

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) SOBRE *Listeria
monocytogenes* EN QUESO FRESCO**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Autor:

Bach. Brenda Abigail Chapa Vásquez

Asesor:

Ms. Segundo Grimaldo Chávez Quintana

Chachapoyas, Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) SOBRE *Listeria
monocytogenes* EN QUESO FRESCO**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Autor:

Bach. Brenda Abigail Chapa Vásquez

Asesor:

Ms. Segundo Grimaldo Chávez Quintana

Chachapoyas, Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres Max Eloy y Lilia Mercedes porque ellos han dado razón a mi vida, sentaron en mí el deseo de superación y fueron el cimiento de mi vida profesional.

A mis hermanos Melissa, Pamela y Joshua que siempre estuvieron a mi lado y confiaron en mí.

A mi novio Carlos Alberto, por su amor, sus consejos y apoyo incondicional.

A toda mi familia que es lo más valioso que Dios me ha dado.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a Dios porque sé que siempre ha estado a mi lado en los buenos y malos momentos, por darme la fuerza suficiente para saber vencer los obstáculos encontrados en el camino, por darme salud, por bendecir mi vida al permitirme estar al lado de las personas que más amo (mi familia) porque son la luz de mis ojos.

A mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mí día a día, por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida.

A mis hermanos por brindarme su amor y verme como ejemplo.

A mi novio, por su confianza y apoyo brindado sin condiciones, por compartir conmigo experiencias de alegría y tristeza.

A mi asesor de tesis el Ms. Segundo Grimaldo Chávez Quintana, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis; por ser siempre una persona carismática que me inspiró confianza.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, en especial a los docentes de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por proporcionarme una formación académica de calidad.

Brenda Abigail Chapa Vásquez

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

Rector

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

Vicerrector Académico

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

Vicerrectora de Investigación

Ing. MsC. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO
Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Ing. ERICK ALDO AUQUÍNIVIN SILVA
Director de Escuela de Ingeniería Agroindustrial

JURADO DE TESIS

Ing. Guillermo Idrogo Vásquez

Presidente

Ing. Erick Aldo Auquiñivín Silva

Secretario

Mp. Lizette Daniana Méndez Fasabi

Vocal

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo Brenda Abigail Chapa Vásquez identificada con DNI N° 72767889, estudiante de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autora de la tesis titulada

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
(*Origanum vulgare L.*) SOBRE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO**

La misma que presenté para optar:

El título profesional de Ingeniero Agroindustrial

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente: asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de nuestra acción se deriven.

Chachapoyas 02 de abril del 2018

VISTO BUENO DEL ASESOR

Yo, Segundo Grimaldo Chávez Quintana, identificado con DNI N° 44011631, asesor de la tesis titulada “EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) SOBRE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO”, presentada por la bachiller Brenda Abigail Chapa Vásquez.

Por lo indicado doy testimonio y visto bueno, que la bachiller ha ejecutado la tesis mencionada, por lo que en fe a la verdad firmo para mayor veracidad.

Segundo Grimaldo Chávez Quintana

DNI N° 44011631



ANEXO 2-N

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 07 de Marzo del año 2018, siendo las 11:00 horas, el aspirante: Brenda Abigail Chapa Vasquez defiende públicamente la tesis titulada: Efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (origanum vulgare L.) sobre Listeria monocytogenes en queso fresco. para optar el Título Profesional Ingeniero Químico Industrial otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el

Jurado, constituido por: Presidente: Ing. Guillermo Ichazo Vasquez
Secretario: Ing. MSc. Erick Aldo Aquilino Silva
Vocal: Ing. Lizette Dariana Méndez Fasabi



Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideraran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s).

Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

Notable o sobresaliente () Aprobado () No apto ()

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 12:20 horas del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación de la tesis.

[Signature]
SECRETARIO

[Signature]
VOCAL

[Signature]
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA..... | iii |
| AGRADECIMIENTO..... | iv |
| AUTORIDADES UNIVERSITARIAS..... | v |
| JURADO DE TESIS..... | vi |
| DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO..... | vii |
| VISTO BUENO DEL ASESOR..... | viii |
| ÍNDICE GENERAL..... | x |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xiii |
| RESUMEN..... | xiv |
| ABSTRACT..... | xv |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 16 |
| II. OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1. Objetivo general..... | 18 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 18 |
| III. MARCO TEÓRICO..... | 19 |
| 3.1. Antecedentes de la investigación..... | 19 |
| 3.2. Bases teóricas..... | 20 |
| 3.2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos..... | 20 |
| 3.2.2. Métodos de prevención de enfermedades transmitidas por alimentos..... | 21 |
| 3.2.3. Aceites esenciales..... | 22 |
| 3.2.4. Métodos de extracción de aceites esenciales..... | 22 |
| 3.2.5. Concentraciones o diluciones mínimas para evaluar el efecto biocida de los aceites esenciales..... | 23 |
| 3.2.6. Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)..... | 24 |
| 3.2.7. Composición química del orégano..... | 25 |
| 3.2.8. Producción de orégano en Perú..... | 26 |
| 3.2.9. Producción de productos agroindustriales..... | 27 |
| 3.2.10. Queso..... | 28 |
| 3.2.11. Composición de los quesos..... | 28 |
| 3.2.12. Defecto de los quesos..... | 28 |
| 3.3. Definición de términos básicos..... | 29 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 31 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.1. | Materiales..... | 31 |
| 4.2. | Métodos, técnicas y procedimientos | 31 |
| 4.2.1. | Método..... | 31 |
| 4.2.2. | Técnicas | 32 |
| 4.2.3. | Procedimiento | 33 |
| V. | RESULTADOS | 34 |
| 5.1. | Concentración mínima inhibitoria del AEO | 34 |
| 5.2. | Capacidad de inhibición microbiana en queso fresco..... | 36 |
| 5.3. | Evaluación sensorial de los quesos con AEO | 38 |
| VI. | DISCUSIÓN | 40 |
| VII. | CONCLUSIONES..... | 42 |
| VIII. | RECOMENDACIONES..... | 43 |
| IX. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |
| X. | ANEXOS | 48 |
| 10.1. | Anexo 1: Figuras referidas a la investigación | 48 |
| 10.2. | Anexo 2: Panelistas realizando evaluación sensorial de los quesos..... | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Métodos de extracción de aceites esenciales..... | 23 |
| Tabla 2. Taxonomía del orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) | 25 |
| Tabla 3. Composición química del aceite esencial de <i>O. vulgare</i> de acuerdo a cromatografía de gases con detector de masa (GLSM) | 25 |
| Tabla 4. Estadística nacional de orégano según región - 2014..... | 26 |
| Tabla 5. Producción y ventas de productos agroindustriales alimenticios en Perú, enero 2015/16 (miles de toneladas)..... | 27 |
| Tabla 6. Composición por cada 100 g de queso | 28 |
| Tabla 7. Diseño estadístico para el análisis | 32 |
| Tabla 8. Determinación de la menor concentración inhibitoria | 34 |
| Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para la evaluación estadística del comportamiento de la formación de los halos en los medios de cultivo | 35 |
| Tabla 10. Coeficientes estadísticos para la evaluación del comportamiento de la formación de los halos en los medios de cultivo | 36 |
| Tabla 11. Reporte general de los ciclos logarítmicos de <i>L. monocytogenes</i> en los quesos con AEO, sorbato de potasio y sin conservante (Log UFC/gramo)..... | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Planta de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)..... | 24 |
| Figura 2. Comparación de los ciclos logarítmicos de <i>L. monocytogenes</i> en los quesos frescos | 38 |
| Figura 3. Representación gráfica de la variación del color, olor y sabor de los quesos formulados con las diferentes concentraciones de AEO. | 39 |
| Figura 4. Pesado de los medios de cultivo en una balanza con una precisión de $\pm 0,0001$. 48 | |
| Figura 5. Calentamiento de los medios de cultivo en una cocina de plancha | 48 |
| Figura 6. Esterilización de los medios de cultivos en una autoclave | 48 |
| Figura 7. Utilización de una cabina de bioseguridad para evitar la contaminación de los medios de cultivos | 49 |
| Figura 8. Incorporación del aceite esencial de orégano en los medios de cultivos | 49 |
| Figura 9. Pasteurización de la leche fresca de vaca a 60 °C por 30 minutos..... | 49 |
| Figura 10. Cortado en cubos de 2 cm | 50 |
| Figura 11. Desuerado con mallas para el filtrado | 50 |
| Figura 12. Quesos con aceite esencial de orégano, con sorbato de potasio y sin conservante | 50 |

RESUMEN

En la presente investigación se tuvo como objetivo conocer la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre *Listeria monocytogenes* en queso fresco, para lo cual se evaluó la capacidad de inhibición microbiana in vitro de 12 concentraciones de aceite esencial (0,2, 0,5, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4 y 2,6 %) en cepas de *L. monocytogenes*, utilizando la técnica de difusión en agar con diluciones. Con la mejor concentración se elaboró queso fresco y evaluó el efecto inhibitorio de la bacteria por 20 días a 4 °C; también, se realizó una evaluación sensorial (color, olor y sabor) a quesos elaborados con concentraciones menores a 1 %. La concentración mínima inhibitoria in vitro fue de 0,8 % y al evaluarlo en queso fresco, su capacidad de inhibición microbiana fue superior al efecto del sorbato de potasio (4,55 Log UFC/gramo frente a 5,35 Log UFC/gramo). Asimismo las concentraciones menores a 0,6 % de aceite esencial de orégano en quesos fueron más aceptadas por los panelistas. Los resultados obtenidos sugieren una posible aplicación del aceite esencial de orégano, para prevenir la contaminación por *L. monocytogenes* y el deterioro del queso fresco debido al crecimiento del microorganismo.

Palabras clave: actividad biocida, CMI, listeriosis.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the antimicrobial activity of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) on *Listeria monocytoges* in fresh cheese, for which the capacity of microbial inhibition in vitro of 12 concentrations of essential oil was evaluated (0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4 and 2.6 %) in strains of *L. monocytogenes*, using the agar diffusion technique with dilutions. With the best concentration fresh cheese was elaborated and evaluated the inhibitory effect of the bacterium for 20 days at 4 ° C; Also, a sensory evaluation (color, smell and taste) was carried out on cheeses made with concentrations lower than 1 %. The minimum inhibitory concentration in vitro was 0.8 % and when evaluated in fresh cheese, its capacity for microbial inhibition was superior to the effect of potassium sorbate (4.55 Log CFU / gram vs. 5.35 Log CFU / gram). Likewise, concentrations lower than 0.6 % of oregano essential oil in cheeses were more accepted by the panelists. The results obtained suggest a possible application of the essential oil of oregano, to prevent contamination by *L. monocytogenes* and the deterioration of fresh cheese due to the growth of the microorganism.

Keywords: biocidal activity, MIC, listeriosis.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los alimentos trae como consecuencia enfermedades que constituyen un problema mundial, debido que son una importante causa de mortalidad de las personas; además genera pérdidas elevadas en las industrias porque la producción industrial de alimentos es un proceso que se desarrolla a gran escala (Orberá, 2004).

La primera estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria muestra que casi 1 de cada 10 personas enferman cada año al ingerir alimentos contaminados y 420 000 mueren como consecuencia de estas enfermedades. Las regiones de África y Asia Sudoriental tienen la carga más alta de ETA (Organización Mundial de la Salud, 2016). En el Perú durante el año 2014 se informaron y estudiaron un total de 61 brotes de ETA y hasta el III trimestre del 2015 se han notificado 27 brotes de ETA, 52 % menor a lo reportado al mismo periodo en el 2014, siendo el departamento de Lima el que reporta el mayor número de brotes de ETA (Ministerio De Salud, 2015).

La bacteria *Listeria monocytogenes* es el agente causal de listeriosis, una enfermedad que se transmite a través de los alimentos y que, en ocasiones, puede ser difícil de controlar. Según un estudio realizado por expertos europeos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2010 la *L. monocytogenes* causó una infección en todo el mundo a unas 23 150 personas, de las cuales murieron 5 463. Concluyeron que el 20,7 % de las personas que enfermaron fueron mujeres embarazadas, uno de los sectores de población más afectados por la bacteria, otros grupos especialmente sensibles a las infecciones por este patógeno son las personas inmunodeprimidas, ancianos y niños. Según los expertos, y a pesar de que esta bacteria no es tan común y habitual como otros agentes patógenos transmitidos por alimentos, como *Salmonella* o *Escherichia coli*, sí es una de las más letales y adaptables que se encuentran en los alimentos (Chavarrías, 2014).

El queso fresco por sus características fisicoquímicas que presenta, es un alimento susceptible a contaminación por microorganismos. En un estudio realizado en quesos artesanales se encontró la presencia de 21,4 % de *L. monocytogenes* y 78,6 % de otro microorganismos como *Enterococcus spp.* y *Bacillus spp.*, representando esto un riesgo potencial para la población consumidora (Espinoza, De la Torre, Salinas, & Sánchez, 2004).

Actualmente se conocen muchas técnicas para el control e inhibición de microorganismos con el fin de preservar los alimentos, una de estas es el tratamiento térmico; sin embargo existen microorganismo que resisten a altas temperaturas. Por otro lado la adición de sustancias de origen natural proveen a los alimentos calidad sensorial y microbiológica, permitiendo sustituir los aditivos químicos, que han sido catalogadas desde hace varios años como los grandes actores en la causa de las enfermedades modernas (Ríos & Recio, 2005).

Los aceites esenciales son conocidos porque sus compuestos fenólicos con considerados como posibles antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales, acaricidas, analgésicos, antiespasmódicos, insecticidas, larvicidas, pesticidas y vermicidas (Duke, 2002).

Con el conocimiento de lo presentado en los párrafos anteriores surgió la inquietud de plantear una alternativa que contribuya de alguna manera a mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos y es por eso, que se investigó la capacidad inhibitoria que posee el aceite esencial de orégano sobre cepas de *L. monocytogenes* a concentraciones determinadas; con el fin de utilizarlo como aditivo natural en la elaboración de queso fresco, contribuyendo de esta manera al desarrollo industrial.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre *Listeria monocytogenes* en queso fresco.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar la menor concentración inhibitoria in-vitro, del aceite esencial de orégano sobre *Listeria monocytogenes*.
- ✓ Evaluar al mejor tratamiento como inhibidor de *Listeria monocytogenes* en queso fresco

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes de la investigación

Asensio (2013) demostró en su investigación que todos los aceites esenciales de orégano presentan actividad antimicrobiana, ya sea ésta bacteriostática o bactericida. El potencial antimicrobiano de estos aceites se debe principalmente a la acción individual o sinérgica de sus componentes sobre la integridad celular de los microorganismos, siendo esto de gran importancia para su aplicación como antimicrobiano en las tecnologías de elaboración y conservación de alimentos (Gómez & López, 2009).

Albado, Saez y Gabriel (2001) afirman que el aceite esencial del orégano posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gram-negativas. Del mismo modo Solís (2012) demostró que el aceite esencial de orégano presenta efecto antibacteriano mínimo sobre *Salmonella spp.*

En estudios donde se evaluaron las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano frente a 71 bacterias aisladas de leche, el aceite de orégano resultó más eficaz para *E. coli* con 0,35 % de concentración bactericida mínima (Bastos et al., 2011).

Rodríguez y Salazar (2016) argumentan que los aceites esenciales encapsulados (nanopartículas) de orégano, timol y carvacrol presentaron una buena inhibición sobre las cepas de *S. aureus* y *L. innocua* a una concentración de 0,25 %.

En la investigación donde evaluaron el efecto del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) contra bacterias gram-positivas, encontraron que fue activo sobre *L. monocytogenes* a una concentración mínima inhibitoria de 0,1024 % (Castaño, G, Zapata, & Jiménez, 2010).

Por otro lado Morales (2015) demostró que el efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *L. monocytogenes*, se determinó a una concentración no menor de 1,6 %. Donde se pudo observar que el queso Ricotta con aceite esencial presenta inhibición en el recuento de *Listeria*, pasando de 7,18 Log UFC/gramo a 4,95 Log UFC/gramo en 48 horas de evaluación, comportamiento que continuó durante 14 días de prueba, mostrando actividad biocida hasta alcanzar valores 3,70 Log UFC/gramo representando una disminución del 48,46 %.

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Son las enfermedades que se originan por la ingesta de alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes como para afectar la salud del consumidor. La contaminación puede deberse a la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, conservación, transporte o comercialización de alimentos; estos alimentos contaminados pueden ocasionar dolencias provocadas por patógenos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos (Orberá, 2004). Las enfermedades puede manifestarse a través de:

- ✓ Infecciones: se debe a la ingesta de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales, así tenemos por ejemplo: salmonelosis, listeriosis, hepatitis viral A.
- ✓ Intoxicaciones: se produce de la ingesta de alimentos con productos metabólicos de microorganismos, o de sustancias químicas incorporadas a aquellos de modo accidental. Por ejemplo: botulismo, estafilocócica o toxinas por hongos.
- ✓ Toxi-Infecciones: ocasionado por la ingestión de alimentos con una cantidad de microorganismo causante de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Por ejemplo: cólera.

Alimentos con características fisicoquímicas como pH cercano a la neutralidad, actividad de agua superior a 0,92 y alto contenido de proteínas y grasas, permiten que su superficie se contamine con diversos microorganismos, donde se incluyen los patógenos como *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

L. monocytogenes es una bacteria Gram-positiva, aerobia o anaerobia facultativa, móvil, no esporulado, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 1 °C y 45 °C con un óptimo a 37 °C, lo cual lo diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *S. aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas. En cuanto al pH, desarrolla en un rango entre 4,4 y 9,4; crece en presencia de un 10 % de NaCl y sobrevive a un 16 a 20 % (Mercado & Llenque, 2012). Esta bacteria es uno de los patógenos más importante de origen alimentario, dado que resiste a esas diversas condiciones, además se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y, es causante de la listeriosis (Espinoza, De La Torre, Salinas, & Sánchez, 2004).

3.2.1.1. Síntomas de la Listeriosis

Los adultos con listeriosis se presentan con mayor frecuencia con meningitis, meningoencefalitis o sepsis. Los síndromes adicionales incluyen abscesos del cerebro y médula espinal, endocarditis, endoftalmitis, osteomielitis y artritis séptica. La fiebre, la ataxia, las convulsiones, la conciencia deprimida y el estado mental alterado son síntomas frecuentes de presentación de listeriosis del sistema nervioso central.

En la mujer embarazada la listeriosis se presenta como un síndrome febril banal aunque puede causar abortos, partos prematuros y muertes fetales in útero. En el recién nacido, esta bacteria provoca una infección diseminada, a menudo asociada a meningitis (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991). Estos autores también mencionan que el intervalo entre comer un alimento contaminado y el inicio de los síntomas parece ser mucho más prolongado para la listeriosis que para otras enfermedades transmitidas por los alimentos, que generalmente causan síntomas desde horas hasta algunos días después de la exposición a alimentos contaminados.

3.2.2. Métodos de prevención de enfermedades transmitidas por alimentos

Dentro de los métodos de control para proporcionar inocuidad a los alimentos tenemos: los tratamientos térmicos, el almacenamiento a bajas temperaturas, el uso de conservantes químicos y la tendencia que aunque no es nueva es de gran aceptación actual hacia el uso de conservantes naturales.

3.2.2.1. Tratamiento térmico

Se suelen englobar todos los procedimientos que tienen entre sus fines la destrucción de los microorganismos por el calor. Los tratamientos térmicos más usados en la actualidad son la pasteurización y la esterilización, cuya finalidad principal es la destrucción microbiana (Juliarena & Gratton, 2016).

3.2.2.2. Conservantes químicos

En esta categoría de conservantes destacan los siguientes: benzoatos, parabenos, propionatos, acetatos, sorbatos, sulfitos, nitritos, nitratos, antibióticos. Las condiciones de uso de los conservantes están reglamentadas estrictamente en todos los países del mundo, es decir existen límites de las cantidades de conservantes que se pueden añadir; los conservantes alimentarios, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación (Rodríguez, 2011).

3.2.2.3. Conservación con sustancias naturales

Las sustancias de esencias naturales, se han utilizado desde épocas antiguas, como sustancias aromáticas y como conservantes. Los compuestos presentes en muchas hierbas y especies poseen actividad antimicrobiana por ser derivados simples y complejos del fenol; los cuales son volátiles (Ríos & Recio, 2005).

3.2.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (García , Ortega, Martínez, & Castro, 2010).

3.2.4. Métodos de extracción de aceites esenciales

Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final (Servicio Nacional de Aprendizaje, sf). En la Tabla 1, se puede observar diferentes métodos para extraer aceites esenciales.

Tabla 1. Métodos de extracción de aceites esenciales

| Tipo de Método | Procedimiento | Productos obtenidos |
|-------------------------|---|---------------------------------------|
| Métodos directos | Extrusión | Aceites esenciales cítricos |
| | Exhudación | Gomas, resinas, bálsamos |
| Destilación | Directa | |
| | Arrastre con vapor de agua | Aceites esenciales y aguas aromáticas |
| | Destilación-maceración | |
| Extracción con solvente | | Infusiones y resinoides alcohólicos |
| | Solventes volátiles | Concretos y absolutos |
| | Solventes fijos (grasas y aceites) | Absolutos de pomadas |
| | | Absolutos de enflorados |
| | Extracción con fluidos en estado supercrítico | |

Fuente: (Servicio Nacional de Aprendizaje, sf)

3.2.5. Concentraciones o diluciones mínimas para evaluar el efecto biocida de los aceites esenciales

Para poder evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sobre microorganismos patógenos, se aplican convencionalmente dos técnicas básicas: el método de difusión en agar (pozo o disco de papel) y el método de dilución (agar o caldo líquido). Las pruebas y evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son difíciles debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad (Kalemba & Kunicka, 2003).

3.2.5.1. Método de difusión en agar

El método permite cuantificar el grado de inhibición para el crecimiento de los microorganismos y posiblemente cambios en su morfología de una manera simple.

En cajas de Petri con agar se inocula la especie a evaluar; existen dos métodos posibles para la incorporación del aceite esencial que son: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio del agar. Se preparan en cajas de Petri, soluciones del aceite esencial en diferentes concentraciones y los discos de papel son sometidos a inmersión. La eficacia del aceite esencial se demuestra por el tamaño de la zona de inhibición alrededor del disco y se expresa como el diámetro de esta zona en milímetros o centímetros. Este método es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica de antimicrobiano es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008).

3.2.6. Orégano (*Origanum vulgare* L.)

Dirección Regional de Agricultura Tacna (2016), el orégano es una planta herbácea perenne, se caracteriza por tener hojas ovaladas y redondeadas, de color verde intenso y a menudo de color amarillo mestizo. Tanto las hojas como las inflorescencias despiden un aroma agradable debido a los aceites esenciales que contiene. Toda la planta contiene unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, compuesta por un estearopteno y dos tipos de fenoles, principalmente carvacrol y en menor proporción timol (Wikipedia, 2016).



Figura 1. Planta de orégano (*Origanum vulgare* L.)

Fuente: (DRAT, 2016)

Orégano es el nombre común con que se denomina a más de 60 especies vegetales utilizadas en todo el mundo principalmente como condimento, las especies de orégano más utilizadas pertenecen al género *Origanum* (Kintzios, 2002). En la Tabla 2 se muestra la taxonomía del orégano.

Tabla 2. Taxonomía del orégano (*Origanum vulgare* L.)

| Taxonomía | Clase |
|------------------|-----------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophita |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Lamiales |
| Familia: | Lamiaceae |
| Subfamilia: | Nepetoideae |
| Tribu: | Mentheae |
| Género: | <i>Origanum</i> |
| Especie: | <i>vulgare</i> |

Fuente: (Kintzios, 2002).

3.2.7. Composición química del orégano

En la Tabla 3, se observa la composición del aceite esencial de orégano de acuerdo a la cromatografía de gases con detector de masa.

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de *O. vulgare* de acuerdo a cromatografía de gases con detector de masa (GLSM)

| COMPUESTO | % |
|-------------------------------|----------|
| PhellandreneOS | 1,75 |
| <i>p-cymenecoccus aureus</i> | 6,86 |
| <i>trans-sabinene hydrate</i> | 3,53 |
| <i>Linalool</i> | 1,47 |
| Cis sabinene hydrate | 18,66 |
| <i>4-terpineol</i> | 9,43 |
| <i>Terpineol</i> | 2,76 |

| | |
|---|------|
| <i>Linalyl acetate</i> | 7,40 |
| <i>Thymyl-metyl-eter</i> | 1,52 |
| <i>Thymyl-metyl-eter</i> | 2,07 |
| <i>Carvacrol</i> | 7,72 |
| <i>Carvacrol</i> | 1,18 |
| Trans-caryophyllene | 2,76 |
| Spathulenol | 2,26 |
| caryophyllene oxide | 2,21 |
| palmitic acid | 8,39 |
| 9,12-octadecadienoic acid | 8,29 |
| 9,12,15. octadecatrienal | 5,08 |
| 2-methyl-hexanal | 1,74 |
| 2-dodecanona | 2,52 |
| 1,3,3-trimethyl-2-(3-methyl-2-methylene 3-buthylene-3-butenylidene) ciclohexanol | 2,40 |

Fuente: (Albado Plaus, Saez Flores, & Grabiell Ataucusi, 2001).

3.2.8. Producción de orégano en Perú

La data del Ministerio de Agricultura y Riego, registra información hasta el año 2014, dando cuenta una superficie cosechada de 2 050 hectáreas y su producción de 15 mil 374,85 toneladas en el país con una tendencia ascendente de 3,9 % en los últimos quince años. En el Perú la superficie cultivada y distribución geográfica del orégano, está presente principalmente en las Regiones de Tacna, Arequipa y Moquegua, como se observa en la Tabla 4 (DRAT, 2016).

Tabla 4. Estadística nacional de orégano según región - 2014

| Región | Producción | Superficie | Rendimiento | Precio en |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Nacional | (t) | (ha) | (kg/ha) | chacra (S/.) |
| Total | 15 701 | 3 512 | 4 471 | |
| Tacna | 10 898 | 2 048 | 5 321 | 4,49 |
| Arequipa | 3 232 | 680 | 4 753 | 4,53 |
| Moquegua | 1 425 | 710 | 2 006 | 4,74 |

| | | | | |
|-------------|----|----|-------|------|
| Junín | 64 | 30 | 2 119 | 4,47 |
| Apurímac | 32 | 27 | 1 178 | 2,27 |
| Ayacucho | 31 | 10 | 3 100 | 4,84 |
| Puno | 15 | 5 | 3 000 | 0,62 |
| La Libertad | 5 | 2 | 3 000 | 3,17 |

Fuente: (DRAT, 2016)

3.2.9. Producción de productos agroindustriales

La producción y venta de productos agroindustriales alimenticios en el Perú se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Producción y ventas de productos agroindustriales alimenticios en Perú, enero 2015/16 (miles de toneladas)

| PRODUCTO | Producción | | | Ventas | | |
|----------------------------------|--------------------|------|-----------|--------------------|------|-----------|
| | Enero ^p | | | Enero ^p | | |
| | 2015 | 2016 | Var. % | 2015 | 2016 | Var. % |
| Elaboración de productos lácteos | | | | | | |
| Leche evaporada | 39,3 | 47,9 | 21,9 | 31,9 | 42,2 | 32,5 |
| Leche condensada | 0,2 | 0,4 | 140,0 | 0,4 | 0,7 | 49,1 |
| Leche pasteurizada | 10,1 | 12,6 | 25,0 | 10,7 | 11,4 | 6,1 |
| Queso madurado (tipo suizo) | 1,2 | 1,2 | 0,7 | 1,2 | 1,2 | 4,2 |
| Queso fresco | 0,5 | 0,6 | 7,6 | 0,5 | 0,6 | 4,2 |
| Queso mantecoso | 0,0 | 0,1 | 0,9 | 0,0 | 0,1 | 0,8 |
| Mantequilla | 0,3 | 0,3 | 8,5 | 0,2 | 0,2 | -10,9 |
| Cremas | 0,7 | 0,8 | 4,4 | 0,6 | 0,7 | 8,8 |
| Yogurts | 15,4 | 17,0 | 10,3 | 16,6 | 17,6 | 5,7 |
| Manjar blando | 0,3 | 0,3 | 10,0 | 0,4 | 0,4 | 19,9 |

Fuente: (Ministerio de Agricultura y Riego, 2016)

3.2.10. Queso

El Codex alimentarius (2011) define al queso como un producto fresco o madurado, solido o semisólido, obtenido a partir de la coagulación total o parcial de la proteína de la leche (a través de la acción del cuajo u otros coagulantes, con o sin hidrólisis previa de la lactosa) y posterior separación del suero. Los quesos frescos se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y tener un periodo de vida de anaquel corto (Buendía, González, Mendoza, Muñoz, & Reyes, Sf).

3.2.11. Composición de los quesos

En la Tabla 6 podemos observar la composición química por cada 100 g de queso.

Tabla 6. Composición por cada 100 g de queso

| Quesos | Calorías Kcal | Proteína % | Hidratos % | Grasa % | Agua % |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Queso fresco | 121 | 8,2 | 3,1 | 8,0 | 77,9 |
| Queso cottage | 96 | 13,6 | 1,4 | 4,0 | 78,8 |
| Queso crema Philadelphia | 313 | 8,4 | - | 31,0 | 58,0 |
| Brie | 318 | 18,9 | - | 26,9 | 48,6 |
| Edam | 331 | 25,5 | - | 25,4 | 43,8 |
| Blue Stilton | 409 | 22,3 | 0,1 | 35,5 | 38,6 |
| Queso Cheddar | 412 | 25,5 | 0,08 | 34,4 | 37,5 |
| Parmesano | 449 | 38,6 | - | 32,7 | 18,4 |

Fuente: (Buendía, González, Mendoza, Muñoz, & Reyes, Sf)

3.2.12. Defecto de los quesos

La calidad de los quesos se determina por sus características fundamentales tales como el aroma, color, consistencia y aspectos generales; las cuales dependen del tipo de queso que se produce. Cuando alguna de estas características se deteriora, le hacen perder su calidad y muchas veces queda no apto para el consumo.

Los defectos de los quesos se deben a diferentes causas entre las cuales están: fermentaciones originadas por contaminación de microorganismos en la leche original o que se desarrollan durante su elaboración, también se debe a las condiciones de almacenamiento inadecuadas. Entre los defectos más frecuentes en los quesos se encuentran:

- Hinchazón, ocasionado por fermentaciones con alta producción de gas, esta hinchazón puede ser precoz, que aparece a los tres días de producción o tardía, que aparece a los diez días de elaboración. Ocasiona la aparición de ojos irregulares y abombamiento.
- La putrefacción, se debe a la contaminación de microorganismos no deseables y patógenos causantes de un olor nauseabundo, se presentan dos tipos de putrefacción: la blanca y la de color ceniza.
- Defectos de corteza, debido a problemas de almacenamiento se ocasionan pigmentos o decoloraciones.
- Defecto de sabor, que dan lugar a sabores ácido, amargo, a rancio y a suero, los cuales se deben a diferentes causas.
- Defecto de cuerpo y textura, ocasionado por mal manejo y control de variables en diferentes etapas del proceso de producción, como: cuerpo duro, cuerpo friable, textura abierta, manchas blancas y húmedas y de apariencia.
- Defectos de color, que se debe a la contaminación por algunos hongos, distribución inadecuada de la sal, por actividad de algunas bacterias, lo cual ocasiona centros decolorados o manchas en la masa del queso (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, s.f.).

3.3. Definición de términos básicos

Antimicrobiano: se refiere a cualquier agente que interfiera con el crecimiento y la actividad de los microorganismos (Montoya, 2008).

Aceite esencial: son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de la planta como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, frutos y raíces. Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua (García , Ortega, Martínez, & Castro, 2010).

Concentración inhibidora mínima (CIM): se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibióticos que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas (Quistián, 2014).

Halos de inhibición: es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un lugar antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculado con el germen (Ramos , 2014).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Aceite esencial

El AEO con 68,23 % de carvacrol, fue adquirido de la empresa Ikaro, la cual elabora productos aromáticos naturales de calidad reconocida, sin aditivos químicos ni sintéticos.

Preparación del inóculo

25 g de muestra de queso se homogeneizó con 225 ml de caldo de Enriquecimiento Base Listeria (LEB) durante un minuto, posteriormente se incubó a 30 °C durante cuatro horas. Después de la incubación, se adicionó 0,9 ml del suplemento selectivo para caldo LEB y se continuó con la incubación a 30 °C hasta completar las 24 horas. A partir del caldo LEB incubado por 24 horas, se sembró en agar Palcam por estría a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se tomaron del agar Palcam de 4 a 5 colonias de *L. monocytogenes* y se transfirieron estas colonias, simplemente tocando la parte superior de cada una con asa bacteriológica a un tubo que contenía 5 cm³ de caldo estéril de Mueller-Hinton. Se incubó este cultivo a 35 °C por un tiempo prudencial de 2 a 8 horas hasta que se produzca un crecimiento moderado, después se diluyó el cultivo con solución salina estéril hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland (Bernal & Guzman, 1984).

4.2. Métodos, técnicas y procedimientos

4.2.1. Método

Se realizó un experimento con diseño unifactorial cuya variable evaluada fue la dosis de aceite esencial de orégano (tabla 7) con 12 niveles y cuatro réplicas.

Tabla 7. Diseño estadístico para el análisis

| Concentración del aceite esencial de orégano (%) | Tratamientos | Replicas | | | |
|--|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0,2% | T_1 | T_1R_1 | T_1R_2 | T_1R_3 | T_1R_4 |
| 0,5% | T_2 | T_2R_1 | T_2R_2 | T_2R_3 | T_2R_4 |
| 0,8% | T_3 | T_3R_1 | T_3R_2 | T_3R_3 | T_3R_4 |
| 1,0% | T_4 | T_4R_1 | T_4R_2 | T_4R_3 | T_4R_4 |
| 1,2% | T_5 | T_5R_1 | T_5R_2 | T_5R_3 | T_5R_4 |
| 1,4% | T_6 | T_6R_1 | T_6R_2 | T_6R_3 | T_6R_4 |
| 1,6% | T_7 | T_7R_1 | T_7R_2 | T_7R_3 | T_7R_4 |
| 1,8% | T_8 | T_8R_1 | T_8R_2 | T_8R_3 | T_8R_4 |
| 2,0% | T_9 | T_9R_1 | T_9R_2 | T_9R_3 | T_9R_4 |
| 2,2% | T_{10} | $T_{10}R_1$ | $T_{10}R_2$ | $T_{10}R_3$ | $T_{10}R_4$ |
| 2,4% | T_{11} | $T_{11}R_1$ | $T_{11}R_2$ | $T_{11}R_3$ | $T_{11}R_4$ |
| 2,6% | T_{12} | $T_{12}R_1$ | $T_{12}R_2$ | $T_{12}R_3$ | $T_{12}R_4$ |

4.2.2. Técnicas

Concentración mínima inhibitoria del AEO

Se determinó aplicando la combinación de la técnica de difusión en agar con diluciones. La metodología fue basada en el método de Kirby-Bauer a través del uso de discos de papel impregnados (Zapata, Muñoz, Ruiz, Montoya, & Gutiérrez, 2009). Se tomaron 200 μ L de la suspensión de *L.monocytogenes* a una concentración de 0,5 del patrón de McFarland, la cual se sembró masivamente en el medio de cultivo Mueller-Hinton. Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron impregnados con 50 μ l de aceite esencial a las diferentes concentraciones de prueba, estos discos fueron depositados en la superficie del agar; para luego incubar las cajas petri durante 24 horas a 37 °C. La actividad antimicrobiana se expresó

como la diferencia, en milímetros, entre el radio del halo de inhibición y el radio del disco de papel filtro (Bernal & Guzman, 1984). Todos los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado.

Capacidad de inhibición microbiana en queso fresco

Se realizó teniendo en cuenta la técnica de conteo de placas ISO 11290-2: 1998 Enmienda 1: 2004 para *L. monocytogenes* en los alimentos (Instituto de salud pública chile, 2017). La evaluación se realizó por duplicado.

Evaluación sensorial del queso con AEO

Se llevó a cabo mediante una escala hedónica, con 33 panelistas entre docentes y alumnos de la Universidad Señor de Sipán.

4.2.3. Procedimiento

Después de haber determinado la concentración mínima inhibitoria del AEO que fue 0,8 %, se elaboró 33 quesos frescos (11 fueron elaborados con 0,8 % de AEO, el cual se adicionó en función del peso de la cuajada; 11 con sorbato de potasio y 11 sin ningún conservante); y para determinar la capacidad de inhibición microbiana en estas matrices, se inocularon los 33 quesos frescos con *L. monocytogenes* (la inoculación se realizó en una concentración del 1% sobre el peso total de cada muestra de queso). El análisis se realizó a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 días; ya que es el tiempo de vida anaquel aproximado del queso fresco.

Paralelamente se elaboró quesos con concentraciones de AEO de (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 %) con el propósito de medir su grado de aceptabilidad mediante un análisis sensorial.

V. RESULTADOS

5.1. Concentración mínima inhibitoria del AEO

El punto final de inhibición completa del crecimiento se estima a simple vista alrededor de algunos discos.

En la tabla 8, se puede apreciar la dimensión de la formación de halos en las diferentes concentraciones después de una incubación a 37 ° C / 24 h.

Tabla 8. Determinación de la menor concentración inhibitoria

| n° | Concentración de Aceite esencial en discos | Diámetro del halo de inhibición (mm) en los 4 discos | | | |
|----|--|--|-----|-----|-----|
| | | D1 | D2 | D3 | D4 |
| 1 | 0,2 % | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 0,5 % | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3 | 0,8 % | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,5 |
| 4 | 1,0 % | 1,0 | 1,0 | 1,5 | 1,0 |
| 5 | 1,2 % | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,0 |
| 6 | 1,4 % | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,5 |
| 7 | 1,6 % | 3,0 | 3,5 | 3,0 | 2,5 |
| 8 | 1,8 % | 3,5 | 4,0 | 3,5 | 3,0 |
| 9 | 2,0 % | 4,0 | 4,5 | 4,0 | 3,5 |
| 10 | 2,2 % | 5,5 | 5,5 | 6,0 | 4,5 |
| 11 | 2,4 % | 6,0 | 6,0 | 7,0 | 5,5 |
| 12 | 2,6 % | 6,5 | 7,5 | 8,0 | 6,5 |

Nota: D1: Disco 1, D2: Disco 2, D3: Disco 3 y D4: Disco 4.

En la Tabla 9 se observa el análisis de varianza en la cual podemos analizar la significancia del modelo estadístico, para ello se obtiene la suma de cuadrados equivalente a 256,86; con

grados de libertad de 14 de un total de 48 experimentos. El resultado del cuadrado promedio es 18,35; que se obtuvo al dividir el cociente (256) entre los grados de libertad (14).

El valor F (109,98) es el resultado de dividir el cuadrado promedio entre el valor residual (0,17); a partir de este valor se determina el p-valor, el cual determina la probabilidad de que ocurra un evento, demostrando si la variable dependiente es matemáticamente diferente. Además este p-valor se fija en 0,05 para demostrar que el error del estudio solo puede ser 5 %, y el 95 % de confianza debe ser atribuido a la maniobra experimental, por lo cual tendremos una certeza o confiabilidad del 95 % de lo que estamos observando, ósea debido a la maniobra y no al azar.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para la evaluación estadística del comportamiento de la formación de los halos en los medios de cultivo

| Fuente | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado promedio | Valor F | p-valor | |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|---------|----------|---------|
| Modelo | 256,86 | 14 | 18,35 | 109,98 | < 0,0001 | Signif. |
| A-Concentración de Aceite Esencial | 255,43 | 11 | 23,22 | 139,19 | < 0,0001 | * |
| B-Discos de papel | 1,43 | 3 | 0,48 | 2,86 | 0,0516 | * |
| Residual | 5,51 | 33 | 0,17 | | | |
| Total | 262,37 | 47 | | | | |

Todas las concentraciones evaluadas presentaron resultados diferentes, tal como se observa en la Tabla 9 (sig.=0,05), los discos de papel no tuvieron efecto, por lo que se considera como único factor a la concentración de AEO.

En la Tabla 10, se observa la Desviación Estándar (Std. Dev.) también denominado Raíz cuadrada del error puro (experimental), el cual es 0,41 y mide la dispersión de los datos. En cuanto al promedio (Mean) es el resultado que se obtiene al generar una división con la sumatoria de los datos y el número de datos, teniendo como resultado 2,86. El Coeficiente de Variación en porcentaje (C.V. %) es 14,26, este nos da referencia a la relación entre el

tamaño de la media y la variación de la variable. La Suma Residual predicha de cuadrados (PRESS) es una medida de como este modelo en particular se ajusta a cada punto en el diseño. Los coeficientes se calculan sin el primer punto. Este modelo luego se usa para que estime el primer punto y calcule el residual para el punto uno. Esto se hace para cada punto de datos y los residuales cuadrados se suman, obteniendo 11,65. El R^2 (R-cuadrado) es la proporción de la varianza total de la variable explicada por la regresión, donde los resultados son mejor si se acerca a 1,00, para este estudio tenemos el valor de 0,979. El R^2 Ajustado (Adj R-Squared), es la medida de la cantidad de variación sobre la media explicado por el modelo ajustado para la cantidad de parámetros en el modelo, con un valor de 0,970. El R^2 predicho (Pred R-Squared) tiene un valor de 0,956, este es una medida de la capacidad predictiva del modelo. La Adecuada Precisión (**Adeq Precision**), es el coeficiente que compara el rango de valores pronosticados en los puntos de diseño con el error de predicción promedio. Las relaciones superiores a cuatro indican una discriminación modelo adecuada, para este caso tiene un valor de 33,213.

Tabla 10. Coeficientes estadísticos para la evaluación del comportamiento de la formación de los halos en los medios de cultivo

| Coeficientes estadísticos | Valor | Coeficientes estadísticos | Valor |
|---------------------------|-------|---------------------------|--------|
| Std. Dev. | 0,41 | R-Squared | 0,979 |
| Mean | 2,86 | Adj R-Squared | 0,970 |
| C.V. % | 14,26 | Pred R-Squared | 0,956 |
| PRESS | 11,65 | Adeq Precision | 33,213 |

5.2. Capacidad de inhibición microbiana en queso fresco

En la tabla 11 podemos observar los resultados de las muestra tratadas con AEO, sorbato de potasio y sin conservante. Estos resultados nos muestran los ciclos logarítmicos de la bacteria *L. monocytogenes* en los quesos frescos.

Tabla 11. Reporte general de los ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en los quesos con AEO, sorbato de potasio y sin conservante (Log UFC/gramo)

| Días de almac. | Aceite Esencial de orégano | | Sorbato de Potasio | | Sin conservante | |
|----------------|----------------------------|-----|--------------------|-----|-----------------|-----|
| | R1 | R2 | R1 | R2 | R1 | R2 |
| 2 | 0,9 | 0,8 | 1,2 | 1,2 | 3,3 | 3,5 |
| 4 | 0,9 | 0,9 | 1,2 | 1,2 | 3,4 | 3,7 |
| 6 | 1,5 | 1,6 | 1,5 | 1,3 | 3,5 | 3,8 |
| 8 | 2,5 | 2,2 | 1,8 | 1,9 | 4,1 | 4,1 |
| 10 | 3,3 | 2,9 | 2,3 | 2,4 | 4,1 | 4,2 |
| 12 | 3,5 | 3,3 | 2,6 | 2,4 | 4,3 | 4,4 |
| 14 | 4,2 | 3,9 | 3,4 | 3,2 | 5,3 | 5,2 |
| 16 | 4,4 | 4,3 | 4,5 | 4,3 | 5,8 | 5,6 |
| 18 | 4,4 | 4,5 | 5,1 | 5,0 | 6,2 | 6,3 |
| 20 | 4,5 | 4,6 | 5,5 | 5,2 | 6,5 | 7,2 |

Nota: R1: Repetición 1, R2: Repetición 2

En la figura 2, se observa los ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en los quesos frescos formulados con AEO, sorbato de potasio y sin ningún conservante. Los cuales en el 2 día de evaluación son 0,85, 1,2 y 3,4 Log UFC/gramo respectivamente; pasando a tener valores de 4,55, 5,35 y 6,85 Log UFC/gramo en el día 20 de evaluación. De esta manera se puede evidenciar que los ciclos logarítmicos en los quesos formulados con AEO son menores en los días de evaluación con respecto a las muestras testigo.

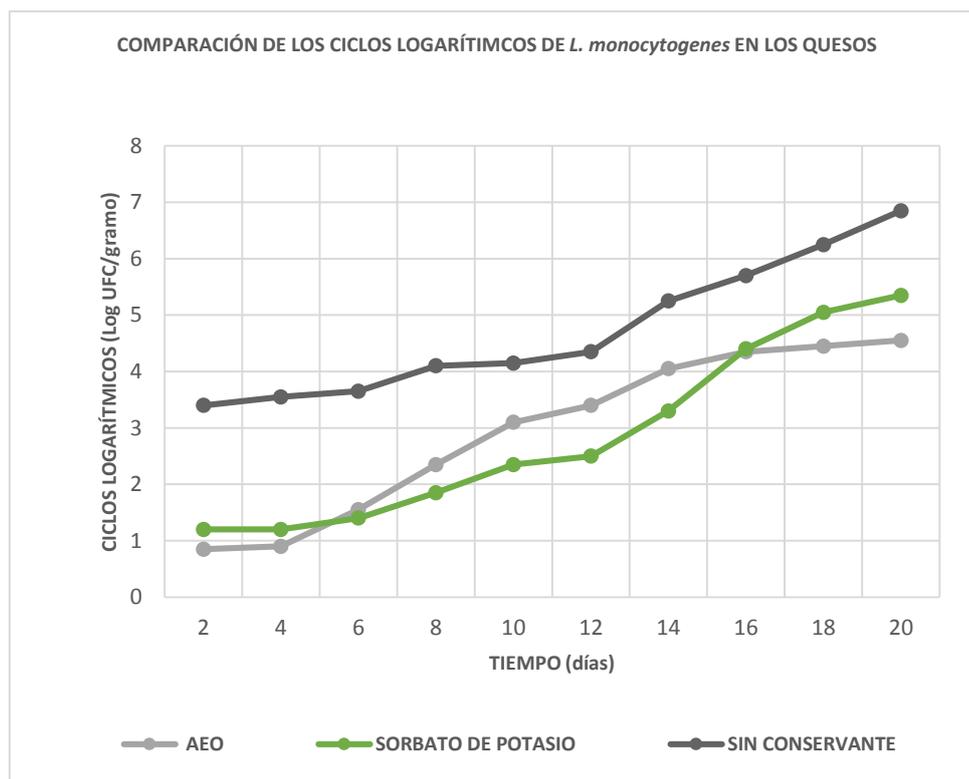


Figura 2. Comparación de los ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en los quesos frescos

5.3. Evaluación sensorial de los quesos con AEO

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la evaluación sensorial (color, olor y sabor) de los quesos elaborados con las diferentes concentraciones de AEO.

Tabla 12. Resultados de la evaluación sensorial de los atributos Color, Olor y Sabor

| n° | Concentración de Aceite esencial de Orégano | | | | | | | | | | |
|----|---|-----------|-----------------|-----|-----|----------------|-----|-----|-----------------|-----|-----|
| | de | Aceite de | Color (Puntaje) | | | Olor (Puntaje) | | | Sabor (Puntaje) | | |
| | % | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 0 | | 7,0 | 6,5 | 6,7 | 4,2 | 4,3 | 4,2 | 7,4 | 7,3 | 7,1 |
| 2 | 0,1 | | 7,3 | 7,3 | 7,2 | 4,2 | 4,4 | 4,2 | 7,9 | 7,7 | 7,8 |
| 3 | 0,2 | | 7,5 | 7,4 | 7,3 | 4,5 | 4,4 | 4,4 | 8,3 | 8,5 | 8,1 |
| 4 | 0,3 | | 7,7 | 7,7 | 7,6 | 5,2 | 4,7 | 5,0 | 8,5 | 8,3 | 8,9 |
| 5 | 0,4 | | 7,9 | 7,6 | 7,5 | 6,5 | 6,4 | 6,4 | 8,6 | 8,4 | 8,7 |

| | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 6 | 0,5 | 8,0 | 8,1 | 7,8 | 7,5 | 7,6 | 6,9 | 8,2 | 8,5 | 7,7 |
| 7 | 0,6 | 8,1 | 7,9 | 7,5 | 7,7 | 7,7 | 7,6 | 7,5 | 7,4 | 7,0 |
| 8 | 0,7 | 8,2 | 7,9 | 7,6 | 7,6 | 7,8 | 7,5 | 5,3 | 5,2 | 4,9 |
| 9 | 0,8 | 8,2 | 8,0 | 7,9 | 7,0 | 7,2 | 6,9 | 2,1 | 2,0 | 1,9 |
| 10 | 0,9 | 8,2 | 8,1 | 7,9 | 6,2 | 6,3 | 6,1 | 1,2 | 1,1 | 1,3 |
| 11 | 1,0 | 8,3 | 8,3 | 7,9 | 5,0 | 4,9 | 4,8 | 0,6 | 0,5 | 0,7 |

En la Figura 3, se observa que el AEO influye en el grado de aceptabilidad tanto del olor y sabor, debido a que los quesos formulados con concentraciones superiores a 0,6 % descienden su aceptabilidad.

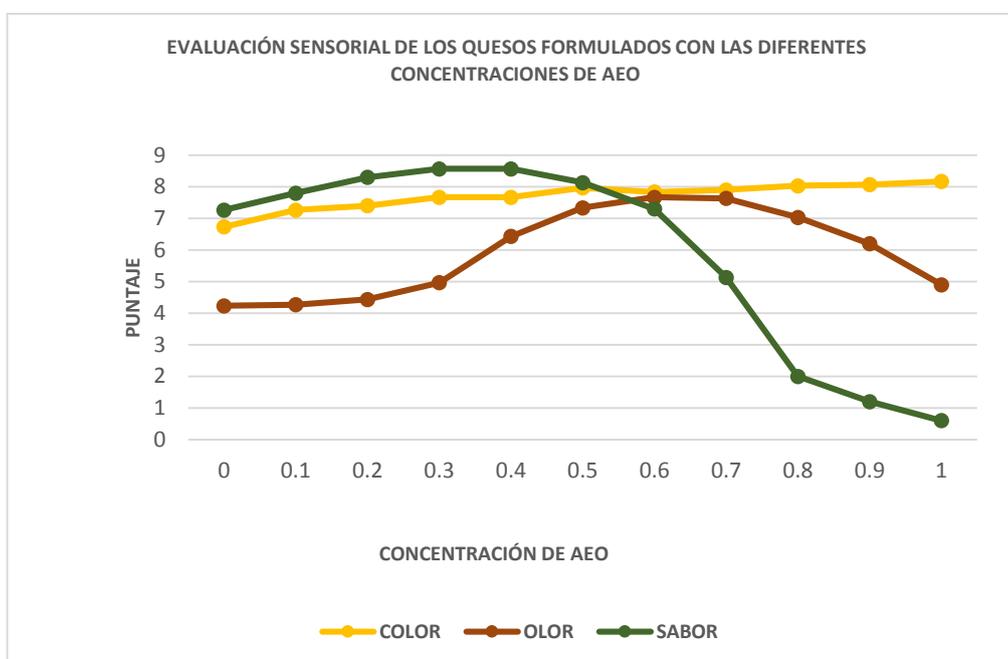


Figura 3. Representación gráfica de la variación del color, olor y sabor de los quesos formulados con las diferentes concentraciones de AEO.

VI. DISCUSIÓN

La necesidad actual de descubrir nuevas tecnologías de control microbiano para los alimentos, ha estimulado la investigación sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales de plantas. Asensio (2013) demostró en su investigación que todos los AEO presentan actividad antimicrobiana, ya sea ésta bacteriostática o bactericida. El potencial antimicrobiano de estos aceites se debe principalmente a la acción individual o sinérgica de sus componentes sobre la integridad celular de los microorganismos, siendo esto de gran importancia para su aplicación como antimicrobiano en las tecnologías de elaboración y conservación de alimentos (Gómez & López, 2009). Asimismo Albado, Saez y Gabriel (2001) afirman que el AEO posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram-positivas como *S. aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gram-negativas. De la misma manera Solís (2012) demostró que el AEO presenta un efecto antibacteriano mínimo sobre *Salmonella spp.* En la investigación realizada se pudo corroborar lo expuesto por los autores antes mencionados, ya que se demostró que el AEO tiene efecto antimicrobiano frente a *L. monocytogenes*, bacteria causante de Listeriosis.

En estudios donde se evaluaron las diferentes concentraciones del AEO frente a 71 bacterias aisladas de leche, el aceite de orégano resultó más eficaz para *E. coli* con 0,35 % de concentración bactericida mínima (Bastos et al., 2011). En otra investigación Rodríguez y Salazar (2016) argumentan que los aceites esenciales encapsulados (nanopartículas) de orégano, timol y carvacrol presentaron una buena inhibición sobre las cepas de *S. aureus* y *L. innocua* a una concentración de 0,25 %. En la investigación donde evaluaron el efecto del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) contra bacterias gram-positivas, encontraron que fue activo sobre *L. monocytogenes* a una concentración mínima inhibitoria de 0,1024 % (Castaño, G, Zapata, & Jiménez, 2010). Por ende es necesario dejar claro que el efecto biocida de los aceites esenciales está estrechamente ligado al tipo de microorganismo y a la especie aromática probada, además de las condiciones de experimentación.

Los resultados de esta investigación se comparan con el trabajo realizado por Morales (2015), quien en su investigación probó concentraciones de aceite esencial de tomillo desde 0,005 % hasta 2,4 %; demostrando que el efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes*, se determinó a una concentración no menor de 1,6 %. Donde se pudo observar que el queso

Ricotta con aceite esencial presenta inhibición en el recuento de *Listeria*, pasando de 7,18 Log UFC/gramo a 4,95 Log UFC/gramo en 48 horas de evaluación, comportamiento que continuó durante 14 días de prueba, mostrando actividad biocida hasta alcanzar valores 3,70 Log UFC/gramo representando una disminución del 48,46 %. En esta investigación se probó concentraciones desde 0,2 % hasta 2,6 % para determinar la concentración mínima inhibitoria in vitro, demostrando que el efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* se determinó a una concentración de 0,8 % y al evaluarlo en queso fresco, se puede observar que hay un control satisfactorio en el incremento de los ciclos logarítmico durante 20 día, en un 4,55 Log UFC/gramo frente al 5,35 Log UFC/gramo del sorbato de potasio y 6,85 Log UFC/gramo del sin conservante en el día 20. Fundamentalmente la cantidad permitida de los conservantes, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación; mientras que los aceites esenciales usados como antimicrobianos son compuestos que pueden retardar el crecimiento microbiano o inactivarlo dependiendo de su concentración de adición, esto se debe a que atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas y síntesis de proteína, todos ellos son esenciales para el desarrollo celular; por lo que si uno es atacado o inactivado, la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada. Es posible que las condiciones tanto de crecimiento de la planta, la geografía y el clima; sean condiciones que pueden afectar las propiedades antimicrobianas, por ello es que se puede evidenciar las variaciones respecto a la capacidad mínima inhibitoria en diferentes investigaciones.

Si bien es cierto el AEO tiene poder inhibitorio, es importante calcular la cantidad correcta para no cambiar las características sensoriales del queso fresco que puedan darle sabores y/o olores que afecta su aceptación por el consumidor.

VII. CONCLUSIONES

La menor concentración inhibitoria in-vitro del AEO sobre *L. monocytogenes*, se determinó una concentración de 0,8 %. Este resultado puede ser atribuido a la composición química que presenta el aceite esencial utilizado.

La concentración de 0,8 % de AEO en los quesos frescos, influye en los ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*; ya que estos fueron menores en todos los días de evaluación con respecto a los ciclos logarítmicos de los quesos formulados con sorbato de potasio y más aun de los que fueron elaborados sin ningún conservante.

El AEO influye en el grado de aceptabilidad de las características sensoriales tanto del olor y sabor de los quesos frescos, debido a que los quesos formulados con concentraciones superiores a 0,6 % descienden su aceptabilidad.

VIII. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos sugieren una posible aplicación del AEO, para la prevención por contaminación de *L. monocytogenes* y el deterioro del queso fresco debido al crecimiento del microorganismo.

Sería conveniente continuar con otras investigaciones para poder formular quesos que contengan aceites esenciales que brinden aromas y además inhiban microorganismos patógenos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albado Plaus, E., Saez Flores, G., & Grabiél Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Scielo*, 12(1), 16-19. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3>
- Albado, E., Saez, G., & Gabriel, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Medica Herediana*, 12(1). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2001000100004&script=sci_arttext
- Asensio, C. M. (2013). *Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. Obtenido de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1692/Asensio%20-%20Utilizaci%C3%B3n%20de%20aceites%20esenciales%20de%20variedades%20de%20or%C3%A9gano%20como%20conservante....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bastos, M. E., Damé, L. F., Prestes, L. d., Almeida, D. B., Alves, M. R., & Braga, J. R. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300006
- Bernal, M., & Guzman, M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, 4(3 y 4), 112-121. Obtenido de [file:///C:/Users/Jhojan%20Omar/Downloads/1891-7206-1-SM%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Jhojan%20Omar/Downloads/1891-7206-1-SM%20(1).pdf)
- Buendía, M., González, V., Mendoza, A., Muñoz, J., & Reyes, C. (Sf). *Queso fresco*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TEMA3.QUESO_2832.pdf
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO Y METABOLITOS DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Minthostachys mollis* (MUÑA). *Scielo*, 25(3), 298-301. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n3/a08v25n3.pdf>
- Castaño, H. I., G. G. C., Zapata, J. E., & Jiménez, S. L. (Mayo de 2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Scielo*, 17(2). Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Chavarrías, M. (4 de Diciembre de 2014). *CAFETA INFORMA*. Recuperado el 22 de Diciembre de 2016, de

<http://blog.pucp.edu.pe/blog/cafetainforma/2014/12/12/carga-mundial-de-listeriosis-en-el-mundo/>

- CODEX ALIMENTARIUS. (2011). Leche y Productos Lácteos. Obtenido de Norma general del codex para el queso: <http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>
- Dirección Regional Agricultura Tacna. (Abril de 2016). *Producción y exportación de orégano de la región tacna*. Obtenido de http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/oregano/produccion_exportacion_oregano.pdf
- Duke, J. A. (2002). *Handbook of Medicinal Herbs* (2 ed.). USA: CRC Press. Obtenido de https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=B_XLBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=+Handbook+of+Medicinal+Herbs&ots=iMyNFZ_49D&sig=Y9qtxdfQE7ZsjRPIUEAuPRbdS-k#v=onepage&q=Handbook%20of%20Medicinal%20Herbs&f=false
- Espinoza, A., De la Torre, M., Salinas, M., & Sánchez, V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Scielo*, 21(2), 1-2. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342004000200003&script=sci_arttext&tlng=en#tab01
- Espinoza, A., De La Torre, M., Salinas, M., & Sánchez, V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 21(2). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342004000200003&script=sci_arttext
- García , C., Ortega, J. L., Martínez, A., & Castro, F. (Agosto de 2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2). Obtenido de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v9n2/garcia.htm>
- Gómez, A. I., & López, A. (2009). *Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*)*. Universidad de la América Puebla, San Andrés Cholula.
- Instituto de salud pública chile. (06 de Diciembre de 2017). *Sección Microbiológica Alimentos*. Obtenido de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/10/PRT-712.02-093%20V0%20Rto%20placa%20L.%20monocytogenes%20ISO%2011290-2%20V0.pdf
- Juliarena, P., & Gratton, R. (26 de Setiembre de 2016). *Conservación de alimentos*. Obtenido de <http://www.exa.unicen.edu.ar/catedras/tecnoambiente/CAP03.pdf>

- Kalemba, D., & Kunicka, A. (Mayo de 2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10). doi:<https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Kintzios, S. E. (2002). *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. (S. E. Kintzios, Ed.) Londres: Taylor y Francis. Obtenido de [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=8dOBz66SxwEC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Part+I+%E2%80%93+Introduction:+Profile+of+the+multifaceted+principle+of+the+herbs.+En:+Oregano:+The+genera+Origanum+and+Lippia.+Kintzios,+S.+E.+\(Eds.\).&ots=30heAfcRQj&sig=0VV-69LbEs](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=8dOBz66SxwEC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Part+I+%E2%80%93+Introduction:+Profile+of+the+multifaceted+principle+of+the+herbs.+En:+Oregano:+The+genera+Origanum+and+Lippia.+Kintzios,+S.+E.+(Eds.).&ots=30heAfcRQj&sig=0VV-69LbEs)
- Mercado, P., & Llenque, L. (2012). Efecto del cloruro de sodio, sales biliares y pH en la actividad antibacteriana de *Bifidobacterium animalis* sobre *Listeria monocytogenes*. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(22). Obtenido de <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/187>
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. (Enero de 2016). *Boletín Estadístico de Producción Agroindustrial Alimentaria*. Obtenido de http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/prod-agroindustrial/2016/boletin_estadistico_prod_agroindustrial_ene16.pdf
- MINISTERIO DE SALUD. (23-29 de Agosto de 2015). 24(34). Obtenido de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2015/34.pdf>
- Montoya, H. H. (2008). *Microbiología Básica para el área de la salud y afines* (2 ed.). (U. d. Antioquia, Ed.) Medellín. Obtenido de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=5RjS6B0X5RgC&oi=fnd&pg=PR17&dq=Microbiolog%C3%ADa+B%C3%A1sica+para+%C3%A1reas+de+salud+y+afines+montoya+2008&ots=0JirHfaM2d&sig=6fkMvTu3gW-fpp2uxZCada8mRpY#v=onepage&q=Microbiolog%C3%ADa%20B%C3%A1sica%20para%20C>
- Morales, A. F. (2015). *Efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo (Thymus vulgaris) sobre la contaminación de Listeria monocytogenes en queso ricotta*. tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/50994/1/1044503145.2015.pdf>
- Orberá, T. (Septiembre de 2004). Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Cubana de Salud Pública*, 30(3). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000300016
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Recuperado el 22 de Diciembre de 2016, de <http://www.who.int/foodsafety/es/>
- Quistián, H. (30 de Octubre de 2014). *Microbiología*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/halos-de-inhibicion.html>

- Ramos , M. (30 de Octubre de 2014). *Microbiología*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/halos-de-inhibicion.html>
- Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>
- Rodríguez, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170. Obtenido de http://www.uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-19articulosPDF/14-USO%20DE%20AGENTES%20ANTIMICROBIANOS%20%20NATURALES%20EN%20LA%20%20CONSERVACION_Elvia%20Rguez.pdf
- Rodríguez, S., & Salazar, I. J. (2016). *Efecto antimicrobiano de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Listeria innocua*. Colegio Indoamericano, S. C., Tlalnepantla de Baz. Obtenido de <http://vinculacion.dgire.unam.mx/Memoria-Congreso-2016/trabajos-ciencias-biologicas/biologia/7.pdf>
- Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C. (1991). Epidemiology of Human Listeriosis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEW*, 4(2), 169-183. Obtenido de <http://cmr.asm.org/content/4/2/169.full.pdf>
- Servicio Nacional de Aprendizaje. (sf). *SENA*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016, de http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES_ESENCIALES_EXTRAIDOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_Y_AROMATICAS.pdf
- Solís, P. N. (2012). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (origanum vulgare L.) y tomillo (Thymus vulgaris L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/1992#sthash.LpG5pBS3.dpuf>
- Universidad Nacional Abierta y a Distancia*. (s.f.). Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Defectos de los quesos: http://dateca.unad.edu.co/contenidos/301105/Archivos-2013-2/Modulo-linea/leccin_39_defectos_de_los_quesos.html
- Wikipedia*. (12 de Noviembre de 2016). Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Origanum vulgare: https://es.wikipedia.org/wiki/Origanum_vulgare
- Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O., & Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1). Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es

X. ANEXOS

10.1. Anexo 1: Figuras referidas a la investigación



Figura 4. Pesado de los medios de cultivo en una balanza con una precisión de $\pm 0,0001$



Figura 5. Calentamiento de los medios de cultivo en una cocina de plancha



Figura 6. Esterilización de los medios de cultivos en una autoclave



Figura 7. Utilización de una cabina de bioseguridad para evitar la contaminación de los medios de cultivos



Figura 8. Incorporación del aceite esencial de orégano en los medios de cultivos



Figura 9. Pasteurización de la leche fresca de vaca a 60 °C por 30 minutos



Figura 10. Cortado en cubos de 2 cm



Figura 11. Desuerado con mallas para el filtrado



Figura 12. Quesos con aceite esencial de orégano, con sorbato de potasio y sin conservante

10.2.Anexo 2: Panelistas realizando evaluación sensorial de los quesos

