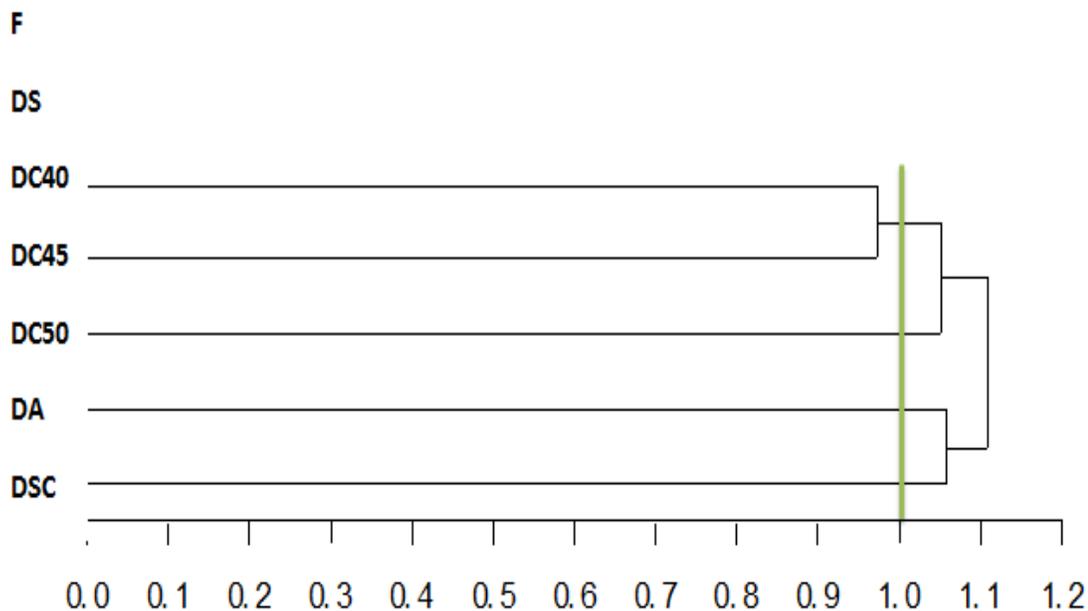
El propósito del trabajo fue comparar tres métodos de deshidratación (DA, DS y DC) de hojas de albahaca y orégano y determinar cuál de ellos, preserva sus propiedades fitoquímicas y la calidad microbiológica. La calidad fitoquímica se determinó midiendo la actividad antioxidante, los fenoles, flavonoides, pigmentos fotosintéticos, rendimiento y composición química de los aceites esenciales.



**Figura 6.1.** Dispersión de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de albahaca, basadas en los primeros tres componentes principales, respecto a las variables fitoquímicas y microbiológicas.

Para ver el efecto de todas las variables antes mencionadas se hizo un análisis de componentes principales, el cual arrojó que el primer componente representó un 34% e implicó a las siguientes variables: flavonoides, actividad antioxidante, coliformes totales, coliformes fecales y hongos. El segundo componente comprendió un 24.43% con: índice de color, clorofila "b", bacterias mesófilas y hongos, lo que representa. El tercer componente representó el 22.5 %, levaduras, presencia de *Salmoella*, eugenol y clorofila "a".

En la figura 6.1 se presenta como interactuaron los tratamientos de deshidratación en las hojas de albahaca con las variables fitoquímicas y microbiológicas; se aprecia que los tratamientos DC a 40 y 45 °C, tuvieron una respuesta semejante, en tanto la DC a 50 °C se separó del grupo, muestra que un incremento en la temperatura de 5 °C sobre la deshidratación, tiene un impacto sustancial en la calidad fitoquímica como en la microbiológica de albahaca. La DA y la DSC también distaron de los tratamientos por convección, dado que mostraron mayor contaminación microbiológica. Esto se corrobora con el análisis con dendogramas (Figura 6.2), donde se agrupa a los tratamientos de DC a 40 y 45 °C.



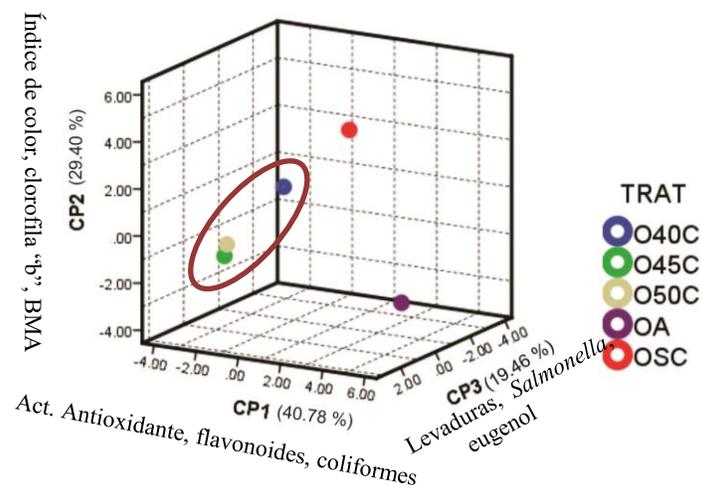
**Figura 6.2.** Dendrograma de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de albahaca /variables fitoquímicas y microbiológicas.

Los tratamientos de DA y la DC a 40 y 45 °C fueron los que conservaron mejor las propiedades fitoquímicas en las hojas de albahaca. También la DSC tuvo buenos resultados siempre y cuando no sobrepase una temperatura de 45 °C, ya que puede haber degradación de compuestos bioactivos. Cabe destacar que hay un efecto significativo cuando el material vegetal se expone a la radiación solar directa y cuando ésta fue bloqueada con papel aluminio, conservando el calor. La radiación solar influye en la degradación de pigmentos fotosintéticos y fenoles, estos compuestos le confieren su capacidad antioxidante. Esto concuerda con lo reportado con Jimoh *et al* (2010) los métodos de secado no producen diferencias significativas en temperaturas y tiempos, el secado solar produce un pardeamiento en las muestras, por la degradación de fenoles, ya que estos proporcionan parte del color. Por tanto, la DSC puede ser una alternativa para deshidratar y ahorrar energía; sin embargo, es

necesario bloquear la radiación solar para obtener un producto de mejor calidad fitoquímica y visual.

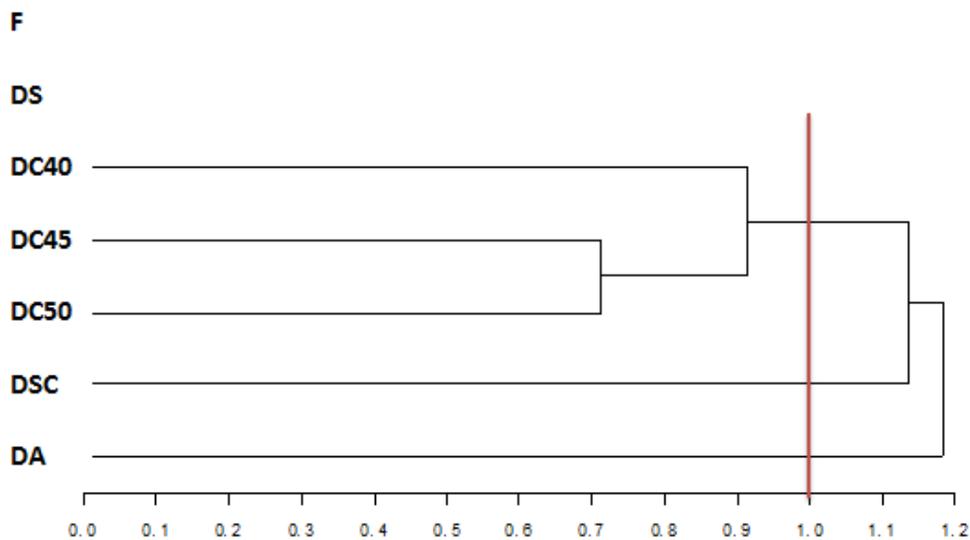
En cuanto al contenido de aceites esenciales en las hojas de albahaca se obtuvo un mayor rendimiento con temperaturas por debajo de los 40 °C, esto puede ser debido a la naturaleza de sus compuestos químicos, como son polifenoles, fenilpropanoides y terpenoides (eugenol, metil eugenol, chavicol) (Fatemeh *et al.*, 2012) que son más sensibles a su degradación con altas temperaturas. Por otro lado, el rendimiento de aceite esencial orégano, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos de deshidratación evaluados, los principales compuestos hallados fueron el timol y 4-terpineno-ol. Estos compuestos concuerdan con los reportados en la literatura, donde mencionan que el *O. vulgare* contiene carvacrol, timol, -terpinene  $\gamma$ , y linalol, los cuales poseen fuertes propiedades antioxidantes. Además, el timol y el carvacrol presentan fuerte actividad antibacteriana, estos compuestos son capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Listeria monocytogenes*, ya que afecta a la composición de la mureína, que influyen en la pared celular de *E. coli*. (Teixeira *et al.*, 2013). Se especula que está es la razón por la que no se encontró alta incidencia de *E. coli* ni *Salmonella* spp. en las hojas de orégano, en comparación con las de albahaca.

Por otra parte, la calidad microbiológica se encuentra muy relacionada con la carga inicial del producto, ya que los tratamientos de deshidratación evaluados no eliminan a los microorganismos. Como se mencionó anteriormente, la albahaca puede tener una buena calidad fitoquímica con tratamientos por debajo de los 40 °C, pero deficiente calidad microbiológica.



**Figura 6.3.** Dispersión de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de orégano, basadas en los primeros tres componentes principales, respecto a las variables fitoquímicas y microbiológicas.

En cuanto al orégano, el análisis de componente principales determino que el primer componente representa el 40.78 %, el segundo un 29.4 % y el tercero el 19.46 % de las variables. En la Figura 6.2, se puede notar que los tratamientos de DC a 45 y 50 °C se encuentran traslapados por que tuvieron una respuesta similar, en tanto que los demás tratamientos (DA y DSC) se encontraron muy distantes. Asimismo, la Figura 6.4 muestra como la DC (40, 45 y 50 °C), formaron un solo grupo, esto es porque las hojas de orégano no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos con respecto al contenido de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides y pigmentos fotosintéticos) y contenido de aceites esenciales, aunque la DC a 50 °C se podría reducir los tiempos de secado.



**Figura 6.4.** Dendrograma de la interacción tratamientos de deshidratación en hojas de orégano /variables fitoquímicas y microbiológicas.

Hay que destacar que con la DSC se podría tener los mismos resultados en cuanto a la calidad de compuestos bioactivos que los obtenidos por la DC, con la ventaja de un ahorro de energía, pero con el riesgo de una contaminación microbiológica.

Con base en los resultados obtenidos se recomienda que las hojas de albahaca y/o de orégano se sometan a una desinfestación antes del proceso de deshidratación. La DSC es una buena opción para deshidratar hierbas aromáticas, ya que permite el ahorro de energía y no contamina. Sin embargo, el diseño del deshidratador solar influye en la calidad fitoquímica del producto, por lo que se sugiere utilizar cubiertas con materiales que bloqueen la radiación solar al producto, además de instalar un termostato que permita tener un control sobre la temperatura, que no supere los 50 °C para el caso de albahaca.

## 6.1 Conclusiones generales

La temperatura influye en la calidad fitoquímica y microbiológica de albahaca y orégano deshidratados.

Los compuestos bioactivos y los aceites esenciales de albahaca se preservaron mejor con temperatura por debajo de los 40 °C, a excepción del eugenol que se pierde con cualquiera de los métodos de deshidratación evaluados.

Las hojas de orégano conservan mejor su calidad fitoquímica y microbiológica con la deshidratación por convección a 50 °C.

La deshidratación reduce las poblaciones de BMA's, coliformes totales y fecales, pero no elimina las bacterias potencialmente patógenas como *E. coli* y *Salmonella* spp.

La deshidratación a temperatura ambiente tiene la desventaja de prolongados tiempos de secado, además de ser susceptible a contaminación microbiológica del producto de igual modo que la deshidratación solar.

La deshidratación solar cubierta se obtuvieron resultados similares que con la deshidratación por convección, con la ventaja de ahorro energía, no contamina y puede reducir los tiempos de deshidratación.

La deshidratación por convección a 40 °C tiene el inconveniente de largos periodos tiempos de deshidratación y mayor consumo de energía eléctrica. La deshidratación por convección a 50 °C tiene la ventaja de reducir en un 53 %, el tiempo de deshidratación comparándolo con el de 40 °C y un 98 % con la deshidratación a temperatura ambiente.

## 6.2 LITERATURA CITADA

- Fatemeh Fathiazad, Amin Matlobi, Arash Khorrami, Sanaz Hamedeyazdan, Hamid Soraya, Mojtaba Hammami, Nasrin Maleki-Dizaji and Alireza Garjani. 2012. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-20.
- Feldsine P. T., Lienau A. H., Leung S. C., Mui L. A., Humbert F., Bohnert M., Mooijman K., Shulten S., Veld P., Rollier P., Leuschner R. and Capps K. 2003. Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC official method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, (86):275-295.
- Jimoh, K. O., Olurin, T. O and Aina, J. O. 2010. Effect of drying methods on the rheological characteristics and colour of yam flours. *African Journal of Biotechnology*, 8(10).
- Schweiggert U., Reinhold C., and Schieber A. 2007. Conventional and alternative processes for spice production e a review. *Food Science and Technology*. 18: 260-268.
- Teixeira B., Marques A., Ramos C., Serrano C. Matos O., Neng R., Nogueira J. M. F., Saraiva J. A., Nunes M. L. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11):2707-14.