



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE NUTRICIÓN

“Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre Coliformes y Mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE NUTRICIONISTA

AUTORA:

Araujo Sánchez, Francy Elena

ASESORES:

Dra. Nélide Milly E. Otiniano García

Mg. Jaime Polo Gamboa

LINEA DE INVESTIGACION:

Salud Pública

Trujillo – Perú

2016

JURADO CALIFICADOR

----- Mg.
Dhyana Huaynalaga Alama
Presidente

Mg. Karin Olascuaga Castillo
Secretaria

Dra: Nélide Milly E. Otiniano García
Vocal

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada de manera muy especial a toda mi familia, principalmente mis padres Francisco Araujo y María Elena Sánchez, porque ellos han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme la confianza, consejos, oportunidades y recursos para lograrlo, a mis hermanos Bleidy Maryeline y David Francisco por el apoyo que siempre me brindaron en el transcurso de mi carrera.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado y a mis padres porque son un ejemplo de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundido siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Francy Elena Araujo Sánchez, con CE N° 000818766 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Nutrición, declaro bajo un juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 07 de abril de 2016

Francy Araujo Sánchez

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre Coliformes y Mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Licenciada en Nutrición.

Francy Araujo Sánchez

ÍNDICE

JURADO CALIFICADOR	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	v
PRESENTACIÓN	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Realidad Problemática	1
1.2. Trabajos Previos.....	2
1.3. Teorías relacionadas al tema	7
1.4. Formulación del Problema.....	12
1.5. Justificación del estudio	12
1.6. Hipótesis.....	13
1.7. Objetivos.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos	13
II. METODO	14
2.1. Diseño de investigación	14
2.2. Variables y operacionalización de variables	16
2.3. Población, muestra y muestreo.....	19
2.4. Métodos de análisis de datos	19
2.5. Aspectos éticos	19
III. RESULTADOS	20
IV. DISCUSIÓN.....	24
V. CONCLUSIÓN.....	26
VI. RECOMENDACIONES	27
VII. REFERENCIAS	28
ANEXOS.....	32

RESUMEN

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas naturales de conservación. Es por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEOV) sobre coliformes y mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente. Se realizó un estudio experimental de estímulo creciente, en una muestra de 30 porciones de carne de hamburguesa, seleccionadas por muestreo no probabilístico aleatorio, en establecimientos de la ciudad de Trujillo. Las carnes de hamburguesas fueron tratadas con aceite esencial de *Origanum vulgare* a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%. Se hizo el recuento de bacterias coliformes totales por el método del número más probable (NMP) y de aerobios mesófilos viables por recuento en placa. Se evaluó el efecto antibacteriano del AEOV sobre estos microorganismos, encontrándose para coliformes >1100 UFC/g de carne de hamburguesa en el 100% de muestras, por lo que se le consideró no apto para el consumo humano. Sin embargo, en 15 de las 30 muestras tratadas con AEOV al 75% y 100% se contaron UFC menores de las permitidas. Por ello, no hubo efecto antibacteriano sobre las bacterias coliformes por el resultado de no apto para el consumo, pero si hubo efecto sobre los aerobios mesófilos ya que se aprecia que 50% de las muestras son aptas para consumo humano en concentraciones de 75% y 100% de AEOV y se evidencia una diferencia estadística significativa ($p < 0.012$) entre la presencia de UFC de mesófilos según concentraciones de AEOV. Se concluye que el AEOV puede utilizarse como un método de conservación, mejorando el tiempo de vida útil del alimento estudiado

Palabras claves: Aceite esencial, *Origanum vulgare*, antibacteriano

ABSTRACT

At present, the need to seek natural conservation alternatives has arisen. Therefore, the objective of this investigation was to determine the antibacterial effect of the essential oil of *Origanum vulgare* (AEOV) on coliforms and mesophiles in meats of hamburgers prepared by hand. An experimental study of increasing stimulus, carried out in a sample of 30 portions of hamburger meat, selected by random non-probabilistic sampling, in establishments in the city of Trujillo. The hamburger meats were treated with essential oil of *Origanum vulgare* at concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%. The most probable number (MPN) and viable mesophilic counted total coliform bacteria aerobes by plate count. The antibacterial effect of AEOV on these microorganisms was evaluated, with coliforms > 1100 CFU / g of hamburger meat in 100% of samples, being considered unfit for human consumption. However, in 15 of the 30 samples treated with AEOV at 75% and 100%, CFUs less than allowed were counted. Therefore, there was no antibacterial effect on coliform bacteria due to the result of not suitable for consumption, but there was an effect on the mesophilic aerobes since it can be seen that 50% of the samples are suitable for human consumption in concentrations of 75% and 100% AEOV and a statistically significant difference ($p < 0.012$) was observed between the presence of CFUs of mesophiles according to AEOV concentrations. It is concluded that the AEOV can be used as a conservation method, improving the useful life of the food studied.

Keywords: Essential oil, *Origanum vulgare*, antibacterial.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad Problemática

Las especias y plantas aromáticas han sido utilizadas durante siglos para aumentar el tiempo de vida útil de los alimentos previniendo el crecimiento de bacterias. En la actualidad numerosas investigaciones han demostrado que los aceites esenciales de estas especias aromáticas poseen propiedades antioxidantes y actividad biológica notable ante bacterias y hongos¹. Actualmente, ha reducido el consumo de los alimentos que contienen aditivos sintéticos como parte de sus ingredientes, ya que la mercadotecnia ha generado una preferencia favorable hacia la ingesta de productos con conservantes naturales². En efecto, se requiere de conservadores naturales que reemplace a los sintéticos que hay en la actualidad, que su Ingesta Diaria Aceptada (IDA) no se exceda al consumirlo, que su espectro de inhibición sea adecuado para utilizarse en alimentos y que su uso sea una opción económica tanto para las empresas como para los consumidores y los aceites esenciales de plantas aromáticas son la alternativa de conservadores naturales que pueden competir en el mercado con los conservantes sintéticos y a la vez es beneficio para sus consumidores.

En un estudio realizado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) sobre la contaminación microbiológica de las comidas que se venden en las calles en países de Latino América entre ellos República Dominicana, México, Guatemala, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. En donde se obtuvieron muestras de comida, y se analizaron en busca de bacterias como *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.*, coliformes fecales y *E.coli* O157:H7. Llegando a la conclusión que es notable el riesgo de contaminación en las comidas que son vendidas en las calles, en las cuales se encontraron dosis infectivas de las bacterias que se investigaron. Finalmente, se estimó en alrededor que más 3 millones de

personas que pueden estar en riesgo de contraer enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) por consumo de estos productos³.

1.2. Trabajos Previos

Estudios recientes demuestran la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L., tal es el caso de la investigación de Bastos Oyarzabal, et al⁴ en la cual evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a 71 bacterias aisladas de leche bovina, de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*; y 3 cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La técnica utilizada fue de dilución en microplaca. La investigación dio como resultado que la concentración bactericida mínima media varió de 0.23 a 2% frente a las bacterias aisladas de leche bovina, con la menor concentración para el género *Streptococcus* y la mayor para *Staphylococcus coagulasa negativa*. En cuanto a las cepas patrones, la concentración bactericida mínima fue de 3.17 y 0.35% para *S. aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente; se determinó efecto para *Pseudomonas aeruginosa*. Se comprobó la actividad in vitro del aceite de orégano frente a las bacterias relacionadas con la mastitis bovina.

Asimismo, Solis⁵ evaluó el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de orégano y tomillo como conservantes naturales, con el propósito de reducir la carga microbiana durante el almacenamiento de la pechuga de pollo. Los métodos utilizados en el ensayo fueron inductivo-deductivos y científico experimentales. Los microorganismos de ensayo fueron *Salmonella spp* y microorganismos proteolíticos; se aplicaron pruebas de screening, concentración mínima bactericida “in vivo” y tiempo de muerte “in vitro” e “in situ”. Donde se demostró actividad antimicrobiana con concentraciones al 100% sin diluir. La concentración mínima bactericida frente a *Salmonella spp* fue de 1.56%. In vitro, el tratamiento más efectivo frente *Salmonella spp* fue obtenido con el aceite esencial de tomillo en concentración total mientras que el aceite esencial

de orégano presentó una inhibición mínima. Se determinó la eficacia del efecto antibacteriano del aceite de tomillo ya que presentó una reducción significativa de la carga microbiana de *Salmonella spp.* Los ensayos “in situ” mostraron que el aceite esencial de tomillo en el almacenamiento de la pechuga de pollo a temperatura de refrigeración (4°C) hasta 48 horas, fue el tratamiento más efectivo para reducir la contaminación bacteriana y la pérdida de las características organolépticas de la carne, logrando dar un producto de mejor calidad y apto para el consumo humano. Por lo que se recomienda el uso de los aceites esenciales como conservante natural y antibacteriano

En otras investigaciones como en la de Amadio, et al⁶, Obtuvo aceite esencial por arrastre de vapor de agua de *Origanum x applii* (criollo) y *Origanum x mejoricum* (mendocino). Donde se determinó su poder antioxidante y conservante en alimentos evaluando: rendimiento, polifenoles totales, cuantificación de timol y carvacrol mediante cromatografía en capa fina de alta resolución y la capacidad de secuestro de radicales libres. La capacidad conservante se evaluó in vitro, por el método de difusión en agar, frente a cultivos de 5 bacterias patógenas y seis cepas de bacterias lácticas que modifican alimentos. El efecto antibacteriano en aceites esencial de estos oréganos varía entre los valores encontrados por otros autores para variedades cultivadas en otras regiones. Se destaca el contenido de polifenoles de ambos en relación con los valores encontrados en investigaciones para otros *Origanum vulgare*, predominando el timol sobre el carvacrol. Los oréganos evaluados inhibieron todas las cepas ensayadas, pero fueron más efectivos contra *Staphylococcus aureus*. Llegando a la conclusión que los aceites esenciales de *Origanum x applii* y *Origanum x mejoricum* son una buena fuente de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, reteniendo radicales libres y acción antibacteriana que pueden incorporarse a los alimentos para prolongar su vida útil.

En la investigación realizada por Levario et al⁷, se evaluó la capacidad del orégano de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en forma plantónica o formando biopelículas. Se utilizaron cepas multirresistentes, aisladas del área de terapia Intensiva de un hospital de la Ciudad de Chihuahua, y se identificaron por API20E. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano y de sus compuestos mayoritarios se determinó por concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), con concentraciones de 50 hasta 3000 ppm. Se prepararon también infusiones acuosas de orégano, con 2, 4 y 6% de orégano. También se determinó el efecto desinfectante del aceite esencial, comparándolo con benzal y cloro. En tubos con caldo tres azúcares-hierro (TSI), se introdujeron trozos de sonda para formar biopelículas. Los trozos fueron luego colocados frente a los desinfectantes por cinco minutos, y se pasaron luego a solución de fosfatos, y se determinó unidad formadoras de colonias (UFC). Se identificaron las cepas como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas fluoresces* y *Burkholderia cepacia* multirresistentes y formadoras de biopelículas, siendo *B. cepacia* la que formó la mayor cantidad de biopelícula. En relación a los rangos de CMI y CMB, el aceite esencial requirió concentraciones >3000 mg/l frente a cepas multirresistentes, el timol a 1000 mg/l y el carvacrol requirió menores concentraciones, de entre 750 y 1000 mg/l. La cepa de *E. coli* fue la más sensible frente todos los compuestos. Las infusiones de orégano se prepararon de 4 formas distintas y se obtuvieron sólo efectos bacteriostáticos. En las sondas se apreció mayor formación de biopelículas para *P. fluorescens* y *B. cepacia*. Las sondas en los desinfectantes produjeron desprendimiento. Hubo mayor crecimiento procedente de sondas estando en contacto con el aceite de orégano (0.71×10^5 y 0.44×10^5 UFC/cm²) que en los desinfectantes (<2 UFC/cm²) para las cepas antes mencionadas. La explicación podría ser que sus componentes actuaran como fijadores de biopelículas por las características hidrofóbicas que presentan. Llegando a la conclusión que las cepas mostraron multirresistencia a por lo menos 3 antibióticos. Todas las cepas formaron biopelículas. La utilización del aceite esencial de orégano y sus componentes

mayoritarios, tuvieron efectos bactericidas, pero se requirieron concentraciones altas (>3000 mg/l) para *P. fluorescens* como la más resistente. El aceite esencial de orégano se requeriría a concentraciones más altas para igualar el efecto que el benzal y el cloro como desinfectantes.

Los aceites esenciales son bien conocidos como fuertes agentes antimicrobianos de origen vegetal. A pesar de esto, el sinergismo antimicrobiano de los aceites esenciales aislados de diferentes especies de plantas es poco investigado. Stojkovic´D., et al⁸, analizaron el sinergismo de los aceites esenciales de *Origanum vulgare L.* y el *Timo vulgaris L.* contra las bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. En primer lugar, se puso a prueba el efecto antibacteriano de los aceites, y las CIM de ambos aceites se determinaron utilizando el método de microdilución. Para probar si los aceites actúan de forma sinérgica, se utilizó cada combinación posible de las concentraciones de aceites esenciales en un método de tablero de ajedrez dinámico. Los resultados indicaron que los aceites de hecho actuaron sinérgicamente con índices de concentración inhibitoria fraccional de 0.45 y 0.50.

En estudios realizados en Perú, como el de Vásquez et al⁹, se determinó el efecto del aceite esencial del orégano, *Origanum vulgare*, en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada con la CMI del aceite esencial de *Origanum Vulgare* para cada una de las bacterias en estudio. El vegetal procedió de la zona de San Ignacio Provincia de Otuzco (La Libertad, Perú) y el aceite esencial se obtuvo mediante el método de destilación directa por arrastre con vapor de agua; posteriormente, se determinó la CMI mediante el método de macrodilución en caldo nutritivo más Tween 80 al 0.1% para cada microorganismo. Las CMI fueron: para *S. typhi*, 3.0 µL/ml; *S. enteritidis*, 1.7 µL/ml; *S. paratyphi A*, 2.3 µL/ml y *S. aureus*, 1.5 µL/ml. Cada una de las CMI se inocularon en sistemas de ensayo conteniendo 10g carne

de porcino molida y pasteurizada a $80^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos y 1 mL de suspensión bacteriana y se llevaron a refrigeración a $8^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 192 horas, al término de los cuales se realizó la medición del crecimiento microbiano mediante la técnica de recuento en placa en Agar Müller Hinton. Se concluye que las CMI del aceite esencial de *Origanum Vulgare* afectan la supervivencia de *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* y *S. aureus*. El aceite esencial de *Origanum Vulgare* que suplementa a la carne molida de cerdo afecta de manera diferente la supervivencia de las especies de bacterias probadas y el aceite esencial de *Oreganum Vulgare* que suplementa a la carne molida de cerdo afecta en mayor medida a *S. aureus* y en menor medida a *S. typhi*.

Por su parte, Chavez et al¹⁰ realizaron una investigación en la cual tuvieron como propósito determinar el efecto sinérgico antibacteriano entre el aceite esencial de *Origanum Vulgare* y la gentamicina en aislados de *Escherichia coli*. Para ello aplicaron el método de Kirby Bauer (discos de difusión) en 20 placas Petri. Asimismo aislaron la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. El grupo Experimental fue tratado con discos de papel filtro, embebidos con gentamicina y aceite esencial de orégano al 75%; mientras que el grupo Control, con discos de Gentamicina sola. Se realizaron la medición de los halos y se registraron los datos. Para identificar el efecto antibacteriano, evaluaron el diámetro de los halos de inhibición los cuales en el caso del grupo experimental resultaron 22,375 mm, mayores que los del grupo Control (20,75 mm). La prueba T determinó que la diferencia era estadísticamente significativa, $p = 0.001$ ($p < 0.05$). Concluyeron que existe un efecto sinérgico antibacteriano *in vitro* entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y la gentamicina en *E. coli*.

I.3. Teorías relacionadas al tema

Los Aceites esenciales obtenidos a partir de plantas aromáticas vienen siendo ampliamente utilizados desde la Edad Media y numerosas aplicaciones se encuentran todavía en la actualidad. Las propiedades antimicrobianas entre otros de interés general, se han atribuido a su alto contenido de derivados fenólicos¹¹.

Los aceites esenciales están compuestos por sustancias lipofílicas, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, ésteres y éteres) en distintas cantidades¹². Se han utilizado por la industria cosmética en la elaboración de perfumes, aunque durante el último tiempo han cobrado gran importancia en el sector farmacéutico y alimentario debido a que contiene propiedades antimicrobianas además a su creciente demanda de productos de origen natural por parte de los consumidores¹³. En Estudios previos se informó el potencial del aceite esencial de orégano para conservar los alimentos, como la carne de pechuga de pollo fresco, pez espada y pulpo¹⁴.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe a que contienen principalmente compuestos fenólicos (carvacrol, timol, eugenol, etc.). Los aceites esenciales con mayor acción antimicrobiana son aquellos en los que se la proporción de compuestos fenólicos es mayor, aunque se ha encontrado que los elementos traza también son destacados debido a efectos de sinergia con el resto de componentes. La capacidad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento microbiano ha sido investigada en gran variedad de alimentos como frutas y verduras mínimamente procesadas¹⁵, carne picada¹⁶, pollo¹⁷, etc.

La información y las investigaciones que se encuentra actualmente respecto al mecanismo de acción de los aceites esenciales es muy poca, sin embargo en lo reportado se coincide que el carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite ingresar en los lípidos de las membranas bacterianas alterando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a las pérdida de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte de la célula. Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas de la membrana citoplasmática modificando la interacción lipido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular, otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína¹⁸.

En una investigación realizada por Fisher y Phillips, se determinó que el carvacrol aumenta la fluidez de la membrana y causa fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso potencial de membrana y la inhibición de la síntesis de ATP. Por otra parte, la citronela interfiere con los procesos de fotosíntesis, lo que sugeriría que los aceites esenciales no solo pueden estar actuando en la pared celular, sino que además pueden tener un efecto mayor sobre los sistemas metabólicos¹⁹.

El orégano cuyo nombre científico es *Origanum vulgare L.*, perteneciente a la familia de las lamiáceas, es una planta herbácea perenne de aspecto leñoso que alcanza hasta 90 cm de altura. Los tallos, que a menudo adquieren una coloración rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores. Las hojas surgen opuestas, ovales y anchas, miden 2 a 5 cm, tienen bordes enteros o ligeramente dentados, y vellosidad en el envés. Las inflorescencias son panículos tipo cima, con brácteas negras y flores labiadas de color púrpura. Éstas están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo. Para

su empleo medicinal se recogen las sumidades al inicio de la floración y se secan a la sombra cortadas y en capas finas o colgadas en manojos²⁰.

En estudios realizados sobre la composición química del orégano, utilizando extractos acuosos y sus aceites esenciales, se han logrado identificar flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *Oreganum vulgare* se han hallado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, r - hidroxibenzóico y vainillínico²⁰. Entre los principios activos que contiene se puede mencionar el Aceite esencial (0.15%-1%): monoterpenos como carvacrol (40%-70%), g-terpineno (8%-10%), p-cimeno (5%-10%), α -pineno, timol, mirceno, linalol, terpinen-4-ol; sesquiterpenos como β -cariofileno, d-germacreno. También encontramos flavonoides como naringina, ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico: ácido rosmarínico (5%). Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas²⁰.

Asimismo presenta diferentes beneficios como antioxidante, probablemente debido a la presencia de polifenoles (encontrados 26 compuestos distintos), ácido rosmarínico y flavonoides. Se ha comprobado in vitro que el extracto de esta planta puede inhibir la oxidación de las proteínas de baja densidad (LDL) y también prevenir el daño en el DNA causado por los radicales de peróxido de hidrógeno. De todos modos, en un estudio clínico se observó que tras la administración de zumos enriquecidos con extracto de orégano no había cambios significativos en la peroxidación lipídica ni en el perfil lipídico sanguíneo, también antimicrobiano, frente a *Listeria monocytogenes* y antifúngico frente a *Candida albicans*, debido a que contienen carvacrol y timol. Se ha comprobado su efecto antibiótico sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. También tiene eficacia frente a *Trypanosoma cruzi*²⁰.

Es aspectos beneficiosos para la salud, la ingesta de los aceites esenciales del orégano favorece la expulsión de los gases acumulados en el intestino. Debido a esta propiedad es muy recomendado para aquellas personas que presenten meteorismo y flatulencia además se recomienda el consumo de los aceites esenciales del orégano a las personas que tengan problemas digestivos como: el estreñimiento, digestión lenta, entre otros, ya que debido a sus cualidades medicinales favorece la función biliar mejorando la digestión. Debido a lo mencionado anteriormente se recomienda consumir después de las comidas. El orégano posee muchas sustancias dentro de su composición (como los flavonoides) que favorecen la circulación sanguínea. Por lo tanto es muy recomendable su ingesta para prevenir problemas cardíacos y la aparición de trombos. También ayuda a calmar cefaleas producidas por una mala circulación sanguínea. Los aceites esenciales del orégano están muy recomendados para aquellas mujeres que sufren de cólicos menstruales, ya que a sus beneficios medicinales la ingesta de estos aceites disminuyen dichos dolores ²¹.

El aceite de orégano es uno de los principales antisépticos naturales y tiene un amplio poder microbicida, no tiene la tendencia conocida para el desarrollo de la resistencia. El aceite de Orégano puede acabar o bloquear el crecimiento de cualquier hongo, así como también inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias. Por sus principales compuestos como lo es el carvacol y timol que son los más activos y que contienen un efecto sinérgico para aumentar las propiedades antisépticas²¹.

Sin embargo no se recomienda el uso del aceite esencial de orégano durante un periodo prolongado de tiempo ni a dosis mayores que las recomendadas, debido a su posible neurotoxicidad. Muy raramente puede producir irritación, hiperexcitabilidad nerviosa, nerviosismo, insomnio e incluso convulsiones. En los niños pequeños se debe tener especial cuidado al usar el aceite esencial puro y no sobrepasar nunca las dosis diarias recomendadas, ya que puede resultar neurotóxico y convulsivante. Tampoco debe usarse durante el embarazo a dosis

mayores que las usadas en la alimentación, dado que se ha descrito que incrementa la muerte celular en los embriones de hembras de ratón que han ingerido aceite esencial en la dieta además no debe usarse durante la lactancia a dosis mayores que las usadas en la alimentación, debido a la ausencia de datos que avalen su seguridad. Se ignora si los componentes del orégano son excretados en cantidades significativas con la leche materna, y si ello puede afectar al niño. Se recomienda suspender la lactancia materna o evitar la administración del orégano²⁰.

Los coliformes totales pertenecen a las Enterobacteriaceae, son lactosa-positivas y constituyen un conjunto de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30 - 37°C. Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Y son varios los géneros que forman parte del grupo coliforme entre estos encontramos: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Donde se pueden encontrar en el intestino del hombre y de los animales, pero también se encuentran en el agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc²².

Los coliformes fecales tienen semejanzas con los totales en lo que se refiere a morfología, la capacidad de fermentar lactosa, ser aerobios y anaerobios, pero se distinguen en la capacidad de resistir temperaturas, a diferencia de los totales, los fecales pueden fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en un tiempo de incubación de 24 a 48 horas a una temperatura de 44.5°C en condiciones de laboratorio²³.

Los microorganismos mesófilos crecen a una temperatura óptima de 20 a 45° C, siendo la mínima 15 a 20° C, y la máxima de casi 45° C. La mayoría de los microorganismos pertenecen a esta categoría, casi todos los agentes patógenos

humanos son mesófilos, como es de esperar, pues la temperatura corporal humana es, casi de forma constante, de 37° C. La mayoría de alimentos industrializados, excluyendo a los productos fermentados, debe ser inapropiados para el consumo cuando presentan una gran cantidad de microorganismos, aun cuando no sean patógenos y no hayan modificado las características organolépticas del alimento. Recuento elevados en alimentos estables a menudo indican sustancias primas contaminadas, la presencia de las bacterias aerobias mesófilas significa que se dieron condiciones adecuadas a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano animal²⁴.

I.4. Formulación del Problema

¿Cuál es el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre coliformes y mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente?

I.5. Justificación del estudio

En la actualidad, hay un significativo aumento de ventas de hamburguesas en carritos sin ninguna forma de conservación. Es por este motivo que se realiza esta investigación para dar a conocer a los vendedores de hamburguesas una forma segura y natural de prevenir la proliferación de bacterias en los alimentos, debido a que, la conservación de los alimentos, ha sido un tema de mucho interés para el ser humano desde los inicios del hombre en la tierra. A finales del siglo XIX se descubrieron los microorganismos y de su implicación como causa de las enfermedades, por ende se establecieron las fundantes para la generación de principios científicos que puedan lograr prevenir la contaminación, evitar la proliferación, inactivar de manera segura los microorganismos en los alimentos y la elaboración de técnicas que permitan su detección. En algunos casos, la eliminación de microorganismos no puede hacerse por métodos físicos, lo que motiva al empleo de sustancias conservadoras naturales que actúan, química o bioquímicamente, sobre la célula de los microorganismos, rompiendo su membrana, bloqueando su actividad enzimática o perjudicando su estructura genética. De tal forma que se incorporan al alimento para aumentar

su estabilidad y seguridad microbiológicas, aumentando el tiempo de vida útil del alimento. Pueden usarse aisladamente o en mezcla y son capaces de detener o inhibir los procesos de fermentación, putrefacción, crecimiento de hongos y otras modificaciones biológicas de alimentos y bebidas y deberán asegurar la inocuidad del alimento así como mantener las características sensoriales del mismo²⁵.

1.6. Hipótesis

H1: El aceite esencial de *Origanum vulgare* tiene efecto antibacteriano sobre los coliformes y los mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.

H0: El aceite esencial de *Origanum vulgare* no tiene efecto antibacteriano sobre los coliformes y los mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.

1.7. Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre coliformes y mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.

Objetivos Específicos

- Determinar el recuento de bacterias coliformes totales en carnes de hamburguesa preparadas artesanalmente con aceite esencial de *Origanum vulgare* a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.
- Determinar el recuento de bacterias mesófilas viables en carnes de hamburguesa preparadas artesanalmente con aceite esencial de *Origanum vulgare* a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.
- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre coliformes totales.

- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre bacterias mesófilas viables.

II. METODO

2.1. Diseño de investigación

Experimental de estímulo creciente

M1: 0%

M2: 25%

M3: 50%

M4: 75%

M5: 100%

Procedimiento

En la preparación de aceite esencial, se utilizó la técnica de arrastre de vapor de agua. La extracción con vapor, se lleva a cabo a presión atmosférica: si los componentes pueden sufrir hidrólisis, el proceso se efectúa a presión reducida. Los extractores constan de las siguientes partes: una fuente de calor que genera vapor (cocina), un balón para alojar tallos y hojas del orégano, un embudo de decantación y condensador. *El Origanum vulgare* (hojas y tallos) se seca a una temperatura de 45° C durante cuatro días, y luego es colocada dentro de un balón, donde se incorpora directamente vapor saturado, el cual es producido por una estufa eléctrica y a presiones más elevadas que la atmosférica, el vapor de agua atraviesa las hojas y el tallo del *Origanum vulgare* colocada en el balón, donde extrae y arrastra el aceite esencial que tiene bajo punto de volatilización y lo lleva hasta el condensador, donde al enfriarse se

condensa y es donde se separa el agua con el aceite por densidad. El aceite es más denso que el agua, queda al fondo; de esta manera es fácil la separación.²⁶

Luego de obtener el aceite esencial de *Origanum vulgare*, se le agrego como parte de los ingredientes a las carnes de hamburguesa, en las diferentes concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) dejándolas a temperatura ambiente por un tiempo de 6 horas. También se realizaron dos grupos controles, el primero al momento de la preparación de las carnes y el segundo luego de las 6 horas, este procedimiento tubo cuatro repeticiones.

En la preparación de la muestra Se colocó 225 ml de solución de NaCl al 0.9% (SSF) en un matraz estéril de 500 mL y se incorporaron 25 g. de carne de hamburguesa preparada artesanalmente. Se agitó suavemente en forma giratoria en ambos sentidos. Así, la dilución de la muestra quedó al décimo (10^{-1}). Después, se formó una batería de diluciones, de acuerdo a los siguientes pasos: Se colocaron en una gradilla, 5 tubos de ensayo estériles de 15x150 mm rotulándolos con 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , luego se agregó a cada tubo 9 mL de SSF estéril. Se tomó 1mL de solución 10^{-1} del matraz y se agregó al tubo 10^{-2} , donde se agito en un vortex e inmediatamente después se tomó 1 mL del tubo 10^{-2} y se agregó al tubo 10^{-3} , se agito y se prosiguió con el mismo mecanismo hasta llegar al tubo 10^{-7} .

La determinación de microorganismos Coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se basa por la capacidad que tiene este grupo de bacterias en fermentar la lactosa con producción de ácido y gas.²⁷ para esto se colocaron en una gradilla 3 tubo de 12 x 100 mm en donde se agregó a cada tubo 6ml del medio de cultivo (caldo verde brillante Merck) estéril. Luego, se adiciono 0.3 ml de la disolución 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se rotularon los tubos, según la disolución agregada. Todo esto frente a un mechero en condiciones de

asepsia y bioseguridad, después se llevaron a la incubadora a 30° C por 24 horas.

La determinación de microorganismos mesófilos por la técnica de recuento de placa, la cual se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. ²⁷ Para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables, se utilizó el método de siembra por incorporación; para ello, se colocaron sobre la mesa de trabajo 3 placas Petri estériles donde se agregaron 18 a 20 ml aproximadamente de medio de cultivo estéril (Agar PCA Merck), se dejó solidificar el medio de cultivo y con la ayuda de una micropipeta se sembró 0,1 ml de la dilución 10^{-5} a una placa, 0,1 ml de la dilución 10^{-6} y 10^{-7} a la otra placa, y se rotularon las placas, según sea la dilución agregada. Todo esto frente al mechero en condiciones de asepsia y bioseguridad. Después, se invertirán las placas y llevarán a la incubadora a 30°C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias.

2.2. Variables y operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
----------	-----------------------	------------------------	-------------	--------------------

<p>Concentración del aceite esencial de <i>Origanum Vulgare</i></p>	<p>El aceite esencial es el aceite volátil y oloroso de la planta, producido por glándulas secretoras o células especializadas dentro del tejido vegetal o bien en la superficie de esta. Los aceites esenciales son el resultado del metabolismo secundario de las plantas.²⁸</p>	<p>Se considera cuatro concentraciones diferentes y control placebo.</p> <p>M1: 0% M2: 25% M3: 50% M4: 75% M5: 100%</p>	<p>Tiene efecto: si logra reducir el recuento de bacterias coliformes.</p> <p>No tiene efecto: si no logra disminuir el recuento de bacterias coliformes.</p>	<p>Cualitativa Nominal</p>
---	---	---	---	----------------------------

Recuento coliformes	de	El grupo coliforme se define como todas las bacterias Gram negativas de origen fecal en forma bacilar, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la B-galactosidasa. ²⁹	Coliformes totales con caldo verde brillante. Se considera la norma técnica NTS 0071 – 2008 – MINSA. ³⁰	<p>< 50 UFC/g Apto para el consumo</p> <p>50 a 500 UFC/g en riesgo</p> <p>> 500 UFC/g No apto para el consumo</p>	Cualitativa Ordinal
Recuento mesófilos	de	En este grupo se encuentran todas las bacterias, capaces de crecer en presencia de oxígeno a una temperatura adecuada entre 20°C y 45°C. ³¹	Mesófilos en Agar PCA. Se considera la norma técnica NTS 0071 – 2008 – MINSA. ³⁰	<p>< 10⁶ UFC/g Apto para el consumo</p> <p>10⁶ a 10⁷ UFC/g en riesgo</p> <p>>10⁷ UFC/g No apto para el consumo</p>	Cualitativa ordinal

2.3. Población, muestra y muestreo

Muestra: 30 carnes de hamburguesas

Muestreo: No probabilístico, aleatorio por conveniencia.

2.4. Métodos de análisis de datos

Prueba estadística ANOVA para comparar los promedios de los recuentos de bacterias obtenidos en las diferentes de aceite esencial de *Origanum vulgare*.

2.5. Aspectos éticos

- Veracidad de los datos
- Respeto a la propiedad intelectual

III. RESULTADOS

Presencia de Coliformes en carne de hamburguesa preparada artesanalmente según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*

Coliformes	Concentración											
	Control I		Control II		100%		75%		50%		25%	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
No apto	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100
Apto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100

En la tabla 1, se aprecia una totalidad de muestras con un resultado de no apto para el consumo por la presencia de >1100 UFC/g de coliformes en carne de hamburguesa preparada artesanalmente, según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Presencia de Mesófilos en carne de hamburguesa preparada artesanalmente según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*

Mesófilos	Concentración											
	Control I		Control II		100%		75%		50%		25%	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Apta	4	100	4	100	2	50	2	50	4	100	4	100
No apta	0	0	0	0	2	50	2	50	0	0	0	0
Total	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100

En la tabla 2, se aprecia 50% de muestras son aptas para consumo humano en concentraciones de 75% y 100% con aceite esencial de *Origanum vulgare* y no apto el otro 50% de las muestras restantes, por presentar $>10^7$ UFC/g de mesófilos en carne de hamburguesa preparada artesanalmente.

Análisis de varianza de las UFC de Mesófilos según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	226975,5	5	45395,1	4,059	0,012*
Dentro de grupos	201301,9	18	11183,4		
Total	428277,5	23			

*p<.05

En la tabla 3, se evidencia una diferencia estadística significativa entre la presencia de UFC de Mesófilos según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Tabla 4. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan de la presencia de UFC de Mesófilos según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*

Concentración (%)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
75%	4	106,18	
100%	4	126,58	
50%	4		262,75
Control I	4		333,00
Control II	4		333,00
25%	4		333,00
Sig.		,062	,400

En la tabla 4, se observa una igualdad estadística entre la UFC de Mesófilos con concentraciones de 75% a 100% y una igualdad estadística entre los controles I y II y los grupos para concentraciones de 25% - 50%, formándose dos grupos estadísticamente diferentes.

IV. DISCUSIÓN

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEOV) sobre coliformes y mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente. Como se puede observar en la tabla 1, se aprecia una totalidad de muestras con un resultado de no apto para el consumo, porque hay presencia de >1100 UFC/g de coliformes en carne de hamburguesa preparada artesanalmente, según concentraciones de AEOV, demostrando así que no hay efecto del aceite esencial sobre este tipo de bacterias. En general son más efectivos los aceites de las especias y hierbas frente a organismos Gram positivos, que frente a bacterias Gram negativas³². Desde otro punto de vista en la investigación de Gomez A.³³ donde demostraron el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*), llegaron a la conclusión que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales se reduce considerablemente en carnes, productos cárnicos y pescado con alto contenido de grasa.

En la tabla 2, se aprecia 50% de muestras son aptas para consumo humano en concentraciones de 75% y 100% con aceite esencial de *Origanum vulgare* y no apto las muestras restantes, por presentar >107 UFC/g de mesófilos en carne de hamburguesa preparada artesanalmente, por lo tanto hay efecto del AEOV sobre mesófilos, reduciendo la carga microbiana. Estos datos son semejantes a los que reporto Hilbay L.³⁴, que al realizar la estimación de tiempo de vida útil de la carne de cuy sometida a un tratamiento con aceite de orégano al 30%, por medio del desarrollo de Aerobios mesófilos. Obteniendo como resultado 1.5×10^2 Ufc/g; logrando mantener un color, olor, sabor, aceptable y una vida útil de 40 días mantenida a 4°C.

En la tabla N° 3, Análisis de varianza de las UFC de Mesófilos según concentraciones de aceite esencial de *Origamun vulgare*, se evidencia una diferencia estadística significativa entre la presencia de UFC según concentraciones. Y en la tabla 4, se observa una igualdad estadística entre la

UFC de Mesófilos con concentraciones de 75% a 100%. En un estudio realizado por Solís P.²¹ en carne de pollo, utilizando aceite esencial de orégano y tomillo, presentó un efecto antibacteriano sobre *Salmonella spp.* y *S. aureus*, en concentración total (100 %), logrado reducir la carga microbiana. Por lo tanto las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) requeridas en alimentos son mayores a las registradas in vitro³³.

El presente estudio también demuestra que el aceite esencial de *Origanum vulgare* es efectivo como bioconservador en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.

V. CONCLUSIÓN

- Mediante el estudio realizado se evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre coliformes y mesófilos en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente, logrando así el desarrollo de un método de conservación, mejorando el tiempo de vida útil del alimento en comparación al grupo control.
- En la evaluación del recuento de bacterias coliformes totales, todas las pruebas dieron resultados negativos en las diferentes concentraciones., al presentar muestras con un resultado de no apto para el consumo por la presencia de >1100 UFC/g de coliformes en carne de hamburguesa preparada artesanalmente, según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*.
- Se determinó el recuento de bacterias mesófilas viables en carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente con aceite esencial de *Origanum vulgare* en las diferentes concentraciones, demostrando así que a concentraciones del 75 y 100% hubo una reducción notable de la carga microbiana.
- No hay efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre las bacterias coliformes totales.
- Hay efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre las bacterias mesófilas viables.

VI. RECOMENDACIONES

- Capacitar a los vendedores de hamburguesas sobre los métodos naturales de conservación de las carnes.
- Educar a los vendedores sobre las buenas prácticas de manipulación de alimentos
- Estudiar y Realizar trabajos de investigación sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* en las bacterias coliformes totales presentes en la carnes de hamburguesas preparadas artesanalmente.
- Estudiar el comportamiento del aceite esencial en otros tipos de carnes y alimentos perecederos para prolongar el tiempo de vida útil.
- Identificar cuáles son las bacterias que reaccionan frente al aceite esencial de *Origanum vulgare*.

VII. REFERENCIAS

1. Irianda, P., Benedito J. Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos. Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia. 2011. España.
2. Mera Mendoza, R. Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) como agente antimicrobiano en la conservación de la carne de dos especies de tilapia: negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*). Quevedo – Ecuador, Universidad técnica estatal de Quevedo facultad de ciencias de la ingeniería. 2015
3. Graciela Michelena. Producción segura de carnes y lácteos – Análisis de contaminación. Laboratorio Central de Salud Pública, Instituto biológico. Argentina. 2008
4. Bastos M., E., Damé L., et al. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Revista cubana de Plantas Medicinales, 2011; 16(3): 260-266.
5. Solís campoverde, P., Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Tesis de Grado. Riobamba- Ecuador. Escuela superior politécnica de Chimborazo Facultad de ciencias. Escuela de bioquímica y farmacia. 2011
6. Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., et al. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. Rev. FCA UNCUYO. 2011; 43(1): 237-245.
7. Levario A., González M., Orégano como antimicrobiano frente a cepas multirresistentes. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua México: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 2011.
8. Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić A., Et al. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *thymus vulgaris* essential oils. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 2013; 65 (2), 639-643.

9. Vázquez M., Alvarado P., Rodríguez I., et al. 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. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas, 2014; 34(1): 57-68.
10. Chávez L., Díaz F., Escalante G., Estrada E., Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum Vulgare* a la gentamicina en cultivos de *Escherichia Coli*. Lima, Perú. Universidad Nacional Federico Villareal, Ciencia e investigación medico estudiantil latinoamericana, 2008; 13(2)
11. Vale Silva, L., Joao Silva, M., Oliveira, D., et al Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *Virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. Journal of Medical Microbiology (2012), 61,252–260.
12. Fornari, T., Vicente, G., Vazquez, E., Garcia-Risco, M. R., & Reglero, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. J Chromatogr A, 2012. 1250, 34-48.
13. Elizari Reta, I. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo incorporados en soluciones formadoras de films sobre la microbiota superficial de filetes de merluza. Tesis de grado, Universidad pública de navarra. Departamento de Tecnología de Alimentos. Pamplona, Septiembre 2013.
14. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. Society of Chemical Industry. 2013.
15. Gutierrez, J., Rodríguez, G., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. Journal of Food Protection, 2008 71(9), 1846-1854.
16. Hulankova, R., Borilova, G., & Steinhäuserova, I. Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. Meat Science, 2013 95(2), 190-194.

17. Fernandez Pan, I., Mendoza, M., & Mate, J. I. Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. *J Sci Food Agric*, 2013 93(12), 2986-2994.
18. Ocares Cerón, Mara. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Valdivia – Chile, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 2012.
19. Reyes Jurado, F., Palou, E., López Malo., A. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Rev. Temas selectos de ingeniería de alimentos* 2012 6(1): 29 – 39.
20. Del Villar Ruiz de la Torre, J., Melo Herráiz, E. Guía de plantas medicinales del magreb cuadernos de la fundación Dr. Antonio Esteve nº 18. Barcelona 2010. P. 73 - 75
21. Solís Campoverde, P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Tesis de Grado. Riobamba- Ecuador, Escuela superior politécnica de Chimborazo Facultad de ciencias. Escuela de bioquímica y farmacia. 2011.
22. Paredes A., Implementación del protocolo para la determinación de coliformes totales y *E. coli* en agar chromocult para la asociación municipal de acueductos comunitarios amac. Universidad tecnológica de Pereira, facultad de tecnologías. 2014.
23. Pérez C., Presencia de coliformes totales y fecales en el agua del rio Matlacobatl, Xico, Veracruz, México. Universidad Veracruzana, facultad de biología. 2011.
24. Zazueta G. Estudio de la calidad sanitaria de la cafetería del Itson campus centro CD. Obregón. Tesis de grado. Junio 2007
25. Urbina G. evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial extraído de la candia (*hibiscus esculentus*) aplicada a la conservación de hamburguesa de res. Trabajo de grado. Colombia, Universidad de Cartagena facultad, 2011.
26. Lossi E., Obtención de aceite esencial del flavelo del fruto del naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) tipo blanca, variedad valencia, empleando el método de

- destilación por arrastre de vapor a nivel laboratorio, en función de diferentes tipos de corte y contenido de humedad. Tesis de Grado. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería. Guatemala, febrero de 2012.
27. Camacho, A., M. Giles., et al. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 2009
 28. Guerra BL, evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional, Trabajo de grado, Universidad autónoma de nuevo león Facultad de medicina, 2011.
 29. Carillo Zapata, E., Lozano Caicedo, A., Validacion del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult, Bogotá - Colombia, Pontificia universidad javerina, Facultad de ciencias, microbiología industrial. 2008.
 30. NTS N° 071 – MINSA – V.0.01. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, 27 de agosto del 2008.
 31. Red nacional de laboratorios de análisis de alimentos. Manual de análisis microbiológicos de los alimentos. Vol III. 2014
 32. Gómez A., López A., Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*), Rev. Temas selectos de ingeniería de alimentos 2009 3(1): 33 – 45.
 33. Hilbay L., 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*), Trabajo de grado, Universidad técnica de Ambato, Faculta de ciencias e Ingenierías de alimentos. Ambato – Ecuador. 2015.

ANEXOS

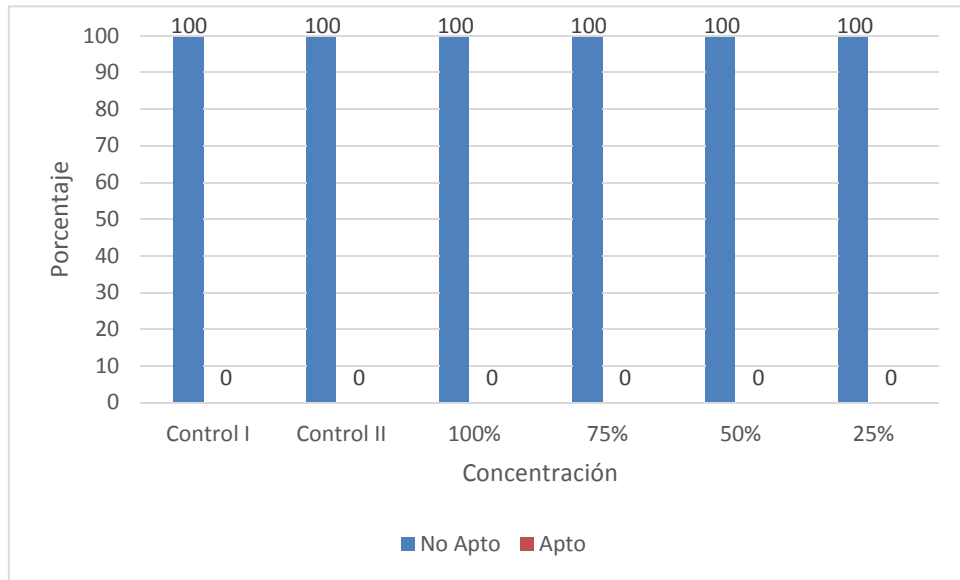


Figura 1. Presencia de Coliformes en carne de hamburguesa preparada artesanalmente según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*. Fuente: Tabla 1

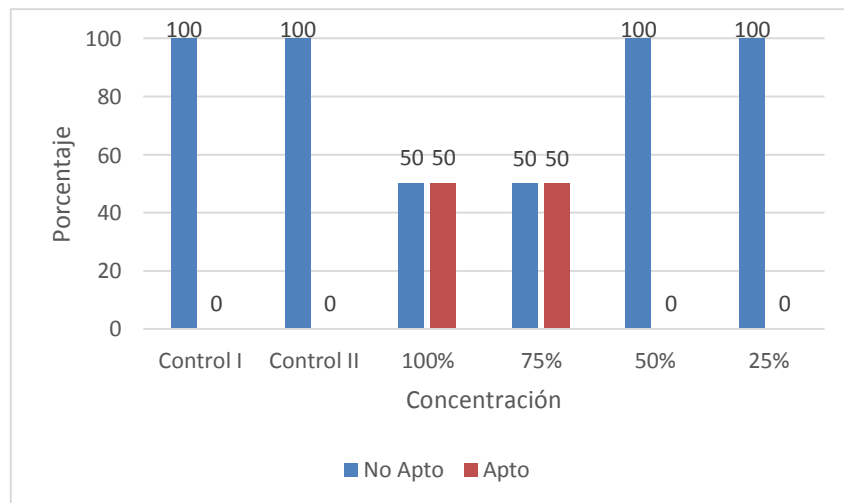


Figura 2. Presencia de Mesófilos en carne de hamburguesa preparada artesanalmente según concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare*. Fuente: Tabla 2.

Extracción del Aceite Esencial



Preparando medios de cultivos





Pesando las muestras de carne de hamburguesa



Agregando el aceite esencial de *Origanum vulgare* a las muestras de carne



Siembras de muestras



Siembras de muestras

