



**REPÚBLICA DEL ECUADOR
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO**

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS
HOJAS DE *Melissa officinalis* FRENTE A LA CEPA *Escherichia coli* PARA
LA APLICACIÓN EN QUESO TIPO FRESCO.**

Autor:

María Fernanda Rojas Vallejo

Directora:

GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **María Fernanda Rojas Vallejo** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magisteren Biotecnología, como aporte a la Línea de Alimentación y Nutrición de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 04 de febrero del 2024



María Fernanda Rojas Vallejo

C.I: 0603870395

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **Garcés Moncayo María Fernanda**, en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Rojas Vallejo María Fernanda** cuyo tema es **“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* FRENTE A LA CEPA *Escherichia coli* PARA LA APLICACIÓN EN QUESO TIPO FRESCO”**., que aporta a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología** previo a la obtención del GradoMagister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 04 de febrero del 2024



Garcés Moncayo María Fernanda

C.I: 1803571577

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ROJAS VALLEJO MARÍA FERNANDA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS HOJAS DE MELISSA OFFICINALIS FRENTE A LA CEPA ESCHERICHIA COLI PARA LA APLICACIÓN EN QUESO TIPO FRESCO ", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	56.00
SUSTENTACIÓN	36.33
PROMEDIO	92.33
EQUIVALENTE	Muy Bueno



ALEX EDWIN GUILLEN
BONILLA

Ing. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



VIVIANA LORENA
SANCHEZ VASQUEZ

Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA
VOCAL



MANUEL ALEJANDRO
FIALLOS CARDENAS

Mgtr. FIALLOS CARDENAS MANUEL ALEJANDRO
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen María, por bendecirme con mi familia, por no abandonarme y orientarme por su camino.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por su ejemplo de trabajo y constancia, por ser mi fortaleza, gracias por formarme con buenos sentimientos y valores, espero nunca defraudarles.

A mis amados hermanitos Adri, Nenita, Hernancito, quienes han sido mi mayor motivación para no rendirme y ser un buen ejemplo para ellos.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento a la Universidad Estatal de Milagro, maestría en Biotecnología.

A la MSc. María Fernanda Garcés, por su ayuda y orientación en este trabajo de investigación, mi eterno agradecimiento por su flexibilidad, disponibilidad y gran aporte a mi proyecto.

A mi familia, porque todos contribuyeron en esta gran meta, espero ser siempre un ejemplo de superación y constancia.

A mis amigos, por estar al pendiente de mi a cada momento, en mi corazón siempre estará cada cosa que hacen por mí.

Resumen

Los extractos obtenidos de plantas en la actualidad están siendo utilizados dentro de la formulación de productos alimentarios, debido a su capacidad antimicrobiana que hace frente a cepas patógenas, que atentan contra la calidad de un alimento. En esta investigación se planteó determinar la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli* para la aplicación en queso tipo fresco, para lo cual se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por medio de la obtención de un extracto acuoso de la planta, obteniendo halos de inhibición de mayor dimensión a las concentraciones de 1.5 y 2%. Se probaron las mejores concentraciones en la elaboración de quesos tipo fresco, añadiendo hojas secas de *Melissa officinalis* al 1.5 y 2% durante la etapa de cuajado y desuerado de manera que se extraigan los compuestos activos de la planta y las hojas formaran parte del queso. Se compararon los resultados de las características fisicoquímicas de los quesos con una muestra control (queso sin adición de hojas). Al adicionar hojas secas de *Melissa officinalis*, los parámetros de acidez, pH, proteína y grasa, no presentaron diferencias significativas con relación a la muestra control en ninguna de las muestras analizadas, sin embargo si se encontraron diferencias significativas en la prueba de humedad de los valores obtenidos del queso con 1.5% de hojas y 2% de hojas frente al queso sin hojas, logrando una disminución del contenido de agua del 61.25 % del control al 55.16% al adicionar las hojas secas de *Melissa officinalis*. Al analizar los atributos sensoriales de los quesos con hojas de *Melissa officinalis*, el perfil aromático y gustativo se intensifica, parámetros como textura y elasticidad se mantienen iguales que el queso control, pero se logró una mejor firmeza del queso tipo fresco al adicionar hojas de *Melissa officinalis*.

Palabras claves: *Melissa officinalis*, *Escherichia coli*, capacidad antimicrobiana.

Abstract

The extracts obtained from plants are currently being used in the formulation of food products, due to their antimicrobial capacity that confronts pathogenic strains, which threaten the quality of a food. In this research, it was proposed to determine the antimicrobial capacity of *Melissa officinalis* leaves against the *Escherichia coli* strain for application in fresh cheese, for which the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was evaluated by obtaining an aqueous extract. of the plant, obtaining larger inhibition halos at concentrations of 1.5 and 2%. The best concentrations were tested in the production of fresh cheeses, adding dry leaves of *Melissa officinalis* at 1.5 and 2% during the curdling and draining stage so that the active compounds of the plant were extracted and the leaves became part of the cheese. The results of the physicochemical characteristics of the cheeses were compared with a control sample (cheese without the addition of leaves). When adding dry leaves of *Melissa officinalis*, the parameters of acidity, pH, protein and fat did not present significant differences in relation to the control sample in any of the samples analyzed, however, significant differences were found in the humidity test of the values obtained from cheeses with 1.5% leaves and 2% leaves compared to cheese without leaves, achieving a decrease in water content from 61.25% of the control to 55.16% by adding the dry leaves of *Melissa officinalis*. When analyzing the sensory attributes of cheeses with *Melissa officinalis* leaves, the aromatic and gustatory profile intensifies, parameters such as texture and elasticity remain the same as the control cheese, but a better firmness of the fresh type cheese was achieved by adding *Melissa officinalis*.

Keys words: *Melissa officinalis*, *Escherichia coli*, antimicrobial capacity.

Índice / Sumario

Capítulo I: El problema de la investigación	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Delimitación del problema.....	4
1.3. Formulación del problema.....	4
1.4. Preguntas de investigación	4
1.5. Determinación del tema	5
1.6. Objetivo general.....	5
1.7. Objetivos específicos	5
1.8. Hipótesis.....	6
1.9. Declaración de las variables (operacionalización)	6
1.10. Justificación.....	6
1.11. Alcance y limitaciones	7
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial	9
2.1. Antecedentes.....	9
2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación	9
2.2.1. Producción lechera en el Ecuador	9
2.2.2. Queso.....	10
2.2.3. Queso tipo fresco	11
2.2.3.1. Tipos de queso fresco	11
2.2.3.2. Requisitos del queso tipo fresco.....	12
2.2.3.3. Factores que influyen contra la calidad del queso fresco	13
2.2.4. Alteraciones causadas por microorganismos patógenos en queso fresco	13
2.2.5. Antimicrobianos naturales	15
2.2.5.1. Aceites esenciales	15
2.2.5.2. Extractos botánicos	17
2.2.6. Toronjil	18
2.2.6.1. Propiedades.....	19
2.2.6.2. Composición química	20
2.2.6.3. Capacidad antimicrobiana del Toronjil.....	20
2.2.7. Métodos para determinar la capacidad antimicrobiana.....	21

CAPÍTULO III: Diseño metodológico	23
3.1. Tipo y diseño de investigación	23
3.2. La población y la muestra	23
3.2.1. Características de la población.....	23
3.2.2. Delimitación de la población	24
3.2.3. Tipo de muestra.....	24
3.2.4. Tamaño de la muestra.....	24
3.2.5. Proceso de selección de la muestra	25
3.3. Los métodos y las técnicas	25
3.3.1. Deshidratación de hojas de <i>Melissa officinalis</i>	25
3.3.2. Activación y réplica de la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25
3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	26
3.3.4. Elaboración de queso tipo fresco.....	27
3.3.5. Análisis microbiológico	27
3.3.6. Propiedades fisicoquímicas del queso tipo fresco	28
3.3.6.1. Acidez titulable	28
3.3.6.2. pH	28
3.3.6.3. Humedad	29
3.3.6.4. Proteína.....	29
3.3.6.5. Grasa	30
3.3.7. Análisis sensorial.....	31
3.4. Procesamiento estadístico de la información	31
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados	32
4.1. Análisis de los resultados	32
4.1.1. Calidad Microbiológica de muestras de queso tipo fresco	32
4.1.2. Capacidad antimicrobiana de hojas de <i>Melissa officinalis</i>	33
4.1.3. Caracterización físico-química	34
4.1.4. Evaluación sensorial.....	36

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	39
5.1. Conclusiones.....	39
5.2. Recomendaciones.....	39
Bibliografía	41
ANEXOS	49

INTRODUCCIÓN

Las intoxicaciones alimentarias, son un problema de salud pública extendido en todo el mundo, pueden ser causadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, sustancias químicas nocivas o agentes biológicos que pueden provocar enfermedades en los seres humanos (Torrens *et al.*, 2015). Actualmente la industria busca garantizar la inocuidad y seguridad alimentaria, implementando medidas de control eficaces con la utilización de conservantes antimicrobianos, que garanticen la inactivación bacteriana y que a su vez no generen efectos secundarios por su consumo (Argote *et al.*, 2017).

La búsqueda de métodos de conservación de alimentos que sean efectivos y no dependan de productos químicos sintéticos es un área de creciente interés en la industria alimentaria y la investigación científica. Los conservantes químicos tradicionales, como los nitritos, los sulfitos y algunos conservantes artificiales, han sido efectivos para controlar el desarrollo microbiano y prolongar la vida útil de los alimentos, pero su uso ha generado preocupaciones por posibles efectos secundarios en la salud humana, como alergias y sensibilidades, y algunos estudios incluso han planteado inquietudes sobre la relación entre ciertos aditivos y enfermedades crónicas (Vélez *et al.*, 2018).

En este contexto el estudio y el desarrollo de métodos de conservación de alimentos basados en la utilización de plantas son una respuesta a la creciente preocupación por los conservantes químicos en la industria alimentaria. Si bien las plantas ofrecen beneficios como alternativas naturales y seguras, es importante abordar los desafíos relacionados con su estabilidad y su posible impacto en el sabor y el aroma de los alimentos. La seguridad y la eficacia deben ser evaluadas cuidadosamente antes de su aplicación en la producción de alimentos a gran escala (Astudillo & Pucha, 2023)

Las plantas generalmente se consideran seguras para el consumo humano cuando se utilizan en concentraciones adecuadas, muchas exhiben una fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias, levaduras y hongos, lo que puede ayudar a prolongar la vida útil de los alimentos; al ser productos naturales y biodegradables

reducen su impacto ambiental en comparación con algunos conservantes químicos. Es necesario destacar, que para su integración en alimentos se requiere realizar varios estudios de seguridad y eficacia, ya que algunas limitan su aplicabilidad en ciertos alimentos y requiere técnicas de formulación específica. Es indispensable controlar el sabor y aroma ya que a concentraciones altas pueden alterar estos factores (Serra *et al.*, 2020).

En este contexto esta investigación tiene por objeto determinar la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa de *Escherichia coli* para la aplicación en queso tipo fresco.

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1. Planteamiento del problema

En la producción de queso tipo fresco, generalmente se usa leche pasteurizada de ganado vacuno, con la finalidad de eliminar la presencia de microorganismos patógenos, que puedan atentar contra la calidad del producto. Sin embargo, durante el proceso de elaboración, almacenamiento y transporte el producto podría contaminarse atentando contra la salud del consumidor (Cevallos *et al.*, 2019). Por lo cual, las actividades de producción posteriores al tratamiento térmico son consideradas de manera especial como puntos críticos de control en las industrias de producción de queso fresco (Olivares & Klotz, 2020).

Los quesos pueden contaminarse por manipulación, almacenamiento, transporte y por manipulación en el punto de distribución con microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, que es una bacteria que se desarrolla en los intestinos de las personas y los animales, en el medioambiente, en los alimentos y en el agua, causando enfermedades como diarrea, infecciones urinarias, problemas respiratorias e infecciones del torrente sanguíneo (Jiménez, 2019). Los tipos de *E. coli* que provocan enfermedades se propagan por contacto de los animales y personas con el agua y alimentos contaminados. La manera más frecuente de contraer una infección por *E. coli* es ingerir alimentos contaminados, como: carne molida, productos frescos y leche no pasteurizada (*E. coli* se desarrolla en las ubres de los vacunos o en los instrumentos ordeño) (Lojano *et al.*, 2023).

El queso tipo fresco en su composición posee un porcentaje de agua relativamente alto, siendo un medio propicio para el crecimiento de bacterias y hongos. Muchos quesos poseen un bajo contenido de sal (la sal contribuye a inhibir el crecimiento de microorganismos) en comparación a los quesos curados y la falta de ella en el queso fresco puede aumentar el riesgo de contaminación. El queso fresco suele tener un pH cercano a neutro, provocando el desarrollo de microorganismos, ya que no existe un ambiente ácido que inhiba su crecimiento (Wong *et al.*, 2021).

En este sentido, el tratamiento térmico que se realiza a la leche antes de la elaboración del queso no garantiza la ausencia de bacterias patógenas en el

producto final. Este hecho podría convertirse en un riesgo potencial para el consumidor si llega a ingerir alguna bacteria patógena presente en el queso y a su vez podría representar pérdidas significativas para el productor y punto de comercialización si es asociado con contaminación microbiológica. Motivo por el cual, es necesario buscar alternativas que garanticen la inocuidad del alimento.

1.2. Delimitación del problema

Área: Tecnología de Alimentos

Subárea: Alimentación

Sector: Industrial

Subsector: Lácteos

Espacial: Se recolectaron muestras de queso tipo fresco expandidas en el mercado Santa Rosa, ubicado en la Ciudad de Riobamba- Provincia de Chimborazo, mismas que fueron analizados en los laboratorios de Control de Calidad de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Temporal: El muestreo de queso tipo fresco se efectuó en un periodo de dos semanas. Posteriormente se determinó la capacidad antimicrobiana presente en *Melissa officinalis*, durante el mes de enero. Finalmente se realizó un análisis de datos que se efectuó en un periodo de dos semanas.

1.3. Formulación del problema

¿La determinación de la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli* para la aplicación en queso tipo fresco, podrá controlar al microorganismo responsable del deterioro del producto, sin modificar las propiedades organolépticas?

1.4. Preguntas de investigación

¿Las hojas de *Melissa officinalis* poseen características antimicrobianas que contribuyan a la conservación del queso fresco?

¿Las hojas de *Melissa officinalis* en el queso fresco influye en las propiedades organolépticas?

¿Las hojas de *Melissa officinalis* en el queso fresco influye sobre las propiedades fisicoquímicas?

1.5. Determinación del tema

La determinación del tema se basó en la búsqueda del efecto antimicrobiano que empíricamente se sabe que poseen las hojas de *Melissa officinalis* por lo cual se quiere comprobar su efecto antimicrobiano por medio de pruebas microbiológicas de laboratorio y efectividad en la elaboración de queso tipo fresco por lo que se plantea el siguiente tema de investigación: Determinación de la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli* para la aplicación en queso tipo fresco.

1.6. Objetivo general

Determinar la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli* para la aplicación en queso tipo fresco.

1.7. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de las hojas de *Melissa officinalis* sobre las propiedades fisicoquímicas del queso fresco.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli*.
- Analizar la aceptabilidad general del producto terminado por medio de evaluación sensorial.

1.8. Hipótesis

Ho *Melissa officinalis* posee propiedades antimicrobianas que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*.

Ho *Melissa officinalis* no posee propiedades antimicrobianas que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*.

Hi Las hojas de *Melissa officinalis* influyen en la calidad sensorial del queso fresco.

Hi Las hojas de *Melissa officinalis* no influyen en la calidad sensorial del queso fresco.

1.9. Declaración de las variables (operacionalización)

Tabla 1

Operacionalización de las variables

Variable	Conceptualización	Indicador	Técnicas e instrumentos
Independiente			
Actividad antimicrobiana de <i>Melissa officinalis</i>	Capacidad de <i>Melissa officinalis</i> para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como <i>Escherichia coli</i> .	Concentración mínima inhibitoria (CMI) Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i>	Discos de sensibilidad Discos de sensibilidad
Dependiente			
Propiedades organolépticas	Propiedades organolépticas que se identifican en el queso tipo fresco.	Aroma, sabor, color	Análisis sensorial
Propiedades fisicoquímicas	Propiedades fisicoquímicas que encuentran en el queso tipo fresco.	% de acidez pH % Humedad % Grasa % Proteína	Norma INEN 1528 (2012)
Perfil sensorial	Perfil sensorial que determina en el queso tipo fresco.	Humedad superficial, elasticidad, intensidad aromática, firmeza, impresión textura.	Prueba sensorial hedónica con un panel de catadores

Nota: Variable independiente y dependiente

1.10. Justificación

En nuestro país la producción de queso tipo fresco, ha incrementado significativamente en los últimos años, ya que su consumo es considerado en la

dieta diaria de la población. Se evidencia notablemente la creación de varias empresas productoras de quesos cuyas actividades son vigiladas por organismos de control sanitario. Sin embargo, el queso tipo fresco es muy susceptible a la contaminación debido a sus características, que incluyen un alto contenido de agua y un pH neutro; condiciones que son propicias para el crecimiento de microorganismos patógenos que pueden alterar la salud del consumidor.

La industria quesera en la actualidad se ha visto en la necesidad de buscar recursos que contribuyan a la obtención de productos sanos, inocuos y de calidad, buscando alternativas que permitan inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Varias empresas que buscan mejorar la conservación del queso fresco utilizan conservantes químicos en su procesamiento, alterando las características nutricionales del queso fresco, cambios en el sabor y textura, reacciones adversas en alérgicos, residuos químicos, resistencia microbiana y preferencias del consumidor (consumidores prefieren productos alimenticios sin aditivos químicos).

Es importante reemplazar estos conservantes químicos por antimicrobianos de origen natural. El uso de antimicrobianos naturales podrían contribuir a obtener productos de calidad, a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos, aumento de la vida útil del producto, protección de la cadena alimentaria y el cumplimiento de normativas y estándares de Seguridad Alimentaria. Ciertas plantas se destacan por sus propiedades antimicrobianas que pueden ayudar a reducir la presencia de microorganismos patógenos. Estos compuestos pueden ser usados en la conservación de alimentos y pueden aplicarse como aceites esenciales, extractos o infusiones.

En esta investigación planteamos determinar la capacidad antimicrobiana del *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli* para su posterior aplicación en queso tipo fresco con el fin de incrementar la vida útil del producto y controlar la proliferación de los microorganismos.

1.11. Alcance y limitaciones

Alcance.

- Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Melissa officinalis*.

- Determinación de la capacidad antimicrobiana de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli*.
- Elaboración de queso tipo fresco con adición de hojas de *Melissa officinalis*.
- Determinación de las propiedades fisicoquímicas del queso tipo fresco con adición de hojas de *Melissa officinalis*.
- Perfil sensorial del queso tipo fresco con adición de hojas de *Melissa officinalis*.

Limitaciones.

- Identificar el compuesto activo que le otorga propiedades antimicrobianas a *Melissa officinalis*.
- Eficiencia de las hojas de toronjil en un queso comercial.
- Tiempo de durabilidad de las propiedades antimicrobianas en el queso tipo fresco.
- Utilización de cepas microbiológicas (Enterobacterias, Salmonella y Shigella, Estafilococos aureus, Listeria monocytogenes) que son posibles causantes de la proliferación de microorganismo.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1. Antecedentes

Los antimicrobianos naturales son compuestos de origen natural que tienen propiedades antimicrobianas, lo que significa que inhiben o matan microorganismos como bacterias, virus, hongos y otros patógenos. Estos compuestos se encuentran en una variedad de fuentes, como plantas, alimentos, productos vegetales y microbianos.

El propósito del uso de sustancias antimicrobianas en la industria alimentaria es prevenir o controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y la descomposición en los alimentos. Estos compuestos antimicrobianos ayudan a mejorar la seguridad alimentaria, prolongar la vida útil del producto y mantener la calidad microbiológica de los alimentos.

El uso de antimicrobianos en la industria alimentaria debe cumplir con estrictas regulaciones para garantizar la seguridad y calidad del producto. Es importante gestionar el uso de forma responsable para evitar la resistencia microbiana y otros posibles efectos secundarios. Además, es fundamental que los consumidores sean conscientes de la presencia de antimicrobianos en los alimentos y sigan buenas prácticas de higiene y manipulación para garantizar la seguridad alimentaria.

Estudios indican la utilización de antimicrobianos obtenidos a partir de hierbas, considerados como compuestos naturales que se obtienen de diversas partes de las plantas, como hojas, raíces, tallos, flores o frutos, y se ha demostrado que tienen propiedades antibacterianas, antibacteriales y antifúngicas.

2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1. Producción lechera en el Ecuador

La producción láctea ecuatoriana es una parte importante de la economía agrícola del país. Ecuador cuenta con varias zonas geográficas favorables para la producción láctea. Las razas de ganado lechero más comunes en Ecuador son el

ganado Holstein, Jersey y Pardo Suizo, estas razas son conocidas por su alta producción de leche (Lonita, 2023).

Entre las provincias con mayor volumen de producción de leche, se destacan Pichincha, Azuay, Cotopaxi, Loja e Imbabura, estas áreas proporcionan condiciones climáticas y geográficas propicias para la producción y transformación de la leche. En los últimos años el gobierno de Ecuador ha implementado políticas y programas para apoyar a los productores de leche a mejorar la calidad sus productos, con el fin de aumentar la productividad y promover prácticas sostenibles (Banco Central del Ecuador, 2021).

A pesar de los avances, la industria láctea de Ecuador aún enfrenta desafíos, como la necesidad de mejorar la genética del ganado, la eficiencia de la cadena de suministro y la infraestructura de procesamiento y enfriamiento de la leche. El foco está en mejorar la calidad de la leche producida en el Ecuador, implementando buenas prácticas agrícolas y controlando enfermedades que puedan afectar la salud del ganado y la calidad del producto final (Arteaga *et al.*,2021).

En nuestro país gran parte de la producción lechera es destinada para la producción de derivados lácteos entre estos el queso tipo fresco, que se destaca por su alto consumo en todas las regiones de nuestro país (Paredes *et al.*, 2022)

2.2.2. Queso

El queso es un producto alimenticio elaborado a partir de leche que se obtiene cuajando la caseína, que se encuentra en la leche. El proceso de elaboración del queso incluye varias etapas que pueden variar según el tipo de queso. La leche utilizada para elaborar el queso puede proceder de diferentes animales, como vaca, cabra u oveja. La calidad de la leche es crucial para la producción de queso de buena calidad. Existen muchas variedades de queso en todo el mundo, cada una con sus características únicas dependiendo de factores como el tipo de leche, el proceso de producción y el tiempo de maduración (Thomas *et al.*,2019).

En Ecuador, se producen diversas variedades de queso, y su consumo es una parte esencial de la dieta local. Es importante señalar que las variedades de queso

pueden variar según la región y los métodos de producción específicos de cada productor; además, muchos quesos se elaboran de manera artesanal, lo que contribuye a la diversidad de sabores y estilos (De la Cruz González *et al.*, 2018)

2.2.3. Queso tipo fresco.

Los quesos frescos son aquellos que no han sido sometidos a un proceso de maduración y se consumen en las fases iniciales de elaboración. Estos quesos tienden a tener una textura más suave y húmeda y un sabor más suave que los quesos más maduros. El queso tipo fresco es apreciado por su versatilidad y capacidad de adaptación a diferentes preparaciones. Por lo general, están listos para ser ingeridos poco después de su elaboración y no requieren un largo período de maduración, lo que los hace perfectos para quienes buscan un queso más suave y fresco (Albán, 2006).

El queso fresco es una variedad de queso que se consume en las primeras etapas de producción y puede proporcionar una variedad de beneficios nutricionales. Es una buena fuente de proteínas de alta calidad que son esenciales para construir y reparar tejidos en el cuerpo. Al igual que otros productos lácteos, el queso fresco es rico en calcio, un mineral importante para la salud ósea. También puede aportar otros minerales como fósforo y zinc. Contiene varias vitaminas, incluida la vitamina A, que es esencial para la salud de los ojos, la piel y el sistema inmunológico. El queso fresco generalmente tiene menos grasa que los quesos más maduros, lo que lo convierte en una opción más fácil para quienes controlan su consumo de grasa (Merchán *et al.*, 2018).

En Ecuador el queso fresco es un alimento muy popular y parte de la dieta diaria de muchas personas, es valorado por su versatilidad y se utiliza en varios platos tradicionales de la cocina ecuatoriana (Solórzano, 2020).

2.2.3.1. Tipos de queso fresco

Según su composición y características físicas el queso tipo fresco se clasifica en:

- Según el contenido de humedad: Duro, semiduro, semiblando, blando.

- Según el contenido de grasa láctea: Rico en grasa, entero ó graso, semidescremado ó bajo en grasa, descremado ó magro (NTE INEN 1528, 2012).

2.2.3.2. Requisitos del queso tipo fresco

Según la (NTE INEN 1528, 2018) los requisitos químicos que debe cumplir un queso tipo fresco son:

Tabla 2

Composición química del queso fresco

TIPO	% Humedad (máximo)	% Contenido de Grasa en extracto seco (mínimo)
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero ó graso	-	45
Semidescremado ó bajo en grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0,1

Nota: Caracterización de las propiedades químicas del queso fresco (NTE INEN 1528, 2018).

En la Tabla 2 se indican los requisitos microbiológicos que debe cumplir un queso tipo fresco:

Tabla 3

Requisitos microbiológicos del queso fresco

Requisito	Número de muestras a examinar	Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.	Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.	Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.	Métodos de ensayo
Enterobacterias (UFC/g)	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli ((UFC/g)	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus (UFC/g)	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
Listeria monocytogenes /25 g	5	Ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15

Nota: Caracterización de los requisitos microbiológicos del queso fresco (NTE INEN 1528, 2018).

2.2.3.3. Factores que influyen contra la calidad del queso fresco

El queso tipo fresco puede verse afectado por diversos factores durante su procesamiento y almacenamiento; la calidad de la leche utilizada para elaborar queso fresco es crucial. La leche fresca y limpia con bajos niveles de contaminantes y bacterias no deseadas contribuyen a la producción de productos de calidad, la higiene es esencial en todas las etapas de la producción, desde el procesamiento de la leche hasta la producción y el envasado del queso fresco. La contaminación cruzada y la presencia de microorganismos dañinos pueden afectar negativamente la calidad y seguridad del producto (Arguello, 2019).

El queso fresco debe almacenarse a una temperatura adecuada para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos y mantener la frescura. La temperatura incorrecta puede acelerar el crecimiento de bacterias y afectar la textura y el sabor del queso (Castellanos, 2028).

El queso fresco no tiene un período de maduración prolongado como otros quesos y su calidad se deteriorará con el tiempo. Los productores de queso fresco deben cumplir con estrictas prácticas de fabricación, cumplir con las regulaciones alimentarias y realizar controles de calidad para garantizar un producto final de alta calidad que sea seguro para el consumo humano (Rojas, 2020).

2.2.4. Alteraciones causadas por microorganismos patógenos en queso fresco

La presencia de microorganismos patógenos en el queso tipo fresco pueden provocar diversos cambios y suponer un riesgo para la salud humana. Los microorganismos patógenos son aquellos capaces de provocar enfermedades en el ser humano, y en el caso de los alimentos, su presencia puede provocar problemas de seguridad alimentaria (Prada, 2023). A continuación, se describen los posibles patógenos presentes en el queso:

- ***Escherichia coli***. Es una bacteria común que se encuentra en los intestinos de los animales. La presencia de *Escherichia coli* (*E. coli*) en el queso fresco puede ser un riesgo para la salud pública ya que, si bien muchas cepas son inofensivas,

algunas producen toxinas dañinas, que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos (Tuttle, 2021).

La contaminación por *E. coli* en el queso fresco puede ocurrir en diferentes etapas de producción. Puede desarrollarse en la leche cruda si la materia prima no se pasteuriza adecuadamente durante el procesamiento o si se observa una mala higiene en el área de producción (Escobar, 2023). Otro problema es la contaminación cruzada causada por una mala desinfección de utensilios, superficies o equipos utilizados durante la cadena de producción. Las condiciones de conservación del queso fresco también son un factor importante. Si el queso se almacena a temperaturas inadecuadas, puede promover la presencia de *E. coli* u otras bacterias patógenas (Instituto Nacional de Salud, 2015).

- ***Listeria monocytogenes***. La presencia de *Listeria monocytogenes* en el queso fresco es un grave problema de salud pública, ya que es una bacteria que causa listeriosis, que puede ser grave, especialmente en grupos vulnerables como mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas con sistemas inmunológicos debilitados (Ocampo, 2019). La contaminación por *Listeria monocytogenes* en el queso fresco puede ocurrir en diferentes etapas de producción. Puede ingresar en la leche cruda, durante el procesamiento de materias primas o por malas condiciones higiénicas en la planta de producción. Para prevenir la presencia de *Listeria monocytogenes* en el queso tipo fresco y garantizar la seguridad alimentaria, se deben seguir buenas prácticas de manufactura y controlar rigurosamente la calidad del producto (Villanueva & Salazar, 2017).
- ***Stafilococcus aureus***. La presencia de *Staphylococcus aureus* en queso fresco es un tema importante en la seguridad alimentaria. El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que puede producir toxinas que, cuando se consumen en alimentos contaminados, pueden causar intoxicaciones alimentarias. El *Staphylococcus aureus* produce toxinas termoestables que son resistentes procesos de pasteurización y otros procesos térmicos. Si las bacterias están presentes y se

multiplican en las condiciones adecuadas, estas toxinas pueden acumularse en el queso. Los síntomas de la intoxicación alimentaria por *S. aureus* suelen aparecer rápidamente y pueden incluir náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea. Los síntomas suelen aparecer entre 2 y 6 horas después de ingerir alimentos contaminados (Chambi & Rodríguez, 2022).

- ***Salmonella y shigella***. La presencia de *Salmonella* y *Shigella* en el queso representa una seria preocupación para la salud pública, ya que ambas bacterias son patógenas y pueden causar enfermedades gastrointestinales en los seres humanos. Estos microorganismos pueden desarrollarse en el queso fresco a través de la leche cruda no pasteurizada o durante el procesamiento, manipulación y envasado del queso. Su crecimiento comúnmente está asociado con la contaminación fecal (Soto *et al.*, 2018).
- ***Enterobacterias***. Son una familia de bacterias que incluye varios géneros, los más destacados son *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Enterobacter*. La presencia de enterobacterias en el queso puede afectar la seguridad alimentaria, ya que algunas cepas pueden causar enfermedades humanas. Para garantizar la seguridad alimentaria y prevenir la presencia de enterobacterias en el queso, se deben seguir buenas prácticas de manufactura y de higiene, realizar pruebas regulares de calidad y acatar las regulaciones locales. Además, los consumidores también deben seguir prácticas seguras de manipulación y almacenamiento de alimentos (Gonzales *et al.*, 2021).

2.2.5. Antimicrobianos naturales

Los antimicrobianos naturales son sustancias que se encuentran en la que se caracterizan por inhibir o matar microorganismos como bacterias, virus, hongos y otros patógenos. Estos compuestos naturales son de interés en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, entre otros campos (Marcén, 2000). Algunos de los antimicrobianos naturales más estudiados incluyen:

2.2.5.1. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son derivados de plantas que se caracterizan por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Algunos ejemplos son el

aceite de toronjil, tomillo, laurel, eucalipto, entre otros. Se evidencian estudios, donde se determina que los aceites esenciales pueden tener efectos positivos contra una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias patógenas y hongos (Pino & Aragüez, 2021)

Los aceites esenciales se utilizan comúnmente como conservantes naturales en aromaterapia, productos de cuidado personal y la industria alimentaria. También se está explorando su potencial para desarrollar alternativas naturales a los fármacos antibacterianos tradicionales (Vignola *et al.*, 2020).

El uso de aceites esenciales en la industria alimentaria presenta varias ventajas desde el punto de vista de la salud, así como desde la funcionalidad y conservación de los alimentos.

- Propiedades antimicrobianas. Muchos aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas, lo que significa que pueden ayudar a inhibir el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos en los alimentos. Esto contribuye a la seguridad alimentaria y prolonga la vida útil del producto (Gonzales *et al.*, 2022).
- Sabores y fragancias naturales: Los aceites esenciales pueden agregar sabores y aromas naturales a los alimentos y bebidas. Su uso en formulaciones de productos puede proporcionar perfiles de sabor únicos y mejorar la experiencia sensorial del consumidor (Rodríguez *et al.*, 2022).
- Conservación de alimentos: Algunos aceites esenciales tienen propiedades antioxidantes que ayudan a prevenir la oxidación de los lípidos de los alimentos, ayudan a conservar el producto y previenen el enranciamiento (Enríquez, *et al.*, 2023).
- Alternativas a los aditivos artificiales: el uso de aceites esenciales puede proporcionar una alternativa más natural a los aditivos alimentarios artificiales. Los aceites esenciales funcionan para preservar y mejorar el sabor de forma más natural que el uso de conservantes y fragancias sintéticas (Huaraca *et al.*, 2021).
- Posibles propiedades funcionales: además de mejorar el sabor y el aroma,

algunos estudios sugieren que algunos aceites esenciales pueden tener propiedades funcionales que pueden tener efectos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, se han estudiado sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (SENA, 2021).

- Es importante señalar que, a pesar de estos beneficios, el uso de aceites esenciales en la industria alimentaria debe realizarse con precaución y de acuerdo con las regulaciones locales. Se debe considerar la concentración, pureza y selección de los aceites esenciales para garantizar la seguridad y calidad de los alimentos.

2.2.5.2. Extractos botánicos:

Muchos extractos de plantas han mostrado propiedades antimicrobianas debido a la presencia de compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Es importante tener en cuenta que la actividad antimicrobiana de estos extractos puede variar según la concentración, el método de preparación y otros factores. Además, cabe señalar que, si bien estos extractos pueden ser útiles, su uso específico debe adaptarse según sea necesario y cumplir con las regulaciones locales en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Tighe *et al.*, 2018).

Los extractos botánicos se utilizan en la producción de alimentos por sus propiedades antioxidantes y antibacterianas, además de mejorar el sabor y el aroma de los productos (Martínez *et al.*, 2019). A continuación, se muestran algunos usos comunes de los extractos botánicos en la industria alimentaria:

- **Antioxidantes:** Muchos extractos de plantas contienen compuestos antioxidantes que ayudan a prevenir la oxidación de lípidos y proteínas en los alimentos. La oxidación puede afectar la calidad del producto y producir sabores y olores desagradables (Serra *et al.*, 2020).
- **Conservantes naturales:** Los extractos botánicos con propiedades antibacterianas actúan como conservantes naturales para ayudar a inhibir el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos. Esto facilita la conservación de

los alimentos, especialmente los productos que no contienen conservantes químicos (Heredia *et al.*, 2022).

- **Sabor y el aroma:** Algunos extractos botánicos se utilizan para mejorar el sabor y el aroma de los productos alimenticios, ofrecen aromas herbáceos, especiados o florales que potencian la experiencia sensorial del consumidor (Serra *et al.*, 2020).
- **Colorantes naturales:** Algunos extractos de plantas contienen pigmentos naturales que pueden usarse como colorantes en los alimentos. Por ejemplo, el extracto de remolacha se utiliza para producir un color rojo natural (Tighe *et al.*, 2018).
- **Ingredientes funcionales:** Algunos extractos de plantas contienen compuestos con propiedades beneficiosas para la salud. Por ejemplo, los polifenoles del té verde tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y pueden incorporarse a productos como el té o suplementos (Solano, 2018).
- **Potenciadores del sabor:** Algunos extractos de plantas actúan como potenciadores del sabor, potenciando la percepción de otros sabores en los alimentos. Por ejemplo, el extracto de alga Kombucha se utiliza tradicionalmente como potenciador del umami en la cocina japonesa (Solano, 2018).

2.2.6. Toronjil

Melissa officinalis o toronjil como se la conoce en nuestro país y es una planta medicinal muy estudiada por su agradable aroma a limón y su aceite esencial que tiene un efecto estimulante general. En Ecuador, esta planta fue introducida y cultivada en diversas zonas montañosas de climas templados o cálidos, donde se propaga por semillas o ramas de raíces desprendidas; se la conoce como una de las plantas medicinales más comunes (Gallegos *et al.*, 2017).

El toronjil es una planta aromática que pertenece a la familia Lamiaceae, originaria del Mediterráneo y Oriente Medio, así como de América del Norte y del Sur. En el pasado, los griegos y romanos utilizaban esta planta con fines terapéuticos. *Melissa*

o toronjil se deriva de la palabra griega que significa abeja y se considera una planta melífera muy atractiva para los insectos (Ibarra *et al.*,2020).

Figura 1

Planta de Melissa officinalis



Nota: Melissa officinalis (Petrisor et al., 2022)

Se describe como una planta de tallos erectos, cuadrados, peludos y ramificados. Planta perenne, de 40-70 cm de altura, con hojas opuestas, ovaladas, rugosas, de color amarillo verdoso, dentadas y puntiagudas en la punta, su color es rosa, amarillento o blanco azulado. La planta se destaca por su agradable aroma a limón y un sabor ligeramente amargo pero aromático, sus hojas se pueden utilizar frescas o secas (Vélez *et al.*, 2018)

2.2.6.1. Propiedades

El toronjil es una variedad vegetal con excelentes propiedades medicinales y se utiliza para tratar enfermedades centrales del cerebro, enfermedades cardiovasculares y respiratorias, diversos tipos de cáncer y mejorar la memoria. Además, muchas farmacopeas herbarias iraníes, británicas y europeas enumeran varias propiedades farmacológicas: neurológicas, antioxidantes, hipoglucemiantes, hipolipidémicas, antibacterianas, anticancerígenas, antidepresivas, ansiolíticas, anticonceptivas, antiinflamatorias y antiespasmódicas (Taco, 2023).

En estudios fitoquímicos experimentales demostraron la presencia de compuestos volátiles, triterpenos, ácidos fenólicos y flavonoides. El toronjil pertenece a la familia

de las Lamiaceae y suele crecer en suelos ricos en materia orgánica en bosques, malezas y jardines. Comúnmente utilizada como sedante natural, a partir de esta planta se elaboran infusiones y su aceite esencial se utiliza para elaborar perfumes (Montiel *et al.*, 2021).

El toronjil contiene compuestos fenólicos (taninos, ácidos fenólicos y flavonoides) y terpenos (triterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos), siendo los principales componentes activos los compuestos volátiles, triterpenos y ácido fenólico; de manera similar, los aceites esenciales y los compuestos fenólicos también proporcionan actividad farmacológica. Los usos conocidos del toronjil son: medicinal, estimulante, hipnótico, carminativo, diaforético, digestivo, antidepresivo, antiviral, reconstituyente, antibacteriano, antiespasmódico, colerético y antipirético (Montiel *et al.*, 2021).

2.2.6.2. Composición química

En las últimas décadas, la composición química de los productos naturales ha aumentado significativamente en todo el mundo. De las tres categorías de fuentes botánicas que pueden tener un impacto significativo en la futura protección de las plantas, los aceites esenciales y sus constituyentes se derivan de una variedad de especies de plantas (Acevedo *et al.*, 2013).

La composición química de las hojas de *Melisa* depende de factores como época de cosecha, año, método de extracción, condiciones de almacenamiento, condiciones geográficas de la planta (tipo de suelo, época de cosecha, edad de la planta, etc). El aceite esencial de toronjil que contienen las hojas de toronjil está compuesto por aldehídos, alcoholes, taninos, ácidos triterpénicos, marrubina, saponinas y flavonoides (Aydin, 2022).

2.2.6.3. Capacidad antimicrobiana del Toronjil

Según (Vélez *et al.*, 2018), el toronjil, es una planta medicinal utilizada tradicionalmente por sus propiedades medicinales y antimicrobianas. Existen estudios que han determinado al Toronjil como un inhibidor sobre ciertos microorganismos. Estudios de laboratorio han demostrado que posee efectos

antimicrobianos contra bacterias y hongos. En su composición posee componentes químicos como el citral, citronelal y geraniol, que han sido estudiados por su actividad contra algunas bacterias patógenas.

- **Citral:** Es un compuesto químico estudiado por sus propiedades antimicrobianas, comprende dos isómeros, el geranial y el neral, los cuales son aldehídos que contribuyen al aroma cítrico característico de muchas plantas. Estudios demuestran que el citral presenta actividad contra bacterias, hongos y virus. El toronjil es conocido por disponer de un alto contenido de citral, especialmente en sus aceites esenciales, que son utilizados en la industria alimentaria como saborizantes y aromatizantes debido a sus propiedades sensoriales agradables (Lu *et al.*, 2018).
- **Citronelal:** Es un componente químico que se encuentra en el toronjil (*Melissa officinalis*), es un monoterpenoide que contribuye al aroma y sabor característicos de la planta. Así como el citral, la citronela también ha sido objeto de investigación debido a sus diversas propiedades y beneficios potenciales. Estudios de laboratorio determinan sus propiedades antimicrobianas, lo que significa que posee la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, como bacterias y hongos. Esta propiedad puede contribuir a la preservación de alimentos y a aplicaciones medicinales (Bezerra *et al.*, 2019).
- **Geraniol:** Es un alcohol monoterpenoide estudiado por sus propiedades antimicrobianas, propiedades que se destacan para aplicaciones en la preservación de alimentos y en la medicina natural; se encuentra naturalmente en varias plantas y se lo utiliza en la preparación de alimentos (bebidas, como productos de panadería, postres, bebidas, helados entre otros) debido a su aroma y sabor característicos (Lira *et al.*, 2020).

2.2.7. Métodos para determinar la capacidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son una de las muchas herramientas disponibles para determinar la capacidad antimicrobiana de sustancias o agentes, lo que resulta importante en áreas de la microbiología y la

medicina. Es importante considerar que existen métodos que presentan ventajas y limitaciones que depende de varios factores, como el tipo de microorganismo, la sustancia antimicrobiana y los recursos disponibles (Herrera, 2010).

- **Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer):** Se colocan discos de sensibilidad impregnados con sustancias, extractos, infusiones, aceites esenciales en una caja petri con medio de cultivo y la inoculación de un microorganismo. Se mide el diámetro de la zona de inhibición que aparece alrededor del disco de sensibilidad (Chaves & Esquivel, 2019).
- **Dilución en Caldo o Agar:** Se preparan varias diluciones con diferentes concentraciones de una sustancia, extractos, infusiones, aceites esenciales. Se inoculan con microorganismos y se observa el crecimiento. La concentración más baja que inhibe el crecimiento se considera la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Palacio *et al.*, 2018).
- **Método de Dilución en Microplaca:** Similar al método de dilución, pero se realiza en microplacas. Permite probar múltiples sustancias o concentraciones simultáneamente (Chaves & Esquivel, 2019).
- **Método de Tubos con Difusión en Agar:** Se llenan tubos con agar con diferentes concentraciones de la sustancia. Se inoculan con microorganismos y se observa la inhibición. Incluye tubos de control positivo (sensible al agente antimicrobiano) y control negativo (sin sensibilidad al agente antimicrobiano) (Herrera, 2010).

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

En este proyecto de investigación la metodología es de tipo:

Experimental

El estudio, que se realizó mediante experimentos de laboratorio, evaluó diferentes tratamientos para determinar las propiedades antimicrobianas del *Melissa officinalis* contra la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y su posterior uso en queso fresco. Además, realizamos evaluaciones microbiológicas, sensoriales y fisicoquímicas de cada tratamiento.

Explicativa

Este estudio fue elaborado sobre la base de información científica y técnica y examina las posibles causas de los problemas relacionados con la producción, almacenamiento y conservación del queso fresco; destaca la importancia de identificar propiedades antimicrobianas utilizando plantas para extender la vida útil, y los resultados de nuestros experimentos se comparan con otros estudios relacionados para proporcionar una base científica y técnica que respalde nuestros resultados.

Bibliográfica

El acceso a información relevante a través de libros, artículos y páginas web permite la formulación de hipótesis, diseños experimentales adecuados, búsqueda de métodos analíticos y discusión de los resultados obtenidos.

3.2. La población y la muestra

3.2.1. Características de la población

Para el presente estudio se consideró como población la producción de quesos con la aplicación de hojas de *Melissa officinalis*.

3.2.2. Delimitación de la población

La investigación se desarrolló en tres etapas:

La primera etapa consistió en un muestreo al azar de 4 puestos de un total de 12 puestos donde se comercializa quesos frescos en el mercado “Santa Rosa” de la ciudad de Riobamba – Ecuador, y determinación de su calidad microbiológica.

La segunda etapa consistió en la determinación de la actividad antimicrobiana de *Melissa officinalis* y de la concentración mínima inhibitoria contra *Escherichia coli* de concentraciones altas medias y bajas.

La tercera etapa fue la elaboración del queso fresco con hojas secas de *Melissa officinalis* y análisis físico químico.

La cuarta etapa fue la aplicación de una prueba sensorial hedónica con un panel de 20 catadores.

3.2.3. Tipo de muestra

En la primera etapa se adquirió en cada puesto 2 quesos tamaño mediano de marcas comerciales populares.

En la segunda etapa se probaron concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 y 2% del extracto acuoso de *Melissa officinalis*.

La tercera etapa durante en la elaboración del queso tipo fresco se colocaron las 2 mejores concentraciones que inhiben el crecimiento de *E. coli*, ya a estos se les evaluó sus características físico-químicas.

En la cuarta etapa en la evaluación sensorial se seleccionaron al azar 20 personas Para realizar una evaluación sensorial de las dos mejores concentraciones que inhiben el crecimiento de *E. coli*.

3.2.4. Tamaño de la muestra

En la primera etapa se obtuvo un total de 8 quesos frescos, de 4 marcas comerciales (2 quesos por marca comercial).

En la segunda etapa para determinar la concentración mínima inhibitoria se realizaron 3 réplicas de cada uno de las concentraciones altas, medias y bajas de *Melissa officinalis* contra *Escherichia coli*.

En la tercera etapa se elaboraron 5 quesos con las proporciones de ,1,5 y 2% de hojas secas de *Melissa officinalis*

A cada integrante del panel de catadores se le proporciono tres muestras de queso, controlando el Queso control y las dos mejores concentraciones de hojas secas de *Melissa offiinalis* que inhibieron el crecimiento de *E.coli* y una hoja de evaluación de las características: humedad superficial, perfil gustativo, elasticidad, intensidad aromática, firmeza e impresión textural.

3.2.5. Proceso de selección de la muestra

Esta investigación se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería, Carrera Agroindustria de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Las muestras evaluadas fueron las siguientes:

- Queso tipo fresco.
- *Melissa officinalis* en diferentes concentraciones en queso fresco.

3.3. Los métodos y las técnicas

3.3.1. Deshidratación de hojas de *Melissa officinalis*.

Con el fin de reducir el mayor porcentaje de humedad de las hojas de *Melissa officinalis*, se procedió a realizar un secado con aire caliente re circulado a temperaturas de 30 °C, previamente se realizó una desinfección y un lavado de las hojas a secarse.

3.3.2. Activación y réplica de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

A continuación, se describen los pasos para la activación y replica la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

- Preparación de una base de agar de MacConkey
- Enfriamiento de la base de agar a 45°C y colocar 10 ml en cada tubo de ensayo en posición inclinada y dejar solidificar.
- Tomar una muestra de la cepa con la ayuda de un asa bacteriológica y colocar en 10 ml de agua estéril, seguido colocar 1 ml de la solución bacteriológica en el tubo con agar solidificado.
- Incubación a 35 ° C durante 24 horas

3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se aplicó el método de Difusión en agar, analizando el efecto inhibitorio de las hojas frente a la cepa de *Escherichia coli*.

Preparación de soluciones de hojas deshidratadas en agua estéril a 45°C, dejar reposar durante 20 horas.

Preparar el agar MacConkey y colocar 20 ml aproximadamente en cajas Petri estériles y dejar solidificar.

Preparar el inóculo bacteriano usando el método turbidimétrico visual, para lo cual con un asa bacteriológica se toma muestras de *E. coli* y se suspende en un tubo de ensayo con 4 o 5 ml de suero fisiológico estéril hasta alcanzar una turbidez similar a la escala 0.5 de McFarland (0.1 ml BaCl₂ al 1.175% + 9.9 ml H₂SO₄ al 1%).

Estriar con un hisopo de tal manera que se cubra toda la superficie de la caja Petri y se deja secar de 3 a 5 min.

Colocar discos de sensibilidad con una pinza estéril y presionar levemente, deben estar a 14 o 15 mm del borde la caja y a 22 mm de distancia entre cada disco.

Incubar a 35 ° C por 24 horas, medir la distancia del halo de inhibición con ayuda de una regla por la parte posterior de la placa y a contraluz.

El procedimiento se realizó por triplicado.

3.3.4. Elaboración de queso tipo fresco

El proceso de evaluación de queso tipo fresco se realizó bajo los parámetros establecidos por las Fichas Técnicas de Procesado de Lácteos de la FAO, IICA y PRODAR (FAO, 2004). La leche se obtuvo de los ganaderos del cantón Chunchi, perteneciente a la provincia de Chimborazo. El queso tipo fresco fue elaborado en el Centro de Capacitación, Transferencia, Tecnológica, Producción y Servicios (CETTEPS) perteneciente a la Universidad Nacional de Chimborazo, ubicada en la ciudad de Riobamba, perteneciente a la Provincia de Chimborazo. Se realizó un control de la calidad de la leche según los requerimientos establecidos por la NTE INEN 9 (INEN, 2015). La leche recibida fue pasteurizada hasta llegar a una temperatura de 80 °C, realizando una retención por 10 min, posteriormente se realizó un enfriamiento hasta 40 °C, adicionando CaCl₂ y cuajo y dejando reposar por 30 min. Se realizó el corte de la cuajada utilizando una lira esterilizada, realizando el primer desuerado, con su respectivo lavado y batido con un reposo de 15 min, antes de realizar el segundo desuerado se procedió a la adición de hojas secas de *Melissa officinalis* considerando las dos mejores concentraciones que inhiben el crecimiento de *E.coli*. A continuación, se procedió al moldeo, enmallado y prensado, para finalmente almacenar el producto final a temperaturas de 4°C.

3.3.5. Análisis microbiológico

Para los ensayos microbiológicos se tomó como referencia los requisitos microbiológicos establecidos por la NTE-INEN 1528; se tomaron 10 g de una muestra representativa de cada muestra, se transfirieron a bolsas estériles (Sterilin, Stone, Staffordshire, Reino Unido) con 90 ml de agua de peptona (Difco, Le Pont de Claix, France) y se agitaron vigorosamente durante 1 min en un homogenizador Stomacher (400C, Seward, Londres, Reino Unido). Todos los recuentos se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC/g).

3.3.6. Propiedades fisicoquímicas del queso tipo fresco

3.3.6.1. Acidez titulable

La acidez titulable se determinó, tomando como referencia los parámetros establecidos en la (NTE INEN 13,1984). Se colocaron aproximadamente 20 g de muestra, agregando un volumen dos veces mayor de agua destilada, posteriormente se adicionaron 2 cm³ de solución indicadora de fenolftaleína. Con la ayuda de una bureta automática se adicionó una solución de NaOH al 0,1 N, hasta conseguir un color rosado persistente por 30 segundos. Leer en la bureta el volumen de solución empleada. El porcentaje de acidez se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%A = \left(\frac{V \times N}{m1 - m} \right) * 100$$

Donde:

A = acidez titulable del queso, en porcentaje en masa de ácido láctico.

V = volumen de la solución de NaOH empleado en la titulación.

N = normalidad de la solución de NaOH

m = masa del matraz Erlenmeyer vacío, en g.

m1= masa del matraz Erlenmeyer con el queso.

3.3.6.2. pH

La determinación de pH se desarrolló utilizando un pH-metro para sólidos (HACH). Se introduce el electrodo en las muestras, dejando a reposar hasta que el pH se mantenga, procediendo a anotar el valor obtenido. Colocando 10 gramos de muestra en 50 ml de agua destilada.

3.3.6.3. Humedad

El porcentaje de humedad se determinó aplicando la metodología de la AOAC 990.19 (AOAC International, 1993), colocando aproximadamente 1 g de muestra de queso en una capsula de porcelana, previamente tarada (en una mufla) y pesada, a continuación, se secó a una temperatura de 105 °C durante 12 h. Posteriormente la capsula se colocó en un desecador hasta obtener peso constante. El contenido de humedad se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\%H = \left(\frac{W1 - W2}{\text{peso de la muestra}} \right) \cdot 100$$

Dónde:

W1= peso de la muestra + capsula antes de la estufa

W2= peso de la muestra + capsula después de la estufa

3.3.6.4. Proteína

El análisis de proteína se realizó utilizando el método Kjeldahl basándonos en los parámetros establecidos por la AOAC 991.20 (AOAC International, 1995). Este método está compuesto de tres etapas:

- Digestión: Se pesó 0,1 g de muestra (previamente triturado y homogenizado), colocando en un tubo de digestión Kjeldahl, agregando 2,5 g de K₂SO₄, 0,15 g de CuSO₄ y 10 ml de H₂SO₄. El tubo de digestión fue colocado en un bloque de calentamiento empezando a evaporar el agua a una temperatura de 150°C entre 15 a 30 min, a continuación, se dejó la muestra a temperaturas de 270 °C y 300 °C por 15 o 30 min para reducir la producción de humos blancos. Se continuo la digestión a 400 °C entre 60 y 90 min. Este procedimiento se desarrolló hasta obtener un líquido transparente con una coloración azul verdosa.
- Destilación: Se procedió a retirar los tubos Kjeldahl del digestor, dejando enfriar a temperatura ambiente y colocando 10 ml de agua destilada. En un Erlenmeyer

se adicionaron 50 ml de H₃BO₃ al 4% con 3 gotas de indicador. Se conectó el equipo de destilación con la muestra diluida, programando una dosificación de 50 ml de NaOH al 40%. Se introdujo el tubo de digestión en el destilador, procediendo a destilar hasta recoger 250 ml en el Erlenmeyer (50 ml de H₃BO₃ + 200 ml de destilado). • Titulación: Se valoró el destilado con una solución de HCl hasta el cambio de color. El contenido de proteína se determinó aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\% N = (V_m - V_b) * N * mEQ * 100 / m$$

$$\% Proteína = \% N * F$$

Donde:

N= Normalidad del ácido de valoración

V_m= Volumen de ácido consumido en la muestra

V_b= Volumen del ácido consumido en el blanco

14= peso atómico del Nitrogeno.

F= Factor proteico (6,25)

3.3.6.5. Grasa

Para la determinación de grasa se utilizó el método AOAC 2000.18 Gerber (AOAC International, 2000), pesando aproximadamente 3 g de muestra en una copa de butirómetro junto con H₂SO₄ hasta cubrir la muestra de queso. La muestra fue calentada a baño maría durante 30 min a una temperatura de 65 °C, posteriormente se adiciono 1 ml de alcohol amílico procediendo a homogenizar la muestra. Se completó con H₂SO₄, hasta que el volumen alcanzó las tres cuartas partes de la columna graduada. Nuevamente se colocó el butirómetro a baño maría por 5 min. El butirómetro fue llevado a una centrifuga a 1200 r.p.m, durante 5 min, para posteriormente realizar su lectura, llevando la base de la columna de grasa a cero

y presionando el tapón del butirómetro. Para la expresión de resultados se dio lectura a la escala, indicando directamente la cantidad de grasa como porcentaje.

3.3.7. Análisis sensorial.

Para juzgar las diferencias debidas a la aplicación hojas de *Melissa officinalis* en quesos tipo fresco, se realizó una prueba sensorial hedónica con un panel de catadores compuesto por 20 panelistas semientrenados que probaron las muestras siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE- ISO 6558. (UNE-ISO, 2008).

Se evaluaron los atributos de humedad superficial (muy seca, seca, media, húmeda, muy húmeda), elasticidad (muy elástica, elástica, media, rígida, muy rígida), intensidad aromática (tenue, sutil, ligera, intensa, muy intensa), firmeza (muy débil, débil, media, elevada, muy elevada), impresión textura (líquida, pastosa, gomosa, cerrada, muy compacta) y perfil gustativo (casi inapreciable, suave, fuerte, intenso, muy intenso).

3.4. Procesamiento estadístico de la información.

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa informático SPSS Estatistics. Los resultados se presentan como media (\pm) desviación estándar (σ). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las variables.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1. Análisis de los resultados

4.1.1. Calidad Microbiológica de muestras de queso tipo fresco

Se recolectaron 8 muestras de queso tipo fresco que se comercializa en 4 puestos del mercado “Santa Rosa” ubicado en la ciudad de Riobamba- Ecuador. En la Tabla 3 se puede evidenciar que las muestras recolectadas incumplen con requisitos establecidos por la NTE INEN 1528, notándose un importante crecimiento de *Enterobacterias*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*.

Tabla 4

Calidad microbiológica de muestras de queso tipo fresco

Calidad microbiológica de muestras de queso tipo fresco que se expanden en el mercado “Santa Rosa”									
Requisitos	Factor de Dilución	Puesto 1 (UFC/ml)		Puesto 2 (UFC/ml)		Puesto 3 (UFC/ml)		Puesto 4 (UFC/ml)	
		a	b	a	b	a	b	a	b
<i>Enterobacterias</i>	10	970	1010	INC	INC	580	650	740	810
	100	5800	6500	11300	11900	1100	1900	3600	4100
	1000	33000	40000	61000	71000	0	0	7000	12000
<i>Escherichia coli</i>	10	INC	1230	1100	INC	INC	INC	INC	INC
	100	INC	8800	7000	INC	INC	13300	INC	INC
	1000	INC	43000	40000	73000	96000	86000	INC	INC
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	INC	INC	INC	INC	1010	910	INC	INC
	100	INC	INC	INC	INC	7600	6600	INC	INC
	1000	INC	INC	79000	INC	23000	19000	INC	INC
<i>Salmonella</i>	10	INC	INC	1110	1010	124	990	INC	INC
	100	8600	9000	8900	7000	99	6300	INC	INC
	1000	54000	64000	49000	35000	70	12000	INC	INC

Nota: Requisitos Establecidos por la NTE INEN 1528

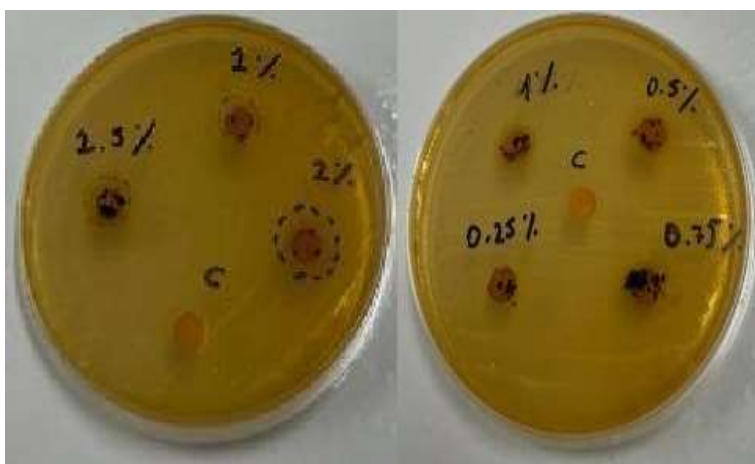
El crecimiento de estos microorganismos contribuye al deterioro del alimento, atentando contra la salud del consumidor. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los resultados determinados por (Álvarez *et al.*, 2022), donde se realiza un muestreo de queso producido artesanalmente y comercializado en mercados populares dando a notar la presencia de microorganismos patógenos, producto de una mala pasteurización, prensado y almacenado, productos que fueron elaborados bajo mínimas condiciones sanitarias.

4.1.2. Capacidad antimicrobiana de hojas de *Melissa officinalis*

Se realizó la determinación de la capacidad antimicrobiana de las hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli*, para lo cual se evaluó la Capacidad Mínima Inhibitoria (CMI) de las hojas frente a la cepa. La capacidad de las hojas para inhibir el crecimiento bacteriano se demuestra mediante la formación de halos de inhibición alrededor de discos sensibles en las pruebas del espectro antimicrobiano; si no se observa ninguna zona de inhibición, esto puede indicar resistencia bacteriana a las hojas estudiadas. Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones, evidenciando que, a concentraciones de rango bajo 0.25, 0.5 y 0.75% no se observa la formación de halos de inhibición debido a que existe crecimiento de la cepa sobre los discos de sensibilidad, mientras que a partir de la concentración 1, 1.5 y 2% se han formados halos de inhibición.

Figura 2

Concentración mínima inhibitoria (CMI)



Nota: Formación de halos de inhibición a diferentes concentraciones

En la Tabla 5 se observan los resultados obtenidos al determinar la CMI, dando a notar halos de inhibición con mayor dimensión en las concentraciones de 1, 1.5 y 2%. Es importante mencionar que a nivel alimentario estas concentraciones no provocan toxicidad al producto, siendo segura su incorporación en la producción de queso tipo fresco, garantizando de esta manera la inocuidad del alimento y la salud del consumidor (Villa *et al.*, 2019).

Tabla 5

Halos de inhibición en mm

Distancia de halos de inhibición en mm			
Concentraciones %	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Control	0	0	0
0,25	0	0	0
0,5	0	0	0
0,75	0,9	0,9	1
1	1,7	1,8	1,8
1,5	2,5	2,5	2,5
2	3,8	3,8	4

Nota: Distancia de halos de inhibición

4.1.3. Caracterización físico-química

Figura 3

Muestras de queso



Nota: Q (queso sin adición de *Melissa officinalis*); Q1 (queso con 1.5% de *Melissa officinalis*); Q2 (queso con 2% de *Melissa officinalis*).

Se procesó un queso tipo fresco con adición de las concentraciones del 1,5 y 2% de las hojas secas de *Melissa officinalis*, evaluando la caracterización físico-química de los dos mejores tratamientos que formaron un halo de inhibición de mayor dimensión, de hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli*; para lo

cual se tomó como referencia los requisitos físico-químicos establecidos por la NTE INEN 1528.

Se evaluaron los parámetros de acidez, pH, proteína y grasa, donde no se encontraron diferencia significativa en ninguna de las muestras estudiadas (Ver tabla 6 y 7), lo que quiere decir que la adición de hojas de *Melissa officinalis* no contribuye a la pérdida o aumento de estos parámetros físico-químicos. Estos parámetros determinados en este estudio están dentro de los rangos establecidos por la NTE INEN 1528.

Tabla 6
Análisis físico-químico de muestras de queso

Muestra	Acidez titulable %	pH	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa %
Q	0,41±0,03 ^a	4,97±0,06 ^a	61,25±1,00 ^a	14,30±0,21 ^a	15,29±0,01 ^a
Q 1	0,47±0,05 ^a	5,29±0,01 ^a	55,38±0,53 ^b	14,01±0,01 ^a	15,20±0,02 ^a
Q 2	0,55±0,08 ^a	5,29±0,01 ^a	55,16±0,56 ^b	13,71±0,53 ^a	15,14±0,13 ^a

Nota: Q (queso sin adición de *Melissa officinalis*); Q1 (queso con 1.5% de *Melissa officinalis*); Q2 (queso con 2% de *Melissa officinalis*)

Tabla 7
Análisis de varianza parámetros físico-químicos

		ANOVA			
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
Acidez titulable %	Entre grupos	,031	2	,015	4,771
	Dentro de grupos	,019	6	,003	
	Total	,050	8		
pH	Entre grupos	,205	2	,102	77,471
	Dentro de grupos	,008	6	,001	
	Total	,213	8		
Humedad (%)	Entre grupos	71,631	2	35,816	45,743
	Dentro de grupos	4,698	6	,783	
	Total	76,329	8		
Proteína (%)	Entre grupos	,528	2	,264	2,403
	Dentro de grupos	,659	6	,110	
	Total	1,188	8		
Grasa %	Entre grupos	,034	2	,017	3,206
	Dentro de grupos	,032	6	,005	
	Total	,066	8		

Nota: Determinación del análisis de Varianza ANOVA de los parámetros físico-químicos de muestras de queso.

Estudios indican que la adición de hojas, extractos, aceites esenciales e infusiones, contribuyen a la reducción del contenido de agua de un alimento, resultando ser positivo para el producto, ya que a una menor humedad se reduce el riesgo de contaminación por bacterias y hongos (Ceballos & Londoño, 2017); los datos obtenidos en esta investigación indican que al adicionar hojas secas de *Melissa officinalis* en el queso a concentraciones del 1,5 y 2% se reduce el contenido de humedad del producto; estos resultados concuerdan con lo mencionado por (Sánchez *et al.*, 2022), donde determinaron el efecto del aceite de orégano en las propiedades fisicoquímicas, texturales y sensoriales del queso, notándose que la adición del aceite contribuye a la reducción del porcentaje de agua en el producto final.

4.1.4. Evaluación sensorial

Se determinó la caracterización sensorial de los dos mejores tratamientos que formaron un halo de inhibición de mayor dimensión, de hojas de *Melissa officinalis* frente a la cepa *Escherichia coli*; se realizó una prueba sensorial hedónica con un panel de catadores compuesto por 20 panelistas semientrenados que probaron las muestras de queso tipo fresco y queso tipo fresco con adición de hojas de *Melissa officinalis* a concentraciones del 1,5 y 2%.

La humedad de las muestras de queso sin hojas de *Melissa officinalis* (Q) se valoró como “muy húmeda”, mientras que en las muestras con hojas de *Melissa officinalis* Q1 y Q2, se valoraron con una intensidad de “húmedo”, estos valores concuerdan con los valores obtenidos en el análisis físico- químico, donde se evidencia un contenido mayor de humedad en la muestra Q, lo cual es un factor importante ya que la adición de las hojas de *Melissa officinalis* contribuye a la reducción de agua en el queso, factor que resulta positivo para prolongar la vida útil del producto ya que se reduce el riesgo del desarrollo de bacterias que pueden afectar la calidad del queso (Ceballos & Londoño, 2017).

Al aplicar la prueba hedónica se determinó que en parámetros de elasticidad y textura no se presentan diferencias significativas en ninguna de las muestras, es

decir que la adición de hojas secas al 1,5 y 2% no alteraron estos atributos; determinando una elasticidad “media” y una impresión textural “cerrada”.

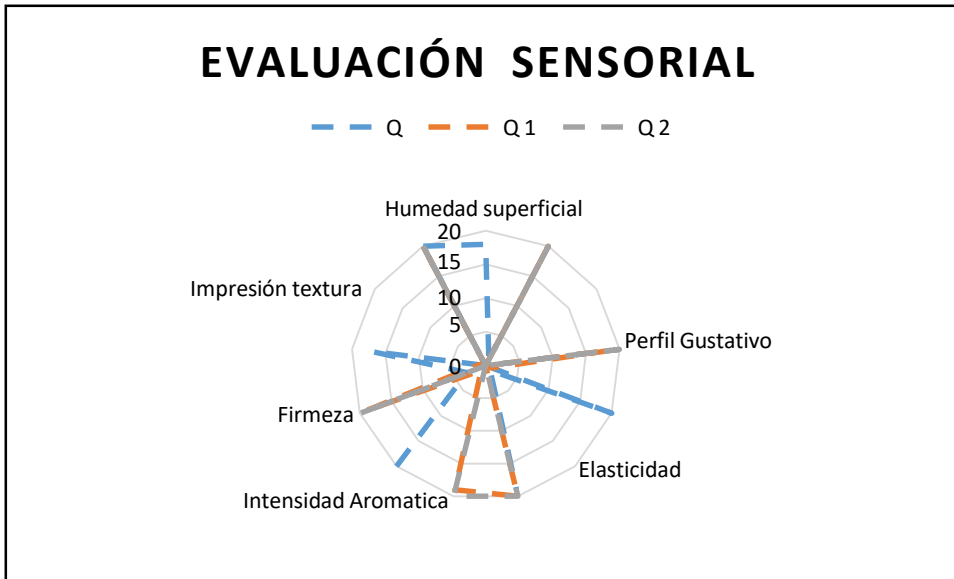
El perfil gustativo y aromático presentan diferencias significativas con respecto al queso tipo fresco sin adición de hojas secas de *Melissa officinalis*, evaluando a las muestras Q1 y Q2 con un perfil gustativo y aromático “intenso”, este factor puede ser el resultado del sabor y olor característicos de la planta. La adición de especias al queso puede cambiar significativamente su sabor, ofreciendo una variedad de perfiles de sabores interesantes. La adición de especias al queso no solo afecta el sabor, sino también el aroma. Las especias pueden contribuir a crear un bouquet aromático complejo y agradable en el queso (fragancias herbales y frescas) (Cano, 2021).

Se determinó una firmeza muy elevada en las muestras Q1 y Q2 a diferencia de la muestra Q donde se estableció una menor firmeza, valores que coinciden con los resultados obtenidos en el análisis físico- químico donde se puede notar que las muestras Q1 y Q2 poseen un menor contenido de humedad con respecto a Q; por lo que al tener menos cantidad de agua en un alimento se contribuye a una mejor firmeza en el producto final (Estrada, 2019).

En la figura 4 se observa el resultado del análisis de 6 atributos evaluados por los 20 panelistas semientrenados, dando a notar que la mayoría de panelistas localizan las mejores características del producto en las muestras Q1 y Q2. Es necesario destacar que la cantidad y tipo de planta utilizada, así como la forma en que se incorporan en el queso, pueden afectar la calidad sensorial de manera diferente, es esencial considerar las preferencias del consumidor y las características específicas del producto final (Sánchez *et al.*, 2022).

Figura 4

Diagrama de araña de los resultados de la evaluación sensorial



*Nota: Q (queso sin adición de *Melissa officinalis*); Q1 (queso con 1.5% de *Melissa officinalis*); Q2 (queso con 2% de *Melissa officinalis*)*

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Se determinó la calidad microbiológica de quesos tipo fresco que se expenden en el mercado “Santa Rosa” Riobamba – Ecuador; evidenciando una alta contaminación en sus productos, lo cual atenta contra la inocuidad del producto, alterando su contenido nutricional, y la reducción de tiempo de vida útil del producto, los resultados obtenidos incumplen los requisitos establecidos por la NTE INEN 1528.

Las hojas secas de *Melissa officinalis* presentan propiedades antimicrobianas a concentraciones de 1,5 y 2%, presentando la formación de halos inhibitorios frente a la cepa *Escherichia coli*.

La aplicación de hojas de *Melissa officinalis* en el queso tipo fresco ayudó a reducir el porcentaje humedad del producto final, factor que es importante para mejorar su vida útil ya que se reduce el riesgo del desarrollo de bacterias y hongos.

Las variables analizadas como acidez, pH, proteína y grasa en el queso fresco tras la adición de hojas secas de *Melissa officinalis* no alteran estos parámetros físico-químicos.

Al adicionar hojas secas de *Melissa officinalis* se intensifica el perfil gustativo y aromático del producto, pero se mantienen los atributos de elasticidad y de textura.

5.2. Recomendaciones

Estudiar la composición química del extracto acuoso de *Melissa officinalis* para determinar los compuestos que le otorgan la capacidad antimicrobiana.

Para conservar por mayor tiempo el extracto acuoso y evitar su descomposición, se recomienda filtrarlo para eliminar microorganismos que puedan alterar sus características fisicoquímicas y almacenarlo en refrigeración.

Realizar pruebas para determinar la actividad antibacteriana de *Melissa officinalis* contra otras bacterias de importancia alimentaria como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, y enterobacterias.

En la elaboración del queso fresco con la adición de las hojas de *Melissa officinalis*, se recomienda que estas sean añadidas durante la cuajada con la finalidad de que se extraigan los compuestos activos de la planta y se concentren en el queso.

Bibliografía

1. Acevedo, D., Navarro, M., & Montero, P. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de las Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis* L.) Chemical Composition of the Essential Oil from Lemon Balm Leaves (*Melissa officinalis* L.). *Información Tecnológica*, 24(4), 49-54. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v24n4/art06.pdf>
2. Albán, M. (2006). Elaboración de un queso fresco a partir de una mezcla de leches de oveja y leche de vaca. Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3362>
3. Álvarez Badel, B., Doria Espitia, M. A., Hodeg Peña, V., Simanca Sotelo, M. M., Pastrana Puche, Y., & De Paula, C. D. (2022). Efecto de la nisina en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y en las propiedades sensoriales del queso costeño. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(1), 272-286. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i1.5741>
4. Argote Vega et al. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
5. Arguello Hernández, P., Carrillo, L., Escobar Arrieta, S., Guananga-Díaz, N., Andueza Leal, F., & Albuja Landi, A. (2019). EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL SISTEMA DE AGUA QUE ABASTECE A LAS PLANTAS PROCESADORAS DE QUESO FRESCO ARTESANAL DE LA PARROQUIA QUIMIAG- RIOBAMBA-ECUADOR. *Perfiles*, 1(21), 12-18. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i21.43>
6. Arteaga Solórzano, R. A., Armenteros Amaya, M., Quintana García, D., & Martínez Vasallo, A. (2021). Evaluación de las buenas prácticas en la elaboración de queso artesanal en Manabí. *Revista de Salud Animal*, 43(2), 1-10. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v43n2/2224-4700-ras-43-02-e03.pdf>
7. Astudillo & Pucha. (2023). Jiménez RR. QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

- LICENCIADO EN QUÍMICA DE ALIMENTOS. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/25707/1/UPS-CT010770.pdf>
8. Aydin, B. (2022). *Melissa officinalis* L. In *Novel Drug Targets with Traditional Herbal Medicines: Scientific and Clinical Evidence* (pp. 401-422). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07753-1_27
 9. Banco Central del Ecuador, (BCE). (2021). *Reporte de Coyuntura. Sector Agropecuario*. Banco Central del Ecuador (pp. 77-98).
 10. Bezerra, R. V., De Oliveira, H. M. B. F., Lima, C. M. B. L., Diniz, M. de F. F. M., Pêsoa, H. de L. F., & Alves de Oliveira Filho, A. (2019). ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MONOTERPENOS (R)-(+)-CITRONELAL, (S)-(-)-CITRONELAL E 7-HIDROXICITRONELAL CONTRA CEPA DE BACILLUS SUBTILIS. *Revista Uningá*, 56(2), 62-69. <https://doi.org/10.46311/2318-0579.56.euj2132>
 11. Cano García, M. (2021). *Recubrimientos Activos Para Alargar La Vida Util De Quesos*. Universidad Politecnica de Valencia, 47. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/171140/Cano - Recubrimientos activos para alargar la vida útil de los quesos.pdf?sequence=1>
 12. Castellanos, nuri A. merchán, Gómez, lida marcela pineda, Parra, A. katherine cárdenas, Neiza, N. C. G., Rodríguez, M. carolina otálora, & Neira, yaline sánchez. (2018). *Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016*
 13. Ceballos Toro, V., & Londoño Giraldo, L. M. (2017). Aceites esenciales en la conservación de alimentos. *Microciencia*, 6, 38-50. <https://doi.org/10.18041/2323-0320/microciencia.0.2017.3659>
 14. Cevallos, J., Ruales, J., Ortiz, J. y Maldonado, P. (2019). *Avances en Biociencias e inocuidad alimentaria en Ecuador*. Red VVir Ecuador (pág. 127). Obtenido de <http://drive.google.com/file/d/1CjcAFFvIOMDshpsGEoEWjJjaBTQbWua9/view?usp=sharing>

15. Chambi-Rodriguez, A. D. (2022). Evaluación de la calidad microbiana de los quesos frescos de los mercados de Juliaca - Perú. *UNACIENCIA*, 15(28), 25-29. <https://doi.org/10.35997/unaciencia.v15i28.668>
16. Chaves-Ulate, E. C., & Esquivel-Rodríguez, P. (2019). Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía Mesoamericana*, 299-311. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32974>
17. De la Cruz González, E. G., Aquino Ruíz, E. L., Rocha, D. A., & Bonifaz, N. F. (2018). Estudio de la calidad físicoquímica y microbiológica del lactosuero de queso fresco proveniente de queseras artesanales de Cayambe - Ecuador. *SATHIRI*, 13(2), 178. <https://doi.org/10.32645/13906925.764>
18. Enríquez-Estrella, M. Á., Poveda-Díaz, S. E., & Alvarado-Huatatoca, G. I. (2023). Bioactivos de la hierba luisa utilizados en la industria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i1.3249>
19. Escobar, S., Albuja, A., Tene, K., Jara, H., & Ramírez, J. (2023). ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DEL QUESO FRESCO QUE SE EXPENDE EN UN MERCADO, DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA. *Perfiles*, 1(30), 13-23. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i30.223>
20. Estrada Korta, O. (2019). Flores de cardo: una alternativa al cuajo animal en la elaboración de queso / Olaia Estrada. *Unidad de Producción y Sanidad Anima*.
21. Gallegos-Zurita, M., & Gallegos-Z, D. (2017). Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos - Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 78(3), 315. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i3.13767>
22. Gonzales-Malca, J., & Abanto-López, M. (2021). Calidad de los derivados lácteos producidos en la Región Amazonas, Perú. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 5(1). <https://doi.org/10.25127/aps.20211.759>
23. Gonzales D., K., Salazar S., M. E., & Fuertes R., C. M. (2022). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* Griseb. "Muña" y

- Piper carpunya Ruíz & Pav. "Pinku." *Ciencia e Investigación*, 24(2), 21-26.
<https://doi.org/10.15381/ci.v24i2.22522>
24. Heredia-Castro, P. Y., García-Baldenegro, C. V., Santos-Espinosa, A., Tolano-Villaverde, I. D. J., Manzanarez-Quin, C. G., Valdez-Domínguez, R. D., ... Sosa-Castañeda, J. (2022). Perfil fitoquímico, actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos de *Gnaphalium oxyphyllum* y *Euphorbia maculata* nativas de Sonora, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(4), 928-942.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i4.6042>
25. Herrera, C. S. (2010). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. *Revista Médica Del Hospital Nacional De Niños*, 39(30), 1-10.
Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462004000200004
26. Higiene y Epidemiología. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 56, 1.6.
Retrieved from <https://docs.bvsalud.org/leisref/2018/03/290/alcohol-192-codex-unido.pdf>
27. Huaraca Aparco, R., Delgado Laime, M. D. C., Tapia Tadeo, F., & Nolasco Carbajal, G. (2021). Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. *Revista Alfa*, 5(14), 153-165.
<https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i14.106>
28. Ibarra Rosero, E. M., Campos Vallejos, R. M., García Bolívar, J. J., & Benavides Rosales, H. R. (2020). Evaluación comparativa de alternativas agropecuarias en la provincia del Carchi. *Tierra Infinita*, 6(1), 35-45.
<https://doi.org/10.32645/26028131.1029>
29. Instituto Nacional de Salud, G. de E. de, & INS, R. en I. de A. (2015). Perfil de riesgo de *Escherichia coli* enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco. *Documentos Evaluación de Riesgo En Inocuidad de Alimentos*, 1, 1-102.
Retrieved from https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones/ERIA_y_Plaguicidas/PERFIL_E_COLI.pdf

30. Jiménez, E. (2019). "Evaluación de la presencia de Escherichia coli y Listeria monocytogenes en tres queseras rurales de la provincia de Chimborazo". Escuela Superior Politécnica de Chimborazo , 1 , 1-66.
31. Lira, M. H. P. de, Andrade Júnior, F. P. de, Moraes, G. F. Q., Macena, G. da S., Pereira, F. de O., & Lima, I. O. (2020, May 3). Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. Journal of Essential Oil Research. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697>
32. Lojano Collantes, DJ, Quezada Córdova, CF, & Pacheco Cárdenas, KE (2023). Identificación de Staphylococcus aureus en leche cruda de cabra expendida en mercados de Cuenca - Ecuador. Anatomía Digital, 6 (2.1), 6-17. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i2.1.2569>
33. Lonita, E. (2023). La producción de leche en Ecuador. Retrieved from <https://www.veterinariadigital.com/articulos/la-produccion-de-leche-en-ecuador/>
34. Lu, W. C., Huang, D. W., Wang, C. C. R., Yeh, C. H., Tsai, J. C., Huang, Y. T., & Li, P. H. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. Journal of Food and Drug Analysis, 26(1), 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>
35. Marcén, J. J. (2000). Antimicrobianos naturales. Medicina Naturista, 2(2), 104-108.
36. Martínez-Alemán, S. R., Hernández-Castillo, F. D., Aguilar-González, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes, (77), 73-79. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2019772124>
37. Merchán, A., Pineda, M., Cárdenas, K., González, C., Otálora, C., & Sánchez, Y. (2018). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016 | Merchán Castellanos | Revista Cubana de
38. Montiel, B. M., Sánchez-Arzubide, M. G., Ramos-Cassellis, M. E., Luna-

- Guevara, J. J., Luna-Guevara, M. L., & Ibarra-Cantún, D. (2021). Propiedades de calidad fisicoquímica y antioxidantes de un licor artesanal de toronjil (*Dracocephalum moldavica* L.). *Exploraciones, Intercambios y Relaciones Entre El Diseño y La Tecnología*, 57-79. Retrieved from <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/15088>
39. Ocampo Ibañez, I. D., González, C., Moreno, S. L., Calderón, C., Flórez-Elvira, L. J., Olaya, M. B., ... Lesmes, M. C. (2019). Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales comercializados en Cali-Colombia. *Acta Agronómica*, 68(2), 108-114. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n2.77185>
40. OLIVARES TENORIO, ML, & KLOTZ CEBERIO, B. (2020). Evaluación del efecto antifúngico de metabolitos de cultivos bioprotectores: aplicación en derivados lácteos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 18 (2), 15. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(18\)15-25](https://doi.org/10.18684/bsaa(18)15-25)
41. Palacio-Arango, M. A. ... Peñuela-Mesa, G. A. (2018). Evaluación de la capacidad degradadora de taninos por microorganismos aislados a partir de un efluente de curtiembre del municipio de Copacabana, Antioquia. *Actualidades Biológicas*, 40(108). <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v40n108a02>
42. Paredes Pita, C. A., Cadena Mafla, V. E., & Bolaños Fuel, C. K. (2022). Caracterización del perfil sensorial del queso amasado de la provincia del Carchi. *Tierra Infinita*, 8(1), 17-29. <https://doi.org/10.32645/26028131.1151>
43. Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai, A. (2022, April 1). *Melissa officinalis*: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073591>
44. Pino, J. A., & Aragüez, Y. (2021). Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales. *Rev. CENIC Cienc. Quím*, 52(1), 10-25.
45. Prada Herrera, J. C., Vizcaíno Bermejo, M. R., Bolaños Contreras, C. C., Jiménez Ochoa, T., & García, C. (2023). Calidad microbiológica de queso costeño artesanal expandidos en la comuna cuatro de Valledupar-

Colombia. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(2), 1387-1406.
https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i2.5409

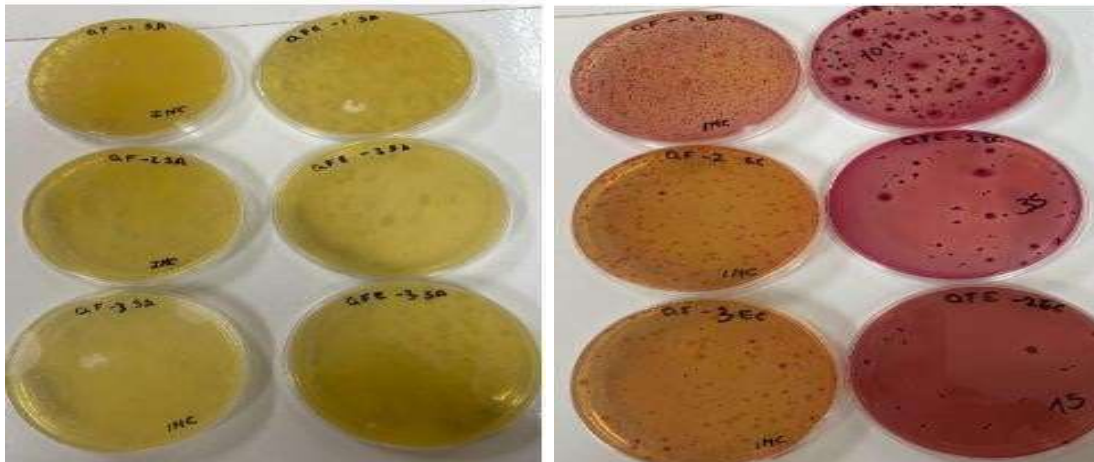
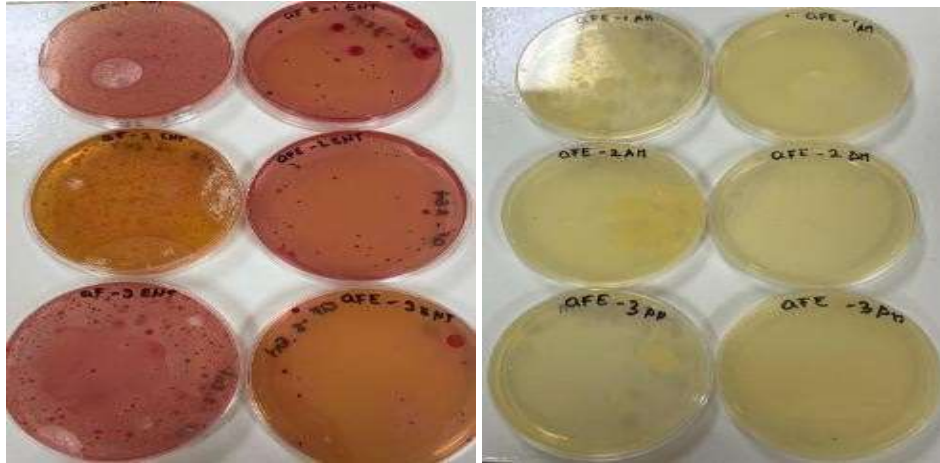
46. Rojas, M. (2020). Aplicación de un recubrimiento activo de harina de banano y aceite esencial de jengibre en queso fresco. Repositorio Institucional de la Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/12640>
47. SENA. (2021). Generalidades de los Aceites esenciales. División de Publicaciones UIS, 21.
48. Sánchez-Zamora, N., Cepeda-Rizo, M. D., Tamez-Garza, K. L., Rodríguez-Romero, B. A., Sinagawa-García, S. R., Luna Maldonado, A. I., ... Méndez-Zamora, G. (2022). Efecto del aceite de orégano en las propiedades fisicoquímicas, texturales y sensoriales del queso panela. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(1), 258-271. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i1.5567>
49. Serra Bisbal, J. J., Melero Lloret, J., Martínez Lozano, G., & Fagoaga, C. (2020). Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.*, (12), 71-90. https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.577
50. Solano-Doblado, L. G., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 30. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>
51. Solórzano, A., Armenteros Amaya, M., García, D. Q., Vasallo, A. M., Habana, L., ... Mayabeque, C. (2021). Artículo Original Ecuador Evaluation of good practices in the production of artisan cheese in Manabí, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 43(2). Retrieved from <https://eqrcode.co/a/DQeq27>
52. Soto-Varela, Z. E., Gutiérrez, C. G., De Moya, Y., Mattos, R., Bolívar-Anillo, H. J., & Villarreal, J. L. (2018). Detección molecular de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto. *Biomédica*, 38, 30-36. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3677>

53. Taco, M. (2023). Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de un té elaborado a partir de cuatro plantas medicinales del Ecuador. Universidad Técnica De Ambato, 1-69.
54. Thomas, M., Tiwari, R., & Mishra, A. (2019). Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth in queso fresco. *Journal of Food Protection*, 82(12), 2041-2079. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-185>
55. Tighe Neira, R., Montalba Navarro, R., Leonelli Cantergiani, G., & Contreras Novoa, A. (2018). Efecto de dos extractos botánicos en el desarrollo y contenido de polifenoles de ají (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(1), 115-127. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i1.1015>
56. Torrens R, Argilagos B, Cabrera S, Valdés B, Sáez M, Viera G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio;16(8):28.
57. Tuttle, A. R., Trahan, N. D., & Son, M. S. (2021). Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/cpz1.20>
58. Vélez, R., D' Armas R. PhD., H., Jaramillo-Jaramillo, C., & Vélez, E. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *FACSALUD-UNEMI*, 2(2), 31-39. <https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol2iss2.2018pp31-39p>
59. Villa Silva, P. Y., Valencia López, M., Gaytan Andrade, J. J., Sierra Rivera, C. A., & Silva Belmares, S. Y. (2019). Estudio toxicológico sobre *Artemia salina* y análisis fitoquímico cualitativo de *Prosopis glandulosa* y *Yucca filífera* utilizadas como alimento. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 914-918.
60. Villanueva, D., & Salazar, M. (2017). Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima. *Anales de La Facultad de Medicina*, 78(3), 322. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i3.1376>

61. Vignola, M. B., Serra, M. A., & Andreatta, A. E. (2020). Actividad Antimicrobiana de Diversos Aceites Esenciales en Bacterias Benéficas, Patógenas y Alterantes de Alimentos. *Revista Tecnología y Ciencia*, (37), 92-100. <https://doi.org/10.33414/rtyc.37.92-100.2020>
62. Wong-Villarreal, A., Corzo-González, H., Hernández-Núñez, E., González-Sánchez, A., & Giacomán-Vallejos, G. (2021). Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México. *CienciaUAT*, 144-155. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1368>

ANEXOS

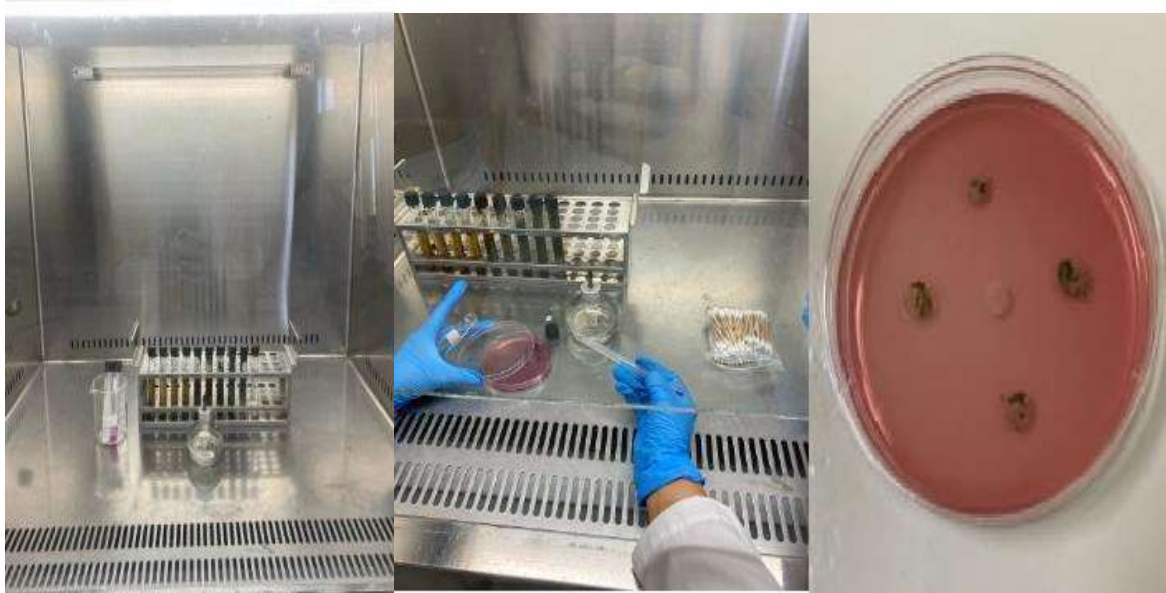
Anexo 1. Calidad Microbiológica de muestras de queso tipo fresco- muestras que se comercializan en el Mercado “Santa Rosa” de la ciudad de Riobamba.



Anexo 2: Activación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922



Anexo 3: Determinación de la Capacidad Mínima Inhibitoria (CMI)



Elaboración de queso tipo fresco



UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

