



**Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* con potencial uso en películas antimicrobianas aplicadas en la industria láctea**

**Alba Lucía Corredor Espinel**

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Microbiología Industrial  
Bogotá D.C 2021**



**Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* con potencial uso en películas antimicrobianas aplicadas en la industria láctea**

**Alba Lucía Corredor Espinel**

**Deyci Rocío Rodríguez Cordero**  
**Directora**

**Ana Karina Carrascal Camacho**  
**Jurado**

**Dra. Alba A Trespacios, PhD.**  
**Decana**  
**Facultad de Ciencias.**

**Dra. Marcela F. Correa, PhD.**  
**Directora de carrera**  
**Microbiología industrial**

**Pontificia Universidad Javeriana**  
**Facultad de Ciencias**  
**Microbiología Industrial**  
**Bogotá D.C 2021**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

*“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”*

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis amados padres, por su amor y apoyo incondicional durante todo este proceso, por sus palabras de aliento, y por su esfuerzo que me llevan a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, valentía y a no temer de las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mi hermana Daniela y a su esposo Brandon, por su constante guía, consejos y apoyo.

A Oscar González, por su amor, apoyo incondicional, por ser testigo de mis caídas y ayudar a levantarme.

Mi más grande y sincero agradecimiento a Deyci Rodríguez, mi directora de trabajo de grado, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo de grado.

A mis amigos Angélica, Víctor y Maria Paula, por animarme cuando más lo necesitaba y por hacerme ver las grandes cosas que puedo lograr.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Antecedentes.....	9
2.2 Bases teóricas.....	10
2.2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	10
2.2.2 Sintomatología de la Listeriosis.....	10
2.2.3 Mecanismos de prevención frente a ETA.....	11
2.2.4 Aceites esenciales.....	11
2.2.5 Forma de extracción de los aceites esenciales.....	12
2.2.6 Destilación.....	12
2.2.7 Extracción con fluidos supercríticos.....	12
2.2.8 Orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	13
2.2.9 Aceite esencial de orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	14
2.2.10 Composición química del aceite esencial de orégano.....	14
2.2.11 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. METODOLOGÍA.....	17
4.1. Preparación del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
4.1.1 Obtención de la cepa Estandarización del inóculo.....	17
4.1.2 Estandarización del inóculo.....	17
4.2. Aceite esencial de Orégano <i>Origanum vulgare</i> .....	17
4.2.1 Obtención del AE.....	17
4.2.2 Preparación de diluciones y concentraciones del aceite esencial de Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	17
4.3. Controles positivos y negativos.....	19
4.4. Pruebas para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano. ....	20
4.4.1 Determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano mediante el método de Kirby Bauer.....	20

4.4.2 Determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano mediante el método de gota sobre césped.....	20
4.4.3 Determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano mediante el método de siembra en pozo.....	20
4.5. Medición de halo de inhibición.....	21
4.6. Determinación de porcentaje de inhibición.....	21
4.7. Análisis estadístico.....	21
4.8. Análisis de la información.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Método Kirby Bauer (MKB).....	22
5.2 Método Siembra en Pozo (MSP).....	23
5.3 Método gota sobre césped.....	24
5.4 Porcentaje de inhibición.....	24
5.5 Análisis de varianza.....	26
6. DISCUSIÓN.....	27
7. CONCLUSIONES.....	30
8. RECOMENDACIONES.....	31
9. BIBLIOGRAFÍA.....	32
10. ANEXOS.....	38

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial (AE) de Orégano *Origanum vulgare* frente al crecimiento de *Listeria monocytogenes*, se evaluaron 13 concentraciones del aceite bajo tres métodos para determinar el efecto antimicrobiano del AE, gota sobre césped, método de Kirby Bauer (MKB) y siembra en pozo (MSP); se empleó como control positivo una cepa de *Carnobacterium maltaromaticum* y como control negativo aceite mineral, los ensayos se realizaron por triplicado, se tomaron las medidas correspondientes de los halos de inhibición con la ayuda de un calibrador de marca Mitutoyo, para obtener medidas más precisas, se promediaron las tres medidas y se determinó el porcentaje de inhibición para cada concentración de aceite esencial. Posterior al tiempo de incubación se descartó el método de siembra en pozo debido que se presentó solapamiento de los halos impidiendo tomar las respectivas medidas, de manera que los dos métodos que se tuvieron en cuenta fueron MKB y MSP. A partir de los dos métodos de siembra se obtuvo un efecto antimicrobiano del AE de orégano frente a *L. monocytogenes*, en todas las concentraciones estudiadas se logró obtener halos de inhibición hasta la concentración 11 que iban desde los 3,7 cm hasta los 0,1 cm. Las dos concentraciones con comportamientos antimicrobianos estables fueron la 33 y 25, las cuales permitieron obtener porcentajes de inhibición de 32,2% a 39,6%, lo que podría indicar una concentración de aceite esencial adecuada para su potencial uso en películas antimicrobianas aplicadas en la industria láctea.

**Palabras clave:** Aceite esencial, orégano, *Listeria monocytogenes*, actividad antimicrobiana, inhibición.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los alimentos por patógenos como *Listeria monocytogenes* traen consigo un alto riesgo de contraer listeriosis, enfermedad que implica un alto riesgo para la salud pública del país y graves complicaciones para quienes contraigan esta patología.

*L. monocytogenes*, es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativa, perteneciente a la familia Listeriaceae, considerado como un patógeno intracelular facultativo, es un microorganismo psicrótrofo y resistente al calor, por lo que tiene la capacidad de crecer en temperaturas que van desde los 0°C a 45°C, sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, así como también tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de pH entre 4,6 y 9,2 [1]. Este microorganismo suele transmitirse por contaminación de alimentos listos para el consumo como quesos frescos, germinados crudos, jamones, salchichas, patés, cortes fríos, pescados o por el consumo de mariscos ahumados [2] dando lugar a la enfermedad transmitida por alimentos (ETA) conocida como listeriosis, esta, se puede presentar de forma invasiva causando meningitis, septicemia y abortos espontáneos; y en forma no invasiva causando una leve gastroenteritis [3]. Según datos de la OMS la listeriosis es una enfermedad de la cual no se presentan gran cantidad de casos pues dice que, se presentan de 0,1 a 10 casos anuales por un millón de personas, lo que la lleva a ser un serio problema de salud pública [4]. En el presente año, cuatro estados de Estados Unidos reportaron trece casos de personas infectadas con *L. monocytogenes* por consumo de queso fresco, cuatro de estas personas se encontraban en estado de embarazo, de las cuales dos tuvieron abortos espontáneos, una de las trece personas falleció y los otros doce recibieron atención hospitalaria [5]. Según la base de datos de SIVIGILA, en Colombia durante los últimos dos años no se han presentado casos de personas enfermas, sin embargo, del año 2017 al 2019 se reportaron nueve casos de esta enfermedad de los cuales seis fueron por el consumo de queso fresco [1], sin embargo, se han realizado estudios que han comprobado la presencia de esta bacteria en alimentos derivados de los lácteos como el queso [6].

Es por esta razón que se debe garantizar la implementación de diferentes estrategias que permitan prevenir la contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes*, especialmente durante el proceso de producción, entre las cuales se destacan el control y análisis de materia prima recibida por los proveedores, identificación de los factores de riesgo durante la producción para ejercer un control estricto que permita identificar los puntos críticos donde se podría generar una contaminación del alimento por este patógeno, de manera que sea posible



aplicar acciones correctivas y garantizar por medio del plan de acción la inocuidad del alimento [7]. Otra gran estrategia de prevención que se ha venido implementando es por medio del uso de agentes antimicrobianos naturales, estos son compuestos derivados de plantas, tejidos animales, microorganismos e incluso de algunos minerales, que poseen la capacidad de disminuir o eliminar la presencia de microorganismos patógenos o alteradores de alimentos, por esta razón son considerados una alternativa para garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos listos para el consumo como lo es el queso [8].

Los agentes antimicrobianos de origen vegetal incluyen los aceites esenciales que se obtiene a partir de las hojas, flores, rizomas, bulbos y otras partes de las plantas, es allí donde se encuentra comúnmente contenida la actividad antimicrobiana, esta es atribuida especialmente a la presencia de compuestos fenólicos como los terpenos y monoterpenos que al interactuar con la membrana de las células pueden llegar a causar daños irreversibles que conducen a la lisis celular. [9]. El aceite esencial de orégano presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos alteradores de los alimentos debido a la presencia de carvacrol y timol en su composición química [10]. Previamente se ha evaluado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente al crecimiento de *L. monocytogenes* en queso como estrategia de mitigación, obteniendo resultados favorables que se atribuyen a sus compuestos fenólicos del [11]. Es por esto, que se pretende generar una alternativa con potencial aplicación en la industria láctea para el control de este microorganismo en los alimentos listos para el consumo como los quesos, mediante el uso del aceite esencial de *Origanum vulgare* como agente antimicrobiano.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

A lo largo de los años se han venido implementando el uso de especias con efecto antimicrobiano para prevenir el crecimiento de diversas bacterias, en el año 2011 Bastos y colaboradores evaluaron la concentración bactericida mínima del aceite esencial de orégano frente a 71 bacterias aisladas de leche bovina de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium* y de tres cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En este estudio frente a las bacterias aisladas de leche obtuvieron como resultado una concentración bactericida mínima media de 0,23% a 2%, y para las cepas patrón la concentración bactericida mínima fue de 3,17% y 0,35 % para *S. aureus* y *E. coli* respectivamente, sin embargo, el aceite esencial de orégano no presentó efecto antimicrobiano frente a *P. aeruginosa* [12].

Para el año 2020 se realizó una evaluación de diferentes concentraciones de aceite esencial (AE) de orégano frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus*, en este estudio se obtuvo el AE por medio de hidrodestilación, a este aceite se le determinó el perfil de compuestos químicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), de igual manera determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución y la concentración mínima bactericida (CMB) por medio de siembras en agar. A partir del perfil de compuestos químicos que se le realizó al AE de orégano determinaron la presencia de monoterpenos de baja concentración como el carvacrol en un 1.7% y timol en un 11.9%, para *L. monocytogenes* se obtuvo una concentración mínima inhibitoria y bactericida del 4%, esto fue determinante para considerar el AE de orégano como agente antimicrobiano con posible uso en la industria alimentaria para prevenir contaminación y problemas de salud pública [13].

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos**

Son aquellas que se producen por la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas de microorganismos patógenos que afectan directamente la salud del consumidor, las ETA abarca un importante problema de salud pública debido que la incidencia de estas enfermedades es indicador de un mal manejo en la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos [14]. La contaminación de estos se puede dar durante el proceso de producción o por la manipulación de materia prima de baja calidad. Uno de los patógenos responsables de causar estas enfermedades es *L. monocytogenes*, esta bacteria, en humanos provoca una infección conocida como listeriosis, la vía de transmisión oral se produce principalmente por la ingesta de alimentos contaminados como leche y derivados lácteos sin pasteurizar, frutas, verduras, germinados crudos, jamones, pescados o mariscos ahumados [2].

### **2.2.2 Sintomatología de la Listeriosis**

La listeriosis hace parte del grupo de las ETA y afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos mayores. Esta enfermedad se puede presentar de dos maneras, de forma invasiva y no invasiva; en el proceso de embarazo esta infección se presenta de forma invasiva donde puede provocar abortos espontáneos, muerte fetal, o partos prematuros, si bien esta infección en las madres se presenta de forma no invasiva, se puede transmitir de manera vertical, es decir, el feto puede adquirir la listeriosis presentando síntomas como la septicemia, apatía y mala alimentación [15]. En pacientes de la tercera edad que presentan antecedentes clínicos se han reportado casos de listeriosis invasiva provocando meningitis, esto se debe a que los adultos mayores se encuentran en un estado de inmunosenescencia producida por el propio proceso de envejecimiento que los hace más susceptibles a contraer enfermedades [16].

### **2.2.3 Mecanismos de prevención frente a ETA**

Actualmente, los temas relacionados a la inocuidad alimentaria han tomado más importancia ya que con la presencia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos se han buscado formas de inhibir o prevenir el crecimiento microbiano y la contaminación en los alimentos.

En la industria de alimentos se implementan diversos métodos para garantizar la inocuidad y así prevenir las ETA, claros ejemplos de estos mecanismos son la esterilización y pasteurización, que permiten la destrucción de microorganismos empleando altas temperaturas [17]. Así como la implementación de las buenas prácticas de manufactura (BPM) que implican seguir normas generales de higiene en los procesos de manipulación, preparación, envasado, almacenamiento, transporte y distribución de alimentos, siguiendo la resolución 2674 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social, donde se indican los requisitos sanitarios que se deben cumplir para llevar a cabo actividades como las anteriormente mencionadas con el fin de proteger la vida y salud de las personas [18]. Los principios generales de higiene de los alimentos recomiendan la implementación de un Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC), para asegurar la calidad de los alimentos, de manera que la aplicación de estos principios y de las BPM, permiten operar dentro de condiciones ambientales favorables para la producción de alimentos inocuos [19]

Una alternativa que podría ser implementada en la industria es utilizar productos naturales como los aceites esenciales que cumplen un papel de agentes antimicrobianos frente a diversos patógenos, estos aceites presentan activos químicos que previenen el crecimiento de microorganismos que pueden ser causantes de enfermedades [20].

### **2.2.4 Aceites esenciales**

Son líquidos oleosos aromáticos extraídos de diferentes partes de las plantas, como, por ejemplo, semillas, hojas, raíces, brotes, corteza. [21]. Los AE poseen gran variedad de aplicaciones, como las farmacológicas donde son implementados como excipientes y aromatizantes para la preparación de jarabes o suspensiones, en la industria cosmética hacen uso de estos para la elaboración de fragancias y productos que se basan en las funciones específicas de ciertas esencias sobre la piel, otro gran uso que se le da a los aceites esenciales es por medio de la aromaterapia, que se considera como una disciplina de la medicina natural que se enfoca en el uso de AE para la elaboración de tratamientos [22].

Se conoce que los aceites esenciales (AE) poseen actividad antioxidante y antimicrobiana, razón por la cual es posible hacer uso de estos como aditivos naturales en productos alimenticios, esta actividad antimicrobiana generalmente es conferida por la composición química de los diferentes AE, estos suelen ser terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), compuestos aromáticos (aldehídos, alcoholes y fenoles) y terpenoides (isoprenoides) [23].

### **2.2.5 Forma de extracción de los aceites esenciales**

El método de extracción de los AE afecta significativamente los componentes químicos y la composición de los mismos, de manera que este debe ser seleccionado de manera conveniente para mantener y concentrar el compuesto activo del aceite [24].

### **2.2.6 Destilación**

Es la forma tradicional de aislar compuestos volátiles como lo son los AE del material vegetal, durante el proceso de destilación las plantas aromáticas expuestas al vapor o al agua hirviendo liberan sus AE a través de la evaporación, al ser dos líquidos inmiscibles (agua y aceite) se facilita la recuperación del AE. Existen diferentes tipos de destilación, dentro de los cuales se encuentran; destilación HD, destilación agua/vapor y destilación por arrastre de vapor, siendo esta última la más utilizada para la obtención de AE a gran escala, sin embargo, el aumento de la demanda, y la necesidad de llevar a cabo estos procesos de manera rápida en la industria hoy en día representa una pérdida costosa de tiempo y energía, además de favorecer la degradación de compuestos sensibles al calor [25].

### **2.2.7 Extracción con fluidos supercríticos.**

Este método hace circular a través del material vegetal cortado en trozos un líquido supercrítico que en la mayoría de los casos es dióxido de carbono líquido que actúa como solvente extracto, esto permite que las esencias sean solubilizadas y arrastradas, este líquido se elimina por descompresión, obteniendo así una esencia pura [26].

### 2.2.8 Orégano *Origanum vulgare*

La planta de orégano crece en forma de arbusto, puede alcanzar una altura de 80 cm, sus hojas brotan pareadas y opuestas, son ovaladas y terminan en punto, suelen tener un aspecto ligeramente peludo en ambas caras [27].

El orégano hace parte de las hierbas aromáticas más utilizadas en la cocina a nivel mundial, también ha sido reconocido desde la antigüedad por sus aplicaciones en la medicina tradicional por efectos benéficos que ha tenido sobre la salud, especialmente en las afecciones respiratorias y digestivas. Sin embargo, sus usos y valor comercial han ido aumentando debido al contenido de aceite esencial y oleorresina que posee [28]. Su clasificación taxonómica es: [29]

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Género: *Origanum*

Especie: *vulgare*

Nombre binomial: *Origanum vulgare*

Nombre común: Orégano



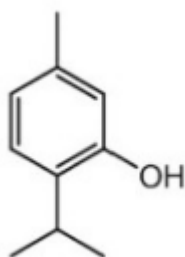
**Figura 1.** Planta de orégano [30]

### 2.2.9 Aceite esencial de orégano *Origanum vulgare*

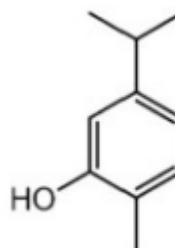
Se caracteriza por ser un líquido de color amarillo, olor fuerte y agradable, además por su amplio rango de usos, dentro de los cuales se ha encontrado que este aceite confiere actividad antimicrobiana y puede llegar a ser un sustituyente de los conservantes sintéticos de los alimentos [31].

### 2.2.10 Composición química del aceite esencial de orégano

La composición química de los aceites esenciales puede verse afectada por el medio ambiente, lugar de origen de cosecha de la planta y el método de extracción, sin embargo, los compuestos más comúnmente encontrados en este aceite son: alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano, flavonoides como la apigenina y la luteolina, así como de derivados fenólicos como el carvacrol y el timol, estos monoterpenos son los encargados de conferir el olor, sabor y fragancia del aceite [31].



**Figura 2.** Estructura química del Timol [31]

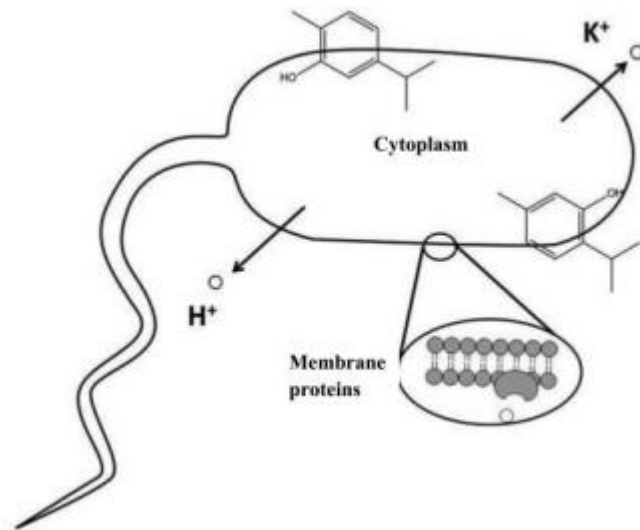


**Figura 3.** Estructura química del Carvacrol [31]

### 2.2.11 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano

El carvacrol y el timol son los principales agentes antioxidantes y antimicrobianos presentes en el aceite esencial de orégano, estos compuestos fenólicos constituyen alrededor del 78 al 85% del aceite esencial. Su actividad antimicrobiana se atribuye a su actividad lipofílica, razón por la cual generan daños en las estructuras de la membrana celular, provocando la expansión de esta ocasionando un aumento en la fluidez y la permeabilidad, inhibiendo la respiración, altera los procesos de transporte de iones, afecta la actividad proteica. Estos monoterpenos

actúan como agentes antioxidantes, debido a su acción sobre los radicales libres provocando un retardo en la oxidación de los lípidos [32].



**Figura 4.** Efecto del Carvacrol y Timol sobre la membrana plasmática [32].



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano *Origanum vulgare* frente al crecimiento de *L. monocytogenes*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

**3.2.1** Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano *Origanum vulgare* frente al crecimiento de *L. monocytogenes*.

**3.2.2** Establecer la mejor concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* con actividad antimicrobiana frente al crecimiento de *L. monocytogenes* con potencial aplicación en la industria láctea.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes*

#### 4.1.1 Obtención de la cepa Estandarización del inóculo

La cepa de *L. monocytogenes* fue suministrada por la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana, correspondiente a la ATTC 19115.

#### 4.1.2 Estandarización del inóculo

La reactivación de la cepa se realizó en agar tripticasa de soya (TSA) suplementado con extracto de levadura durante 18h a 37°C, y se estandarizó el inóculo basado en el patrón 5 de la escala de McFarland, lo que corresponde a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml la cual se verificó mediante un recuento en placa [33].

### 4.2. Aceite esencial de Orégano *Origanum vulgare*

#### 4.2.1 Obtención del AE

El aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* que se empleó para la realización del presente trabajo de grado es un producto comercial de la marca Young Living®, el método de obtención del aceite fue por medio de destilación de vapor.

#### 4.2.2 Preparación de diluciones y concentraciones del aceite esencial de Orégano (*Origanum vulgare*)

Para preparar las diluciones del aceite esencial se procedió inicialmente a medir el volumen correspondiente a 1 gota de este, se realizaron 10 mediciones con ayuda de una micropipeta, se realizó promedio y se determinó un volumen de 40  $\mu$ L por gota de aceite esencial, se prepararon 12 diferentes diluciones, la 0 corresponde al aceite esencial puro. Se realizaron las

diluciones del aceite esencial de Orégano con aceite mineral tal como se representa en la tabla 1.

**Tabla 1.** Tabla de diluciones del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare*

Dilución	Aceite esencial (µL)	Aceite mineral (µL)
0	40	-
1	40	40
2	40	80
3	40	120
4	40	160
5	40	200
6	40	240
7	40	280
8	40	320
9	40	360
10	40	400
11	40	440
12	40	480

Fuente: Autor

Para determinar la concentración del aceite esencial de orégano presente en cada dilución se empleó la ecuación de volumetría (1):

$$C1 * V1 = C2 * V2 \quad (1)$$

Donde C1, hace referencia a la concentración de aceite esencial inicial (100%), V1 al volumen de aceite esencial de orégano empleado para cada dilución, C2 a la concentración final de aceite esencial presente en cada dilución y V2 al volumen final que comprende el aceite esencial de orégano y el aceite mineral. De manera que se obtuvieron las concentraciones consignadas en la tabla 2.

**Tabla 2.** Tabla de concentraciones del aceite esencial de orégano *Origanum Vulgare*

<b>Dilución</b>	<b>Concentración</b>
0	100
1	50
2	33
3	25
4	20
5	17
6	14
7	13
8	11
9	10
10	9
11	8
12	7.7

Fuente: Autor

### **4.3. Controles positivos y negativos**

Como control positivo de agente antimicrobiano frente al crecimiento de *L. monocytogenes* se empleó una cepa de *Carnobacterium maltaromaticum* (Micocin ®II) a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/ml de la casa comercial Griffith Laboratories y como control negativo se utilizó el mismo aceite mineral con el cual se prepararon las diluciones del aceite esencial de orégano.

#### **4.4. Pruebas para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano.**

##### **4.4.1 Determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano mediante el método de Kirby Bauer**

Esta prueba se realizó con el fin de evaluar cualitativamente diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* frente al crecimiento de *Listeria monocytogenes* “*in vitro*”. Esta técnica consistió en sembrar el inóculo de *L. monocytogenes* previamente estandarizado en placas de agar TSA suplementado con extracto de levadura, posteriormente se tomaron discos de papel filtro (6 mm) impregnados de las diferentes diluciones del aceite esencial de orégano (**Tabla 1**) y se situaron sobre el agar, este ensayo se realizó por triplicado. Las cajas de petri se llevaron a incubar a 37°C por 18 horas [34].

##### **4.4.2 Determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano mediante el método de gota sobre césped.**

Inicialmente se prepararon las cajas de petri utilizando agar Plate count como medio base, se preparó agar TSA a una concentración del 70% para inocular con *L. monocytogenes*. Una vez solidificado el medio base se procedió a agregar un volumen de 5 mL de agar TSA + inóculo, posterior a esto se agregaron las diluciones del aceite esencial previamente preparadas (**Tabla 1**) con ayuda de una micropipeta, se llevaron a incubar las cajas a 37°C por 18 horas. [35]

##### **4.4.3 Determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano mediante el método de siembra en pozo.**

Para llevar a cabo esta técnica se realizó una modificación a lo indicado por Tag y McGiven [36], se preparó el medio de cultivo TSA suplementado con extracto de levadura, se sirvió en las cajas de petri y una vez solidificado se realizó una siembra masiva en superficie del inóculo de *L. monocytoneges* con la ayuda de un escobillón, se procedió a abrir agujeros de 4mm de diámetro con un pitillo estéril, para esto se dividieron las cajas en cuatro partes iguales para ubicar cuatro diferente concentraciones, se procedió a agregar 20µL de cada concentración en

los pozos previamente realizados, se llevó a incubar 18h a 37°C. Finalmente este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

Los tres métodos anteriormente descritos fueron aplicados también al control positivo y negativo (*C. maltaromaticum* y aceite mineral respectivamente).

#### **4.5. Medición de halo de inhibición.**

Se realizó posterior a las 18 horas de incubación, se tomaron tres mediciones por halo utilizando como instrumento de medición un calibrador de marca Mitutoyo para obtener medidas más precisas, a las medidas de cada concentración se le calculó el promedio para poder determinar el porcentaje de inhibición.

#### **4.6. Determinación de porcentaje de inhibición**

Se determinó tomando la medida obtenida del control positivo correspondiente a cada método (MKB y MSP), se tomaron los promedios de los halos de inhibición de cada concentración, se multiplicaron por la medida del control positivo (*C. maltaromaticum*), se dividió por este mismo valor y se multiplicó por 100. (Anexo D)

#### **4.7. Análisis estadístico**

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), teniendo en cuenta que el diseño experimental se basó en la evaluación de trece concentraciones del aceite esencial de Orégano, por triplicado, frente al crecimiento de *Listeria monocytogenes*, obteniendo así un diseño experimental de 13\*3\*1.

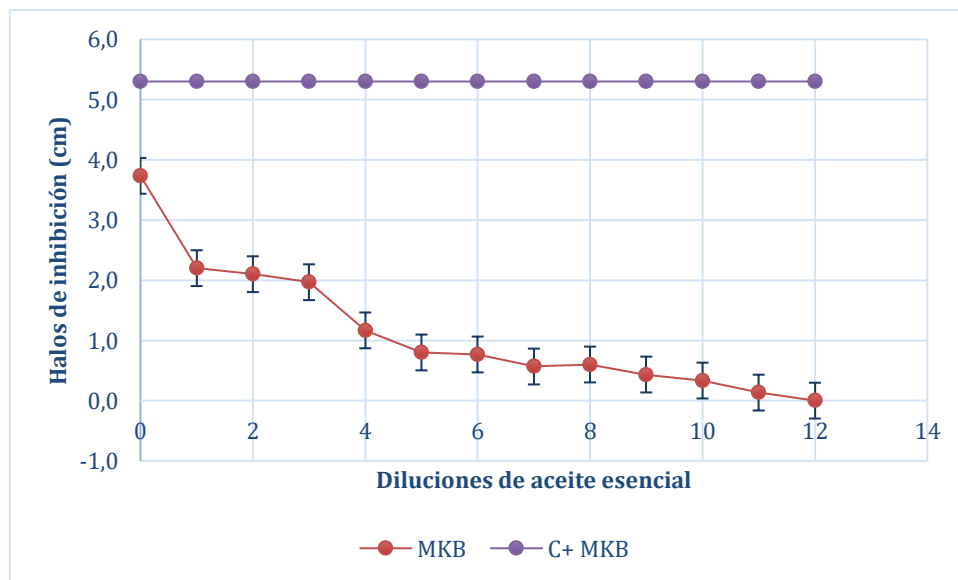
#### **4.8. Análisis de la información**

Los datos se colectaron en hojas de cálculo de Microsoft Excel y se evaluaron mediante el análisis de varianza ANOVA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Método Kirby Bauer (MKB)

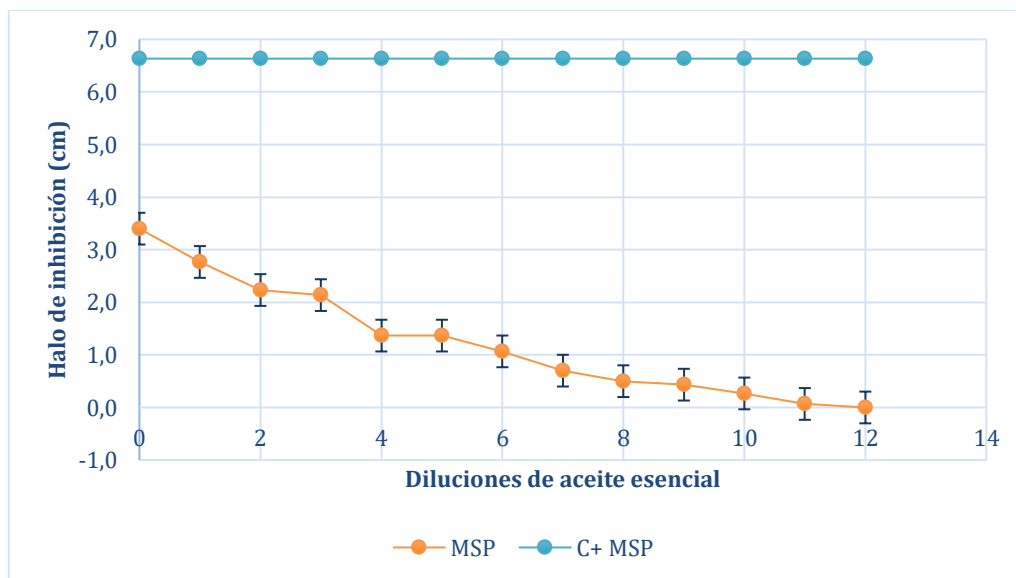
En la **figura 5** se presenta el promedio de las tres mediciones que se hicieron a los halos correspondientes a cada dilución de aceite preparada (**tabla 1**), el promedio de estas medidas está representado en cm y con las siglas MKB, por otra parte, se encuentra el valor promedio del control positivo (*C. maltaromaticum*) frente al crecimiento de *L. monocytogenes* (5.3cm). La concentración que presentó un halo de inhibición de mayor tamaño corresponde a la concentración 100, donde se evaluó el aceite esencial puro, sin embargo, las concentraciones 50, 33 y 25 que corresponden a las diluciones 1,2 y 3, demostraron tener un comportamiento similar frente al crecimiento del patógeno evaluado teniendo halos de inhibición de 2.2, 2.1 y 2.0 respectivamente, se puede evidenciar que, a pesar de haber realizado doce diluciones al aceite, este seguía teniendo un efecto de inhibición sobre *L. monocytogenes*. Todos los valores presentados corresponden a la medida del halo con la resta del disco de papel filtro empleado en este método.



**Figura 5.** Halos de inhibición (cm) del MKB y del control positivo C+MKB, frente a las diferentes diluciones de aceite esencial de orégano *Origanum Vulgare*.

## 5.2 Método Siembra en Pozo (MSP)

En la **figura 6**, se encuentran representados los datos correspondientes al promedio de los halos para cada dilución de aceite esencial de orégano preparadas (**Tabla 1**), estos datos están presentados en cm y con las siglas MSP, por otra parte, se encuentra el valor promedio de los halos de inhibición del control positivo (*C. maltaromaticum*) frente al crecimiento de *L. monocytogenes* (6,6 cm). Respecto a los halos de inhibición obtenidos para cada concentración se puede evidenciar que bajo este método el aceite esencial de orégano puro logró un halo de inhibición de 3.4 cm, las concentraciones 33 y 25 mantuvieron un comportamiento similar frente al crecimiento del patógeno en estudio con halos de inhibición de 2.2 cm y 2.0 cm respectivamente, es posible observar que a partir de la dilución 6 la medida de los halos es inferior a 1 cm y que para la dilución 12, es decir, para la concentración 7,7 de AE no se evidenció la formación de halo de inhibición, por lo que se presume que a esta concentración el aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.



**Figura 6.** Halos de inhibición (cm) del MSP y del control positivo C+MSP, frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano *Origanum Vulgare*.

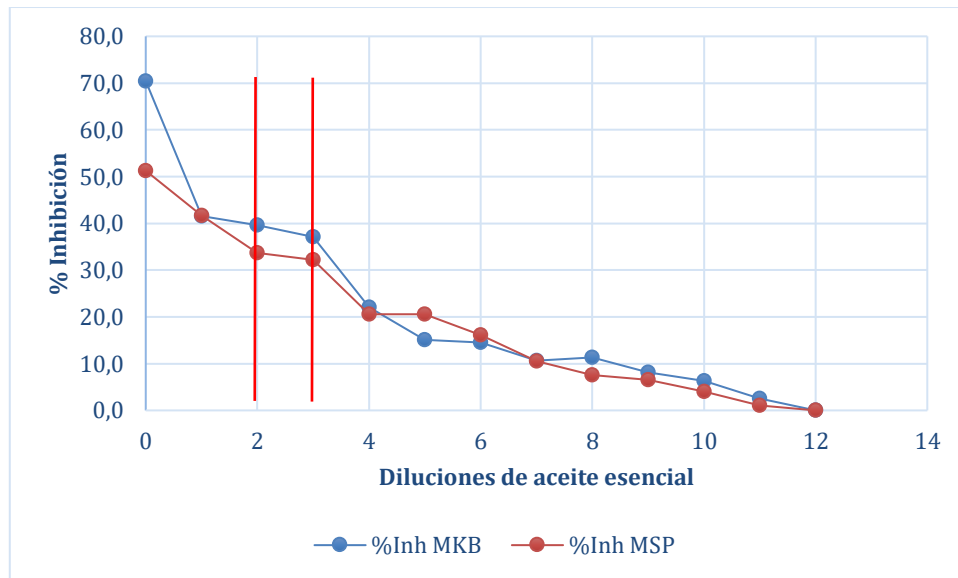


### 5.3 Método gota sobre césped

Al cabo de 18 horas de incubación a 37°C, se observó una dispersión en los halos que pudo deberse al solapamiento del aceite, este método fue descartado al no permitir observar ni medir de manera clara los halos de inhibición.

### 5.4 Porcentaje de inhibición

En la **Figura 7** están representados los porcentajes de inhibición de las concentraciones de aceite esencial de orégano frente al crecimiento de *L. monocytogenes*, este porcentaje se obtuvo con relación al control positivo (*C. maltaromaticum*) correspondiente a cada método. A partir de los resultados se puede evidenciar que los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron bajo la mayor concentración de AE evaluada, esto indica que por sí solo el aceite puro tiene la capacidad de conferir un efecto inhibitorio de 71.4% y 51.3%. A pesar de haber obtenido porcentajes de inhibición para todas las concentraciones de aceite evaluadas es posible evidenciar que entre más diluido esté el aceite más pequeño va a ser este porcentaje, permitiendo obtener para la concentración 12 un 0% de inhibición para los dos métodos (MKB y MSP). Las líneas verticales hacen referencia a las concentraciones 33 y 25 donde se evidenció un comportamiento similar frente a *L. monocytogenes* en los dos métodos evaluados, con porcentajes de 39.6% y 37.1% para el método Kirby Bauer (MKB) y porcentajes de 33.7% y 32.2% respectivamente para el método Siembra en Pozo (MSP).



**Figura 7.** Porcentajes de inhibición de los aceites esenciales en los dos métodos de siembra, (MKB y MSP) frente a las doce diluciones de aceite esencial de orégano *Origanum vulgare*.

## 5.5 Análisis de varianza

El análisis de varianza se llevó a cabo por medio de ANOVA, el rango de datos que se tomó fue correspondiente a los promedios de los halos de inhibición obtenidos para cada método empleado (MKB y MSP), el valor de alfa para el análisis fue de 0,05.

**Tabla 3.** Análisis de varianza (ANOVA) para evaluación estadística de los halos de inhibición de cada método empleado MKB y MSP.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Probabilidad (P-valor)	Valor crítico para F
Entre MKB y MSP	0,08692	1	0,08692350	0,07452936	0,787188091	4,259677
Dentro de MKB y MSP	27,9911	24	1,1662988			
Total	28,0780	25				

Fuente: Autor

El valor de alfa se fijó en 0,05, lo que indica que el error del estudio puede ser de un máximo del 5%, mientras que el 95% restante se atribuye a la confiabilidad del estudio realizado. Teniendo en cuenta esto, a partir de los resultados obtenidos del análisis de varianza se pudo determinar un P-valor  $> 0,05$ , por lo tanto, se aprueba la hipótesis del presente trabajo de investigación que hace referencia al efecto antimicrobiano que posee el aceite esencial de orégano frente al crecimiento de *L. monocytogenes*.

## 6. DISCUSIÓN

La composición química del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* permitió obtener resultados favorables sobre la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* aun cuando el aceite fue diluido 12 veces (tabla 1), según Mendoza, *et al*, 2018 [37] el carvacrol y el timol influyen en gran medida en la actividad antimicrobiana, debido que estos compuestos fenólicos afectan directamente la composición de la membrana celular, provocando alteraciones en los procesos de transporte de iones potasio modificando la permeabilidad de la misma llegando a causar lisis celular. Además, Rodríguez, *et al*, 2017 [38] afirman que la actividad antimicrobiana del carvacrol se relaciona con la alteración de las proteínas de la membrana citoplasmática, ocasionando comportamientos disfuncionales en la síntesis de ARN y en la actividad ATPasa afectando directamente la respiración celular. Basado en estos antecedentes teóricos y en los resultados obtenidos a partir de los dos métodos empleados (Kirby Bauer y Siembra en pozo) para evaluar el efecto antimicrobiano, es posible afirmar que el aceite esencial de orégano tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* debido al contenido de carvacrol y timol en su composición, esto se puede evidenciar también ya que a pesar de haber diluido el aceite doce veces, en la concentración 11 (**Tabla 1**) se evidenció aún un efecto inhibitorio, lo que lleva a confirmar la alta concentración de estos componentes fenólicos presentes en el aceite esencial evaluado, confirmando así lo evaluado por Lu, *et al*, 2018 [39] donde se determinaron porcentajes de carvacrol y timol del 72.25% y de 6.62% respectivamente, llegando a la conclusión que entre más altos sean los porcentajes de dichos fenoles la probabilidad de obtener daños en la membrana celular eran más altas.

A partir de los resultados evidenciados en la **Figura 5** y **Figura 6** donde se evaluaron las concentraciones de aceite esencial preparadas mediante dos métodos de siembra y con el fin de establecer la mejor concentración del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* con actividad antimicrobiana frente al crecimiento de *L. monocytogenes*, los halos de inhibición concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio con los obtenidos por Carrillo, 2020 [40] donde la concentración de AE de orégano que presentó una mayor actividad antimicrobiana frente al crecimiento de *L. monocytogenes* fue medida por un halo de inhibición de 2.5cm, en el presente estudio las concentraciones que más se asemejan a lo encontrado por Carrillo [40] son la 33 y la 25, que al evaluar el porcentaje de inhibición cuentan con un rango de 32,2% a 39,6% teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los dos métodos de siembra,

estas concentraciones podrían ser las indicadas para llevarlas a una potencial aplicación en la industria láctea, por medio de la incorporación de estas en películas antimicrobianas sin generar efectos adversos sensoriales.

La necesidad de querer implementar alternativas naturales que permitan garantizar la seguridad alimentaria viene de lo expuestos que están los productos listos para el consumo de ser contaminados por microorganismos patógenos, esta contaminación puede generarse durante el almacenamiento, transporte o procesamiento, lo que implica grandes pérdidas en la calidad y composición de nutrientes de estos alimentos [41]. Las películas antimicrobianas son consideradas como envases que permiten mejorar la estabilidad de los alimentos frescos y listos para el consumo confiriendo una extensión de la vida útil de los mismos [42]. Asimismo, la adición de agentes antimicrobianos como ácidos orgánicos, extractos de plantas, bacteriocinas y aceites esenciales en películas permite disminuir o inhibir el crecimiento de microorganismos logrando así asegurar la calidad del alimento por un tiempo prolongado y un menor riesgo de contagios por enfermedades transmitidas por alimentos [43]. A lo largo de los años se ha venido estudiando la implementación del aceite esencial de orégano como agente antimicrobiano en películas para recubrir alimentos, Guzmán, *et al.* [44] evaluaron una película comestible incorporada con una concentración de aceite de orégano frente a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Typhi* obteniendo resultados favorables con un porcentaje de inhibición del 100% frente a los patógenos anteriormente mencionados, llegando a la conclusión de poder incorporar el aceite esencial como una alternativa potencial en la conservación de los alimentos. De igual manera, Diniz, *et al.*, 2019 [45] lograron incrementar la vida útil de queso hasta 21 días empleando una película suplementada con una mezcla de aceites esenciales de orégano y de romero, sin generar alteraciones en las características fisicoquímicas y organolépticas del alimento. Por esta razón, las dos concentraciones que mejor se adaptan a las características anteriormente mencionadas son la 2 y la 3 ya que mantienen un porcentaje de inhibición estable frente al crecimiento de *L. monocytogenes* y al encontrarse diluidas no generarían mayores cambios en las características organolépticas de los alimentos, sin embargo, se considera que su uso se emplee en alimentos derivados lácteos que contengan especias como el orégano para causar menores alteraciones en los mismos al emplear la película antimicrobiana.

Estas películas antimicrobianas pueden realizarse a base de concentrado de proteína de suero lácteo, empleando glicerol o sorbitol como agente plastificante y un agente antimicrobiano para la acción frente al crecimiento de diferentes microorganismos, en el presente estudio se

pretendían realizar pruebas con el aceite esencial de orégano como agente antimicrobiano en la elaboración de películas antimicrobianas, sin embargo, a pesar de haber empleado glicerol como agente plastificante, pasado el tiempo de secado las películas no solidificaron. El procedimiento que se pretendía realizar era similar al implementado por Seydim, *et al*, 2006 [46] sin embargo, en este estudio además del concentrado de proteína de suero lácteo, glicerol y adiciones del aceite esencial añadieron cera de candelilla que favorece la solidificación de la misma, en los ensayos que se realizaron en el presente estudio la no solidificación de las películas pudo deberse a la falta de un agente que aportara la solidificación, por el bajo contenido de proteína empleado para realizar las películas, o por cambios en la temperatura de calentamiento que se debe mantener a 90°C para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Sydim, *et al* [46] evaluaron el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano, romero y ajo, sin embargo, el aceite que mostró tener un mayor efecto antimicrobiano fue el aceite de orégano frente al crecimiento de *S. aureus*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* y *L. delbrueckii*, permitiéndoles llegar a la conclusión de que la adición de aceites esenciales en los alimentos permitirá obtener una reducción y prevención de las comunidades bacterianas, sin embargo, las concentraciones empleadas del aceite pueden llegar a alterar las características sensoriales de los alimentos. Otra novedosa alternativa que se ha implementado para la elaboración de películas antimicrobianas fue llevada a cabo por Wang, *et al*, 2019 [47] donde se enfocan en la elaboración de estas películas a base de nanofibras de aislado de proteína de suero lácteo, empleando glicerol como agente plastificante y empleando uno de los componentes que confieren actividad antimicrobiana al aceite esencial de orégano como lo es el carvacrol, esto con el objetivo de aplicar dichas películas sobre queso cheddar recién cortado, llegando a la conclusión de que esta nueva aplicación del concentrado de proteína de suero lácteo puede convertirse en una novedosa alternativa para el recubrimiento de alimentos recién cortados y favorecer su almacenamiento manteniéndolos protegidos de las posibles contaminaciones con microorganismos como *L. monocytogenes*, además, se comprobó que esta nueva composición de películas antimicrobianas confiere una mayor protección de barrera en los alimentos, y una mejora en la calidad de los mismos.

## 7. CONCLUSIONES

El aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* demostró tener un efecto antimicrobiano favorable frente al crecimiento de *Listeria monocytogenes* mediante los dos métodos de siembra empleados (Kirby Bauer y Siembra en pozo).

El aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* demostró tener actividad antimicrobiana mediante porcentajes de inhibición de 71,4% y 51,3% para la concentración 100 frente al crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Las concentraciones 33 y 25 de aceite esencial de orégano permitieron observar un efecto inhibitorio constante frente al crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los dos métodos de siembra empleados, de manera que estas serían las concentraciones a tener en cuenta para una potencial aplicación en las películas antimicrobianas empleadas en productos provenientes de la industria láctea.

## 8. RECOMENDACIONES

Llevar a cabo trabajos de investigación donde se estudie el efecto del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* frente al crecimiento de diferentes patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Realizar estudios donde se evalúe el efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* frente a las características de los diferentes alimentos de la industria láctea.

Ampliar las alternativas de elaboración de películas antimicrobianas, evaluando el uso de diferentes materiales y la adición del aceite esencial de orégano buscando favorecer el efecto protector y antimicrobiano de las mismas frente al crecimiento de microorganismos y que a su vez permitan que el alimento conserve sus características fisicoquímicas y organolépticas.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal - Reporte técnico de *Listeria monocytogenes* para queso en Colombia. 2019.  
doi.org/10.33610/23576189.2019.43
- [2] Centros para el Control y la Prevención de enfermedades (CDC). *Listeria* (Listeriosis). 2017. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/prevention.html>
- [3] Thakur M, Kumar R, Patial V. *Listeria monocytogenes*: A Food-Borne Pathogen. Handbook of Food Bioengineering, Academic Press. Pág 157-192, 2018.
- [4] Organización Mundial de la Salud. Listeriosis. 2018. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- [5] Centros para el Control y la Prevención de enfermedades (CDC). Listeria Outbreak Linked to Queso Fresco Made by El Abuelito Cheese Inc. 2021. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/hispanic-soft-cheese-02-21/esp/index.html>
- [6] Ocampo I., et al. Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales comercializados en Cali Colombia. Acta Agronómica, 68(2):108-114. 2019
- [7] Instituto Nacional de Salud (INS). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. 2011. Recuperado de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Erlisteria-en-lpc.pdf>
- [8] Munera G. Encapsulación de antimicrobianos naturales en sistemas nano y microestructurados: técnicas y aplicaciones en tecnología de alimentos. *Un. Pol. Val.* 2020.
- [9] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 223-253. 2004.

- [10] Zhou Y, Sun S, Bei W, Reda M, Yuan Q, Liang H. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Int. J. Biol. Macromol.* 112(1): 7-13. 2018.
- [11] Govaris A., Botsoglou E., Sergelidis D., Chatzopoulou P. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere, *LWI*, 44(4):1240-1244, 2011. doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.022
- [12] Bastos M, Damé L, de Souza L, Almeida D, Alves M, Braga J. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Rev cubana Plant Med.*; 16(3):260-266. 2011.
- [13] Carhuallanqui A, Salazar M, Ramos D. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Rev. investig. Altoandin.*; 22(1): 25-33. 2020  
doi.org/10.18271/ria.2020.530.
- [14] Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semanal - Las enfermedades transmitidas por alimentos-ETA. 2018. Recuperado de: <https://bit.ly/3HtMOgW>
- [15] Tesini B. Listeriosis en recién nacidos. Manual MDS; 2020. Recuperado de: <https://www.msmanuals.com/es/hogar/salud-infantil/infecciones-de-los-reci%C3%A9n-nacidos/listeriosis-en-reci%C3%A9n-nacidos>
- [16] Antonio M, Gudiol C, Royo-Cebrecos C, Grillo S y col. Current etiology, clinical features and out comes of bacteremia in older patients with solid tumors. *Journal of Geriatric Oncology*, 10(2): 246-51. 2018.  
doi.org/10.1016/j.jgo.2018.06.011
- [17] Juliarena P., Gratton R. Tecnología, ambiente y sociedad - Conservación de alimentos. 2016. Recuperado de: <http://www.exa.unicen.edu.ar/catedras/tecnoambiente/CAP03.pdf>

[18] Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) sinónimo de responsabilidad e inocuidad en los alimentos. 2020, Recuperado de: <https://www.invima.gov.co/buenas-practicas-de-manufactura-bpm-sinonimo-de-responsabilidad-e-inocuidad-en-los-alimentos>

[19] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos, Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). 2002. Recuperado de: [https://www.fao.org/ag/agn/cdfruits\\_es/others/docs/sistema.pdf](https://www.fao.org/ag/agn/cdfruits_es/others/docs/sistema.pdf)

[20] Ortuno M. Métodos de obtención de aceites esenciales. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana Ediciones. Murcia, España. 2006.

[21] Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi E, Casabianca H, Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud F, Elaissari A. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm*, 483(1-2): 220-243. 2015.  
[doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069)

[22] Luengo M. Los aceites esenciales, aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias, *Offarm*, 22(7): 88-91. 2004.

[23] Tongnuanchan P, Benjakul S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7): 1231-1249. 2014.  
[doi.org/10.1111/1750-3841.12492](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492)

[24] Nakatsu T, Lupo A, Chinn J, Kang R. 2000. Biological activity of essential oils and their constituents. Atta-ur-Rahman (ed) *Bioactive natural products (part B)*, vol 21. Elsevier, Amsterdam.

[25] Reyes F, Franco A, Ramírez N, Palou E, López A. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling, *Food Engineering Reviews*, 7(1): 275–297. 2015.  
[doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2](https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2)

[26] Kerrola K, Kallio H. Volatile compounds and odor characteristics of carbon dioxide extracts of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. *J. Agric. Food Chem*, 41(5): 785-790. 1993.

doi.org/10.1021/jf00029a021

[27] Skoufogianni E, Solomou A, Danalatos N. Ecology, Cultivation and Utilization of the Aromatic Greek Oregano (*Origanum vulgare* L.): A Review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), 545-552. 2019.

doi.org/10.15835/nbha47311296

[28] Pezzani R, Vitalini S, Iriti M. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochem Rev* 16(1) 1253–1268. 2017.

doi.org/10.1007/s11101-017-9535-z

[29] Kintzios S. 2002. Orégano: The genera *Origanum* and *Lippia*. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles, v. 25. Taylor and Francis.

[30] Vazquez F, García D, Guerra M, Marquez F. Manual de cultivo del orégano en Extremadura (España). 2019.

[31] Arcila C, Loarca G, Lecona S, González E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam Nutr*, 54(1), 100-111. 2004.

[32] Zhao Y, Yang Y, Ye M, Wang K, Fan L, Su F. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Origanum vulgare* against *Botrytis cinerea*. *Food chemistry*, 365(2): 130506.

doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130506

[33] Rodríguez C., López L., Orjuela E. Película antimicrobiana para el control de *Listeria monocytogenes* en Jamón. *Vitae*. 19(1);144-146. 2012. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914040.pdf>

[34] Bernal, M., & Guzman, M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, 4 (3 y 4), 112-121.

[35] Orjuela E, López L, Moreno H, Rodríguez D. Film in vitro evaluation of antimicrobial protein isolate whey WPI against *Listeria monocytogenes*, *In: XVI World Congress of Food Science and Technology – IUFoST*. 2018.

[36] Tag J., McGiven A. Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol* 21 (5):943. 1971.  
doi.org/10.1128/am.21.5.943-943.1971

[37] Mendoza J, Ganem A, Camacho B, Álvarez C. Actividad bactericida del aceite esencial de orégano y dos derivados fenólicos sobre *Listeria innocua*, *Rev. iberoam. cienc.* 5(4): 19-31. 2018.

[38] Rodriguez M, Mendoza A, Aguilar G, Tellez M, Martins C, Zavala F. Carvacrol as potential *quorum sensing* inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces, *Food control.* 75(1):255-261. 2017.  
doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.014

[39] Lu M, Dai T, Murray C, Wu M. Bactericidal Property of Oregano Oil Against Multidrug-Resistant Clinical Isolates, *Front. Microbiol.* 2018.  
doi.org/10.3389/fmicb.2018.02329

[40] Carrillo E. Evaluación de la capacidad inhibitoria de mezcla de aceites esenciales de Albahaca (*Ocimum basilicum*) y Orégano (*Origanum vulgare*) en *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Universidad de Guayaquil. 2020.

[41] Vega F, Suarez Z, Tobar M, Perez J, Hurtado A, Delgado J. Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Biotecnol. sector agropecuario agroind.* 2(1): 52-60. 2017.

[42] Galet V, Cran M, Bigger S, Hernández P, Gavara R. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components, *J. Food Eng.* 149(1):9-16. 2015.  
doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.007

[43] Yuan G, Chen X, Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems, *Int. Food Res. J*, 89(1):117-128. 2016.

[doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004)

[44] Guzmán J, Castro J, Delgado E, Gallego J, Soto O. Empaque con actividad antimicrobiana a partir de aceite esencial de orégano. *Inst Tecg Durango*.

[45] Diniz H, De Sousa J, Da Silva J, Ramos R, Suely M, Fachine J, Magnani M. A synergistic mixture of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils to preserve overall quality and control *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cheese during storage. *LWT*, 112(1). 2019.

[doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.039](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.039).

[46] Seydim A, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils, *Int. Food Res. J*, 39(5): 639-644. 2006.

[doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013)

[47] Wang Q, Yu H, Tian B, Jian B, Xi J, Li D, Feng Z, Liu C. Novel Edible Coating with Antioxidant and Antimicrobial Activities Based on Whey Protein Isolate Nanofibrils and Carvacrol and Its Application on Fresh-Cut Cheese, *Journal Abbreviation*, 9(9):1-15. 2019.

[doi.org/10.3390/coatings9090583](https://doi.org/10.3390/coatings9090583)

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo A

#### Método Kirby Bauer

Tabla con las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición para cada concentración de aceite preparada representados en cm con su respectivo promedio.

**Tabla 4.** Diámetro de los halos de inhibición método Kirby Bauer

Concentración	Diámetro de los halos de inhibición (cm)				
	1	2	3	$\bar{x}$	DS
100	3,6	3,8	3,8	3,7	0,12
50	2,3	2,2	2,1	2,2	0,10
33	2,1	2,2	2	2,1	0,10
25	2	1,9	2	2	0,06
20	1,3	1,0	1,2	1,2	0,15
17	0,9	0,8	0,7	0,8	0,10
14	0,7	0,7	0,9	0,8	0,12
13	0,6	0,5	0,6	0,6	0,06
11	0,7	0,6	0,5	0,6	0,10
10	0,5	0,4	0,4	0,4	0,06
9	0,2	0,4	0,4	0,3	0,12
8	0,1	0,2	0,1	0,1	0,06
7.7	0	0	0	0	0

Fuente: Autor

Nota:  $\bar{x}$  corresponde al promedio de diámetros de los halos de inhibición por cada concentración, DS hace referencia a la desviación estándar.

## 10.2 Anexo B

### Método Siembra en Pozo

Tabla con las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición para cada concentración de aceite preparada representados en cm con su respectivo promedio.

**Tabla 5.** Diámetro de los halos de inhibición método Siembra en Pozo

Diámetro de los halos de inhibición (cm)					
Concentración	1	2	3	$\bar{x}$	DS
100	3,6	3,2	3,4	3,4	0,20
50	2,8	2,6	2,9	2,8	0,15
33	2,4	2,2	2,1	2,2	0,15
25	2,2	2,21	2	2,1	0,12
20	1,4	1,5	1,2	1,4	0,15
17	1,2	1,6	1,3	1,4	0,21
14	1	1,1	1,1	1,1	0,06
13	0,6	0,8	0,7	0,7	0,10
11	0,5	0,5	0,5	0,5	0
10	0,6	0,4	0,3	0,4	0,15
9	0,4	0,2	0,2	0,3	0,12
8	0,1	0,1	0	0,1	0,05
7.7	0	0	0	0	0

Fuente: Autor

Nota:  $\bar{x}$  corresponde al promedio de diámetros de los halos de inhibición por cada concentración, DS hace referencia a la desviación estándar.



### 10.3 Anexo C

#### Control positivo *Carnobacterium maltaromaticum*

Tabla con mediciones del control positivo con su respectivo promedio para cada método de siembra evaluado.

**Tabla 6.** Diámetro de los halos de inhibición control positivo *C. maltaromaticum*

Método de siembra	Diámetro de halos de inhibición (cm)			
	1	2	3	$\bar{x}$
MKB	5,4	5,5	5	5,3
MSP	6,5	6,8	6,6	6,6

Fuente: Autor

Nota:  $\bar{x}$  corresponde al promedio de diámetros de los halos de inhibición por cada método de siembra.

### 10.4 Anexo D

#### % Inhibición

Porcentajes de inhibición correspondientes al método Kirby Bauer (MKB) y siembra en pozo (MSP).

**Tabla 7.** Porcentajes de inhibición MKB y MSP

Concentración AE Orégano	%Inh MKB	%Inh MSP
100	70,4	51,3
50	41,5	41,7
33	39,6	33,7
25	37,1	32,2
20	22,0	20,6
17	15,1	20,6
14	14,5	16,1
13	10,7	10,6

11	11,3	7,5
10	8,2	6,5
9	6,3	4,0
8	2,5	1,0
7.7	0,0	0,0

Fuente: Autor