



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) EN EMBUTIDOS ARTESANALES DE PORCINO FRENTE A *Escherichia coli*.

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR: PAMELA MILENA CONDOY SUAREZ
CINTHYA ESTEFANIA VIVEROS TUL**

TUTOR: KENNY JESÚS LUGO AVILA

Quito -Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Pamela Milena Condoy Suarez con documento de identificación N° 1722300306 y Cinthya Estefania Viveros Tul con documento de identificación N°1751008630 manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 08 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Pamela Milena Condoy Suarez
1722300306



Cinthya Estefania Viveros Tul
1751008630

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Pamela Milena Condoy Suarez con documento de identificación No. 1722300306 y Cinthya Estefania Viveros con documento de identificación No. 1751008630 expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) en embutidos artesanales de porcino frente a *Escherichia coli.*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 08 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Pamela Milena Condoy Suarez
1722300306



Cinthya Estefania Viveros Tul
1751008630

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ing. Kenny Jesús Lugo Avila, MSc. con documento de identificación N° 1757287543, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*) EN EMBUTIDOS ARTESANALES DE PORCINO FRENTE A *ESCHERICHIA COLI.*, realizado por Pamela Milena Condoy Suarez con documento de identificación N° 1722300306 y por Cinthya Estefania Viveros Tul con documento de identificación N° 1751008630, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 08 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Kenny Jesús Lugo Avila, MSc.
1757287543

Dedicatoria

Este proyecto va dedicado a la familia, especialmente a mis padres Darwin Condo y Rocío Suarez por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su ilimitado apoyo perfectamente incesante a través de todo este tiempo que me encuentro cursando.

A mis abuelitos, Elsa Loaiza & José Condo por ser el pilar fundamental en mi vida, sabiduría y superación ante las severidades de la vida.

Pamela Condo

A Dios, por guiar mi camino y permitirme culminar con éxito este trabajo de titulación, por las virtudes que me ha dado y gracias por la linda familia que me dio.

A mi mamá, Sonia Tul por los esfuerzos que ha realizado en toda mi vida, por ser la mejor mamá del mundo, por inculcarme valores, por siempre estar conmigo en todos los momentos, por su amor incondicional de madre, por cuidarme y amarme todos los días.

A mis padres Víctor Tul y Magdalena Acosta por cuidarme y velar por mí en cada paso que doy, por guiarme por el camino del bien, por apoyarme en toda mi vida estudiantil y por amarme como una hija.

A mi tío, Rubén Tul por ser como un padre para mí, por guiar mi camino, por enseñarme a ser fuerte sin importar nada, por quererme tanto y estar conmigo.

A mis amigos Fabricio, Lisseth, Dennis y Adán por el apoyo incondicional que me han dado, por incentivarme en cada momento a salir adelante, por el ánimo y apoyo que me dan siempre.

Estefanía Viveros

Agradecimiento

En primer lugar, agradecemos a Dios, por fortalecernos y guiarnos en el camino espiritual para alcanzar el éxito.

A nuestro tutor, Ing. Kenny Jesús Lugo Avila, MSc. ofrecernos la congruencia de aprendizaje, y conocimiento en la fabricación de embutidos artesanales, sin su experiencia no hubiera sido posible la realización del proyecto.

Nos complace expresar gratitud a todas aquellas personas que estuvieron presentes en lo largo de esta meta, de este sueño que es sumamente importante para nosotras, recompensando toda su ayuda, sus palabras motivadoras, consejos y dedicación.

Resumen

El principal objetivo de las industrias cárnicas es extender la vida útil de los alimentos, el uso de nitratos como conservantes está limitado, se busca una alternativa para conservar derivados cárnicos. El proyecto se enfocó en conservar embutidos mediante el uso de aceite esencial de orégano (AEO). El objetivo es evaluar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) en embutidos artesanales de cerdo contra la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*), para lo cual, se extrajo el aceite esencial de orégano mediante un destilador semiindustrial, y se analizó el aceite utilizando un cromatógrafo GC-MS Bruker la muestra paso por una columna BR-5 ms de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor de película y una temperatura 260 °C. El gas transportador fue helio. Para la preparación del inóculo la cepa *E. coli* (ATCC 25922) que previamente estaba conservada en Cryobank fue sembrada en placas petri con agar nutritivo mediante la técnica de estriado. Para la concentración mínima inhibitoria del aceite se utilizó una cepa de *E. coli* ATCC 25922, mediante la técnica de difusión y se colocó discos impregnados con concentraciones de 5% hasta 30% del AEO. Se elaboraron embutidos de cerdo con tres tratamientos: AEO al 5%, sal nital y control. El recuento de la cepa *E. coli*, en los embutidos se evaluó mediante placas petrifilm. Se analizaron las características organolépticas durante un período de 15 días. Los resultados mostraron la presencia de compuestos químicos como el timol y carvacrol en el AEO. Se observó que el aceite tenía una capacidad antimicrobiana en concentraciones superiores al 5%. En los embutidos formulados con una concentración del 5% de AEO según la escala de Mac Farland 0,5 hubo una reducción en el crecimiento de *E. Coli*. No existe diferencias significativas con el tratamiento AEO y sal nital. Esto significa que el orégano puede ser empleado como conservante y agente antimicrobiano en embutidos. Sin embargo, la duración con estos tratamientos fue de una semana, debido a que se detectaron modificaciones en las propiedades sensoriales a medida que transcurría el tiempo.

Palabras claves: *Origanum vulgare*, aceite esencial del orégano, *E. coli*, embutidos, conservante.

Abstract

The main objective of the meat industries is to extend the shelf life of foods, the use of nitrates as preservatives is limited, and an alternative is sought to preserve meat derivatives. The project focused on preserving sausages by using *oregano essential oil* (OEO). The objective is to evaluate the antimicrobial capacity of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) in artisanal pork sausages against *Escherichia coli* (*E.coli*) bacteria. For this purpose, oregano essential oil was extracted using a semi-industrial distiller, and the oil was analysed using a Bruker GC-MS chromatograph. The sample passed through a BR-5 ms column of 30 m length x 0,25 mm internal diameter, 0,25 µm film thickness and a temperature of 260 °C. The carrier gas was helium. For inoculum preparation the *E. coli* strain (ATCC 25922) previously preserved in Cryobank was seeded on nutrient agar petri dishes using the streaking technique. For the minimum inhibitory concentration of the oil, a strain of *E. coli* ATCC 25922 was used, using the diffusion technique and discs impregnated with concentrations of 5% to 30% of the AEO. Pork sausages were produced with three treatments: 5% AEO, nitral salt and control. The *E. coli* strain count in the sausages was evaluated using petrifilm plates. Organoleptic characteristics were analysed over a period of 15 days.

Key words: *Origanum vulgare*, oregano essential oil, *E. coli*, sausages, preservative.

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica.....	4
2.1	Embutidos porcinos.....	4
2.1.1	Embutidos crudos.....	4
2.1.2	Embutidos cocidos.....	4
2.1.3	Embutidos ahumados.....	5
2.1.4	Embutidos curados.....	5
2.2	Normativa INEN 1338.....	5
2.3	Conservantes.....	6
2.3.1	Conservantes químicos.....	6
2.3.2	Conservantes naturales.....	7
2.4	Aceites esenciales.....	8
2.4.1	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales.....	8
2.4.2	Clasificación de los aceites esenciales.....	9
2.4.3	Aceites esenciales como conservante de alimentos.....	9
2.5	Orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	10
2.5.1	Taxonomía del orégano.....	11
2.5.2	Composición química del orégano.....	12
2.5.3	Beneficios del orégano.....	12
2.5.4	Producción del orégano en el Ecuador.....	13

2.5.5	Efecto antimicrobiano del orégano	14
2.6	Cromatógrafo de gases	14
2.7	Microorganismos gram negativo.....	15
2.8	<i>Escherichia. Coli</i>	16
3	Materiales y métodos.....	18
3.1	Extracción del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) mediante el método de destilación por arrastre de vapor.	18
3.2	Propiedades físicas del aceite esencial de orégano (<i>Origanum Vulgare L.</i>)	19
3.2.1	Densidad.....	19
3.2.2	Rendimiento	20
3.3	Análisis cromatógrafo del aceite esencial de orégano.....	20
3.4	Preparación del inóculo de <i>E. coli</i>	21
3.4.1	Activación CryoBank	21
3.4.2	Estandarización del inóculo	21
3.5	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por macrodilución en caldo.	22
3.5.1	Preparación del aceite esencial del orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	22
3.5.2	Método de macro dilución en caldo.....	23
3.6	Evaluación actividad antimicrobiana por el método de difusión por disco	24
3.7	Elaboración del embutido artesanal porcino	25
3.7.2	Materia prima.....	25
3.7.3	Troceado y molido	26
3.7.4	Cutterizar.....	26
3.7.5	Embutido.....	27

3.8	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	27
3.9	Características organolépticas del embutido	29
3.10	Análisis estadístico	29
4	Resultados y discusión.....	31
4.1	Extracción del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) mediante el método de destilación por arrastre de vapor.	31
4.2	Composición química del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	32
4.3	Concentración mínima inhibitoria.....	33
4.4	Método de difusión por discos	34
4.5	Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Orégano en el embutido (<i>Origanum vulgare L.</i>)	35
4.6	Análisis estadísticos	38
4.7	Características organolépticas del embutido	39
5	Conclusiones.....	42
6	Recomendaciones	44
7	Bibliografía.....	45
8	Anexos	58

Índice de figuras

Figura 1 Método de destilación por arrastre de vapor en destilador semi industrial.	19
Figura 2 Análisis del aceite esencial de orégano por GC-MS	21
Figura 3 Método de McFarland	22
Figura 4 Método de macro dilución.....	24
Figura 5 Método de difusión en discos	25
Figura 6 Molido de la carne	26
Figura 7 Preparación del embutido	27
Figura 8 Método Oficial AOAC 2003.07	28
Figura 9 Resultados del método por difusión en discos.....	35

Índice de tablas

Tabla 1 Tratamientos	30
Tabla 2 Variables asociadas a la obtención del aceite esencial de orégano.....	31
Tabla 3 Compuestos químicos del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	32
Tabla 4 Diámetro en milímetros (mm) de lo halos de inhibición alcanzados por el aceite esencial de orégano.....	34
Tabla 5 Porcentaje de inhibición y total de UFC/mL en los tratamientos	36
Tabla 6 Tabla requerimiento microbiológicos para obtención de embutidos crudos	38
Tabla 7 Análisis estadístico de los tratamientos 264 horas.....	38
Tabla 8 Propiedades organolépticas con el conservante natural (AEO).....	40

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Densidad.....	19
Ecuación 2 Rendimiento	20
Ecuación 3 UFC/mL	29
Ecuación 4 Tukey.....	30
Ecuación 5 Obtención de UFC/mL.....	36

Índice de anexos

Anexo 1 Certificado de materiales de laboratorios58

1 Introducción

La expansión de las ciudades y crecimiento poblacional en el Ecuador ha provocado un mayor consumo de alimentos, entre ellos los derivados de carne (Novoa, 2019), por esta razón, el principal interés en las industrias cárnicas es preservar la calidad de los alimentos con el uso de conservantes químicos y naturales, evitando así la proliferación de los microorganismos, por lo que se han implementado diversas técnicas y enfoques para prolongar la duración del producto, los cuales desempeñan un papel crucial en la alimentación humana. (Ramos, 2019).

Dado que los embutidos son productos derivados de la carne, son susceptibles a la contaminación por diferentes microorganismos, como el *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica*, por la disponibilidad de diversos nutrientes que favorecen su proliferación, causando así enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Ramos, 2019). Por consiguiente, el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN 1338:2012) detalla los estándares microbiológicos aplicados a los productos cárnicos y también la aceptación o rechazo del producto, tomando en cuenta los parámetros establecidos en cada norma, evitando así contaminación de microorganismos en los alimentos (INEN, 2012).

Las sales nitrales son ampliamente empleadas como conservantes químicos en la producción de embutidos, desempeñando un papel crucial en la conservación del color rojo apetecible de la carne al retrasar la oxidación de los ácidos grasos, reduciendo el sabor rancio, conservando una textura adecuada y disminuyendo totalmente la proliferación de microorganismos. Sin embargo, se encuentra restringido debido a los graves problemas que pueden ocasionar en el cuerpo, incluyendo la aparición de varios

tipos de cáncer, siendo el cáncer colorrectal, el más relevante; así como trastornos en la metahemoglobinemia en niños menores de 5 años (Discovery, 2015).

Cardona & Mejía (2019) aluden que la mayoría de los consumidores buscan implementar productos naturales a sus preparaciones con el fin de disminuir parcial o totalmente el uso de sal curada y sustituirlo por aceites esenciales (AE), generando menor riesgo a la salud, ofreciendo al consumidor un producto menos artificial y aportando una gran capacidad bacteriostática por sus principios activos.

Según Mera (2020), los aceites esenciales tienen compuestos fenólicos como el carvacrol, timol y eugenol. En consecuencia, es importante señalar que el uso de estos aceites esenciales contribuye a prolongar y mejorar la duración de vida de diversos productos elaborados mediante diferentes tecnologías alimentarias. Esta tecnología suele causar que los alimentos se oxiden, por lo que la incorporación de aceites esenciales en los procesos de conservación tiene como objetivo resguardar el sabor característico de los alimentos y prevenir pérdida de nutrientes.

En la investigación de Irianda & Benedito (2017) demuestran que los AE aromáticos, así como la pimienta (*Piper nigrum*), tomillo (*Thymus*), ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare L.*), etc. poseen propiedades antioxidantes. Una de estas plantas es el Orégano (*Origanum vulgare L.*), originaria de la región mediterránea, que posee diversas propiedades antimicrobianas y antioxidantes gracias a que tiene compuestos fenólicos.

Una de las opciones más exploradas es el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*), especie que ha sido derivada en la flora ecuatoriana debido a su agradable sabor y aroma, lo que lo convierte en un ingrediente ampliamente utilizado en la gastronomía. Sin embargo, las investigaciones científicas han demostrado que este arbusto otorga múltiples beneficios para la salud gracias a su composición de sustancias bioactivas. Por añadidura de Tellez & Nolzco (2017), mencionan que el aceite esencial de orégano

alberga diversos grupos de actividad funcional como cetonas, aldehídos, éteres, alcoholes, monoterpenos, entre otros.

De acuerdo con Castillo (2016) el AE de orégano (*Origanum vulgare*) se caracteriza por tener una alta actividad antimicrobiana, Dentro del ámbito de la acción antibacteriana, es posible combatir tanto microbios Gram negativas, como *Salmonella* y *Escherichia coli*, como bacterias Gram positivas, incluyendo *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*. Siguiendo el planteamiento presentado por Castillo (2016), se considera que la aplicación del aceite esencial de orégano como aditivo en la elaboración de embutidos cárnicos podría representar una opción parcial a las ventas de nitratos, lo cual posibilitaría preservar el producto final mediante su efecto antimicrobiano.

El propósito de esta investigación como el orégano (*Origanum vulgare*) puede ser antimicrobiano en embutidos artesanales de cerdo, especialmente frente a la bacteria *Escherichia coli*; se extraerá el aceite esencial de orégano mediante el proceso de destilación, para posteriormente determinar la concentración óptima requerida para la conservación de los embutidos de cerdo. Asimismo, se llevará a cabo una evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano en contra del microorganismo *E. coli* en los embutidos artesanales, así como un análisis de las propiedades organolépticas del producto final.

2 Fundamentación teórica

2.1 Embutidos porcinos

La OMS (2015) considera como embutido a cualquier tipo de carne que ha pasado por procesos como ahumado, curado, cocido u otros métodos para realzar su aroma, sabor y textura, además de preservar su calidad como alimento.

Para Torres (2017) los embutidos constan de carne, vísceras, grasa y algunos subproductos, a los que se puede agregar sal, especias, conservantes y algunos aditivos. Esto conduce a la conversión a través del proceso de conservación para preservar los alimentos.

2.1.1 Embutidos crudos

Los embutidos crudos son aquellos que no han sufrido ningún tratamiento térmico en su elaboración por lo que se denominan “crudos”. Estos embutidos se elaboran a base de tocino y carne cruda, nitratos o nitritos, sal, especias, aditivos y condimentos (Torres, 2017). En el mercado se pueden encontrar en productos como: longaniza, salami, chorizo y salchichón.

2.1.2 Embutidos cocidos

Este tipo de embutidos se elabora utilizando carne de cerdo, así como sangre, corteza, vísceras y grasa. Este compuesto esencial es sometido a un proceso de tratamiento térmico antes de ser sazonadas, trituradas y rellenas de acuerdo con lo establecido por Ramos (2019). Los subproductos cárnicos cocidos son: pate de chanco, morcilla y queso de cerdo.

2.1.3 Embutidos ahumados

Son embutidos que pasan por un proceso de cocción antes de ser ahumados sobre leña que debe seleccionarse con sumo cuidado., donde está previsto este tipo de procedimiento ya que de eso dependerá el olor y sabor del embutido. Al realizar esta acción se debe de considerar las grandes cantidades de humo a causa de las altas temperaturas por lo que el personal debe tener precaución al realizar estos procedimientos (Gámez, 2021).

2.1.4 Embutidos curados

Los embutidos curados son aquellos que para su conservación se les añade sal de mesa además de nitratos y nitritos con el fin de proporcionar sabor al producto y reduciendo la carga bacteriana. Para lograr una curación óptima de los embutidos, es fundamental tener en cuenta los siguientes elementos: La temperatura, el tamaño de corte de la carne, como se emplea las sustancias cura, la cantidad de grasa y el procedimiento de la incorporación de los ingredientes de cura (Torres, 2017). Se los puede encontrar en diferentes presentaciones como: Jamón, cecina y tocino.

2.2 Normativa INEN 1338

La presente técnica ecuatoriana establece los estándares de calidad e identidad que deben ser cumplidos por los ingredientes empleados en la elaboración de alimentos que son necesarios para la salud humano. Es importante garantizar que no haya impurezas que puedan afectar la calidad del producto final. Los requisitos microbiológicos establecen límites máximos de microorganismos permitidos en los ingredientes, con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria. Además, se definen límites máximos y mínimos para ciertos componentes de los ingredientes, como proteínas, grasas, minerales y carbohidratos. Por último, se establecen criterios para el envasado y etiquetado de los

ingredientes, incluyendo información sobre el contenido neto, lote, origen y fecha de elaboración (INEN, 2012).

2.3 Conservantes

Los ingredientes esenciales son importantes para la conservación de los alimentos porque ayudan a mantener su calidad, color, textura, sabor y valor nutritivo. Este tipo de conservantes incluye una gama de métodos de conservación, que van desde prácticas caseras como la refrigeración hasta procesos industriales altamente controlados, como la congelación y la deshidratación, que permiten una conservación a largo plazo. Las preferencias actuales de los consumidores reflejan una demanda de alimentos que sean fáciles de preparar y que mantengan altos estándares de calidad microbiológica (Orozco & Coloma, 2017).

En términos generales, se establecen restricciones en la cantidad de aditivos que se pueden emplear en los alimentos. Por ejemplo, las sales nitrales alcanzan un límite máximo de 150 mg/L o mg/kg, los fosfatos poseen un límite máximo de 1100 mg/kg y los óxidos de hierro tienen un límite máximo de 1000 mg/kg. Es importante destacar que los conservantes no eliminan los microorganismos por completo, sino que simplemente previenen su crecimiento (Orozco & Coloma, 2017).

2.3.1 Conservantes químicos

Estos conservantes son químicos que ayudan a prevenir o evitar procesos de fermentación, acidificación u otros cambios en los alimentos. Además, pueden enmascarar ciertos cambios que pueden ocurrir en los alimentos. Según Reynoso (2022), un ejemplo de conservante utilizado en la industria cárnica son los nitritos, los cuales se presentan en forma de sales como el nitrito de sodio.

El uso de nitritos en la carne proporciona un color rojo estable, un sabor característico de carne curada, retrasa el enranciamiento, previene la oxidación de los lípidos, controla olores indeseables y actúa como inhibidor de bacterias anaeróbicas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia* y *Salmonella* (Reynoso, 2022).

2.3.2 Conservantes naturales

Si bien no es un concepto nuevo, el uso de conservantes naturales ha sido una técnica antigua. Los adobos a base de hierbas y especias utilizadas en recetas tradicionales son ejemplos de conservantes naturales, como el aceite de oliva virgen o el vino tinto. Investigaciones posteriores revelaron que estos conservantes naturales contenían compuestos fenólicos. Estos compuestos no solo tienen función antioxidante, sino que también presentan propiedades antibacterianas que impiden el crecimiento y desarrollo de bacterias patógenas (Pelayo, 2014).

El efecto antimicrobiano de los conservantes naturales está principalmente relacionado con la alteración de las membranas y paredes celulares. Debido a su naturaleza hidrofóbica, estos compuestos pueden penetrar fácilmente en las células bacterianas. Los cambios en la absorción de las estructuras pueden provocar la liberación de componentes celulares y afectar las propiedades funcionales de las células, lo que finalmente conduce a la inactivación y muerte de los microorganismos. Se ha observado que el efecto antibacteriano es más pronunciado en las bacterias grampositivas, ya que estas poseen una capa de peptidoglicano que permite una interacción directa con los compuestos. Por otro lado, las bacterias gramnegativas presentan membranas externas con lipopolisacáridos, los cuales actúan como una barrera contra las moléculas hidrofóbicas, dificultando su paso y aumentando su resistencia (Cofre, 2022).

2.4 Aceites esenciales

Las sustancias lipofílicas están compuestas principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, como alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, ésteres y éteres, en diferentes proporciones. A pesar de haber sido empleados en la industria cosmética para la elaboración de perfumes, recientemente han adquirido una gran relevancia en la industria alimentaria debido a su capacidad antibacteriana y la progresiva demanda de productos naturales (Araujo, 2016).

Los aceites esenciales tienen un efecto antibacteriano porque presentan compuestos fenólicos, como el carvacrol, eugenol y timol. Estos compuestos actúan sinérgicamente con otros componentes. Se ha investigado la capacidad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento de microorganismos en una variedad de alimentos, incluyendo frutas, verduras, pollo, carne molida y carne de res (Araujo, 2016).

2.4.1 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales

Cebrian (2020) alude que existen algunos métodos antibacterianos como: la despolarización de la membrana plasmática, cambios en polimorfismos lipídicos, interacciones con proteínas de membrana en bacterias gramnegativas, cambios en los procesos respiratorios, inhibición de la histidina descarboxilasa, ATP intracelular, agotamiento de toxinas microbianas. De todos, el más aceptado es que los aceites esenciales reaccionan con lípidos en las membranas celulares microbianas, la interacción de estos compuestos con la membrana de las células microbianas provoca la fuga de iones y contenidos citoplasmáticos, con ello la degradación bacteriana favoreciendo el aumento de la permeabilidad lo que permite que los iones migren desde el citoplasma celular, hasta el exterior de la célula, provocando la muerte de la célula.

2.4.2 Clasificación de los aceites esenciales

Existen diversos tipos de aceites esenciales, que se clasifican en natural, artificiales y sintéticos. Los aceites naturales se obtienen directamente de las plantas y no soportan alteraciones físicas o químicas posteriores. Sin embargo, la producción es costosa debido a los bajos rendimientos. Los aceites esenciales artificiales son aquellos en los que se enriquece la esencia con uno o más ingredientes adicionales mediante un proceso específico. Por otro lado, los aceites esenciales sintéticos se fabrican combinando sus componentes mediante procesos de síntesis química. Debido a que son económicos, se usan más como fragancias y agentes saborizantes (Ramos, 2019).

Los aceites esenciales poseen múltiples aplicaciones en diversas industrias tales como: las farmacéuticas donde diversos grupos de investigación se encargan de llevar a cabo estudios *in vivo* e *in vitro* de la actividad antibacteriana, antifúngica, citotóxica y antioxidante, entre otras; industria alimentaria donde los aceites esenciales se usan para dar sabor a carnes cocidas, salchichas, sopas, helados, quesos y más.

Los aceites esenciales más comúnmente utilizados en esta industria abarcan variedades como el cilantro, la naranja y la menta, su aplicación se extiende a la producción de bebidas alcohólicas y no alcohólicas. Para este propósito, se emplean extractos de naranja, limón, menta e hinojo, entre otros; en la producción de dulces, pralinés y nuevos productos de confitería. Además, la industria cosmética utiliza aceites en la fabricación de cosméticos, jabones, perfumes y colonias. Destacan el aceite de geranio, lavanda, rosa y pachulí, entre otros (Ramos, 2019).

2.4.3 Aceites esenciales como conservante de alimentos

Los beneficios antimicrobianos y antioxidantes de los aceites esenciales los convierten en una opción idónea como fuente de alimento seguro. Estos compuestos, que están

presentes en diferentes partes de las plantas son utilizados en la medicina tradicional desde hace siglos para tratar diversas enfermedades. En la actualidad, se están realizando investigaciones sobre su potencial como alternativa a los conservantes químicos convencionales en la industria alimentaria (Ceballos & Londoño, 2017).

Los estudios realizados por Ceballos & Londoño (2017) han demostrado que los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas efectivas contra una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y mohos. Asimismo, se ha comprobado que estos aceites presentan actividad antioxidante, lo que contribuye a prevenir la oxidación de lípidos y proteínas en los alimentos. La oxidación puede provocar cambios en el sabor, el aroma y la calidad nutricional de los alimentos, lo que a su vez puede reducir su tiempo de conservación.

2.5 Orégano (*Origanum vulgare L.*)

Se trata de una planta perteneciente a la familia Lamiaceae que caracteriza el aroma y procede de la zona mediterránea. Es conocida por ser una especie y planta medicinal. De acuerdo con las investigaciones de Giannenas & Bonos (2018), esta planta alberga una variedad de compuestos bioactivos, tales como carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno, los cuales le confieren propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales y antifúngicas.

Diversas investigaciones han corroborado la capacidad para combatir bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* (Hyldgaard, 2012). Según Zhang et al (2015) indica que el orégano tiene propiedades antioxidantes que ayudan a prevenir la oxidación de los lípidos en los alimentos, contribuyendo así a su conservación. Además de su aplicación en la industria alimentaria, el orégano también ha sido objeto de estudio por posibles favores para la salud humana. El consumo de comida puede reducir

la inflamación y el estrés oxidativo en el cuerpo, lo que puede prevenir enfermedades crónicas como cardiovasculares y el cáncer.

2.5.1 Taxonomía del orégano

El orégano es una planta llamada *Origanum vulgare L.*, que pertenece al género *Origanum* de la familia *Lamiaceae*. De acuerdo con Fellenberg & Pérez (2020), este género se originó en la región mediterránea y engloba aproximadamente 40 especies diferentes. En particular, destaca por ser ampliamente utilizada tanto en la industria alimentaria como en la medicina tradicional.

La taxonomía completa del orégano de conformidad con la base de datos de plantas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum*

Especie: *Origanum vulgare L.*

Según González-Trujano et al. (2017), existen varias subespecies y variedades de *Origanum vulgare*, entre ellas *Origanum vulgare subsp. hirtum*, también conocido como orégano griego, y *Origanum vulgare subsp. vulgare*, conocido como orégano español o silvestre. Sin embargo, la clasificación exacta del género *Origanum* y sus especies ha sido

objeto de varias revisiones taxonómicas en el pasado y aún se debate en algunos casos (Fellenberg & Pérez, 2020).

2.5.2 Composición química del orégano

Es una planta olorosa ampliamente utilizada en la medicina tradicional y en la gastronomía debido a su contenido de compuestos bioactivos. La composición química del orégano puede variar debido a factores como la variedad de arbusto, clima, suelo y el momento de la cosecha (González & Trujano, 2017).

Tiene una gran cantidad de componentes volátiles que se encuentran en las glándulas secretoras de las hojas y las flores. Se localiza el carvacrol, el timol, el p-cimeno, el γ -terpineno y el β -felandreno (Alvarez & Rivera, 2020).

Además de los aceites esenciales, el orégano es una fuente rica en compuestos fenólicos, como el ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido clorogénico y flavonoides. Estos componentes exhiben propiedades que incluyen la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana. Por otra parte, el orégano también contiene una amplia variedad de terpenos, como el β -cariofileno, α -pineno, β -pineno, limoneno y terpineno, los cuales exhiben propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y analgésicas. Además, el orégano es una fuente de ácidos grasos, como el ácido oleico y ácido linoleico, que ofrecen beneficios para la salud (González & Trujano, 2017).

2.5.3 Beneficios del orégano

El orégano es una planta herbácea ampliamente que se usa en la medicina tradicional como en la cocina. Según la investigación científica, se le atribuyen diversos beneficios que se detallan a continuación:

- Propiedades antioxidantes: el orégano contiene compuestos antioxidantes, como el ácido rosmarínico y el carvacrol, que han demostrado reducir el estrés oxidativo en el cuerpo y una defensa contra el daño celular ocasionado por los radicales libres (Silva, 2018).
- Propiedades antimicrobianas: el orégano contiene compuestos como el timol y carvacrol, los cuales exhiben actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus, contribuyendo a combatir infecciones y promover la salud (Pandía & Solari, 2021).
- Propiedades antiinflamatorias: el ácido rosmarínico presente en el orégano posee propiedades antiinflamatorias, mostrando efectos beneficiosos al reducir la inflamación en distintas partes del organismo (Monroy & Arrieta, 2022). Asimismo, los compuestos como el carvacrol y el timol pueden aliviar los síntomas de infecciones respiratorias, mostrando propiedades antitusivas y expectorantes.

2.5.4 Producción del orégano en el Ecuador

De acuerdo con Moreno (2018), en Ecuador, la producción de orégano se concentra principalmente en las provincias de Cotopaxi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua, situadas en la región andina del país. Estas áreas cuentan con condiciones climáticas y características de suelo favorables para el cultivo de esta planta. La producción de orégano en Ecuador se lleva a cabo principalmente en pequeñas fincas y se ha caracterizado históricamente por ser un cultivo tradicional y de subsistencia. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un incremento en la demanda internacional de orégano, lo cual ha impulsado una mayor profesionalización en el sector y un aumento en la productividad (Sanchez & Pérez, 2020).

En Ecuador, se cultivan principalmente dos variedades de orégano: el *Origanum vulgare* y el *Lippia graveolens*. El *Origanum vulgare* es la variedad más común y se utiliza en la producción de aceites esenciales y condimentos, mientras que el *Lippia graveolens* se utiliza principalmente en la producción de té (Moreno, 2018).

El cultivo de orégano no requiere de grandes cantidades de fertilizantes ni pesticidas, lo que lo convierte en una opción más sostenible y respetuosa con el medio ambiente (Sanchez & Pérez, 2020).

2.5.5 Efecto antimicrobiano del orégano

El aceite esencial de orégano es uno de los ingredientes más conocidos por su capacidad para combatir bacterias. Según Rota (2008), este aceite esencial puede ayudar a inhibir una amplia gama de microorganismos, incluidos virus, hongos y bacterias gram-negativas y gram-positivas. Los ingredientes del orégano, otros del aceite esencial, también han sido objeto de investigación en relación con sus propiedades antimicrobianas. Para Stevi & Stankovi (2014), el timol y carvacol son los dos principales compuestos activos, responsables de la actividad antibacteriana del orégano.

Los resultados de investigaciones científicas han evidenciado que el orégano posee propiedades inhibitorias del crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (Fuentes, 2019). Además, se ha observado que el orégano puede desempeñar un papel preventivo en la proliferación de microorganismos en alimentos. Por ejemplo, de acuerdo con Montoya & Rodríguez (2022), la inclusión de conservante en la carne de pollo cruda puede ser eficaz para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos durante su almacenamiento.

2.6 Cromatógrafo de gases

La técnica de separación de gases se basa en la diferencia distribución entre una fase móvil gaseosa y fase estacionaria inmobilizada. Este proceso se lleva a cabo mediante un sistema bifásico, en el cual la fase estacionaria retiene los compuestos a ser separados, mientras que la fase móvil los desplaza a través de la fase estacionaria (Zamora, 2017).

2.7 Microorganismos gram negativo

Las bacterias Gram negativas se definen por tener una estructura de pared celular que consiste en una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos y proteínas (Boucher et al., 2009). Los microorganismos Gram negativos son un grupo diverso de bacterias que incluyen patógenos humanos importantes como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Boucher et al., 2009).

Una de las características distintivas es la existencia de una capa externa membranosa, soporta resistencia a muchos antimicrobianos y las defensas del huésped. Esta membrana externa también les permite resistir condiciones ambientales extremas, como la exposición a detergentes y ácidos (Cruz, 2015). Además, los microorganismos Gram negativos pueden ser difíciles de tratar debido a la presencia de bombas de eflujo que les permiten eliminar los antimicrobianos del citoplasma y reducir su concentración intracelular.

El aumento de la capacidad de defensa a los agentes antibacterianos en los microorganismos Gram negativos es una preocupación global y ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos, como la terapia combinada de antimicrobianos y la identificación de nuevas dianas terapéuticas (Boucher, 2009). En la presencia de bacterias Gram negativas en los alimentos, incluidos los embutidos, son indicadores de contaminantes y una gran posibilidad de fuente de enfermedades transmitidas por alimentos (OPS, 2017).

Por lo cual, es importante establecer requisitos microbiológicos para estas bacterias en los alimentos para obtener una mejor garantía en la seguridad alimentaria y su calidad.

La Comisión del Codex Alimentarius ha establecido valores altos permitidos hacia la presencia de algunas bacterias Gram negativas en los alimentos. Por ejemplo, el límite máximo para la disposición de *E. coli*, en embutidos crudos es de 1000 unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL) (Codex Alimentarius, 2021). Además, en cuanto a la industria alimentaria, los fabricantes de embutidos también establecieron sus propios requisitos microbiológicos internos para garantizar la seguridad de sus productos. En una investigación realizada en España encontró que los fabricantes de embutidos establecieron límites para la presencia de *E. coli* en sus productos que eran los límites establecidos por la legislación española que los estipulados por la Comisión del Codex Alimentarius (Díaz & Acosta, 2018). Es un factor importante para considerar calidad y seguridad de los embutidos, se deben cumplir con los límites que se establezcan por las autoridades sanitarias para afianzar la seguridad del producto.

2.8 *Escherichia. Coli*

Escherichia coli es un microorganismo que se localiza habitualmente en el intestino de animales y humanos. Es una bacteria extremadamente adaptable que mantiene la capacidad de realizar una extensa gama de funciones metabólicas, que abarcan desde la síntesis de vitaminas hasta la fermentación de carbohidratos (Schaumburg, 2023). No obstante, ciertas cepas de *E. coli* son nocivas y tienen la capacidad de ocasionar una diversidad de enfermedades, desde diarrea hasta infecciones graves del tracto urinario y sepsis.

Una de las cepas de *Escherichia coli*, es O157:H7, la cual produce una toxina conocida como Shiga, puede ocasionar el síndrome urémico hemolítico (SUH), una complicación

con potencial mortal. Además, *E. coli* es un patógeno transmitido por alimentos importante, que puede contaminar los alimentos durante la producción, el procesamiento y la preparación (Schaumburg, 2023).

3 Materiales y métodos

3.1 Extracción del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) mediante el método de destilación por arrastre de vapor.

A partir del enfoque expuesto por Servio (2018), se procedió a extraer el aceite esencial del orégano mediante el método de destilación por arrastre de vapor por medio de un destilador semi industrial de acero inoxidable, compuesto por tres canastas y una tapa hermética. Se realizó la extracción del aceite esencial utilizando 7 kg de materia vegetal se distribuyeron uniformemente en el destilador en una proporción de 1,5 L de agua destilada por cada kg de materia prima, permitiendo que el vapor de agua circulase adecuadamente alrededor del material vegetal. La temperatura del equipo se elevó a 92 °C para empezar el proceso de separación de la solución agua-aceite, a través del método de decantado se obtiene aceite puro Figura 1.

A continuación, se procedió a colocar el aceite esencial de orégano en un frasco de tonalidad ámbar con el fin de prevenir la degradación ocasionada por la luz. Para garantizar su conservación óptima, el aceite se debe almacenar a una temperatura de 4 °C. De acuerdo con Servio (2018), no es necesario moler la planta de orégano, ya que su tamaño era adecuado para el proceso de extracción.

Método de destilación por arrastre de vapor en destilador semi industrial



Figura 1 Método de destilación por arrastre de vapor en destilador semi industrial.

Elaborado por: (Las autoras, 2023)

3.2 Propiedades físicas del aceite esencial de orégano (*Origanum Vulgare L.*)

3.2.1 Densidad

Se empleó un picnómetro de 5 mL para medir la cantidad de aceite esencial de orégano, después, se llenó con aceite esencial extraído y se volvió a pesar. El parámetro se calculó mediante la ecuación basada en la diferencia de peso (Abalco, 2020).

$$\rho = \frac{(g \text{ picnómetro} + \text{muestra}) - (g \text{ picnómetro})}{(mL \text{ picnómetro})}$$

Ecuación 1 Densidad

3.2.2 Rendimiento

Se consideraron en cuenta el peso total de la materia prima destilada y la cantidad de aceite obtenido (Barreiro & Cabezas, 2017).

Para llegar al resultado se utilizó la siguiente ecuación:

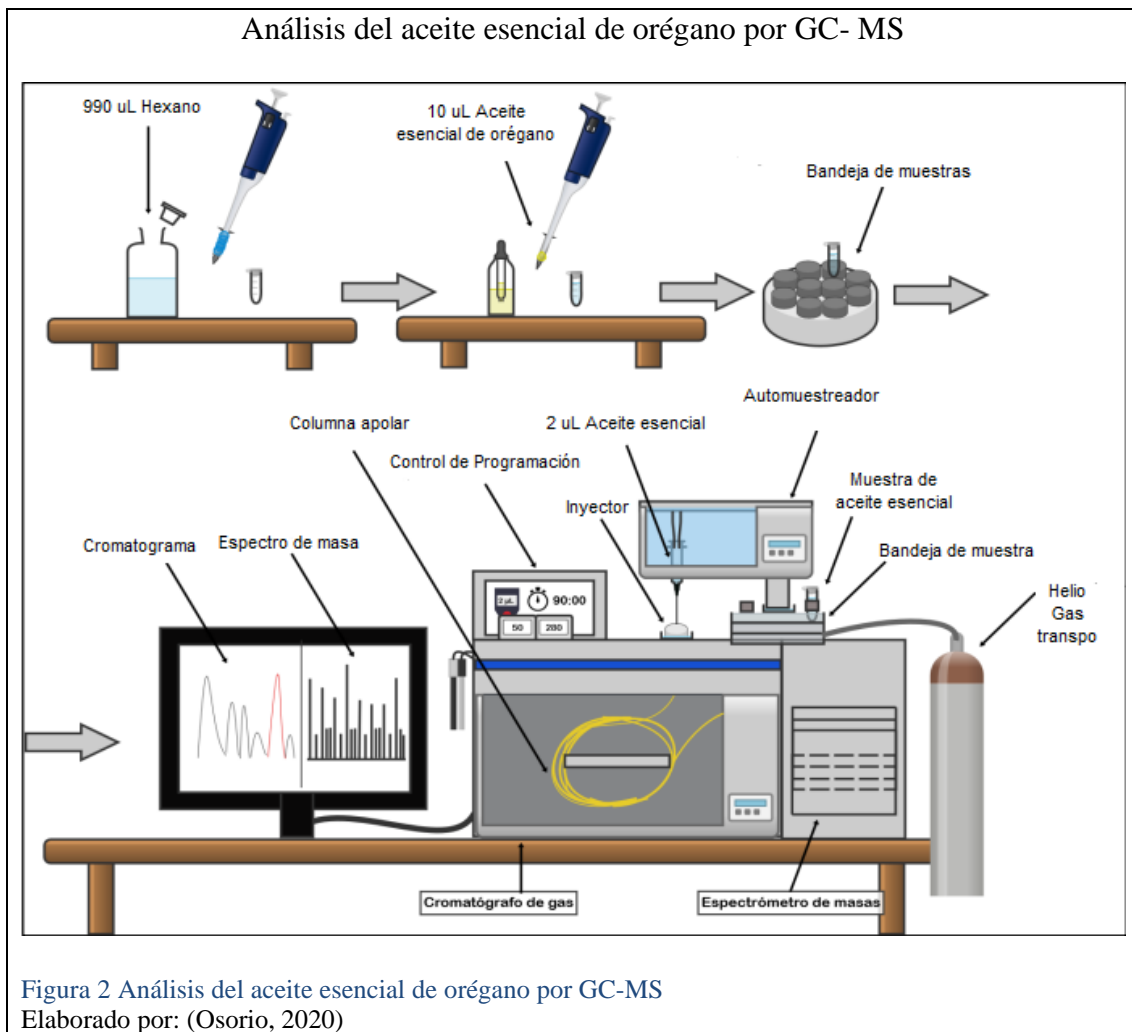
$$\%Rendimiento = \frac{Pi \text{ seco antes de la extracción} - Pf \text{ aceite esencial despues de la extracción}}{Pi \text{ seco antes de la extracción}} * 100$$

Ecuación 2 Rendimiento

3.3 Análisis cromatógrafo del aceite esencial de orégano

El aceite esencial de orégano fue evaluado mediante GC- MS de acuerdo con el método empleado por Scalvenzi et al., (2017). La muestra fue preparada mediante la dilución de 10 uL del AEO en 990 uL de hexano en un vial de 1,5 mL, la cantidad de inyección fue de 2 uL. La composición química del AE se determinó mediante un sistema GC- MS Bruker, cromatógrafo modelo 436 SCION[®] conectado a un detector de masas. Se utilizó una columna BR-5 ms de 30 m de longitud por 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 mm de espesor de película y una temperatura de 260 °C. El gas portador fue helio a una tasa de 1 mL/ min con un radio de split de 1,20 Figura 2.

La identificación de los componentes se obtuvo por comparación de los tiempos de retención obtenidos con librerías computarizada del equipo GC-MS. Las bases de “WILEY-NIST 2009 & Adams 2017” se utilizaron aplicando el criterio de puntuación superior a 90% para comparar las similitudes estructurales de los espectros de masas experimentales con los obtenidos. El software empleado en este análisis de compuestos fue MS-Workstation de Bruker con integración al NIST-MS-Search.



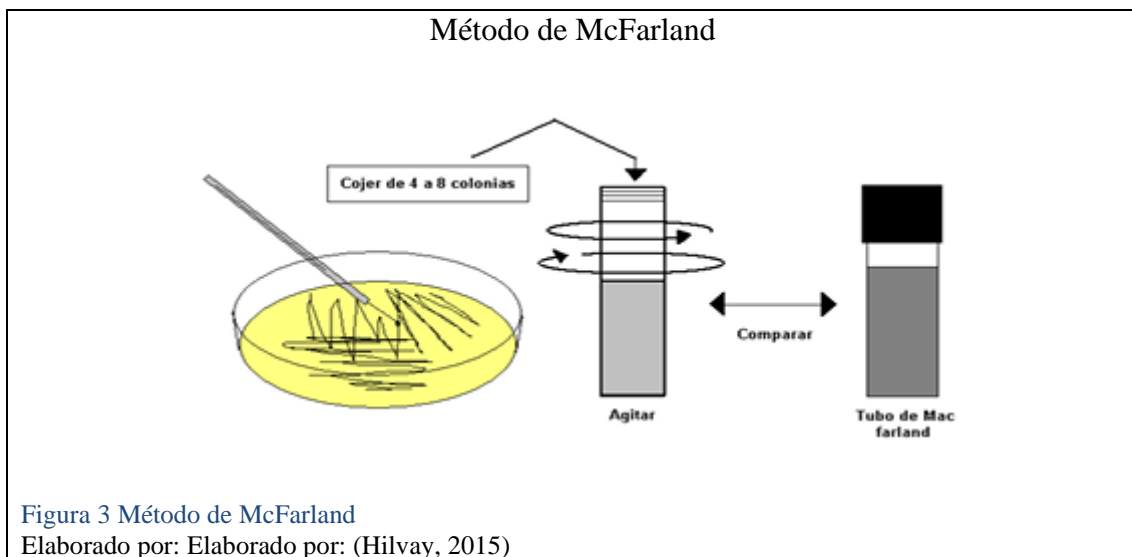
3.4 Preparación del inóculo de *E. coli*

3.4.1 Activación CryoBank

En este procedimiento se retiró el vial de CryoBank del congelador para remover la tapa que contiene el microorganismo *Escherichia coli* (ATCC 25922), se separó una perla del vial con un asa de aguja para la inoculación en un tubo que contenía el medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth), el vial de Cryobank se trasladó a congelación para su conservación y el tubo TSB con el inóculo se almaceno para su previo uso (Vega, 2015).

3.4.2 Estandarización del inóculo

La cepa *E. coli* (ATCC 25922) previamente preparadas en los tubos TSB fue sembrada en cajas petri con agar nutritivo con el método de estriado básico. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Se preparó una suspensión bacteriana en agua peptonada al 0,1% para ajustar el tubo a la escala Mac Farland al 0,5% ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) Figura 3. Esto se denominará inoculo según el método descrito por Valles & Huamán (2014).



3.5 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por macrodilución en caldo.

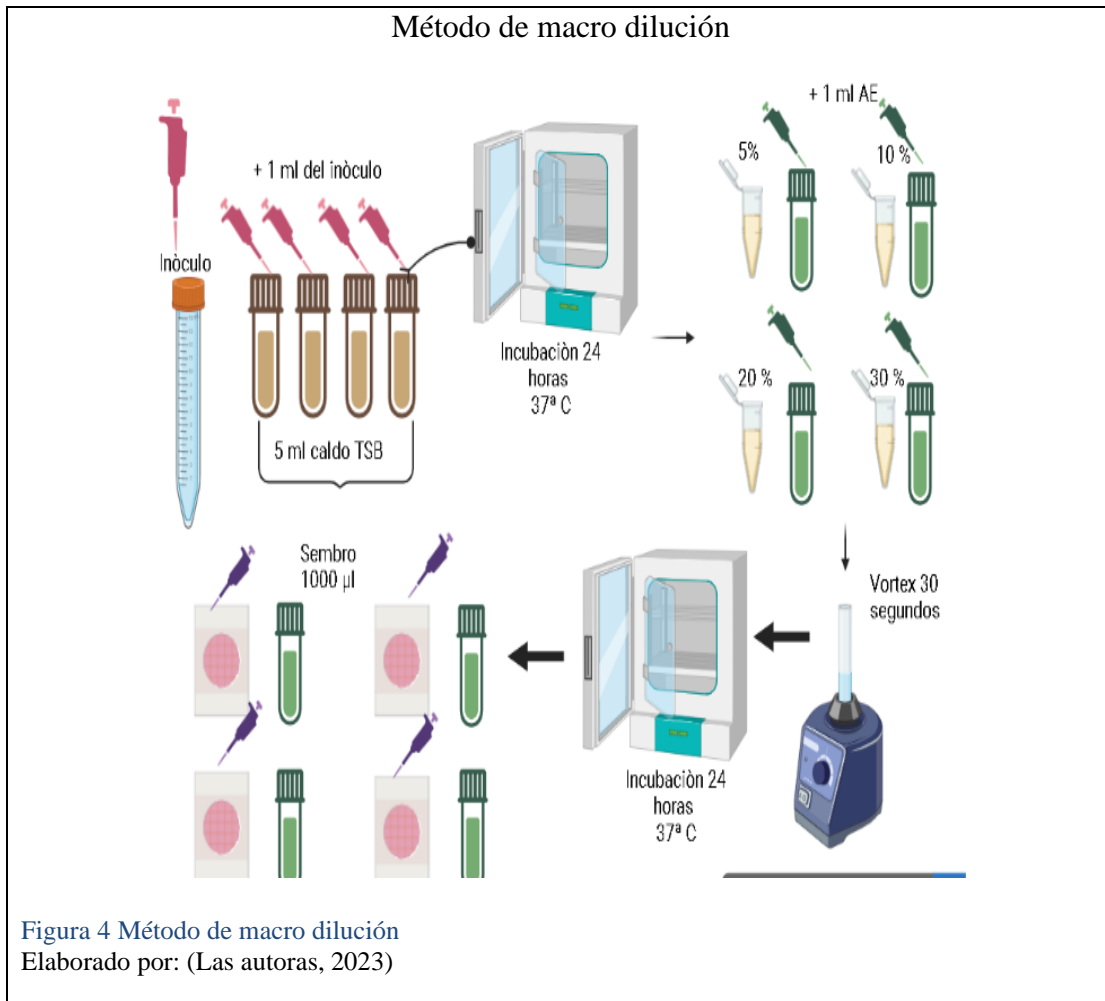
3.5.1 Preparación del aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare L.*)

Se realizaron diferentes concentraciones del aceite esencial, incluyendo 5%, 10%, 20% y 30%. Para alcanzar la concentración del 5%, se agregaron 50 μ L de aceite esencial (AE) a un tubo eppendorf que contenía 950 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido). Se diluyó 100 μ L de AE en 900 μ L de DMSO para la concentración del 1%. En la concentración del 20%, se mezclaron 200 μ L de AE con 800 μ L de DMSO. Finalmente, a la concentración 30%, se agregaron 300 μ L de aceite esencial a 700 μ L de DMSO, siguiendo el método descrito por Ortega (2018).

3.5.2 Método de macro dilución en caldo.

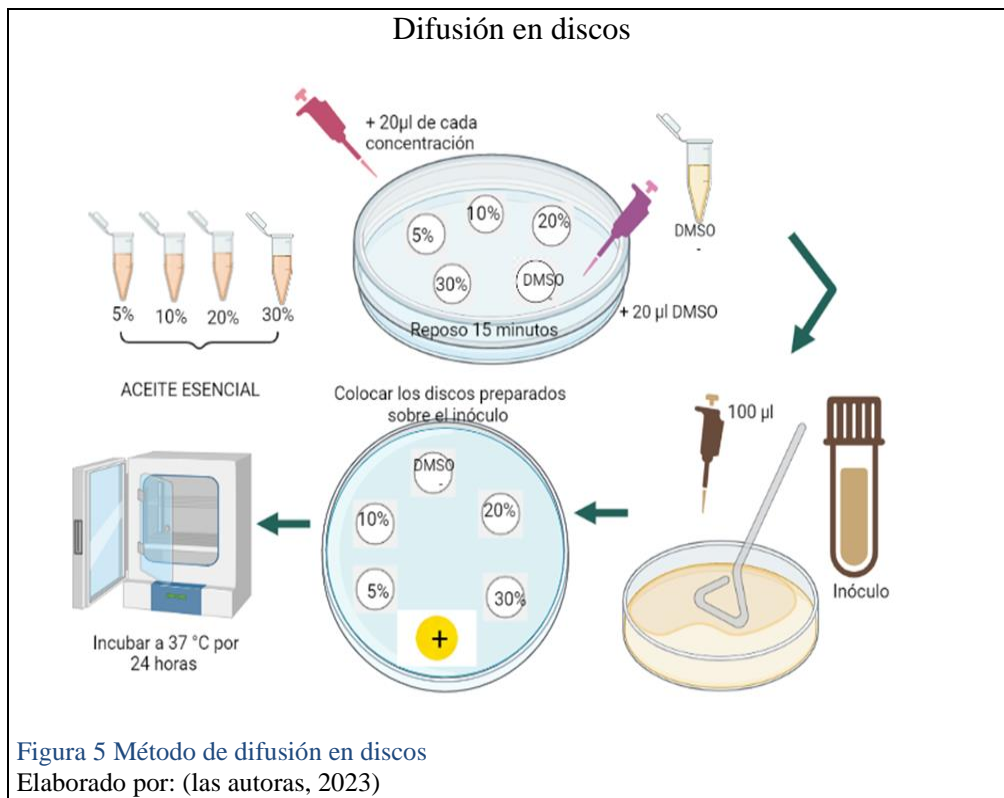
Mediante el método de macro dilución se preparó tubos de 5 mL de caldo TSB más 1 mL de la cepa *E. coli* ATCC 25922 se homogenizo por 30 segundos en el vortex y posteriormente se llevó a incubar a 37°C por 24 horas, luego los tubos se inspeccionaron visualmente en busca de una ligera turbidez perceptible, por consiguiente, se elaboraron en tubos eppendorf las diluciones con DMSO y AEO en las concentraciones 5%, 10%, 20% y 30%, transcurrido las 24 horas se procedió agregar en los tubos 1 mL de las diluciones del aceite esencial del orégano se llevó a incubar por 24 horas a 35 °C (Lopez, 2018).

Para el recuento de microorganismos, a partir de los tubos se sembró una alícuota de 1000 µL en placas petrifilm, se incubo las placas por 48 horas a 35°C para realizar el conteo de colonias. Todo el ensayo se realizó por triplicado. Figura 4



3.6 Evaluación actividad antimicrobiana por el método de difusión por disco

En una caja estéril se prepararon 5 discos de cada concentración del aceite esencial (5%, 10%, 20%, 30% y control negativo DMSO), por cada disco blanco se añadió 20 µL de las concentraciones dejando secar por 15 minutos. En cada caja petri con Agar Nutritivo se colocó 100 µL del inóculo con ayuda del asa de Digrasky se procedió a esparcir el microorganismo e incorporar los discos previamente preparados con las diferentes concentraciones y como control positivo se utilizó la nitrofurantoina; se llevó las cajas Petri a la incubadora a 37°C por 24 horas (Lopez, 2018). Todo este método se realizó por triplicado. Figura 5



3.7 Elaboración del embutido artesanal porcino

3.7.2 Materia prima

La normativa INEN 1338 establece los criterios que la materia prima debe cumplir en la producción cárnicos procesados que incluye a los embutidos porcinos, la materia prima debe ser fresca y en buenas condiciones, la carne debe provenir de animales sanos que sean aptos para el consumo humano, la carne debe estar libre de cualquier agente patógeno, parásito u otra contaminación se deben evitar elementos que puedan comprometer y calidad del producto final, en el uso de carne de animales sacrificados de forma ilegal. También se debe evitar el uso de carne que haya sido sometida a múltiples ciclos de congelación y descongelación. Además, es necesario que la materia prima esté correctamente identificada y se transporte de manera adecuada desde su lugar de origen hasta su destino. (INEN, 2012).

Cumpliendo con las disposiciones de acuerdo con la normativa INEN 1338, se compró carne y grasa de cerdo en un supermercado en el cual se observó su estado de frescura, coloración y ausencia de olores, se procedió a pesar 700 g de carne y 300 g de grasa de porcino para elaborar el embutido para cada tratamiento, incorporando sales nitradas, inóculo y aceite esencial del orégano (Nieves, 2019).

3.7.3 Troceado y molido

Se cortó en fragmento de 2 cm la carne y la grasa, posteriormente se dejó en el congelador por 12 horas a 4°C para evitar que la grasa pierda su colágeno, luego se colocó la carne y grasa en la máquina trituradora de carne industrial y se dio una segunda molida para obtener una mezcla homogénea (carne más fina) Figura 6 (Nieves, 2019).



3.7.4 Cutterizar

Se dividió cada 100 g de carne para los diferentes tratamientos Figura 7, el primer tratamiento se agregaron 10 g de carne más 20 μ L aceite esencial de orégano, segundo

tratamiento se incorporó 10 g de carne en 0,4 g de sales nitrates y el tercer tratamiento no se añadió ningún de los conservantes, finalmente se mezclaron para tener una pasta fina de la carne. No se va a añadir ningún condimento para corroborar un mejor resultado en los distintos tratamientos (Nieves, 2019).

3.7.5 Embutido

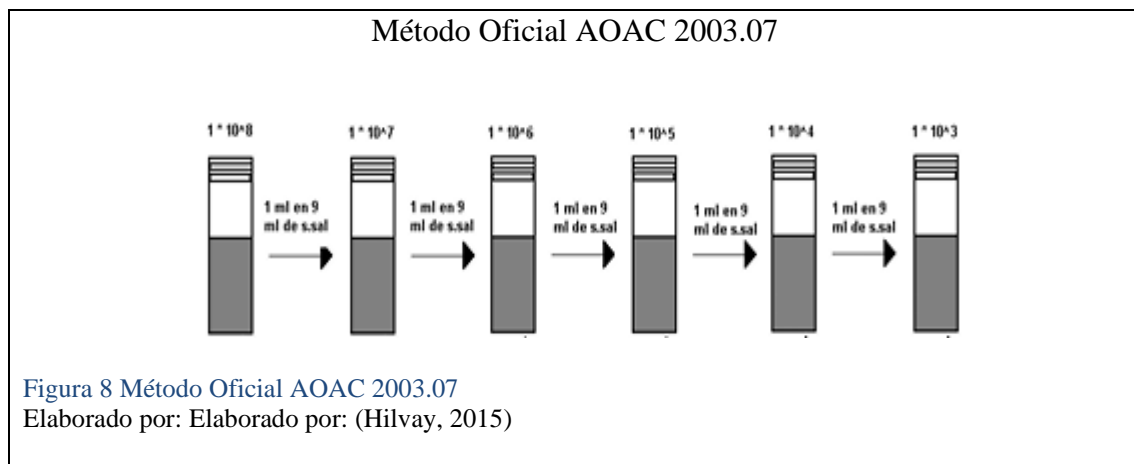
Se incorporó la pasta de carne en la maquina cilíndrica de embutidos modelo GREY – 10L, añadiendo la tripa natural, evitando que, entre aire para no obtener embutidos flácidos, proporcionando un peso de 50 g para cada embutido (Nieves, 2019). Figura 7



3.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Orégano (*Origanum vulgare*)

Mediante la metodología de Nieves (2019) se tomó un porcentaje específico del aceite esencial de orégano del 5% para evaluar su actividad antibacteriana contra la bacteria *E.*

coli. Se realizaron embutidos con carne y grasa. El primer tratamiento consistió en la aplicación del AE de orégano al 5% + 10 mL del inóculo de *E. coli*, el segundo tratamiento utilizó sales nitradas más 10 mL del inóculo de *E. coli* y el tercer tratamiento se realizó sin ningún aditivo más 10 mL de *E. coli*, para la realización de los diferentes tratamientos se tomó 10 g de los embutidos previamente tratados en una funda hermética y adicionalmente se agregó 10 mL del inóculo y se homogenizó. Finalmente, esta mezcla se incorporó en los frascos boecos que contenían 90 mL de agua peptonada 0,1%, estas muestras fueron llevadas al shaker por 24 horas, transcurrido este tiempo se tomó en cuenta el Método Oficial AOAC 998.08 para realizar el análisis microbiológico de *E. coli*, se realizaron diluciones seriadas de cada frasco boeco 10^0 del cual se tomó 1 mL colocándolo en un tubo que contenía 9 mL de agua peptonada al 0,1% para obtener la concentración deseada 10^{-1} siguiendo el procedimiento se llegó a la dilución 10^{-5} ya que la carga bacteriana era alta. Figura 8



Posteriormente, para el recuento selectivo de pruebas petrifilm ECC de *E. coli*. Tena (2016) alude que se debe colocar un 1 mL de las muestras anteriormente preparadas y descender con precaución la capa superior para evitar la creación de burbujas de aire. Se llevaron las placas a incubar con el lado transparente hacia arriba durante 24 horas a 37°C.

Para la interpretación de resultados de coliformes se tomara en cuenta intensidad del color, el tono rojo-púrpura/ azul marino debe contarse para la detección de *E. coli*, cuando existe un gran número de colonias es difícil el conteo, se debe tomara un cuadrante, contabilizar las colonizaciones y esto multiplicarlo por la cantidad total de cuadrantes o se puede expresar los resultados como Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de la muestra, aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\# \text{ de colonias en la placa} * \text{el inverso de la dilución original}}{\text{Volumen de muestra inoculada en el medio (mL)}}$$

Ecuación 3 UFC/mL

3.9 Características organolépticas del embutido

Una vez que se obtuvo el embutido, la Institución Ecuatoriana de la Normalización (INEN) 1338 menciona que “las condiciones organolépticas deben ser características y estables para cada tipo de producto durante su vida útil” como: sabor, olor y color propios del producto terminado (INEN, 2012)

3.10 Análisis estadístico

En el estudio se utilizó un “Diseño Completamente al Azar (DCA)” con tres tratamientos durante un período de 15 días. Los resultados fueron analizados con el software Infostat para observar posibles diferencias significativas entre los tratamientos. Además, se llevó a cabo la prueba post hoc de TUKEY para identificar las diferencias en las medias (Nieves, 2019).

$$T\alpha = q\alpha(k, N - K)\sqrt{CM_E In_i}$$

$CM_E = \text{Cuadrado medio del error}$

$n_i = \text{Número de observaciones por tratamientos}$

$k = \text{Número de tratamientos}$

$N - k = \text{Grados de libertad para el error}$

$\alpha = \text{Nivel de significancia}$

$q\alpha(k, N - K) = \text{Son puntos porcentuales de la distribución del rango estudentizado.}$

Se consideran significativamente distintas las parejas de medias cuya diferencia absoluta en la muestra sea mayor que el valor crítico $T\alpha$.

Tabla 1 Tratamientos

Producto	Tratamientos	Código
Embutido de carne	AE 5% + 10 mL inocular	PE- 1
	Sal nital 0,4 g + 10 mL inocular	PE- 2
	No se aplicó conservante + 10 mL del inocular	PE- 3

Elaborado por: (Las Autoras, 2023)

4 Resultados y discusión

4.1 Extracción del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) mediante el método de destilación por arrastre de vapor.

Como resultado del proceso de extracción, se obtuvo al finalizar el proceso un volumen de 40 mL del aceite esencial de orégano, sobre los constituyentes examinados en la Tabla 2, según la Ecuación 1 se obtuvo una densidad de 0,9100 g/mL, superior a la del estudio realizado por Abalco (2017) y comparable a los resultados encontrados en el trabajo experimental actual.

En cuanto al rendimiento obtenido por medio de la Ecuación 2 fue de 0,99% , tiene una relación con el estudio de Vera & Zambrano (2017), cual menciona que promedio del método de arrastre de vapor se observó un promedio del 0,83% del aceite esencial de orégano, en función a lo encontrado se llegó a determinar que el rendimiento es diferente a los presentados por Sánchez & Rázuri (2017) en donde se reporta un valor de 0,20% de orégano, dependerá de varios factores como la variedad de orégano, la estado de la planta y la técnica de extracción empleada son factores determinantes.

Tabla 3 Variables asociadas a la obtención del aceite esencial de orégano

Componentes	Orégano (<i>Origanum Vulgare L.</i>)
Materia vegetal	7 kg
Agua destilada	11 L
Tiempo	3 – 4 h
Temperatura	92 °C
Volumen total del aceite esencial	40 mL
Color	Amarillento oscuro

Densidad	0,9100 g/ mL
% Rendimiento	0,99%

Elaborado por: (Las Autoras, 2023)

4.2 Composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

En la Tabla 4 se muestran los compuestos detallados, su tiempo de retención y el porcentaje total de la muestra.

Tabla 5 Compuestos químicos del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*)

Nombre de los compuestos	Tiempo de retención	% del Total
6,91 Sabineno	4,90	5,21
1,6-Octadieno, 7-metil-3-metileno	5,39	3,53
1,3-ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletilo)	6,28	9,6
8,59 Cimeno	6,60	7,57
8,70 Felandreno<beta>	6,78	4,19
2-oxabicyclo[2,2,2]octano, 1,3,3-trimetil	6,87	4,59
8,96 Ocimeno<(Z)-beta>	7,11	3,54
9,78 Terpineno<gamma>	8,05	3,87
10,20 Hidrato de sabineno<cis->(IPP frente a OH)	8,77	3,36
4-isopropilideno-1-ciclohexeno	9,38	4,47
5-Isopropil-2-metilbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	10,52	3,86
11,41 Hidrato de sabineno<trans>(IPP frente a OH)	11,92	3,73
14,66 Terpinen-4-ol	16,03	14,85
1-Isopropil-2-metoxi-4-metilbenceno	20,45	2,84
17,61 Carvacrol, éter metílico	21,27	5,67
16,42 Formiato de linalol	22,86	2,93
19,71 Timol	27,35	7,59
20,14 Carvacrol	27,98	4,96
Isocariofileno	38,19	2,57

Elaborado por: (Las Autoras, 2023)

Se identificaron como los constituyentes principales Terpinen-4-ol (14,85), Timol (7,59) y Carvacrol (4,96), menciona Araujo (2016) que estos compuestos tienen propiedades como: biosida, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas de amplio espectro entre bacterias, hongos y virus.

Se obtuvieron valores diferentes a los reportados del estudio Tellez & Nolazco (2017), se basaron por el método de arrastre de vapor, presentando un aumento de L-4 - terpineol (26,56 %), timol (18,80 %) y carvacrol (2,24 %). En comparación a la investigación de Mera (2020), mediante el método de hidrodestilación generó mayor proporción de carvacrol 62,41%, el cual le da a la planta un gran valor nutricional adicional ofreciendo numerosas propiedades microbiológicas y antisépticas, recomienda su uso como bioconservante en la industria alimentaria.

Al observar los resultados obtenidos de nuestro proyecto, comparándolo con distintas investigaciones (Tellez & Nolazco; Mera) podemos observar que la composición química de interés, como el timol y carvacrol, exhiben propiedades diferentes y el porcentaje se va a diferenciar por las distintas formas de extracción del aceite esencial de orégano.

4.3 Concentración mínima inhibitoria

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano sobre la cepa bacteriana *Escherichia coli*, el resultado a las concentraciones de 5%, 10%, 20% y 30% se pudo visualizar que no hubo turbidez lo que indica que no existió crecimiento bacteriano por lo que el aceite esencial inhibió el desarrollo de la bacteria. Por lo que se tomara la concentración más baja que es del 5% como CMI ya que inhibió el crecimiento de la cepa *Escherichia coli*,

Por ende, estos resultados fueron semejantes con los de Souza (2008) que no obtuvo crecimiento bacteriano en las concentraciones de 0,5 hasta 10% y consiguió un crecimiento bacteriano al 20% hasta el 60% con el mismo microorganismo. A diferencia con López (2018) que presentó crecimiento bacteriano al 30% y negativo al 60% y 90%, debido a las variaciones que se dan con los diferentes extractos alcohólicos que sean necesarios para tener mayor concentración para la inhibición del crecimiento de la cepa.

4.4 Método de difusión por discos

Para la lectura de resultados, se usó de referencia como lo indicado por Lagos (2012), frente a la sensibilidad bacteriana de *Escherichia coli*; en la cual un diámetro de halo de 8mm indica una sensibilidad nula, un diámetro de 9 a 14 mm sensibilidad, un halo de 15 a 19 mm muy sensible y superior 20 mm sumamente sensible.

Los discos empapados en diferentes concentraciones del AEO se describen en la siguiente

Tabla 6

Tabla 6 Diámetro en milímetros (mm) de lo halos de inhibición alcanzados por el aceite esencial de orégano

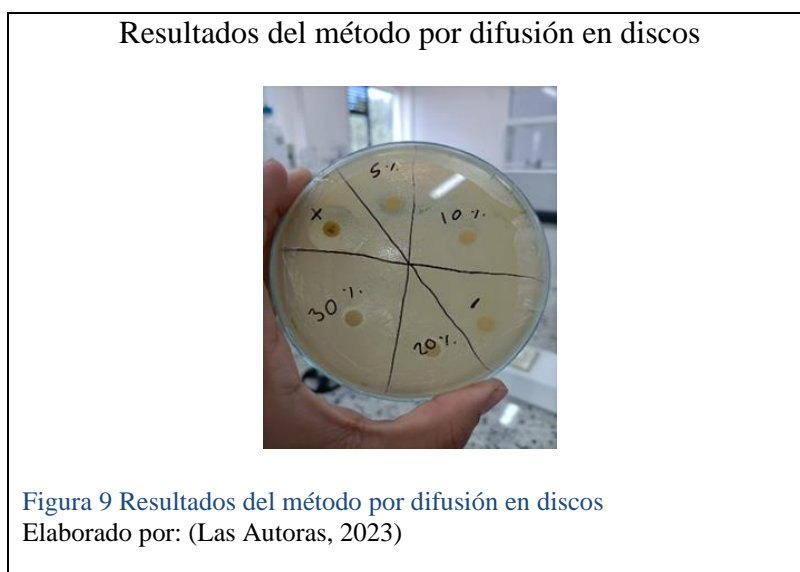
Aceite esencial de orégano	Concentración	Promedio	DE	Control + (nitrofurantoína)	Control – (DMSO)
	5%	8,21	0,10	17,41 mm	0 mm
	10%	8,65	0,27		
	20%	7,16	0,17		
	30%	10,69	0,59		

Elaborado por: (Las Autoras, 2023)

Se evidencia la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano frente a *Escherichia coli*, se observó que, a una concentración más alta, específicamente al 30%, se logró un halo de inhibición de 10,69 mm, lo cual indica que el aceite puede inhibir el crecimiento de la bacteria. Asimismo, la concentración del 20%, obtuvo un halo de inhibición a 7,16 mm, lo cual concuerda con los resultados encontrados en el estudio de Medrano (2020), donde a la concentración de 20% obtuvieron un halo de 8 mm observando así una sensibilidad bacteriana nula frente al microorganismo *Escherichia coli*; para el 10% se obtuvo un halo de 8,65 mm teniendo en cuenta lo descrito por Lagos (2012), la sensibilidad bacteriana es nula en comparación en el ensayo de Ortega (2018), el cual a esa concentración obtuvo un halo de 13 mm, puede darse por las diferentes maneras de extracción del AE, al 5% se alcanzó un halo de 8,21 mm al observar el ensayo

de Sánchez & Manizales (2020), al utilizar el aceite esencial a esa concentración no obtuvieron un halo de inhibición esto es debido al disolvente que se trabajó con el aceite, por lo que no obtuvieron una buena homogenización en sus resultados.

En el estudio se empleó nitrofurantoína como control positivo con un halo 17,41 mm, estos resultados coinciden con el estudio realizado por Ortega (2018), donde se usó la metaciclina como antibiótico, obteniendo un halo de inhibición de 17 mm, indicando que *Escherichia coli*, es altamente sensible a estos antibióticos. Basado en la metodología de Maraví, (2012) se usó como control negativo al DMSO, no presentaron halos inhibitorios en ninguna de las cajas Petri, sirvió para mantener un control de calidad que garantice la siembra del microorganismo. Figura 9



4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Orégano en el embutido (*Origanum vulgare L.*)

Para el conteo de UFC se realizó diluciones seriadas de cada frasco boeco que contenía 10 mL del inóculo, 10g del embutido y 90 mL de agua peptonada al 0,1% del cual se tomó 1 ml colocándolo en 9 mL del agua peptonada al 0,1% logrando la dilución

denominada 10^{-1} siguiendo el procedimiento se llegó a la dilución 10^{-4} ya que la carga bacteriana era alta.

Se realizó el conteo inicial del inóculo de UFC/mL en la dilución 10^{-5} siguiendo la fórmula

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\# \text{ de colonias en la placa} * \text{el inverso de la dilución original}}{\text{Volumen de muestra inoculada en el medio (mL)}}$$

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{3 * 10^5}{1 (mL)}$$

$$\frac{UFC}{mL} = 300,000$$

Ecuación 5 Obtención de UFC/mL

Transcurridas las 24 horas y tomando en cuenta los debidos tratamientos se obtuvieron los siguientes resultados Tabla 7.

Tabla 8 Porcentaje de inhibición y total de UFC/mL en los tratamientos

24 horas					
	P1	P2	P3		
Tratamientos	% de inhibición			Promedio	Total, UFC/mL
Aceite esencial	20%	13,33%	16,16%	16%	50000
Sal nital	33,30%	10%	6,60%	17%	50000
Control	0%	0%	0%	0%	290000
144 horas					
	P1	P2	P3		
Tratamientos	% de inhibición			Promedio	Total, UFC/mL
Aceite esencial	100%	6,60%	100%	69%	6667
Sal nital	100%	7%	3,30%	37%	10000

Control	0%	0%	0%	0%	746667
264 horas					
	P1	P2	P3		
Tratamientos	% de inhibición			Promedio	Total, UFC/mL
Aceite esencial	10%	6,60%	3,30%	7%	15000
Sal nital	100%	7%	100%	69%	10000
Control	0%	0%	0%	0%	775000

Mediante la metodología de Nieves (2019) en 24 horas se demuestran resultados con mayor carga microbiana en el testigo de control que presento un porcentaje nulo, el tratamiento con AEO al 5% presento una inhibición del 16% en comparación con el tratamiento de sal nital que presento un 17%.

Después del transcurso de 144 horas se ha observado que el tratamiento de control, que no recibió ningún aditivo, exhibió la presencia más significativa de microorganismos con una carga microbiana. Por otro lado, el tratamiento con AEO al 5% mostro una inhibición mayor del 69%, mientras que el tratamiento con sal nital revela un porcentaje del 37%. Finalmente, a las 264 horas se obtuvo un crecimiento microbiano de *E. coli* en el testigo de control. Por otro lado, el tratamiento con AEO al 5% mostró una inhibición del 7% en comparación con la sal nital que consiguió un 69% de microorganismo en el embutido.

En un estudio anterior realizado por Buitrón & Quispe en 2016, se observó un crecimiento de *Escherichia coli* en función del tipo de tratamiento a lo largo del tiempo. El tratamiento en blanco, que no recibió ningún tratamiento adicional, mostró un mayor crecimiento con 1% de inhibición. Por otro lado, el tratamiento con orégano 60% inhibió el crecimiento, pero no es adecuado para el consumo debido a que el aceite a esta concentración es toxico para la salud humana.

El tratamiento con AEO al 5% redujo la carga microbiana en comparación con el testigo control, pero aún mostró un crecimiento microbiano significativo. En cambio, el tratamiento con sal nital presentó el porcentaje de inhibición más alto al finalizar los días de evaluación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que según la normativa INEN (2012), el contenido máximo permitido de *Escherichia coli* en embutidos crudos no debe superar ciertos límites. Tabla 9

Tabla 9 Tabla requerimiento microbiológicos para obtención de embutidos crudos

Requisito	n	c	m	M	MÉTODO DE ENSAYO
Aerobios mesófilos ufc/g *	5	3	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g *	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1529-8
<i>Staphilococcus aureus</i> ufc/g *	5	2	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	NTE INEN 1529-14
<i>Salmonella</i> / 25 g **	5	0	ausencia	---	NTE INEN 1529-15
<i>E. coli</i> O157:H7 **	5	0	ausencia	---	ISO 16654
* Requisitos para determinar tiempo de vida útil					
** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Elaborado por: (INEN, 2012).

Según los hallazgos de este estudio, se aprecia que los tratamientos de control, AEO al 5% y sales nitrates exceden los límites establecidos, lo que hace inapropiado para el consumo humano. Es importante tener en cuenta el diseño experimental, las condiciones de cultivo y los criterios de evaluación utilizados en este estudio para interpretar los resultados obtenidos.

4.6 Análisis estadísticos

Tabla 10 Análisis estadístico de los tratamientos 264 horas.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N	E.E.	LETRAS
CONTROL	0,00	3	4,97	A
SAL NITRAL	83,37	3	4,97	B
AEO	83,50	3	4,97	B

“Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)”

Elaborado: (Las autoras, 2023)

P – valor: 0,001

Hipótesis nula: Todos los tratamientos inhiben el crecimiento bacteriano.

Hipótesis alternativa: Al menos un tratamiento inhibe el crecimiento bacteriano.

La hipótesis nula se rechaza debido a que el valor p- valor 0,001 es superior al valor $p > 0,05$, lo cual significa que al menos un tratamiento inhibe la carga bacteriana.

Al observar los resultados revelan que los tratamientos AEO y sal nital no muestran diferencias significativas entre sí, debido a que tienen la misma letra (B), se detectaron disparidades significativas entre en el tratamiento de control con AEO y la sal nital. A diferencia del estudio de López, et al. (2019) que utilizaron concentraciones 0,25 hasta 0,75% de aceite esencial de orégano presentando medias con letras iguales que significan que no hubo significancia en sus tratamientos en esas concentraciones.

4.7 Características organolépticas del embutido

Astudillo (2014) sugiere que el hecho de que un alimento sea aceptado o rechazado depende de muchos factores sensoriales como: el color, el olor, el sabor, textura e incluso el sonido que genera durante su consumo. Todos estos atributos son importantes al diseñar y desarrollar productos nuevos, el orégano al ser utilizado como un conservante genera un olor agradable al olfato, adicional la textura del embutido es firme y el color es característico de una salchicha de carne percibiendo un color agradable a la vista, lo que se pudo observar en los resultados de la primera semana de la Tabla 9.

En la segunda semana las características cambiaron en el embutido, se observó que estaba seco, tenía un color verdoso esto debe al envejecimiento del producto es porque tiende a decolorarse rápidamente cuando se expone a la luz y al oxígeno en el cual el producto se encuentra almacenado lo cual causa la formación de metamioglobina que es la causante de la decoloración en la superficie del embutido, también tuvo un color rosado pálido con un olor a rancio y alrededor del embutido se encontró puntos blancos en la superficie asociado a hongos (*Mucor racemosus*).

Siguiendo con las características organolépticas para cada tipo de producto deben permanecer estables a lo largo de su ciclo de vida y el producto no debe tener ningún cambio o deterioro a causada de factores microbiológicos, biológicos, físicos o químicos, además debe estar libre de materias extrañas; por lo tanto podemos decir que el embutido tiene un ciclo de vida de una semana, donde las características organolépticas fueron estables y no cambiaron por lo que el productos es aceptado, transcurrido el tiempo se observó un deterioro del producto causado por factores microbiológicos en consecuencia el embutido.

Tabla 11 Propiedades organolépticas con el conservante natural (AEO)

Fecha	Color	Olor	Textura
Día 1	Rosado	Característico del orégano	Firme
Día 2	Rosado	Característico del orégano	Firme
Día 3	Rosado	Característico del orégano	Firme
Día 4	Rosado	Característico del orégano	Firme
Día 5	Rosado	Característico del orégano	Firme
Día 6	Rosado pálido	Característico del orégano con olor rancio	Firme
Día 7	Rosado pálido	Rancio	Firme
Día 8	Rosado pálido	Rancio	Firme
Día 9	Rosado pálido	Rancio	Firme
Día 10	Rosado pálido	Rancio	Firme
Día 15	Rosado pálido - con puntos blancos en la superficie	Rancio	Firme

Elaborado por: (Las Autoras, 2023)

Resultados similares se observaron en el estudio que realizó Hilvay (2015), en carne de cuy, en la cual se colocó AEO en una concentración 0,30 %, donde el número de microorganismo aumento con el tiempo. En un periodo de almacenamiento de 40 días, la carne procesada tuvo un control de calidad aceptable para el consumo humano, después

del día 41 de almacenamiento el crecimiento de bacterias tuvo un ascenso además que el color de la carne tenía signos de deterioró, envejecimiento, olor diferente y cambios en la textura de la carne.

5 Conclusiones

- En este estudio se comprobó la factibilidad de obtener AEO mediante el uso del método de destilación por arrastre con vapor utilizando un destilador semiindustrial. Se logró obtener el volumen de 40 mL de aceite con una densidad de 0,9100 g/mL.
- El rendimiento alcanzado en este estudio fue del 0,99%, similar a investigaciones anteriores que utilizaron el mismo método. Sin embargo, se observaron diferencias en comparación con otros estudios, lo cual sugiere que factores como la variedad de orégano, el estado del arbusto y la técnica de extracción pueden influir en el rendimiento obtenido.
- La concentración mínima inhibitoria óptima del aceite esencial de orégano encontrada en este estudio fue del 5%, lo que se asoció con una inhibición significativa del crecimiento de *Escherichia coli*, a lo largo de los 15 días de investigación. Estos hallazgos respaldan el potencial del AEO como un conservante natural capaz de prevenir el crecimiento bacteriano en productos alimenticios.
- Se ha demostrado que los principios activos estudiados, el timol y el carvacrol, exhiben como potenciales antibacterianos. Estas propiedades, junto con la presencia de compuestos fenólicos, respaldan la aplicación de aceites esenciales como una estrategia efectiva para alargar y optimizar el ciclo de vida de diversos embutidos alimentarios, incluso aquellos sometidos a procesos de congelación.

- Al analizar las características organolépticas durante la elaboración del embutido, se pudo observar que el manejo del aceite de orégano (*Origanum vulgare L.*) como conservante no generó impacto significativo en los parámetros evaluados, como la apariencia, el olor, la textura y el color. En resumen, el tratamiento estudiado no tuvo efectos perceptibles en las características organolépticas del embutido porcino.

6 Recomendaciones

- Se sugiere la realización de investigaciones adicionales que se centren en el análisis de diferentes componentes de la planta de orégano, particularmente de la familia Lamiaceae, con el fin de mejorar tanto el rendimiento como las propiedades fisicoquímicas para la conservación del embutido. Estos estudios podrían proporcionar información importante para optimizar el uso del orégano en las industrias alimentarias para la conservación de alimentos.

- Se propone llevar a cabo un estudio en el que emplee el aceite de orégano con el objetivo de investigar su capacidad de inhibir la proliferación de otros microorganismos presentes en los embutidos.

- Realizar estudios más profundos sobre la utilización de aceites esenciales en el área alimentaria. Dado que la demanda de productos con una vida útil prolongada está en aumento, es necesario obtener más información sobre el uso de aceites esenciales como conservantes naturales.

- Realizar una investigación sobre la toxicidad del orégano a mayor concentración para la conservación del embutido sin afectar las características organolépticas y no ocasionar efectos negativos en el ser humano.

7 Bibliografía

- Abalco, T. (2020). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de orégano (*O. vulgare* L.) por cromatografía de gases procedente de dos provincias del Ecuador. (“Repositorio Digital: Caracterización fitoquímica del aceite esencial de ...”) Distrito Metropolitano de Quito, Recuperado: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20545/1/T-UCE-0008-CQU-217.pdf>
- Acero Diaz, J. P., & Cabarcas Acosta, A. K. (2018). Evaluación de la calidad microbiológica en la elaboración de pernils crudo-curado y ahumado a partir de piernas de cordero producidos a escala de agricultura familiar. Recuperado: <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/861>
- Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., & Ibañ Ez, E. (2020). Pressurized Liquid Extraction. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>
- Amanda Ortega (2018). Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600. Recuperado: <file:///C:/Users/condo/Downloads/UPS-CT007779.pdf>
- Araujo, F. (2016). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre Coliformes y Mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente. Nutricionista. Universidad Cesar Vallejo, Trujillo.
- Barreiro & Cabezas, (2017) “Obtención y caracterización de los compuestos aromáticos del Ajenjo (*Artemisia Absinthium* L), y la aplicación del aceite esencial como

repelente contra insectos.” Guayaquil. Recuperado:

<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18246/1/401-1226%20-%20Obtenci%C3%B3n%20y%20caracterizaci%C3%B3n%20de%20los%20compuestos%20arom%C3%A1ticos%20del%20Ajeno.pdf>

Boucher, HW, Talbot, GH, Bradley, JS, Edwards, JE, Gilbert, D., Rice, LB, ... y Bartlett,

J. (2009). Bichos malos, sin drogas: ¡sin ESKAPE! Una actualización de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América. Enfermedades infecciosas clínicas.

Buitron, O, & Quispe, I. (2016). “Conservación de la carne de cuy (*cavia porcellus*) línea

Perú en ambiente modificado con aceite esencial natural de *romero* (*rosmarinus officinalis*), y orégano (*Origanum vulgare*)”. Tesis de grado. Universidad

Nacional del centro del Perú. Huancayo. Perú. Recuperado:

<https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/1582/Buitron%20Vilcapoma%20-%20TESIS%20%283%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Cardona, y Mejía. (2019). Evaluación del efecto antioxidante. Biosalud, 59-70.

Castillo, M. (2017). Efecto combinado del aceite esencial de orégano y extracto de ajo,

en la conservación de hamburguesas de carne vacuna refrigerada [En línea]

(Trabajo de titulación) (Licenciatura). (“Efecto combinado del aceite esencial de orégano y extracto de ... - uncuyo”) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad

Nacional de Cuyo. San Martín-

Argentina.[https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8750/tesis-brom.-](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8750/tesis-brom.-castillo-mara-paula-2017.pdf)

[castillo-mara-paula-2017.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8750/tesis-brom.-castillo-mara-paula-2017.pdf)

Castillo, V. (2016). Efecto del uso de romero (*Rosmarinus officinalis l.*) como aditivo

antibacterial en salchichas de pollo tipo frankfurt. (“Repositorio Digital

Universidad De Las Américas: Efecto del uso ... - UDLA”) Tesis. Maestría en agroecología tropical andina. Cuenca, EC. p 16.https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UDLA_829d18d2a20aab0008f13072d6869c48

Ceballos, V. & Londoño G. (2017). Aceites esenciales en la conservación de alimentos. Bogotá. Barranquilla.

Recuperado:<https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/microciencia/article/download/3659/3054/6039>

Cebrian, S. (2020). Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas. Ingeniería de alimentos. Universidad de Valencia, Valencia.

Cofre, M. (2022). Aplicación de aceites esenciales como aditivos naturales en los sistemas alimentarios. *Ingeniera en Biotecnología*. Universidad Técnica de ambato, Ambato.

Comisión del Codex Alimentarius. (2021). Norma del Codex para productos cárnicos curados cocidos. CXS 269-1969. Recuperado: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS_192s.pdf

Cristian Nieves, C. (2019). “Elaboración de salchicha de pollo (*Gallus domesticus l.*), empleando aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare l.*), como conservante natural, Pucallpa – Ucayali”. Obtenido de Facultad de Ciencias Agropecuarias: http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/4252/000004143T_AGROI_NDUSTRIAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Cruz, A., Guerrero Muñoz, G., & Ariza Ortega, T. D. J. (2015). Síntesis y actividad antibacteriana de benzazolisotiourea carboxilatos de sodio derivados de aminoácidos. Recuperado: <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/9112>
- Discovery. (2015). Discovery salud. Obtenido de Discovery salud: <http://www.dsalud.com/index.php?pagina=articulo&c=490>
- Edwin Lopez (2018). Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (*origanum vulgare*) sobre cepas certificadas de *escherichia coli* y *staphylococcus aureus*.
Recuperado:[file:///C:/Users/condo/Downloads/Tesis%20130%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/condo/Downloads/Tesis%20130%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568%20(2).pdf)
- Fellenberg, MA, Carlos, F., Peña, I., Ibáñez, RA, & Vargas-Bello-Pérez, E. (2020). Calidad oxidativa y variación de color durante la refrigeración (4 C) de filetes de trucha arco iris marinados con diferentes antioxidantes naturales de orégano, quillaia y romero. *Ciencias Agrícolas y Alimentarias*. Chile.
Recuperado: <https://journal.fi/afs/article/view/87078>
- Froböse, NJ, Olaru, ID, Schneider, JS, Zhang, W, Mellmann, A., Schuler, F, y Schaumburg, F. (2023). ¿La preincubación en medios de enriquecimiento selectivo mejora la detección de *Escherichia coli* diarreogénica utilizando el RIDA® GENE PCR? *Revista Internacional de Microbiología Médica*.
Recuperado:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422123000036>
- Fuentes-Castillo, D., Farfan-Lopez, M., Esposito, F., Moura, Q., Fernandes, MR, Lopes, R., & Lincopan, N. (2019). Búhos silvestres colonizados por clones internacionales de *Escherichia coli* y *Salmonella* Infantis productoras de β -

lactamasa de espectro extendido (CTX-M) en el Cono Sur de América. *Ciencia del Medio Ambiente*

Total. Recuperado: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969719316626>

Gómez, R. (2021). Elaboración de un embutido de pavo, empleando okara de soya (*glycine max*) como reemplazo parcial o total de la grasa, aprovechando las propiedades prebióticas. Ingeniero Agrícola. Universidad Agraria del Ecuador, Guayaquil.

Giannenas, L. & Bonos, E. (2018). Lima. Perú. Oregano: A Feed Additive with Functional Properties. Therapeutic.

Recuperado: http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/1231/T_030.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Hyldgaard, M., Mygind, T. y Meyer, RL (2012). Aceites esenciales en la conservación de alimentos: modo de acción, sinergias e interacciones con los componentes de la matriz alimentaria. *Fronteras en microbiología*, Recuperado:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00012/full>

Hilvay, L. (2015) "Efecto de los aceites esenciales de limón (*Citrus limon*), albahaca (*Ocimum basilicum l.*) y orégano (*Origanum vulgare*), en la conservación de la carne de cuy (*Cavia porcellus*)". Ambato. Recuperado:

<https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/11978>

INEN. (2012). Carne y productos cárnicos. productos cárnicos crudos, productos cárnicos curados - madurados y productos cárnicos precocidos - cocidos. Requisitos.

Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito. Obtenido de https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1338-3.pdf

- INEN. (2012). Norma NTE IEN 1338. carne y productos cárnicos. "Productos cárnicos crudos, productos cárnicos curados - madurados y productos cárnicos precocidos - cocidos." ("Universidad Técnica del Norte facultad de ciencias administrativas Y ...") Requisitos. Primera edición. Ecuador. Recuperado: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1338-3.pdf
- Irianda, P. & Benedito, J. (2017). "Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano, obtenido mediante fluidos supercríticos." Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Kena, G., Musu-Gillette, L., Robinson, J., Wang, X., Rathbun, A., Zhang, J., ... y Vélez, EDV (2015). La Condición de la Educación 2015. NCES 2015-144. Centro Nacional de Estadísticas Educativas. Recuperado: <https://eric.ed.gov/?id=ED556901>
- Lopez E. (2018) "Efecto Antimicrobiano In Vitro Del Aceite Esencial De Orégano (*Origanum Vulgare*) Sobre Cepas Certificadas De *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus*." Cevallos-Ecuador. Recuperado: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis%20130%20M%20edicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568.pdf>
- Maraví, I. (2012). Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. Tesis para optar al título profesional de cirujano dentista. Recuperado: <https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/48/018%20EA>

[P%20ODONTOLOGIA%20TESIS%20-%20MARAV%c3%8d%20INGA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

María Vega (2015). Evaluación de la eficacia del aceite esencial de *Cúrcuma longa L.* como conservante en una formulación cosmético-orgánica. Recuperado: <file:///Downloads/UPS-QT06634.pdf>

Martínez-González, CL, Martínez, L., Martínez-Ortiz, EJ, González-Trujano, ME, Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., & Díaz-Reval, I. (2017). Moringa oleífera, una especie con potencial actividad analgésica y antiinflamatoria. *Biomedicina y Farmacoterapia*. Recuperado: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332216320984>

Medrano, E. (2020). Actividad antimicrobiana y efecto desinfectante del aceite esencial de *Origanum vulgare l.* (orégano) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Tesis de grado*. Universidad Maria Auxiliadora, Lima.

Mera, C. (2015). Efecto del aceite esencial de orégano (*Oreganum vulgare l.*) como agente antimicrobiano en la conservación de la carne de dos especies de tilapia: negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*). Ingeniero Agroindustrial. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo.

Mera, C. (2020). Caracterización Química Del Aceite Esencial De Orégano Como Agente Bioconservador En Alimentos. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo.Ecuador.<https://uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/381/793>

Monroy, B. L. D., Tapia, M. F. B., Hidalgo, M. J. R., & Arrieta, R. H. D. (2022). Cuatro antioxidantes y antiinflamatorios naturales en la alimentación de los

pollos. *Domino de las Ciencias*, 8(3). Recuperado:
<https://dominodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/view/2816>

Montoya, L., Quintero, N., Ortiz, S., Lopera, J., Millán, P., & Rodríguez-Souvenir, A. (2022). “Inulina como ingrediente reductor de grasa en albóndigas de cerdo y pollo: sus efectos sobre las características fisicoquímicas y la percepción del consumidor.” *Alimentos*. Recuperado: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/8/1066>

Moreano, M. (2018). “Evaluación del efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) en agua de bebida, como inmunoestimulante, de pollos de engorde. Ecuador.” Recuperado:
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25866/1/T-ESPESD-003126.pdf>

Novoa, Tania. (2019). “Evaluación de la composición química y capacidad antioxidante de la planta de orégano (*Origanum vulgare L.*)”. Universidad Central Del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/17874/1/T-UCE-0008-CQU-081.pdf>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2017). Análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP). Recuperado:
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/food-safety-hacpp-cha-analisis-peligros-puntos-criticos-control.pdf>

Orozco, Y., & Coloma, L. (2017). Evaluación de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*, (romero), *Laurus nobilis* (laurel) y *Origanum vulgare* (orégano) como conservantes orgánicos en pechugas de pollo. Ingenieras en Industrias Pecuarias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.

- Ortega A. (2018). Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600. Tesis de Ingeniero en Biotecnología de Recursos Naturales. Cuenca, Ecuador: Univ. Politécnica Salesiana. 81 p
- Osorio E. (2020). "Identificación química y perspectiva medicinal de los aceites esenciales de hojas, semillas y flores de *Magnolia pugana*". Zapopan. Recuperado: <https://riudg.udg.mx/handle/20.500.12104/84838>
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 18(5), 414-420.
- Pandia-Estrada, S., Romero-Santivañez, R., Céspedes-Chombo, R., & Solari-Godiño, A. (2021). Películas comestibles a base de gelatina obtenida de piel de mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) y extracto de orégano: Características fisicoquímicas, antimicrobianas, estructurales y de superficie. *Scientia Agropecuaria*. Recuperado: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S207799172021000200229&script=sci_arttext
- Pelayo, M. (18 de enero de 2014). Ciencia y tecnología de los alimentos. Obtenido de conservantes naturales: <https://www.consumer.es/seguridadalimentaria/conservantes-naturales.html>
- Pereira, Alcilene de Abreu, Cardoso, Maria das Graças, Abreu, Luiz Ronaldo de, Morais, Augusto Ramalho de, Guimarães, Luiz Gustavo de Lima, & Salgado, Ana Paula Soares Pinto. (2008). Caracterização química e efeito inibitório de óleos

essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
Ciencia e Agrotecnología, 32(3), 887-893.

Ramos Christian N. (2019) Elaboración de salchicha de pollo (*Gallus domesticus L.*), empleando aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare L.*), como conservante natural, Pucallpa- Ucayali.
<http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/4252?show=full>

Reynoso, H. (2022). Efecto del aceite esencial de orégano en la vida de Anaquel de carne de bovino. Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Rota, MC, Herrera, A., Martínez, RM, Sotomayor, JA, & Jordán, MJ (2008). Actividad antimicrobiana y composición química de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* y *Thymus hyemalis*. *Control de alimentos*. Recuperado:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671350700151X>

Sánchez Toala, G. E., & Rázuri Vera, R. E. (2017). Obtención de aceite esencial a partir de Orégano cultivado en la costa ecuatoriana y su evaluación como fitofármaco. Guayaquil: Universidad de Guayaquil

Sanchez. I. & Martinez. V. (2017) "Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama, tomillo (*Thymus*), orégano (*origanum vulgare*), clavo de olor (*Syzygium*) utilizadas en un producto cárnico madurado fermentado frente a microorganismos criterio microbiológico según la norma ntc 1325". Manizales. Recuperado:
<https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/2034/1/Isabel%20Cristina%20Sanchez%20G.pdf>

Sanchez-Quinche, A., Vega Tinoco, M. M., Pimbosa Ortiz, E. D., Cordovilla Loaiza, J. D., Jordán Romero, M. M., & Pérez Baena, I. (2021). Use of *Plectranthus*

amboinicus in Feeding Fattening Pigs. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 16(4). Ecuador. Recuperado: <https://riunet.upv.es/handle/10251/188456>

Solís-Silva, A., Reyes-Munguía, A., Madariaga-Navarrete, G., Medina-Pérez, R. G., Campos-Montiel, A. J., & Cenobio-Galindo, J. (2018). Evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante de una nanoemulsión W/O de *Opuntia oligacantha* y aceite esencial de *Citrus X sinensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, Recuperado: https://www.researchgate.net/profile/A-J-CenobioGalindo/publication/326305698_Evaluacion_de_la_actividad_antifungica_y_antioxidante_de_una_nanoemulsion_WO_de_Opuntia_oligacantha_y_aceite_esencial_de_Citrus_X_sinensis/links/5b454761458515b4f6628148/Evaluacion-de-la-actividad-antifungica-y-antioxidante-de-una-nanoemulsion-W-O-de-Opuntia-oligacantha-y-aceite-esencial-de-Citrus-X-sinensis.pdf

Souza Prestes, L., Frascolla, R., Santin, R., Ziemann dos Santos, M. A., Costa Schram, R., Alves Rodríguez, M. R., ... & Araújo Meireles, M. C. (2008). “Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa.” *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4), 0-0. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003

Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I. y Stanković, S. (2014). @Actividad antifúngica de aceites esenciales seleccionados frente a hongos aislados de plantas medicinales. *Cultivos y productos industriales*.” Recuperado: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669014000892>

- Tellez Len A. Nolazco Maria. (2017). Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare spp.*) de Tacna. Universidad Nacimiento Agraria La Molina. Lima. Perú.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337453922010>
- Torres, A. (2017). “Generalidades de los productos cárnicos (embutidos).” Monografía. Universidad Agraria Antonio Narro, Saltillo. *Thymus vulgaris* l. “tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* atcc 33277 causante de gingivitis. Tesis de grado. Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, Tacna. Recuperado:
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018845572009000200003&script=sci_arttext
- Valles, M. V., Salinas, P. A., Haro, I. R., Sevilla, W. S., Lázaro, W. R., & Huamán, A. V. (2014). “Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada.” REBIOL, 34(1), 57-68
- Vera Z. & Zambrano L. (2017). “Extracción de aceite esencial de orégano mediante arrastre de vapor. Chone.” Recuperado:
<https://repositorio.uleam.edu.ec/bitstream/123456789/1726/1/ULEAM-IAL-0031.pdf>
- Zamora, F. (2017). “Estandarización de la metodología de la cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales.” [Tesis de grado, Universidad de Cuenca]. Repositorio DSPACE.
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27901/3/Tesis.pdf>
- Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Neill, D., Ballesteros, J., ... Guerrini, A. (2017). *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.)

(Myrtaceae) Aceite esencial del Ecuador amazónico: Caracterización química y perfil de bioactividad. *Molecules*, 22(7), 1163.

<https://doi.org/10.3390/molecules22071163>

Anexo 1 Certificado de materiales de laboratorios

Ing. Gabriela Inés Méndez Silva, MSc.

Coordinadora de la unidad de Titulación de la carrera de Biotecnología

Ante todo, un cordial saludo de mi parte, la presente tiene como finalidad hacer constar que yo Kenny Jesús Lugo Avila Cédula de Identidad 1757287543, cuento con la asignación a mi proyecto de los materiales, equipos y reactivos necesarios para que las estudiantes:

Condoy Suarez Pamela Milena 172230030-6 y Viveros Tul Cinthya Estefania 175100863-0

Cumplan con el trabajo de investigación: **Análisis del efecto conservante y antibacteriano en embutidos artesanales aplicando aceite esencial de orégano** (*Origanum vulgare*)

Sin más a que hacer referencia me despido de usted

Atentamente,



Ing. Kenny Jesús Lugo Avila, MSc.

C.I. 1757287543