



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

“Evaluación del efecto combinado bactericida del aceite esencial del ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre *Listeria monocytogenes* ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC) en carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración (4°C)”

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Andrea CARHUALLANQUI PÉREZ

ASESOR

Dra. Daphne Doris RAMOS DELGADO

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Carhuallanqui A. Evaluación del efecto combinado bactericida del aceite esencial del ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre *Listeria monocytogenes* ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC) en carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración (4°C) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2020.



HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	orcid.org/0000-0002-3739-8353
DNI o pasaporte del autor	47231862
Código ORCID del asesor	Orcid.org/0000-0003-3176-804X
DNI o pasaporte del asesor	07607293
Grupo de investigación	SALUD PÚBLICA Y SALUD AMBIENTAL (INOCUVET)
Agencia financiadora	PAIS
	PERÚ
	NOMBRE Y SIGLAS DE LA AGENCIA FINANCIADORA
	Vicerrectorado de Investigación y Posgrado – VRIP
	NOMBRE DEL PROGRAMA FINANCIERO:
	Financiamiento para grupos de investigación (PCONFIGI)
	N° DE CONTRATO
Código A18080561	
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	LUGAR
	Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima-Perú.
	COORDENADAS GEOGRAFICAS
(-12.080729.-76.987032).	
Año o rangos de años en que se realizó la investigación	2018
Disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.00 Salud pública, Salud ambiental http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05

Nota: tomar en cuenta la forma de llenado según las precisiones colocas en la web.
https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios_30junio.pdf



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL PARA OPTAR
EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON
MENCIÓN EN SALUD ANIMAL**

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 11:00 horas del día martes 11 de agosto del 2020, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez (Presidente) y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Juan José Siuce Moreno, Dra. María Elena Salazar Salvatierra y Dra. Daphne Doris Ramos Delgado (**Asesora**), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:


“Evaluación del efecto combinado bactericida del aceite esencial del ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre *Listeria monocytogenes* (ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC) en carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración (4°C)”, presentado por la Bachiller:

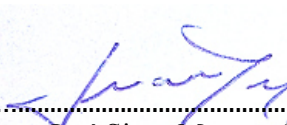
ANDREA CARHUALLANQUI PÉREZ


Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE (19) DIECINUEVE.**


A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, a la Bachiller Andrea Carhuallanqui Pérez.


Siendo las 12:42 horas del día martes 11 de agosto de 2020, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.


.....
Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez (Asoc. D.E.)
Presidente


.....
Mg. Juan José Siuce Moreno (Aux. D.E.)
Miembro


.....
Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P.T.C.)
Miembro


.....
Dra. Daphne Doris Ramos Delgado (P.P.D.E.)
Miembro (Asesora)


.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado UNMSM



DEDICATORIA

A mis amados padres, por su amor infinito, por su apoyo incondicional y por todas sus enseñanzas y consejos que me formaron como persona y profesional.

A mi querida Alma Máter y a las personas que la conforman, por ser parte de mi formación profesional y permitirme sentir orgullosa de pertenecer a esta gran institución.

AGRADECIENTOS

A la Dra. Daphne Ramos Delgado, por su guía constante y aporte invaluable en la realización de este trabajo. Por sus enseñanzas y porque, sin pretenderlo, es ejemplo y motivación.

A la Dra. Maria Elena Salazar, por su apoyo y porque mediante su amplio conocimiento y vasta experiencia supo resolver mis dudas.

A los miembros del Jurado Examinador, el Dr. Jose Luis Rodriguez y el Dr. Juan Siuce por sus sugerencias, comentarios y revisiones para la mejora del presente documento.

INDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1. Carne.....	4
2.1.1. Generalidades.....	4
2.1.2. Microbiología de la Carne.....	4
2.1.2.1. Adherencia bacteriana.....	4
2.1.2.2. Microorganismos presentes en la carne.....	6
2.1.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	7
2.1.2.3.1. Generalidades.....	7
2.1.2.3.2. Patogenia.....	9
2.1.2.3.3. <i>L. monocytogenes</i> en carne.....	11
2.1.2.3.4. Epidemiología.....	12
2.1.2.3.5. Tratamiento.....	13
2.1.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.1.2.4.1. Generalidades.....	14
2.1.2.4.2. Patogenia.....	15
2.1.2.4.3. <i>S. aureus</i> en carne.....	17
2.1.2.4.4. Epidemiología.....	18
2.2. Conservación de la carne.....	19
2.2.1. Generalidades.....	19
2.2.2. Refrigeración.....	19
2.2.2.1. Sabor.....	21
2.2.2.2. Color.....	22
2.2.2.3. Microbiología.....	23

2.2.3. Empacado al vacío.....	24
2.2.3.1. Películas Plásticas.....	25
2.3. Orégano.....	26
2.3.1. Generalidades.....	30
2.3.2. Aceite esencial de orégano (AO).....	29
2.3.2.1. Generalidades.....	29
2.3.2.2. Terpenos.....	32
2.3.2.3. Terpenoides.....	33
2.3.2.4. Bacterias.....	34
2.3.2.4. Impacto en alimentos.....	35
2.4. Ajo.....	36
2.4.1. Generalidades.....	36
2.4.2. Aceite esencial de ajo (AA).....	38
2.4.3. Impacto en alimentos.....	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1. Extracción de aceite esencial.....	43
1.1. Orégano.....	43
1.2. Ajo.....	44
2. Rendimiento de extracción del aceite esencial.....	44
3. Cromatografía de gases- Análisis de espectrometría de masas...44	
3.1. Orégano.....	44
3.2. Ajo.....	45
4. Microbiología y condiciones de crecimiento.....	45
5. Ensayo de difusión en disco (DDA).....	46
6. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida.....	47
7. Evaluación en la carne.....	48
8. Análisis de información.....	49
IV. RESULTADOS.....	50
V. DISCUSIÓN.....	57
VI. CONCLUSIONES.....	62
VII. RECOMENDACIONES.....	63
VIII. LITERATURA CITADA.....	64

IX. ANEXOS.....88

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), son un problema frecuente en salud pública. La industria alimentaria utiliza aditivos químicos para prevenir y disminuir el riesgo de contaminación, inhibir el crecimiento de microorganismos y extender la vida útil de los productos alimenticios. El uso de estas sustancias está asociado a resistencia antimicrobiana y problemas tóxicos. Existen alternativas naturales que tienen efectos similares como los aceites esenciales. El objetivo del estudio es evaluar el efecto combinado bactericida del aceite esencial del ajo (*Allium sativum*; AA) y orégano (*Origanum vulgare*; AO) frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración. Los aceites se obtuvieron mediante destilación por arrastre de vapor y el perfil de compuestos volátiles se obtuvo mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS). Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) para ambos aceites esenciales, posteriormente la CMB de cada aceite obtenida se evaluó independientemente en filetes de carne de res empacados al vacío y almacenados a temperatura de refrigeración (4°C). Después se evaluó cuatro combinaciones de ambos aceites contra *L. monocytogenes* (L1: 2%AO+5%AA; L2: 4%AO+5%AA; L3: 2% AO +2.5%AA; L4: 4%AO+2.5%AA); y cuatro combinaciones contra *S. aureus* (S1: 4%AO+4%AA; S2: 2%AO+4%AA; S3: 4%AO+2%AA; S4: 2%AO+2%AA) y se realizó cuatro repeticiones para cada combinación y se analizaron en los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12. En el día 1 se observó las medias más bajas para las combinaciones S1 y S2 en comparación a las otras combinaciones. En el día 3, las combinaciones S1 y S2 no presentaron crecimiento de *S.aureus*. En los días 6, 9 y 12, las combinaciones S1, S2 y S3 no presentaron crecimiento de *S. aureus*. Asimismo la combinación L2 fue la única en la se determinó la ausencia de *L. monocytogenes*, desde el día 1. El uso independiente o las combinaciones del AO y AA analizadas son útiles para los procesadores de carnes o productos cárnicos debido a sus propiedades antimicrobianas. Sin embargo, es necesario probar sus implicaciones sensoriales.

Palabras clave: carne, orégano, ajo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Foodborne illness (ETA) are common public health problem. The food industry uses chemical additives to prevent and decrease the risk of contamination, inhibit the growth of microorganisms and extend the shelf life of food products. However, the use of these substances is associated with antimicrobial resistance and toxic problems. Currently, natural alternatives are being sought to guarantee the safety and quality of food; one of them being the use of essential oils. The objective of the study is to evaluate the combined bactericidal effect of garlic essential oil (*Allium sativum*; AA) and oregano (*Origanum vulgare*; AO) on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in vacuum packed beef and stored in refrigeration. The oils were obtained by steam entrainment distillation and the volatile compound profile was obtained by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC / MS). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) were determined for both essential oils, subsequently the CMB of each oil obtained was independently evaluated in beef meat fillets vacuum packed and stored at refrigeration temperature (4 ° C). Four combinations of both oils were then evaluated against *L. monocytogenes* (L1: 2% AO + 5% AA; L2: 4% AO + 5% AA; L3: 2% AO + 2.5% AA; L4: 4% AO + 2.5 % AA); and four combinations against *S. aureus* (S1: 4% AO + 4% AA; S2: 2% AO + 4% AA; S3: 4% AO + 2% AA; S4: 2% AO + 2% AA) and performed four repetitions for each combination and they were analyzed on days 0, 1, 3, 6, 9 and 12. On day 1 the lowest means are found for the S1 and S2 combinations compared to the other combinations. On day 3, combinations S1 and S2 showed no growth of *S.aureus*. On days 6, 9 and 12, combinations S1, S2 and S3 did not show growth of *S. aureus*. Likewise, the L2 combination was the only one in which the absence of *L. monocytogenes* was determined, from day 1. The independent use or combinations of AO and AA analyzed are useful for meat or meat processors due to their antimicrobial properties. However, it is necessary to test its sensory implications.

Key words: meat, oregano, garlic, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

	Descripción	Pag.
Figura 1.	Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Listeria monocytogenes</i> .	11
Figura 2.	Principales ubicaciones bacterianas de los sitios de acción de los aceites esenciales: Citoplasma, membrana citoplasmática, y pared celular.	31
Figura 3.	Producción de ajo (<i>Allium sativum</i> L.) en el mundo: Clasificación de la producción de ajo por continentes en el 2013.	38
Figura 4.	Conversión de la Alicina a Diallil polisulfanos.	39
Figura 5.	Estructura de los principales compuestos de los aceites esenciales de ajo.	40
Figura 6.	Flujograma del diseño experimental del estudio.	46
Figura 7.	Evaluación de la zona de inhibición del aceite esencial	47
Figura 8.	Cromatograma de GC-MS del aceite esencial de orégano.	52
Figura 9.	Cromatograma de GC-MS del aceite esencial de ajo.	53

LISTA DE CUADROS

	Descripción	Pag.
Cuadro 1.	Límites de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	8
Cuadro 2.	Factores asociados con la virulencia de <i>S.aureus</i>	16
Cuadro 3.	Pérdidas de peso promedio de partes de la res con buena y mala calidad en diversas condiciones de enfriamiento.	20
Cuadro 4.	Composición de aceite esencial de diferentes especies de orégano.	28
Cuadro 5.	Actividad antibacteriana relacionada con los componentes químicos de las principales especies de orégano.	30
Cuadro 6.	Composición nutricional del <i>Allium sativum</i> L.	37
Cuadro 7.	Composición del AA.	41
Cuadro 8.	Composición química del <i>Origanum vulgare</i> del orégano por GC-MS.	51
Cuadro 9.	Composición química del <i>Allium sativum</i> (ajo) por GC-MS.	52
Cuadro 10.	Zonas de inhibición del crecimiento (media) con el DDA (ensayo de difusión en disco), concentración inhibitoria mínima (CMI) y concentración mínima de bactericida (CMB) del aceite esencial del orégano ajo contra <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	53
Cuadro 11.	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> frente AO en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.	54
Cuadro 12.	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> frente AA en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.	54
Cuadro 13.	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> frente a AO en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.	54
Cuadro 14.	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> frente a AA en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.	55

- Cuadro 15.** Detección de *Listeria monocytogenes* frente a las combinaciones de AO y AA en carne de res enpacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 3, 6, 9 y 12 días. 56
- Cuadro 16.** Recuento de *Staphylococcus aureus* frente a las combinaciones de AO y AA en carne de res enpacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 3, 6, y 12 días. 57

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la demanda de aditivos alimentarios naturales ha aumentado debido a la percepción negativa que tienen los consumidores sobre los conservantes químicos. En este contexto, el uso de aceites esenciales como antimicrobianos se ha desarrollado como una alternativa natural en la industria alimentaria (Calo *et al.*, 2015). Estos compuestos naturales, incluidos los aceites esenciales, tienen actividad antimicrobiana reconocida y pueden usarse para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes en los alimentos (Prakash *et al.*, 2015).

Las especias y las verduras aromáticas, que se emplean comúnmente como ingredientes alimenticios y agentes aromatizantes, pueden representar una buena fuente de compuestos antioxidantes y antimicrobianos naturales (Shaaban *et al.*, 2012). Sin embargo, la estructura química de los alimentos, el contenido de grasa, las proteínas, la actividad del agua, el pH y las enzimas son factores que pueden disminuir la eficacia del aceite esencial (García-Díez *et al.*, 2017)

El consumidor de hoy en día es más exigente con los alimentos y es consciente sobre los beneficios que algunos producen en su salud (Hoffman y Wiklund, 2006). Este cambio se ha dado como respuesta al aumento de enfermedades que tienen origen en el estilo de vida, consumo de alimentos procesados y muchas veces contaminados que surgen como consecuencia de los problemas ambientales generados por el cambio climático y el calentamiento global. Por este motivo, la demanda de productos orgánicos o de fuentes responsables es cada vez mayor (Verbeke *et al.*, 2010).

En los últimos tiempos se ha incrementado el interés por los métodos de conservación de los alimentos, debido a la pérdida de estos por una mala conservación, lo que trae como consecuencia elevada pérdida de dinero; a esto se suma los brotes de intoxicación alimentaria causada por patógenos microbianos muchos de ellos emergentes. Por ello, la industria alimentaria busca alternativas naturales para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos (Bajpai *et al.*, 2009). Siendo los aceites esenciales los más utilizados debido a que presentan compuestos antimicrobianos como por ejemplo: el timol y el carvacrol en el aceite esencial del orégano (AO); el disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo presentes en el aceite esencial de ajo (AA).

Staphylococcus aureus, produce enterotoxinas que son resistentes a la inactivación de las proteasas gastrointestinales y, por consiguiente, son responsables de intoxicación alimentaria (Mhone *et al.*, 2011). La gastroenteritis, muchas veces grave puede desarrollarse dentro de una a siete horas después del consumo de alimentos contaminados, produciendo diarrea, vómitos y deshidratación. Las infecciones estafilocócicas están asociadas con infecciones de piel, tejidos blandos, articulaciones, huesos, trastornos respiratorios y endovasculares y también se puede presentar en casos de: neumonía, meningitis, osteomielitis y síndrome de shock tóxico (Casagrande *et al.*, 2010).

Otro microorganismo importante es *Listeria monocytogenes*, que se caracteriza por ser facultativo e intracelular. El género *Listeria* comprende bacilos grampositivos que pueden estar solos o formando cadenas cortas, no producen cápsula ni esporas. Crece a temperaturas entre menos 0°C y 45 °C, tolera diferentes rangos de pH (4,5-9,2) y sobrevive a altas concentraciones de NaCl (10% w/v) (Vera *et al.*, 2013). Este microorganismo se transmite a través de los alimentos, llegando a ocasionar cuadros clínicos en el hombre como: encefalitis, septicemia, gastroenteritis y meningitis; siendo el grupo de mayor riesgo los recién nacidos, personas inmunocomprometidas, mujeres embarazadas y adultos de la tercera edad (Wagner y McLauchlin, 2008).

La búsqueda continua de compuestos antimicrobianos eficaces que preserven la calidad e inocuidad de los alimentos, sin perjudicar sus atributos sensoriales ha dado lugar

a muchas investigaciones en la industria alimentaria. Por ello, el presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto combinado bactericida del aceite esencial del ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración.

I. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1.1 Carne

2.1.1. Generalidades

La carne es definida por el Codex Alimentarius como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano” (FAO/OMS, 1996). Bender (1992), indica que es el conjunto de tejidos animales adecuados como alimento.

El principal componente de la carne es el tejido muscular esquelético, que representa del 35-36% del peso de la canal, además de otros tejidos como: conectivo, adiposo, óseo, cartilaginoso y nervioso (Hui *et al.*, 2006). La terminología de “carne fresca” es la carne de animales recientemente procesados, que puede estar envasada al vacío o mediante atmósferas modificadas, que no ha sido sometida a ningún tratamiento distinto a la refrigeración (Zhao *et al.*, 2010). El valor nutricional de la carne magra de vacuno contiene aproximadamente 75% de agua, proteína (22.3%), grasa (1.8%) y ceniza (1.2%) (Forrest *et al.*, 1975).

2.1.2. Microbiología de la Carne

2.1.2.1. Adherencia bacteriana

La carne presenta características como: pH cercano al neutro, alto contenido de humedad, proteínas, minerales, vitaminas, etc. Estas características hacen que la carne sea una fuente excelente para el crecimiento y desarrollo de diversas bacterias

y mohos (Yadav y Singh, 2004). La contaminación de la carne puede ocurrir en cualquier etapa de la cadena cárnica, desde el sacrificio hasta el envasado. Se ha reportado que las células de las biopelículas bacterianas, pueden interactuar con proteínas (colágeno, fibronectina y laminina) de la carne y adherirse exitosamente a su superficie (Chen *et al.*, 2007)

La adherencia bacteriana a la superficie de la carne es un proceso complejo que abarca dos etapas: la primera ocurre por las fuerzas Van Der Waals, esta etapa está asociada a una interacción compleja entre las cargas y la hidrofobicidad de las células de la superficie de la carne (Chen *et al.*, 2007). La adherencia está asociada también con interacciones de los apéndices externos de las células microbianas (flagelos, polisacáridos extracelulares, fimbrias, fibras curli) con receptores específicos de las superficies (García, 2006).

La segunda fase, que es irreversible, se caracteriza porque las bacterias forman polímeros extracelulares que permiten la fijación de estas a la superficie y forman biopelículas, dificultando su remoción. Además se vuelven más resistentes al tratamiento térmico y al químico (Moreno, 1991). La obtención del músculo es estéril y la microbiota inicial de la carne se relaciona con la contaminación proveniente de las plumas, piel, pelos, contenido gastrointestinal, agua, aire, operarios, suelo, instalaciones, etc. (Russo *et al.*, 2006).

La fibra curli es un componente proteico de tipo amiloideo producido por diversas bacterias, estas fibras están involucradas en la adhesión a las superficies, la agregación celular y la formación de biopelículas (Barnhart y Chapman, 2006). La fibra curli permite a las bacterias adherencia a las proteínas de la matriz del huésped, como la fibronectina, la laminina y el plasminógeno, que son los componentes básicos de los tejidos conectivos animales (Chen *et al.*, 2007).

Las biopelículas formadas sobre las carnes crudas aumentan los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores al procesado. *L. monocytogenes* tiene la capacidad de proliferar en entornos fríos y húmedos, ideales

para la formación de biofilms (Chmielewsky y Frank, 2003). Además, presenta gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes utilizando: flagelos, pilis y proteínas de membrana (Keskinen *et al.* 2008).

2.1.2.2. Microorganismos presentes en la carne

La población microbiana presentes en la carne es diversa, ya que depende de la especie animal y del tipo de procesamiento al cual es sometida. La carne fresca es un sustrato que permite el crecimiento microbiano, ya que proporciona nutrientes (azúcares, aminoácidos, vitaminas, cofactores, etc.) y posee valores de pH y A_w generalmente compatibles con el desarrollo microbiano (Zhang *et al.*, 2015).

Después de la contaminación inicial de la carne cruda, el número de células microbianas puede aumentar rápidamente. Sin embargo, los parámetros fisicoquímicos encontrados en varios productos cárnicos varían, esto depende del tipo de carne y de los procesos o tratamientos sometidos, estos parámetros influyen de múltiples maneras. Puede afectar la dinámica del microorganismo y en el número final de unidades formadoras de colonias (UFC) alcanzado por cada uno de los contaminantes iniciales (Champomier-Verge`s y Zagorec, 2015).

Las condiciones de almacenamiento, como la temperatura o los procedimientos de envasado, influyen en el crecimiento microbiano, durante la vida útil de los productos cárnicos. Por lo tanto, la carne también puede considerarse como un ambiente que presenta condiciones desfavorables a los que los microorganismos tienen que enfrentar (Champomier-Verge`s and Zagorec, 2015).

La carne fresca puede contener diferentes bacterias que incluyen especies de *Acinetobacter*, *Carnobacterium*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Escherichia*, *Brochothrix*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomila* y *Streptococcus*, así como levaduras y mohos. Las especies microbianas patógenas que contaminan la carne provenientes del tracto gastrointestinal son las cepas entéricas de *Campylobacter*

jejuni, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Hui *et al.*, 2006).

La flora bacteriana normal presente en los ganglios linfáticos de los animales que pueden contaminar la carne son: *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, y *Salmonella*. Los microorganismos que contaminan la piel del animal incluyen bacterias como: *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* asimismo, levaduras y mohos (Kamenik, 2013).

El almacenamiento de carne fresca en el refrigerador (5 °C) se ve afectado por aerobios psicrótróficos y anaerobios facultativos. *Pseudomonas* spp. crece rápidamente, utilizando primero glucosa y luego aminoácidos. Una vez que los carbohidratos simples se han agotado, otros psicrótróficos (*Brochothrix*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Shewanella putrefaciens*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Moraxella*, y *Enterobacter*) comienzan a utilizar aminoácidos libres y compuestos nitrogenados (Erkmen y Bozoglu, 2016).

2.1.2.3. *Listeria monocytogenes*

2.1.2.3.1 Generalidades

El género *Listeria* incluye al patógeno alimentario *L. monocytogenes* (Pirie, 1940) y otras 14 especies: *Listeria grayi* (Larsen y Seeliger, 1966), *L. innocua* (Seeliger, 1981), *Listeria welshimeri* (Rocourt y Grimont, 1983), *Listeria seeligeri* (Rocourt y Grimont, 1983), *Listeria ivanovii* (Seeliger *et al.*, 1984), *Listeria marthii* (Graves *et al.*, 2010), *Listeria rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010), *Listeria fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013), *Listeria weihenstephanensis* (Lang Halter *et al.*, 2013); y las especies recientemente publicadas *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia* y *Listeria grandensis* (den Bakker *et al.*, 2014). Siendo *L. monocytogenes* y *L. ivanovi* consideradas patógenas.

L. monocytogenes, es una bacteria patógena grampositiva, aerobia, anaerobia facultativa y ubicua que prospera en diversos ambientes como el suelo, el agua, diversos

productos alimenticios, humanos y animales. Los límites de crecimiento van desde una temperatura de -0.4°C a 45°C , como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Límites de crecimiento de *Listeria monocytogenes*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	-0.4	37	45
pH	4.39	7.0	9.4
Actividad de agua (aw)	0.92	-	-

(ICMSF, 1996)

La listeriosis, se adquiere al ingerir productos alimenticios contaminados y afecta principalmente a personas inmunocomprometidas, mujeres embarazadas y recién nacidos. Esta enfermedad se manifiesta como gastroenteritis, meningitis, encefalitis, infecciones de madre a feto y septicemia, lo que resulta en la muerte del 25 a 30% de los casos. Las manifestaciones clínicas de infección con *L. monocytogenes* reflejan su capacidad para cruzar tres barreras estrechas en el huésped humano. Después de la ingestión, *L. monocytogenes* cruza la barrera intestinal al invadir el epitelio intestinal, obteniendo así acceso a los órganos internos. Durante las infecciones graves, cruza la barrera hematoencefálica provocando la infección de las meninges y el cerebro, y en mujeres embarazadas, cruza la barrera fetoplacentaria produciendo la infección del feto (Khelef *et al.*, 2005).

L. monocytogenes presenta los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), a partir de estos se pudieron identificar los siguientes serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. Cuatro serotipos principales se pueden clasificar en cuatro serogrupos distintos: IIa (serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c), IIb (1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e), IIc (1/2c y 3c), y IVb (4b, 4d y 4e). Entre los 13 serotipos de *L. monocytogenes*, los serotipos 4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c representan más del 95% de los aislamientos recuperados de alimentos, superficies ambientales y muestras biológicas (Jamshidi y Zeinali, 2019).

2.1.2.3.2. Patogenicie

L. monocytogenes es una bacteria intracelular facultativa y su ciclo de vida refleja una notable adaptación a la supervivencia intracelular y la multiplicación en macrófagos y otros tipos de células (Pamer, 2004). Cuando el alimento contaminado es ingerido, esta bacteria invade los macrófagos y los fagocitos no profesionales, estas son células que no presentan receptores fagocíticos y tienen una capacidad fagocítica limitada, entre ellas tenemos a los linfocitos, eritrocitos, células del endotelio, etc.

La entrada a estas células es inducida por la unión de proteínas de superficie bacteriana (internalina InlA y InlB) a los receptores en la célula huésped (células Met y E-cadherina) (Pamer, 2004). Las invasinas (InlA e InlB) son necesarias para la entrada bacteriana a los enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales, pero la entrada inmediata está restringida al menor número de tipos de células que expresan su receptor. La entrada de esta bacteria a células de mamíferos es un proceso dinámico que requiere la polimerización de la actina y la remodelación de la membrana, y es un excelente ejemplo de cómo una bacteria puede manipular la señalización de la célula huésped y las vías endocíticas para su beneficio (McCaffrey *et al.*, 2004).

La InlA se une al receptor E-cadherina, ubicado en varios tipos de células incluyendo al enterocito, la interacción de InlA/E-cadherina es crítica para la invasión del epitelio intestinal y activa una compleja vía de señalización que conduce a la reorganización del citoesqueleto. InlB se une al receptor Met (factor de crecimiento de hepatocito), Met es una proteína tirosina kinasa y, por lo tanto, la interacción InlB/ Met produce una fosforilación transitoria de Met (Shen *et al.*, 2000).

El proceso de internalización se produce por la activación de las vías de señalización, estas son activadas por InlA y InlB, esta activación provoca un reordenamiento del citoesqueleto y la entrada de *L. monocytogenes* a la célula. (Veiga *et al.*, 2007). La remodelación local de actina en el sitio de unión de InlB está mediada por el reclutamiento y la activación del complejo de nucleación de actina, que promueve la polimerización de actina (Veiga *et al.*, 2007).

Una vez dentro *L. monocytogenes* se internaliza en una vacuola (fagosoma). La membrana de la vacuola se interrumpe por la secreción de dos fosfolipasas C: fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) y fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC), codificadas por *plcA* y *plcB*, respectivamente, así también la toxina formadora de poros (listeriolisina O) (Vera *et al.*, 2013). Las bacterias se liberan en el citoplasma, y expresan genes para adquirir los nutrientes necesarios para la multiplicación intracelular donde se multiplican y comienzan a polimerizar a la actina, se forma las colas de actina características que le permite pasar a una célula vecina formando protuberancias en la membrana plasmática como se muestra en la Figura 1 (Kocks *et al.*, 1992). *L. monocytogenes* aprovecha la polimerización de actina en el citoplasma para facilitar el movimiento intracelular e intercelular (Cabrita *et al.*, 2014). La tecnología de los microarrays de ADN esta permitiendo descubrir otros mecanismos por los cuales *L. monocytogenes* manipula la célula huésped, esta tecnología determina genes que se activan específicamente por la entrada bacteriana en la célula huésped (Cohen *et al.*, 2000).

L. monocytogenes se multiplica rápidamente y evade la exposición a los anticuerpos o neutrófilos; cuando cruza la barrera intestinal, se disemina en sangre y llega a los ganglios mesentéricos, posteriormente migra al hígado y bazo multiplicándose en los macrófagos o en las células epiteliales del parénquima. Esta bacteria es capaz de evadir la respuesta inmune y continuar su multiplicación en el organismo (Cohen *et al.*, 2000).

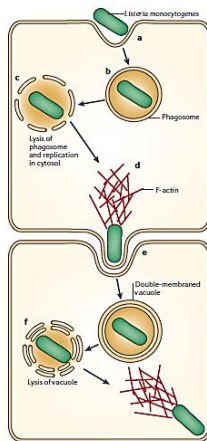


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *Listeria monocytogenes*.
(Fuente: Cossart y Lecuit, 1998).

2.1.2.3.3. *L. monocytogenes* en carne y productos cárnicos

La presencia de *L. monocytogenes* en productos alimenticios genera grandes pérdidas de dinero en la industria alimentaria y es sinónimo de falta de seguridad alimentaria, por ello la identificación, el control y el tratamiento de las infecciones por listeria son necesarios (Ivanek *et al.* 2005). La presencia de *L. monocytogenes* en carne se ha reportado en varias investigaciones, tanto en canales enteras como en cortes de carne (Skovgaard y Norrung, 2009; Buncié, 1991). Los productos cárnicos frecuentemente contaminados son: carne picada, salchichas de pavo, pasta de salami, mortadelas, etc. Siendo la carne cruda picada y el paté, los productos con mayor porcentaje de contaminación (70%) (Skovgaard y Norrung, 2009). El desarrollo de esta bacteria en los productos cárnicos depende del pH, tipo de carne (grasa o magra), cantidad y tipo de microflora originaria, ausencia o presencia de conservantes y temperatura a la que han estado expuestas (Grau y Vanderlinde, 1992).

Meloni *et al.* (2013), reportaron la prevalencia de *L. monocytogenes* en canales porcinas en Italia entre los años 2008 al 2011, ellos informaron que el 33% de las canales porcinas eran positivas para *L. monocytogenes* con los serotipos 1/ 2a y 1/ 2c. Khen *et al.* (2015), investigaron la contaminación con *L. monocytogenes* en canales de ganado bovino en Irlanda entre julio de 2007 y junio del 2009, determinaron que el 27% de las pieles de bovino y el 14% de las canales estaban contaminadas con *L.*

monocytogenes, y 1 / 2a y 4b fueron los serotipos más comunes. Barrientos *et al.* (2015), reportaron una frecuencia de $13.9 \pm 6.1\%$ de *L. monocytogenes* en un total de 88 canales de cerdo, en un centro de beneficio de Lima- Perú.

Grau *et al.* (1992), detectaron en 175 muestras de carnes procesadas envasadas al vacío 93 muestras contaminadas con *L. monocytogenes*, la carne fue obtenida de tiendas minoristas. Así también, encontraron 7 muestras que tenían más de 10^3 UFC/g. Esto confirma que el crecimiento de este anaerobio facultativo no se afecta por el envasado a vacío. Bersot *et al.* (2008), concluyeron que el envasado al vacío y el almacenamiento bajo refrigeración no fueron efectivos para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en rodajas de mortadela, lo que indican que las buenas prácticas de fabricación y los programas HACCP implementados son esenciales para garantizar la seguridad de este producto.

2.1.2.3.4. Epidemiología

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha evaluado brotes de infecciones alimentarias por distintas bacterias, entre ellas *Listeria monocytogenes*, que infecta aproximadamente a 1600 personas al año en Estados Unidos en los últimos años (CDC, 2016). Los brotes de *L. monocytogenes* en este país se han relacionado al consumo de ensaladas empaquetadas, queso blando y melones. Este patógeno causó 292 muertes fetales entre 2009 y 2011, determinándose una tasa de mortalidad aproximada del 21% (CDC, 2013).

Rodríguez (2018), en Brasil determinó una frecuencia de 3.1% de *L. monocytogenes* en verduras listas para consumir; asimismo concluye que en Latinoamérica existe un bajo reporte de casos y una subestimación del problema; sin embargo, se espera que, por las condiciones sanitarias de muchos países, la frecuencia y letalidad sea elevada en comparación con países desarrollados.

En el Perú, *L. monocytogenes* es uno de los causantes de ETAs, y tiene como principales fuentes de infección la ingesta de carne insuficientemente cocinada, hortalizas y frutas contaminadas, entre otros. En los últimos 5 años se ha notificado a través del

Sistema de Vigilancia Epidemiológica un promedio de 45 brotes de ETA, 65 % de los cuales se concentran en los departamentos de Lima (20,3 %), Junín (10,1 %), Cajamarca (9,6 %), Cusco (8,6 %), Huánuco (6 %), Loreto (5,6 %) y Piura (4,7 %) (Ministerio de Salud, 2019).

Diversos estudios apoyan lo mencionado anteriormente, como el estudio de Villanueva *et al.* (2017) quienes reportaron una incidencia de 18,67% en muestras de quesos frescos procedentes de diferentes mercados del Cercado de Lima. Pérez (2013), determinó una incidencia de *L. monocytogenes* de 78% en Salchicha tipo Huacho procedentes de Mercados de Abastos del Cercado de Lima.

2.1.2.3.5. Tratamiento

El tratamiento incluye un beta-lactámico solo o en combinación con un aminoglucósido, es decir, gentamicina con penicilina o gentamicina con ampicilina, son los fármacos de elección en el tratamiento de infecciones graves por *L. monocytogenes* (Murray *et al.*, 2015). Otros antibióticos, como el trimetoprim-sulfametoxazol, se utilizan con éxito para tratar la listeriosis, sin embargo, se ha informado de que la bacteria ha hecho resistencia en algunos de ellos, como a las fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas (Murray *et al.* 2015; Olaimat *et al.*, 2018).

El uso de antibióticos a través de la auto prescripción de los productores para la prevención y el tratamiento de enfermedades de los animales aumentó en un 25% entre 2003 y 2012 (Lim *et al.*, 2014). Desde entonces, muchos estudios informaron la mayor prevalencia de *Escherichia coli* resistente a antibióticos, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Staphylococcus aureus* en Corea (Chae *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2011). Aunque *L. monocytogenes* rara vez adquirió resistencia a los antibióticos, la primera *L. monocytogenes* resistente a los antibióticos se encontró en 1988 (Altuntas *et al.*, 2012), estudios recientes informaron la existencia de *L. monocytogenes* resistente a la ampicilina, amoxicilina, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina y vancomicina (Yücel *et al.*, 2005; Ennaji *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Pesavento *et al.*, 2010;).

2.1.2.4. *Staphylococcus aureus*

2.1.2.4.1. Generalidades

S. aureus es una bacteria grampositiva y ubicua, cuyo diámetro es 1µm, se caracteriza porque se dividen en agrupaciones semejantes a racimos de uvas, son inmóviles, anaerobio facultativo, no formadora de esporas, fermentadores de glucosa, positivos para catalasa y negativos para oxidasa. El género *Staphylococcus* presenta 35 especies y 17 subespecies (Harris *et al.*, 2002). Este género tiene la capacidad de adaptarse, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, presenta la capacidad de propagarse fácilmente y transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos en humano y animales y viceversa (Fox *et al.*, 2007).

Este género presenta trece serotipos de polisacáridos capsulares, siendo los serotipos capsulares 5 y 8 los que están asociados a las infecciones en humanos y animales. Se han descrito 8 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I) siendo el serotipo A el más común; estas toxinas son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, siendo responsables de intoxicación alimentaria (Mohamed *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus es la especie más virulenta porque induce alteraciones en los tejidos y produce lesiones con supuración y cicatrización, y es responsable de varias infecciones en animales y humanos, además presenta la capacidad de colonizar varios sitios de la mucosa del cuerpo.

2.1.2.4.2. Patogenia

Las proteínas de la superficie celular bacteriana (las proteínas de unión a fibronectina) interactúan con las moléculas del huésped (colágeno, fibronectina, etc), para facilitar la unión. La patogenia implica cinco etapas: colonización, infección local, diseminación sistémica, infecciones metastásicas e intoxicación (Oliveira *et al.*, 2018). *S*

aureus utiliza diferentes proteínas, que se encuentran en su superficie, para poder adherirse a diferentes compuestos de la matriz extracelular como: fibronectina, proteínas A, etc. Los factores asociados a la virulencia se muestran en el Cuadro 2.

Después de la adhesión a la célula huésped, se libera un conjunto de señales intracelulares para la polimerización de los microfilamentos de actina en la célula, por ello *S. aureus* es englobado por pseudópodos y se internaliza en un endosoma (Jevon *et al.*, 1999). Posteriormente, *S. aureus* se libera del endosoma y se multiplica en el citoplasma celular (Qazi *et al.*, 2001). Shompole *et al.*, 2003 reportaron que la expresión del gen Agr, activa un sistema regulador de los factores de virulencia de la bacteria y también activa la producción de hemolisinas y otras toxinas, para la ruptura del endosoma y liberación de *S. aureus* al citoplasma del huésped.

La α -toxina es una toxina que ejerce su acción citolítica formando poros en las membranas de eritrocitos, células epiteliales, etc. Estas alteran la osmorregulación, el flujo de cationes y otras moléculas, llegando, incluso, a producir apoptosis. También tiene la capacidad de unión y oligomerización a la membrana de la célula huésped. (Conisilla y Guerra, 2019)

Las enterotoxinas no son procesadas por las células presentadoras de antígenos, sin embargo, se unen al MHC-II (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II) y produce una proliferación policlonal de linfocitos T y la liberación de citoquinas (Foster y Bohach, 2000). Esta forma de respuesta inmune puede evadir el mecanismo de defensa del huésped y ayuda a la permanencia bacteriana (Ferens y Bohach, 2000). Estas enterotoxinas producidas por *S.aureus* provocan intoxicación alimentaria en el hombre, asimismo producen el síndrome del choque tóxico (Ferens y Bohach, 2000).

Después de la colonización inicial, esta bacteria posee diferentes formas para evadir la respuesta del sistema inmune del hospedador (Foster y Bohach, 2000). Finalmente, esta bacteria produce un grave daño en el tejido, favoreciendo su adherencia a otros tejidos y posteriormente a su diseminación (Kerro Dego *et al.*, 2002). Foster y Bohach, (2000) reportaron que estas infecciones, se caracterizan por la formación de

abscesos con una infiltración masiva de polimorfo nucleares que liberan una gran cantidad de enzimas lisosómicas al medio extracelular, contribuyendo con ello al daño tisular.

Cuando hay formación de un absceso cutáneo localizado a causa de *S. aureus*, puede ocasionar infecciones localizadas. La bacteria puede ingresar a la sangre y diseminarse sistémicamente a diferentes órganos causando sepsis y provocar endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, etc (Oliveira *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Factores asociados con la virulencia de *S.aureus*

Componentes superficiales	Toxinas y enzimas extracelulares
<ul style="list-style-type: none"> • Polisacarido capsular • Polisacarido extracelular • Proteínas superficiales <ul style="list-style-type: none"> ✓ Proteínas de unión a colágeno (Cna) ✓ Proteínas a fibronectina (FnBPA y FnBPB) ✓ Proteínas a unión de fibrinógeno (ClfA y ClfB) ✓ Proteína A (Spa) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxinas con actividad sobre membrana <ul style="list-style-type: none"> ✓ Toxinas o hemolisinas α, β ✓ Leucocidina • Toxinas con actividad de superantígenos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Enterotoxinas (A-E y G-J) ✓ Toxina del síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1) ✓ Toxinas epidermolíticas o exfoliativas (A y B) • Enzimas extracelulares <ul style="list-style-type: none"> ✓ Estafiloquinasa ✓ Coagulasa ✓ Hialuronidasa ✓ Lipasas ✓ Proteasas ✓ ADNasa termoestable o termonucleasa ✓ Catalasa

(Fuente: Martínez, 2005)

2.1.2.4.3. *S. aureus* en carne y productos cárnicos

La carne y los productos cárnicos procesados proporcionan un entorno beneficioso para el crecimiento de *S. aureus*. Según la Administración Coreana de Alimentos y Medicamentos, aproximadamente el 30% de los casos de intoxicación alimentaria fue por *S. aureus* en Corea (entre los años 2001 y 2006), los alimentos

involucrados fueron la carne y los productos cárnicos (Kim *et al.*, 2018). En carne de res *S. aureus* ha sido aislado e identificado en todo el mundo (Jackson *et al.*, 2013). Por lo tanto, este patógeno representa una amenaza para la seguridad alimentaria de la carne de res y los productos derivados.

Múltiples estudios en los Estados Unidos han revelado una alta prevalencia de cepas de *S. aureus* multidrogo resistente (MDR) en carnes vendidas por comerciantes minoristas (Waters *et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013), indicándose que representa una amenaza para los trabajadores de la industria cárnica debido a que pueden adquirir cepas virulentas. Además, los consumidores de carne contaminada pueden tener el riesgo de que su organismo sea colonizado por cepas MDR, pudiendo desarrollar infecciones graves (Kluytmans *et al.*, 1995) o actuar como portadores en la transmisión de *S. aureus* (Fritz *et al.*, 2009). El proceso de producción de carne también puede contribuir a la contaminación de las carnes para venta minorista a través de trabajadores, animales de alimentación, superficies y equipos de procesamiento de carne (Jackson *et al.*, 2013).

Se ha encontrado *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en varias especies de animales productores de carne, incluyendo cerdos, pollos y ganado (Hasman *et al.*, 2010). La identificación de MRSA en estos animales, junto con la aparición de la cepa emergente ST398 (MRSA no tipificable) en la población porcina y el potencial observado de esta cepa, puede causar infecciones graves e incluso la muerte en humanos. Por ello, es importante investigar los productos cárnicos debido a que se pueden comportar como vehículo para la transmisión de MRSA de la granja a la población humana general (Hasman *et al.*, 2010).

Varios estudios han documentado la presencia de MRSA en productos de carne cruda al por menor, con una prevalencia que va desde <1 % en Asia (Lim *et al.*, 2010) hasta 11.9 % en los Países Bajos (de Boer *et al.*, 2009). Weese *et al.* (2010) encontraron una prevalencia de 9.6% en carne de cerdo, 5.6% en carne de res y 1.2 % en carne de pollo, en mercados de cuatro provincias de Canadá. Asimismo Pu *et al.* (2009)

reportaron 4.1 % en carne de cerdo y 0.8% en carne de res, en supermercados de Louisiana.

2.1.2.4.4. Epidemiología

Staphylococcus aureus es una bacteria comensal y patógena. Aproximadamente del 50% al 60% de los individuos están colonizados de forma intermitente o permanente con *S. aureus* y, por lo tanto, existe un potencial relativamente alto de infecciones (Gorwitz *et al.*, 2008). *S. aureus* se encuentra entre las causas más frecuentes de infecciones bacterianas a nivel mundial (Kraker *et al.*, 2013).

La elevada prevalencia, *S. aureus* es bien conocida; así como, su capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos (Chambers y DeLeo, 2009). *S. aureus* resistente a la penicilina surgió a finales de la década de 1940 y, a mediados de la década de 1950, la resistencia a la penicilina era tan frecuente que el antibiótico ya no era eficaz para el tratamiento de infecciones (Magill *et al.*, 2014). A principios de la década de 1960 se informó de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y luego se extendió por todo el mundo durante las próximas décadas. El MRSA ahora es endémico en los centros de atención médica en prácticamente todos los países (Magill *et al.*, 2014).

Chile registró 885 brotes de ETA asociados a *S.aureus* en el 2016 (Alarcón *et al.*, 2017). En el Perú, durante el año 2014 al 2018, fueron notificados a través del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC MINSA) un total de 234 brotes de ETA a nivel nacional (23 departamentos), donde *Staphylococcus aureus* era una de las bacterias asociadas (Ministerio de Salud, 2019). En general, se reportó un promedio de 47 brotes anuales, 6 098 personas afectadas, 1311 hospitalizados y 29 defunciones en todo el país, donde estaban involucrados los agentes más comunes causantes de ETA. Los departamentos con mayor porcentaje de brotes fueron: Lima (22,2 %), Cusco (11,1 %) y Cajamarca (8,5 %) (Ministerio de Salud, 2019).

2.2. Conservación de la carne

2.2.1. Generalidades

Los diferentes métodos de conservación se basan en el control de la actividad enzimática microbiana y de los procesos fisicoquímicos. Existen diferentes métodos como la refrigeración y congelación, que se basan en el control de la temperatura, asimismo existe otros métodos que controlan la humedad del alimento y poseen acción antimicrobiana, entre ellas tenemos al empacado, uso de agentes químicos y radiación. Actualmente, los métodos más usados son los de inactivación no térmica, como la alta presión hidrostática, sistemas de empacado con atmósferas modificadas, empaques activos, biopreservación y el uso de componentes antimicrobianos (Zhou *et al.*, 2010).

2.2.2. Refrigeración

La refrigeración es un método de conservación tradicional, el enfriamiento es importante para la higiene, la seguridad, la vida útil, la apariencia y la calidad de la carne; la refrigeración reduce la temperatura de la superficie de la carcasa y mejora su secado para disminuir el crecimiento bacteriano (Ockerman y Basu, 2004).

Un aumento en la velocidad del aire y una disminución en la temperatura reducen el tiempo de enfriamiento. Sin embargo, un factor limitante es la dificultad para eliminar el calor rápidamente de la parte más profunda de la carcasa. En el enfriamiento por aire mediante convección natural, el refrigerante se bombea a través de los tubos de enfriamiento, por ello es lento y en gran medida incontrolable, mientras que el enfriamiento por aire por convección forzada, junto con ventiladores para el movimiento del aire es mucho más eficiente (Ockerman y Basu, 2004).

El enfriamiento rápido de la carcasa aumenta el rendimiento del producto debido a una menor evaporación de la superficie, mientras que el secado rápido de la superficie de la carcasa ayuda a reducir el crecimiento bacteriano. El enfriamiento ultrarrápido de la carne previa al rigor puede, por otro lado, conducir al acortamiento

en frío y al endurecimiento. El enfriamiento por pulverización puede mejorar la oxigenación de la mioglobina de la superficie sin aumentar la metamioglobina, manteniendo así una apariencia brillante y eliminando la pérdida de peso (Feldhusen *et al.*, 1995).

Bouton *et al.* (1957), fueron los primeros en indicar que cuanto mayor sea el volumen de la carcasa y la cobertura de grasa, más tiempo tardará en enfriarse con una velocidad y temperatura de aire determinada. Asimismo, concluyen que la pérdida de peso en partes pequeñas y sin cobertura de grasa (mala calidad) son mayores que las de las partes grandes que tienen una buena cobertura grasa (buena calidad), como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Pérdidas de peso promedio de partes de la res con buena y mala calidad en diversas condiciones de enfriamiento.

Condiciones	% Pérdida de peso	
	Buena Calidad	Mala Calidad
1 día a 0 °C	-	-
2 días a 20 °C	1.7	3.8
3 días a 0 °C	0.7	0.9
14 días a 0 °	1.6	3.2

(Bouton *et al.*, 1957)

El tiempo de vida útil de la carne en refrigeración no excede las dos semanas, este tiempo varía por diferentes factores como: el potencial redox, temperatura, densidad microbiana, pH, etc. (Ordóñez *et al.*, 1999). Forrest *et al.* (1975) recomendaron el consumo de la carne fresca refrigerada, a nivel doméstico, dentro de los 4 primeros días de almacenamiento. Kamenik, (2013) reportó un incremento de la vida útil en 30 a 70%, si la carne se almacena a -1.5 °C.

El almacenamiento refrigerado (de -1.5 a 5 ° C) se usa de forma rutinaria después del sacrificio, ya sea en forma de colgar todo la carcasa (pre-deshuesado) o en cortes primarios envasados al vacío (post-deshuesado). El almacenamiento refrigerado generalmente se lleva a cabo entre 24 horas y varias semanas después del sacrificio, y a menudo varía en duración y temperatura según las especie y el

mercado. El almacenamiento refrigerado preserva la carne del deterioro microbiano a bajas temperaturas y mejora la calidad de la carne a través de la proteólisis antes, durante y después del rigor mortis (Hopkins y Thompson, 2002). También permite que la carne se mantenga durante períodos más largos, lo que ayuda a la distribución del mercado.

2.2.2.1. Sabor

El sabor es una sensación de la boca provocada por las grasas y otros precursores (azúcares y aminoácidos) de un producto cárnico que afecta el gusto del consumidor (Khan *et al.*, 2015). El proceso de almacenamiento refrigerado tiende a aumentar el sabor con el tiempo del almacenamiento, debido a la oxidación de ácidos grasos volátiles (VFA) y aminoácidos (Wood *et al.*, 1999). Sin embargo, una vez que el tiempo de refrigeración y oxidación han superado un umbral de aceptabilidad, puede provocar rancidez a través de su asociación con un sabor rancio que es percibido por los consumidores (Bueno *et al.*, 2013; Corbin *et al.*, 2015). Se utiliza un marcador clave para la oxidación de lípidos como el malondialdehído (MDA), medido por el método de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (Tarladgis *et al.*, 1960).

A pesar del uso generalizado de TBARS, su relación con la percepción sensorial de la ranciedad sigue siendo bajo, la aceptación y el rechazo de los consumidores a menudo varían entre los estudios. Esta variación entre estudios probablemente se debe al uso de diferentes metodologías en el empaquetado y temperaturas de almacenamiento refrigerado (Zhou *et al.*, 2010).

Sumner y Jenson (2011), reportaron un amplio espectro de umbrales de duración (12 semanas en carne de cordero almacenada a menos 0.5 a menos 2.4 °C) de almacenamiento refrigerado en base a la ausencia de olor de confinamiento. Asimismo Small *et al.* (2012), reportaron hasta 24 semanas en carne de res a -0.5 °C, y la aceptabilidad del consumidor por hasta 12 semanas en cordero a -0.3 °C y Kiermeier *et al.* (2013) reportó hasta 26 semanas en carne de vacuno a -0.5 a -1 °C. Colle *et al.* (2015) no encontraron diferencias significativas en el sabor o TBARS

después de 9 semanas de almacenamiento de carne de res a 0 °C, aunque en otros estudios, los valores de TBARS fueron más altos en estas duraciones debido a diferencias metodológicas (Ponnampalam *et al.*, 2014).

2.2.2.2. Color

El color de la carne es un parámetro importante a nivel minorista debido a su percepción de frescura y calidad para los consumidores (Risvik, 1994). Las definiciones subjetivas de color varían, aunque se ha informado la preferencia del consumidor por la carne de res roja cereza brillante (AMSA, 2012). El uso de medidas colorimétricas objetivas es común, las investigaciones registran los valores de la escala de color de la Comisión Internacional de Eclairage (CIE): L * denota la claridad a la oscuridad, a * denota el rojo al verde y b * denota el amarillo al azul (CIE, 1978).

Los cambios oxidativos en la mioglobina (Mb) ocurren a medida que aumenta el tiempo de refrigeración anaerobia, lo que se refleja en la variación de la medición del color instrumental, debido a la formación de desoximioglobina (DMb), que contribuye a un color púrpura y al abrir el envase se forma la oximioglobina (OMb), dando un color rojo brillante (Mancini y Hunt, 2005). El almacenamiento refrigerado prolongado en un medio aeróbico (exposición minorista) conduce a una mayor oxidación de Mb a metamioglobina (MMb), lo que contribuye a un color marrón. Del mismo modo, el aumento de las temperaturas de almacenamiento refrigeradas también puede disminuir la estabilidad del color (Choe *et al.*, 2016).

2.2.2.3. Microbiología

La carne presenta bacterias de descomposición, incluidas las bacterias ácido lácticas (LAB), *Enterobacteriaceae*, *Brocothrix thermospacta* y *Clostridium* sp. Estas especies se originan principalmente por la contaminación en el matadero (Dainty y

Mackey, 1992), y con la excepción de LAB y clostridios se limitan a proliferar solo con disponibilidad de oxígeno; otros factores de riesgo involucrados incluyen la temperatura del almacenamiento en refrigeración, pH, actividad del agua (a_w) y las condiciones de empaque (Mills y Brightwell, 2014).

El almacenamiento refrigerado anaeróbico utilizando el envasado al vacío generalmente da como resultado la proliferación de ácido lácticas (LAB), que tiene un potencial de deterioro de 10^7 UFC/cm² y produce un olor desagradable (Small *et al.*, 2012). La proliferación de LAB conduce a sabores ácidos y a la presencia de un color verde o decoloración de la carne por la producción de sulfuro de hidrógeno que reacciona con Mb para formar sulfomioglobina (Mills *et al.*, 2014).

El prolongado almacenamiento refrigerado anaeróbico aumenta la disponibilidad de agua (aumento de a_w) (Mills *et al.*, 2014) y aumenta el pH debido a la descomposición del tejido muscular, particularmente de la carne de cordero almacenada durante 6 semanas o más (Kim *et al.*, 2014; Kiermeier *et al.*, 2013) y carne de res almacenada durante 12 semanas o más (Hughes *et al.*, 2015). Ambos rasgos (a_w y pH) pueden proporcionar información sobre el potencial de deterioro microbiano, de modo que si a_w excede 0.93 (Egan *et al.*, 1988) y el pH excede 5.8 (Gribble *et al.*, 2014) esto dará como resultado una proliferación más rápida de microbios específicos de deterioro.

Sin embargo, la temperatura de almacenamiento tiene el mayor impacto en la carga microbiana de la carne almacenada refrigerada (Giannuzzi *et al.*, 1998) e idealmente debería estar entre 0 y -1.5 ° C, aunque en la práctica esto no siempre es logrado (Mills *et al.*, 2014).

2.2.3. Empacado al vacío

El envasado al vacío se refiere a la técnica de eliminar el aire de un envase antes del sellado y es un método de conservación de alimentos. Este tipo de envasado mantiene por mayor tiempo las características organolépticas y sensoriales de la

carne (Rodas-González *et al.*, 2011). Impide el crecimiento de microorganismos aerobios degradativos como *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas spp*; bacterias encontradas normalmente en la carnes (Nychas *et al.*, 2008). La falta de oxígeno en los envases puede minimizar las reacciones de deterioro oxidativo y reducir el crecimiento de bacterias aeróbicas, lo que generalmente hace que los pigmentos se encuentren en el estado de desoximioglobina. La combinación de este envasado a condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas (0°C a 4°C) favorece la selección de microorganismos anaerobios facultativos y psicrótrofos (Nychas *et al.*, 2008).

Seideman (1975), identificó las siguientes ventajas para el envasado al vacío: (a) reducción de la pérdida de peso, porque la película impermeable evita la deshidratación de las superficies de carne, superficie que normalmente se encuentra expuesta en un sistema de refrigeración abierto; (b) la conservación del color muscular en su estado más fresco (mioglobina reducida) debido a la exclusión de oxígeno; (c) mantiene una mejor higiene debido a la eliminación de la contaminación externa; (d) proporciona un medio de comestibilidad prolongada en comparación a la carne de vacuno sin envasar al vacío y, (e) proporciona un entorno ideal para el envejecimiento de la carne.

Las carnes que presentan un pH entre 5.3 y 5.8 antes del envasado al vacío y refrigerado; tienden a un mayor desarrollo de bacterias como las del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* (Lucquin *et al.*, 2011), siendo estas bacterias responsables de la producción de aromas fuertemente lácticos y ácidos cuando su número alcanza las 10^7 UFC/g. Asimismo, es posible que se desarrollen en estas condiciones bacterias productoras de gases como bacterias pertenecientes al género *Clostridium* y bacterias gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae*, (Lucquin *et al.*, 2007).

La vida útil de la carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración varía y aumenta cuando la temperatura disminuye; un estudio realizado en Uruguay, demostró que cortes de carne de res envasados al vacío y almacenados a 0°C, mantienen las características fisicoquímicas y sensoriales en condiciones

adecuadas para su comercialización hasta los cuatro meses de almacenamiento (García *et al.*, 2015). Dicho tiempo supera al tiempo sugerido de 3 meses para el comercio internacional (Bell y Garout, 1994).

El envasado al vacío de carne ofrece muchas ventajas, pero una desventaja es el costo relativo de las películas impermeables utilizadas para el envasado, asimismo se cree erróneamente que el envase soporta más temperatura debido a su superioridad en el control de gases que la carne de res empaquetada aeróbicamente. Dado que estos paquetes tienen un ambiente anaeróbico y, si se les permite alcanzar la temperatura ambiente, las condiciones están presentes para un aumento en el número de patógenos que representan un peligro potencial para la salud (Johnson, 1974).

2.2.3.1 Películas Plásticas

Las propiedades físicas de la película utilizada en el envasado al vacío son probablemente el factor más importante para mantener la calidad de la carne. Johnson (1974) afirmó que las películas utilizadas en el envasado al vacío deben poseer características tales como: resistencia mecánica, resistencia a la perforación, capacidad para producir un buen sellado, baja tasa de transmisión de vapor de humedad y, sobre todo, baja tasa de transmisión de oxígeno y baja permeabilidad a otros gases.

Las películas semipermeables tienen como función regular el paso del gas y de la humedad del exterior hacia el interior del empaque; la calidad de la carne empacada está influenciada parcialmente por las propiedades de los materiales del empaque. La elección de la película para empacar carne o productos cárnicos depende mayormente del tiempo que permanecerá envasado y las condiciones de almacenamiento (Ospine y Cartagena, 2008).

Los materiales que son utilizados en el empaque de los productos cárnicos son generalmente poliméricos con buenas características de barrera para el O₂, como el polietileno, las poliamidas, y el polipropileno (Pettersen *et al.*, 2004). El cloruro de polivinilo y el polietileno de baja densidad son los principales plásticos empleados

en el empaçado (Pettersen *et al.*, 2004). El polipropileno es químicamente similar al polietileno pero tiene mejores propiedades de barrera hacia el vapor de agua que el polietileno, y llega a proporcionar un efecto de barrera a los gases de hasta siete a diez veces más y presenta una excelente resistencia a la grasa. (Ospina y Cartagena, 2008).

El equipo de envasado al vacío elimina el aire atmosférico o elimina el aire del paquete con mezclas gaseosas como N₂, CO₂ o mezclas de N₂ y CO₂ antes de sellar con calor las capas de película. La elaboración común para las bandas del paquete superior e inferior es el polímero de barrera de nylon de cloruro de polivinilideno o alcohol etileno vinílico. El nylon proporciona volumen, tenacidad y bajo punto de fusión, mientras que la capa de barrera evita la penetración de vapor y el ionómero proporciona las características necesarias para sellado (Jenkins y Harrington, 1991).

Una variación del envasado al vacío es que la película del envase presente una barrera externa y capas internas permeables al aire, de modo que antes de la exhibición minorista, la capa de película de barrera externa se despegue de la capa permeable para que el aire pueda entrar en contacto con el producto cárnico y producir un color atractivo para el consumidor (Belcher, 2006).

2.3. Orégano (*Origanum vulgare*)

2.3.1 Generalidades

Hay una gran cantidad de especies a nivel mundial, designadas con el nombre de orégano, la mayoría de ellas pertenecen a los géneros *Origanum* (familia: *Lamiaceae*) y *Lippia* (familia: *Verbenaceae*) (Amadio *et al.*, 2011).

Existen diferentes tipos de orégano del género *Origanum*: *O. vulgare* L, *O. viride* y *O. virens* que representan la región mediterránea. México presenta varios géneros de las familias: *Lamiaceae* (*Calamintha*, *Hedeoma*, *Hyptis*, *Mesosphaerum*, *Monarda*, *Origanum*, *Plectranthus* y *Poliomintha*), *Verbenaceae* (*Lantana* y *Lippia*) (Martínez-Rocha *et al.*, 2008). Klauer, (2009) describe la siguiente ubicación taxonómica:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Verbenales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum*.

Especie: *Origanum* spp L

El orégano se ha cultivado desde la antigüedad, gracias a sus propiedades herbales y terapéuticas, y actualmente se utiliza como un ingrediente aromatizante en la culinaria mundial. Las especies de *Origanum* se han cultivado en Egipto por más de 3000 años; asimismo los antiguos griegos lo usaban desde la época clásica y desde el siglo XIII se cultiva en Inglaterra (Tibaldi *et al.*, 2011).

El orégano presenta variedades en forma silvestre por toda Asia occidental y Europa, siendo la más distribuida la mejorana común (*Origanum majorana*) utilizada en la gastronomía tradicional italiana. El orégano común crece en las montañas de la zona Mediterránea y fueron los españoles quienes introdujeron el orégano (*Origanum vulgare*) al Perú, que se siembra al sur del país. Actualmente Argentina y Perú son los países de Latinoamérica, que exportan grandes cantidades de esta planta aromática. (García *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Composición química de AO de diferentes especies de orégano.

Tipo de orégano	Lugar	Composición	Referencia
<i>L. palmeri</i>	Álamos y Puerto del Orégano (Sonora, México)	P-cimeno (22.37 y 14.25%), timol (21.39 y 15.11%), γ -terpinene (6.69 y 4.23%), isoaromandreno (16.7 y 0.62%), respectivamente.	Ortega-Nieblas <i>et al.</i> , 2011
<i>O. vulgare</i> L. sp. <i>glandulosum</i>	Nefza, Bargou y Krib (Norte de Túnez)	P-cimeno (36, 40 y 46%), timol (32, 39 y 18%), γ -terpinene (24, 12 y 16%), y carvacrol (2, 2 y 15%) respectivamente.	Mechergui <i>et al.</i> , 2010
<i>O. applii</i> (Criollo) y <i>O. majoricum</i>	La Consulta, Mendoza, Argentina	Timol (33.8 y 12.9%) y carvacrol (ambos <0.1 %).	Amadio <i>et al.</i> , 2011
<i>Origanum ehrenbergii</i> Boiss y <i>O. syriacum</i> L	Montaña Baskinta, libanés	Timol (19,6 y 24,7%), 2-isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno (14,9 y 7,9%), carvacrol (6,7 y 17,6%) y p-cimeno (16,1 y 8,7%).	Loizzo <i>et al.</i> , 2009
<i>P. longiflora</i> y <i>L. graveolens</i>	Sierra de Real de Catorce, San Luis Potosí, México	Carvacrol (18.36 y 13.48 %) y <i>p-cimeno</i> (14.09 y 7.46%)	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2011
<i>Origanum glandulosum</i>	Argeria	Carvacrol (28.1 y 72.6%), timol (44.6 y 18.5 %), <i>p-cimeno</i> (10.8 y 1.7%)	Sari <i>et al.</i> , 2006
<i>O. vulgare</i> (ecotipo italiano 3383 y ecotipo chino 3386)	Urubamba, Cuzco (Perú)	Timol (18.364% y 2,043%), carvacrol (2.360% y 0.364%) respectivamente	Tellez, 2017
	Argentina	Hidrato de trans-sabineno (27.77%), timol (26.1%), -terpino (5.9%), α -terpino (4.17%).	Dambolena <i>et al.</i> , 2010
<i>O. vulgare</i> L. sp. <i>virens</i>	Irán	α Bisaboleno (39.17%), sabinene (11.52%), carvacrol (5.23%), β -bisaboleno (4.24%).	Morshedloo <i>et al.</i> , 2017
	Portugal	α Terpineol (0.1–65.1%), γ terpinene (0.3–34.25), linalool (2.0–27.4%), carvacrol (0–34.2%), E-cariofileno (2.4–11.0%).	Vale-Silva <i>et al.</i> , 2012
	Argentina	Hidrato de trans-sabineno (23.4–27.2%), timol (14.4–17.2%), terpinen-4-ol (7.8–11.0%), γ -terpinene (7.3–9.8%).	Asencio <i>et al.</i> , 2015
	Argentina	Hidrato de trans-sabineno (32.47%), timol (20.5%), γ -terpineno (15.47%), terpinen-4-ol (5.03%).	Dambolena <i>et al.</i> , 2010
	Irán	Timol (37.13%), γ -terpinene (9.67%), carvacrol (9.57%), carvacrol metil éter (6.88%).	Vaziriam <i>et al.</i> , 2015
<i>O. vulgare</i> L. sp. <i>vulgare</i>	Italia	Spatulenol (18.6%), carvacrol (11.7%), β -cariofileno (8,8%), terpinen-4-ol (5,6%).	De Falco <i>et al.</i> , 2013
	Italia	Carvacrol (14.3%), spatulenol (9.4%), β -cariofileno (5.3%), terpinen-4-ol (5.0%).	De Falco <i>et al.</i> , 2013
	Lituania	Sabinene (6.6–28.2%), β -caryophyllene (7.3–15.5%), E- β -ocimene (4.4–15.1%), allo-ocimene (7.7–12.1%).	Baranauskien <i>et al.</i> , 2013
	Turquía	Timol (58.31%), carvacrol (16.11%), p-cimeno (13.45%), γ -terpinene (4.64%).	Sarikurkcun <i>et al.</i> , 2015

(Adaptado de Rodríguez-García *et al.* (2015))

2.3.2. Aceite esencial de Orégano (AO)

2.3.2.1. Generalidades

La composición de AO depende principalmente de la especie, la temporada de cosecha de la planta y de las fuentes geográficas donde se desarrollan (Arana-Sánchez *et al.*, 2010). El Cuadro 4 muestra las diferentes composiciones reportadas por diferentes investigadores.

Carvacrol y timol son compuestos fenólicos y son los principales compuestos antimicrobianos encontrados en diferentes AO, estos compuestos causan alteraciones en la morfología de bacterias e hifas de los hongos, provocando su lisis celular (Numpaqué *et al.*, 2011). Además, se ha informado que la modificación química de estos compuestos fenólicos a varios derivados de éter y éster producen un cambio en la actividad biológica (Numpaqué *et al.*, 2011). El cuadro 5 muestra la actividad antimicrobiana de AO frente a diferentes microorganismos.

La membrana celular bacteriana (bicapa de fosfolípidos) es el objetivo principal de los componentes antimicrobianos del AO, como los terpenoides como se muestra en la Figura 2 (Gumus *et al.*, 2010). El timol y el carvacrol pueden desintegrar la membrana externa de las bacterias gramnegativas liberando los componentes del lipopolisacárido, aumentando así la permeabilidad del trifosfato de adenosina en la membrana citoplasmática, cambiando la permeabilidad pasiva de la célula (Guarda *et al.*, 2011). El p-cimeno es un compuesto hidrófobo que provoca una mayor inflamación de la membrana citoplasmática en comparación con el carvacrol (Silva y Fernandes, 2010).

Cuadro 5. Actividad antibacteriana del AO relacionada a sus principales componentes antimicrobianos.

Especie /Orégano	Compuesto químico	Efectivo contra	Referencia
<i>O. vulgare</i>	Carvacrol	<i>S. enteritidis</i> , <i>B. cereus</i>	Govaris <i>et al.</i> , 2010; Gutierrez <i>et al.</i> , 2008; Dimitrijević <i>et al.</i> , 2007; Rosato <i>et al.</i> , 2009; Hussain <i>et al.</i> , 2011; Pozzatti <i>et al.</i> , 2010
	Timol	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i>	
	Cymenol	<i>P. aeruginosa</i>	
	Cimeno	<i>C. albicans</i> NRRL 12983	
	α-pineno	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	
		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	
<i>O. acutidens</i>	p-Cimeno	<i>C. albicans</i> NRRL 22077	Cosge <i>et al.</i> , 2009
	Carvacrol	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
	Carvacrol	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>S. poona</i>	
<i>O. compactum</i>	Timol	<i>S. aureus</i> , <i>C. dubliniensis</i>	Bouhdid <i>et al.</i> , 2009
	Terpinene	<i>P. vulgaris</i> S. typhimurium	
	p-cimeno	<i>E. cloacae</i> S. aureus	
		<i>E. coli</i> K. pneumoniae	
<i>O. majorana</i>	Terpinen-4-ol	<i>B. subtilis</i> , <i>S. flexneri</i> ,	Busatta <i>et al.</i> , 2008; Giordani <i>et al.</i> , 2008; Gutierrez <i>et al.</i> , 2008, Hussain <i>et al.</i> , 2011
	γ-Terpinene	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	
	Hidrato de cis-sabineno	<i>K. pneumoniae</i>	
	Timol	<i>S. choleraesius</i> , <i>C. albicans</i>	
		<i>B. cereus</i>	
<i>O. acutidens</i>	Carvacrol	<i>L. monocytogenes</i>	Kordali <i>et al.</i> , 2008
	p-cimeno	<i>P. aeruginosa</i>	
	Acetato de linalol	<i>A. alternata</i> , <i>F. culmorum</i>	
	Borneol	<i>P. ultimum</i> , <i>R. solani</i>	
	β-cariofileno	<i>V. dahliae</i>	

(Fuente: Rodríguez-García *et al.*, 2015)

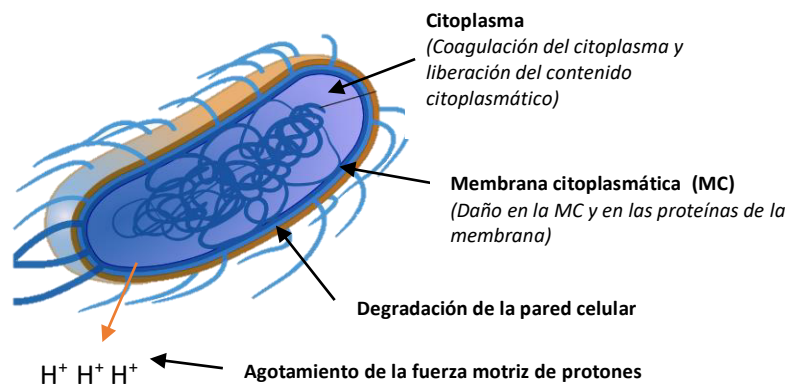


Figura 2. Principales ubicaciones bacterianas de los sitios de acción de los aceites esenciales: Citoplasma, membrana citoplasmática, y pared celular. (Adaptado de Burt, 2004).

En general, los AO son más activos contra las bacterias grampositivas que sobre las bacterias gramnegativas. Algunos autores sugieren que la membrana externa que rodea la pared celular de las bacterias gramnegativas puede restringir la difusión de compuestos hidrófobos del AO a través de su cubierta de lipopolisacárido y las funciones vitales de la célula (Gutierrez *et al.*, 2009). Así tenemos, que el AO de *Origanum compactum* afectó el potencial de membrana y la permeabilidad en *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Bouhdid *et al.*, 2009). El AO de *Origanum acutidens* mostró halos de inhibición menores contra *Proteus vulgaris* (33.5 mm \pm 0.28) y *Salmonella typhimurium* (26.0 mm \pm 0.57) en comparación con otras bacterias grampositivas como *S.aureus* (56.0 mm \pm 0.0) y *S. pyogenes* (82.5 mm \pm 1.44) (Cosge *et al.*, 2009).

Las bacterias gramnegativas son más resistentes a los aceites esenciales que las bacterias grampositivas, debido a que el 90 - 95% de la pared celular de las bacterias grampositivas son peptidoglicano, al que se unen otras moléculas, como el ácido teicoico y las proteínas; esta estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas permite que las moléculas hidrofóbicas del aceite esencial penetren fácilmente en las células y actúen tanto en la pared celular como dentro del citoplasma (Trombetta *et al.*, 2005).

La pared celular de las bacterias gramnegativas es más compleja, tiene una capa de peptidoglicano con un grosor de 2–3 nm, siendo más delgada que la pared celular de las bacterias grampositivas, y constituye aproximadamente el 20% del peso seco de la célula, asimismo presenta una membrana externa (ME) que se encuentra fuera de la capa delgada de peptidoglucano. El peptidoglucano y la ME están firmemente unidos por la lipoproteína de Braun; esta proteína se une covalentemente al peptidoglucano y se incrusta en la ME. La ME presenta una doble capa de fosfolípidos que está unida a la membrana interna por lipopolisacáridos (LPS) (Nikaido, 1994).

La capa de peptidoglicano está cubierta por la ME que contiene varias proteínas y LPS. El LPS presenta: el lípido A, el polisacárido central y la cadena del lado O, que proporciona el "líquido" que permite que las bacterias gram negativas sean más resistentes a los aceites esenciales y otros extractos naturales con actividad antimicrobiana (Vaar, 1992).

Los mecanismos de acción de los aceites esenciales y sus componentes dependen de su composición química (Figura 2). Por ejemplo, el timol y el carvacrol tienen efectos antimicrobianos similares pero tienen diferentes mecanismos de acción contra las bacterias grampositivas y gramnegativas (Nikaido, 1996). La ubicación de uno o más grupos funcionales en estas moléculas puede afectar su actividad antimicrobiana. El timol es estructuralmente análogo al carvacrol, pero las ubicaciones de los grupos hidroxilo difieren entre las dos moléculas (Dorman, 2000)

2.3.2.2. Terpenos

Los terpenos son hidrocarburos que se forman mediante la combinación de varias unidades de isopreno (C_5H_8). Se sintetizan dentro del citoplasma de la célula vegetal; su síntesis ocurre en la vía del ácido mevalónico a partir de acetil CoA, presentan una cadena principal de hidrocarburos que puede ser reorganizada en una estructura cíclica por las ciclasas (Caballero *et al.*, 2003). Los terpenos más comunes son los monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) y los sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), pero existen cadenas más largas, como los diterpenos ($C_{20}H_{32}$) o los triterpenos ($C_{30}H_{40}$) (Caballero *et al.*, 2003).

Los terpenos como: p-cimeno, limoneno, terpineno, sabineno y pineno son los más conocidos. La mayoría de los terpenos no poseen una alta actividad antimicrobiana inherente. El p-cimeno, uno de los componentes más importantes del aceite esencial del tomillo, no muestra actividad antimicrobiana contra muchos patógenos gramnegativos (Bangamboula *et la.*, 2004). Otros terpenos, como el limoneno, α -pineno, β -pineno, γ -terpinene δ -3-carene, y α -terpinene mostraron actividad antimicrobiana muy baja o nula contra 25 géneros de bacterias (Dormman, 2000).

2.3.2.3. Terpenoides

Los terpenoides son terpenos con moléculas de oxígeno agregadas o que han tenido sus grupos metilo desplazados o eliminados por enzimas específicas (Caballero *et al.*, 2003). El timol, el carvacrol son los terpenoides más comunes y conocidos. La actividad antimicrobiana de la mayoría de los terpenoides, está relacionada con sus grupos funcionales y el grupo hidroxilo de los terpenoides fenólicos, así como con la presencia de electrones deslocalizados los cuales son elementos importantes para la acción antimicrobiana (Caballero *et al.*, 2003).

El carvacrol es el más efectivo, y el intercambio entre su grupo hidroxilo y un metil éter puede afectar su hidrofobicidad y actividad antimicrobiana, la posición del grupo hidroxilo en la molécula fenólica no afecta la acción antimicrobiana. En comparación con el carvacrol, el timol tiene una actividad antimicrobiana similar contra *B. cereus*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, a pesar de que su grupo hidroxilo se encuentra en una posición diferente (Ultee *et al.*, 2002). El timol y el carvacrol tienen propiedades de desintegración de la ME prominentes.

El p-cimeno es el precursor del carvacrol, es un monoterpeno con un anillo de benceno sin ningún grupo funcional en sus cadenas laterales (Bangamboula *et al.*, 2004). Otros han descrito la baja actividad antimicrobiana del p-cimeno cuando se usa solo, el p-cimeno también puede aumentar la actividad antimicrobiana de otros compuestos como sucede en el carvacrol (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

El timol es un monoterpenoide fenólico que se encuentra en el AO, presenta grupos hidroxilo que ocupan diferentes posiciones en el anillo fenólico (Sikkema y Bont, 1995). Similar al carvacrol, la actividad antimicrobiana de timol produce alteraciones estructurales y funcionales en la membrana citoplasmática que pueden dañar las membranas externa e interna; asimismo puede interactuar con proteínas de membrana. La interacción del timol con la membrana afecta la permeabilidad de la membrana y da como resultado la liberación de iones K^+ y ATP (Xu *et al.*, 2008). En algunos casos, el timol puede inducir la liberación de lipopolisacáridos, pero no afecta a los cationes quelantes (Helander *et al.*, 1998).

Similar al timol, el carvacrol actúa sobre las células microbianas y causa daño estructural y funcional a sus membranas, lo que resulta en una mayor permeabilidad (Sikkema *et al.*, 1995). El carvacrol es uno de los pocos componentes de una AO que tiene efecto desintegrador sobre la ME de las bacterias gramnegativas (La Storia *et al.*, 2011). El carvacrol causa la liberación de LPS y también actúa sobre la membrana citoplasmática donde altera el transporte de iones (Helander *et al.*, 1998). La actividad del carvacrol parece estar relacionada con la presencia de un grupo hidroxilo que puede funcionar como un transportador transmembrana de cationes monovalentes llevando H^+ al citoplasma celular y transportando K^+ de regreso (Ultee *et al.*, 2002).

2.3.2.4. Bacterias

El Cuadro 5 resume algunos trabajos sobre la actividad antibacteriana de AO frente a diferentes bacterias mediante diferentes metodologías *in vitro*. García-García *et al.* (2011), demostraron que la combinación de carvacrol-timol (75mg / kg; 62.5 mg / kg respectivamente), tuvo el mayor número de combinaciones sinérgicas contra *L. innocua*, seguida de una combinación de timol-eugenol. La combinación de AO de *O. vulgare subsp. Hirtum* al 0.6% con nisina a 500 UI / g mostró una actividad antimicrobiana más fuerte contra *S. enteritidis* (Govaris *et al.*, 2010).

Bendahou *et al.* (2008), analizaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *O. glandulosum* contra bacterias grampositivas: *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y bacterias gramnegativas: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P.*

aeruginosa, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, levaduras (*Candida albicans* 444 y *C. albicans* 9036) y mohos; este estudio reveló que el AO es más antifúngico que antibacteriano. Asimismo, *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* presentaron zonas de inhibición de 24–27 mm, 23–24 mm y 25–26 mm, respectivamente; mientras *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* fueron las cepas más resistentes a los aceites y *L. monocytogenes* mostró una modesta sensibilidad.

2.3.2.4. Impacto en alimentos

Las propiedades de olor y sabor de AO se han utilizado para agregar atractivo sensorial a los productos alimenticios. Las impresiones sensoriales del olor del orégano se han definido como limón o bálsamo de limón, además de afrutados y dulces (Bansleben *et al.*, 2010). Goulas y Kontominas (2007), recibieron una puntuación de olor significativamente más alta o similar a las muestras de control a uno de los tratamientos de su estudio, donde *Sparus aurata* fue tratada con 0.8% de AO.

La aplicación de AO (0.345, 0.69, 1.725, 3.45 mg / g) en salchichas demostró que la adición de este aceite puede ser una ruta prometedora para aumentar el atractivo sensorial, además del efecto bacteriostático observado (Busatta *et al.*, 2007). Los hidrosoles obtenidos de tres plantas de *Lamiaceae* (tomillo, ajedrea de verano y orégano) fueron usados como desinfectantes y resultaron efectivos en tomates y pepinos recién cortados proporcionándoles seguridad microbiana y no produciendo ningún defecto sensorial (Sagdic *et al.*, 2013).

La evaluación sensorial mostró que la adición de AO de orégano entre el 0.6 y 0.9% en carne picada de oveja fue aceptable organolépticamente, y los puntajes de los atributos fueron más altos para el AO a 0.6 que para el de 0.9% (Govaris *et al.*, 2010). Pyrgotous *et al.* (2010) evaluó el efecto sensorial de la sal y AO (0.2%) en el empaque de filetes frescos de trucha arco iris durante el almacenamiento a 4 ° C, esto produjo un olor y sabor diferente pero agradable en los filetes de trucha.

Un estudio evaluó el efecto de AO del *O. onites* en la extensión de la vida útil de los muslos de pollo frescos empacados en envolturas, además se evidenció que AO le

dio un olor y sabor agradable a la carne de pollo, muy compatible con el sabor del pollo cocido, cuando su concentración era 0.1% (Oral *et al.*, 2009).

Se evaluó el efecto sensorial del envasado al vacío combinado con AO (0.2% y 0.4%) en pulpo mediterráneo fresco, este tratamiento dio un olor característico, deseable y agradable a las muestras tratadas hasta los días 17 y 23 de almacenamiento (Atrea *et al.*, 2009).

2.4. Ajo (*Allium sativum*)

2.4.1. Generalidades

El género *Allium* pertenece a la familia *Alliaceae*, anteriormente considerada parte de *Liliaceae* y *Amaryllidaceae*. Es un taxón grande y heterogéneo que incluye aproximadamente 850 especies, crecen de forma silvestres en las regiones templadas, semiáridas y áridas del hemisferio norte. Estas plantas son resistentes porque presentan órganos de almacenamiento subterráneos denominados bulbos verdaderos, o bulbos vestigiales unidos a rizomas, este último conocido como *allium* rizomatoso. El principal centro de evolución del género se extiende a lo largo de la región biogeográfica Irano-Turaniana y los centros secundarios de diversidad se encuentran en la cuenca del Mediterráneo y al oeste de América del Norte (Kamenetsky y Rabinowitch, 2010).

Muchas plantas de este género tienen una gran importancia económica como el ajo (*Allium sativum*), los países asiáticos como China son los productores más importantes de esta especie (Figura 3), asimismo el ajo es una fuente importante de micronutrientes (minerales y vitaminas) (Cuadro 6) y sus actividades farmacológicas se investigan actualmente (Kamenetsky y Rabinowitch, 2010).

Cuadro 6. Composición nutricional del *Allium sativum L.*

Constituyentes	Valor por 100 g
Agua	58.58 g
Energía	149 kcal
Fibra	2.10 g
Nutrientes	
Proteínas	6.36 g
Lípidos totales	0.50 g
Carbohidratos	33.06 g
Azúcar (total)	1.00 g
Minerales	
Calcio (Ca)	181 mg
Hierro (Fe)	1.70 mg
Magnesio (Mg)	25 mg
Fosforo (P)	153 mg
Potasio (K)	401 mg
Sodio (Na)	17 mg
Zinc (Zn)	1.16 mg
Vitaminas	
Vitamin C (ácido ascórbico)	31.2 mg
Vitamin B1 (tiamina)	0.20 mg
Vitamin B2 (riboflavina)	0.11 mg
Vitamin B3 (niacina)	0.70 mg
Vitamin B6 (piridoxina)	1.23 mg
Folato	3.00 µg
Vitamin E (α-tocoferol)	0.08 mg
Vitamin K (filoquinona)	1.70 µg
Lípidos	
Acidos grasos (saturados total)	0.089 g
Acidos grasos (monosaturados totales)	0.011 g
Acidos grasos (poliinsaturados totales)	0.249 g

(Fuente: Ramírez-Concepción *et al.*, 2016)

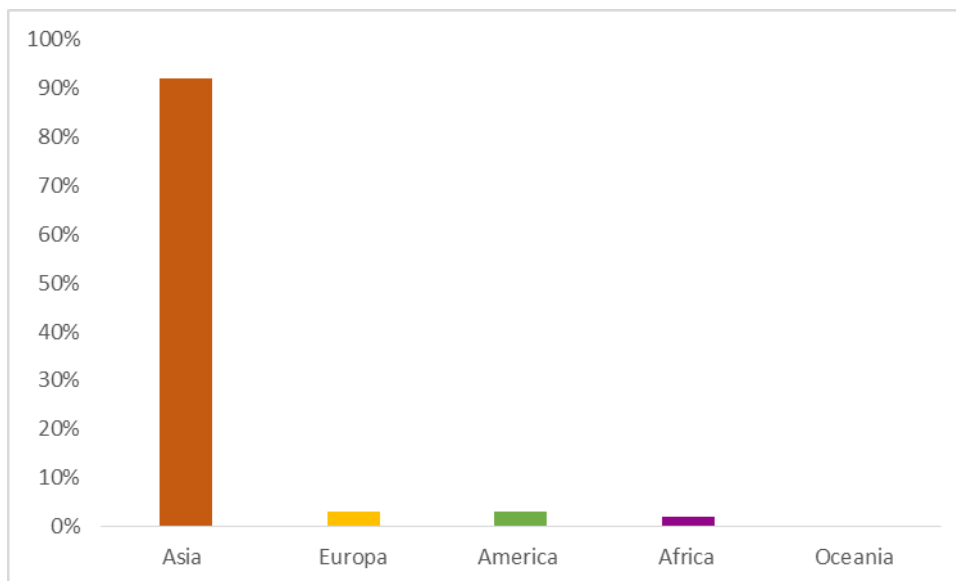


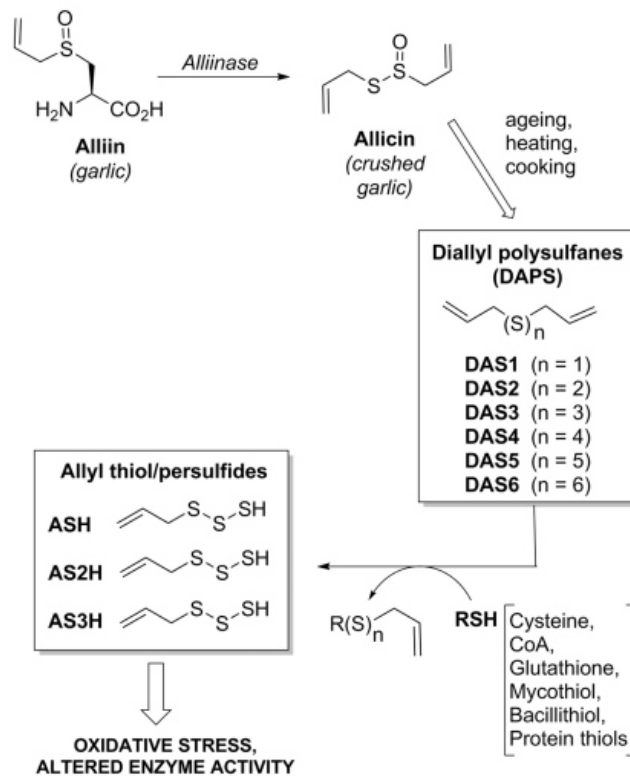
Figura 3. Producción (%) de ajo (*Allium sativum* L.) en el mundo: Clasificación de la producción de ajo por continentes en el 2013. (Fuente: <http://faostat.fao.org>).

El género *Allium* se origina en el sudoeste de Asia en regiones climáticas secas, áridas y moderadamente húmedas. Por lo tanto, su principal centro de diversidad se extiende desde la cuenca mediterránea hasta Asia central y Pakistán. El segundo centro de diversidad, comparativamente menos pronunciado, ocurre en el oeste de América del Norte (Răduică y Popescu, 2010). *Allium sativum* se ha utilizado como agente aromatizante y en medicina tradicional desde la antigüedad, y ahora se cultiva en todo el mundo (Block, 2010). Es utilizado como diurético, expectorante y estimulante; asimismo, los extractos de esta planta han mostrado actividad antibacteriana (Sharifi-Rad *et al.*, 2016) y antifúngica (Pyun y Shin, 2006).

2.4.2. Aceite esencial de ajo (AA)

Los bulbos intactos del ajo presentan poco olor, pero, una vez cortados o triturados, liberan instantáneamente un olor típico y picante, estos olores están asociados a las mezclas de compuestos organosulfurados reactivos formados, en segundos, por la acción enzimática sobre los precursores sin olor en los bulbos intactos. Los compuestos organosulfurados son responsables de las principales propiedades medicinales del ajo (Sharifi-Rad *et al.*, 2014).

La aliina representa el precursor más importante del S-alilcisteina sulfóxido que se presenta en los bulbos intactos del ajo. Otros precursores menores de azufre incluyen metina, isoalina y propina, presentes en concentraciones mucho más bajas. Al cortar, triturar o moler los bulbos, se libera la enzima vacuolar alinasa de las células dañadas, esta enzima corta muy rápidamente los precursores de ácidos sulfénicos (R-SOH), intermedios organosulfurados altamente reactivos, que se cruzan dando tiosulfatos como la alicina (dialil tiosulfato), responsable del característico sabor picante del ajo (Martins *et al.*, 2016).



Abreviaturas: Bacilitiol (BSH); Cisteína (Cys); Coenzima A (CoA); Dialil disulfuro (DAS₂); Dialil trisulfuro (DAS₃); Tetrasulfuro de dialilo (DAS₄); Pentasulfuro de dialilo (DAS₅); Hexil sulfuro de dialilo (DAS₆); Alil tiol (ASH); Persulfuro de alilo (AS₂H); Hidrotrisulfuro de alilo (AS₃H).

Figura 4. Conversión de la Alicina a Dialil polisulfanos. (Fuente: Arbach *et al.*, 2019).

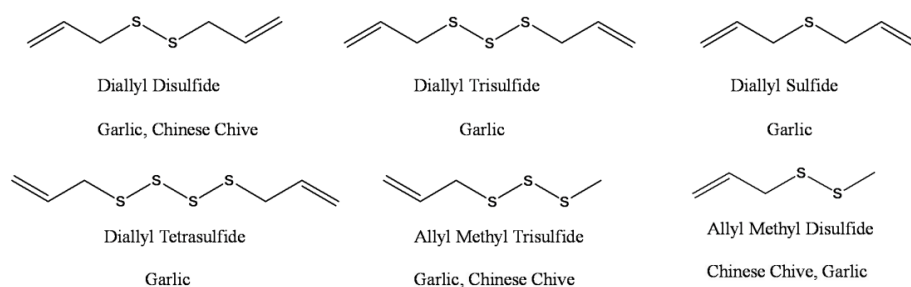


Figura 5. Estructura de los principales compuestos de los aceites esenciales de ajo
(Fuente: Mnayer *et al.*, 2014).

La enzima aliinasa cataliza la rápida conversión de aliina en alicina cuando se tritura el ajo (Figura 4). Dependiendo de las condiciones de preparación y almacenamiento, la aliina puede sufrir numerosas reacciones secundarias para producir mezclas complejas de productos de degradación de alilsulfuro. Para la obtención del AA se utiliza la destilación al vapor de extractos crudos de ajo, que son predominantemente una mezcla de dialilpolisulfanos que contienen de uno a seis átomos de azufre (DAS₁ – DAS₆) (Figura 5) con dialil disulfuro y el dialil trisulfuro (DAS₂₋₃) como componentes principales (Satyal *et al.*, 2017).

Estudios han demostrado que del dialil monosulfuro a dialil tetrasulfuro (DAS₁ a DAS₄) se aumenta la actividad antimicrobiana, el aumento de la longitud de la cadena de azufre tiene este efecto (Tsao y Yin, 2001). Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios sobre las bioactividades relativas de los componentes menores del AA (DAS₅ y DAS₆).

La bioactividad del dialilpolisulfano se inicia mediante reacciones intracelulares con los principales cofactores de tiol de bajo peso molecular como el glutatión (GSH) en eucariotas y bacterias gramnegativas. Para generar alil tiol (ASH) y persulfuros de alilo (AS₂H, AS₃H); GSH juega un papel importante en el manejo del estrés oxidativo y en el mantenimiento de un ambiente reductor intracelular. La disminución de las concentraciones de tioles; de bajo peso molecular; compromete la capacidad de defensa ante el estrés oxidativo. Asimismo, la generación de persulfuros de alilo pueden elevar la producción de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, aumentando el estrés oxidativo (Saidu *et al.*, 2013).

El uso de AA no está muy extendido como aditivo alimentario debido a su relativa inestabilidad bioquímica y a su fuerte sabor. Estudios recientes han evaluado la potencialidad de las plantas del género *Allium* o sus compuestos bioactivos, como conservantes naturales en muchos sistemas alimentarios, especialmente en carne y productos relacionados con la carne (Hygreeva *et al.*, 2014). El Cuadro 7 presenta la composición reportada del AA en diferentes estudios.

Krisch *et al.* (2010), compararon el efecto antimicrobiano de diferentes aceites esenciales entre ellos de ajo, en carne de cerdo picada. Los investigadores observaron que los mejores valores de vida útil en carne de cerdo se obtuvieron usando el aceite de ajo y mejorana. Gheisari y Ranjbar (2012), sugirieron con sus resultados que el ajo, a través de sus efectos combinados antioxidantes y antimicrobianos, sirve para preservar productos cárnicos de carne de camello.

Cuadro 7. Composición del aceite esencial de ajo.

Tipo de ajo	Lugar	Composición	Referencia
<i>Allium sativum</i> <i>L.</i>	España, Barcelona	Trisulfuro de dialilo (33.88%), disulfuro de dialilo (18.86%), tetrasulfuro de dialilo (10.97%), trisulfuro de metil alilo (9.04%), sulfuro de dialilo (8.36%).	Garcia – Diez <i>et al.</i> , 2016.
<i>Allium sativum</i>	España, Las Pedroñeras	Dialil disulfuro (% 27.9), dialil trisulfuro (16.8%), dialil tetrasulfuro (1%).	Satyal <i>et al.</i> , 2017
<i>Allium sativum</i>	Libano	Trisulfuro de dialilo (0,33%), disulfuro de dialilo (37,90%), sulfuro de dialilo (6,59%), trisulfuro de metil alilo (3,69%), sulfuro de dialilo (8,36%)	Mnayer <i>et al.</i> , 2014

(Elaboración propia)

2.4.3. Impacto en alimentos

Sung *et al.* (2014), evaluaron la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *E. coli* y *B. thermosphacta* en carne de res usando películas de plástico impregnadas con 0, 2, 4, 6 y 8% de aceite esencial de *Allium sativum* (AA). Ellos determinaron que el crecimiento de *L. monocytogenes* se inhibía cuando se incorporó 8% de AA. Asimismo, Kirkpınar *et al.* (2014) evaluaron la aceptabilidad de la carne en pollos broiler sometidos a una dieta de 300 mg / kg de AA, la carne de pollos sometidos a esta dieta tuvo una mayor aceptabilidad que la carne de pollos sometidos a una dieta sin AA.

Krisch *et al.* (2010), obtuvieron una disminución de 1 log UFC de *E. coli* en carne picada de cerdo sometida a AA al 1% después de 24 horas de almacenamiento a 5°C. Amany *et al.* (2010), evaluaron las propiedades sensoriales en muestras de carne picada tratada con 1.5% AA, y determinaron que esta concentración mejora los atributos sensoriales, lo que no fue observado en muestras tratadas con 0.5% de AA.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Lugar y tiempo

El presente estudio se realizó durante el período de febrero a octubre del 2018, la Figura 6 muestra el flujograma del diseño experimental. La obtención de los aceites esenciales se realizó en el Laboratorio de Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), los ensayos de laboratorio se desarrollaron en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental y en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. El análisis taxonómico del orégano y el ajo se realizó en el Museo de Historia Natural (Anexo 1 y 2).

2. Extracción de aceite esencial

1.1. Orégano

Se adquirió 7.5 kg de orégano fresco (*Origanum vulgare*) proveniente de la provincia de Concepción, región Junín – Perú. La extracción del aceite se realizó mediante hidrodestilación según lo descrito por Tohidpour *et al.* (2010) con algunas modificaciones, asimismo el Anexo 4 muestra el protocolo de la extracción. El orégano fresco se deshojó y colocó en un deshidratador de alimentos (BLANICK modelo BDA020) a 35°C durante 9 horas. La obtención del aceite esencial se realizó por hidrodestilación durante 2 horas utilizando 3 litros de agua. El producto obtenido fue colectado en una pera de decantación; posteriormente el aceite fue deshidratado con 5 g de sulfato de sodio anhídrido, y se almacenó a 4°C hasta su uso como lo señalan Tohidpour *et al.* (2010).

1.2. Ajo

La extracción del AA se realizó mediante hidrodestilación según lo descrito por Tohidpour *et al.* (2010) pero con algunas modificaciones, el Anexo 4 muestra el protocolo utilizado. Los bulbos frescos de ajo (*Alium sativum*) proveniente del departamento Arequipa fueron lavados con agua corriente y escobillados suavemente hasta remover la tierra, restos vegetales, etc. Se desinfectó por inmersión en una solución de agua e hipoclorito de sodio (20 ppm), se enjuagaron con agua destilada, se secó con papel toalla y se procedió al pelado. Se aplicó la hidrodestilación usando el Método de arrastre por vapor para la obtención del AA, el tiempo de duración del proceso fue de 3 horas; el producto obtenido fue colectado en una pera de decantación; el aceite fue secado con 5 g de sulfato de sodio anhídrido y se mantuvo a 4°C hasta su uso (Tohidpour *et al.*, 2010).

2. Rendimiento de extracción del aceite esencial.

La determinación del rendimiento (AA: 0.25%; AO: 1.31%) fue calculado dividiendo la cantidad de aceite esencial obtenido de la muestra vegetal entre el peso de masa seca y/o fresca de la misma muestra.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{g del aceite esencial}}{\text{g de materia vegetal}} \times 100$$

3. Cromatografía de gases-Análisis de espectrometría de masas del aceite esencial

3.1 Orégano

El perfil por cromatografía se realizó mediante el procedimiento según lo descrito por García Díez *et al.* (2016) pero con algunas modificaciones según el cromatógrafo utilizado. Se diluyó 20 µl de muestra en 1 ml de diclorometano, posteriormente AO se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 (GC-MS) con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C. Se utilizó una columna J&W 122-1545.67659 DB-5ms (60 m x 250 µm x 0.25 µm). El programa de temperatura fue de 40 °C y subió a 5 °C/min hasta 180 °C; 2.5 °C/min hasta 200 °C por 5 min y finalmente 10 °C/min hasta 300 °C, manteniéndose por 3 minutos.

El inyector se mantuvo a 325°C. Se usó helio como gas portador con un caudal de 1 ml/min. La ionización se realizó por impacto de electrones a 70 eV. El perfil de los compuestos químicos presentes en el AO fue identificado al comparar los tiempos de

retención y los patrones de fragmentación representados en los espectros de masas con los patrones existentes en la base de datos del equipo.

3.2 Ajo

El perfil por cromatografía se realizó mediante el procedimiento según lo descrito por García Díez *et al.* (2016), pero con algunas modificaciones según el equipo que se utilizó. Se diluyó la muestra filtrada en la proporción de 1:100 (v:v) en acetona filtrada y se colocó en un vial. El vial se posicionó inmediatamente en el automuestreador del GCMS para su lectura, fue analizado en un Shimadzu, GC-2010 Plus con detector espectrómetro de masas Shimadzu, GCMS-QP210 Ultra. Se utilizó una columna: Restek. RTX-5ms, (30m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m) df. Serial: 1346249. El programa de temperatura fue de 50°C y subió 3°C/min hasta 150°C; 3°C/min hasta 250°C.

El inyector se mantuvo a 220°C. Se usó helio como gas portador con un caudal de 0.80 ml/min. La ionización se realizó por impacto de electrones a 70 eV. El perfil de los compuestos químicos presentes en el AA fue identificado al comparar los tiempos de retención y los patrones de fragmentación representados en los espectros de masas con los patrones existentes en la base de datos del equipo.

4. Microorganismo y condiciones de crecimiento

Las cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) fueron obtenidas del laboratorio *GenLab*. Ambas cepas fueron mantenidas en refrigeración, se cultivaron dos veces en Agar Trypticase Soya (TSA, Merck). La incubación de ambas cepas se realizó a 37°C durante 24 horas.

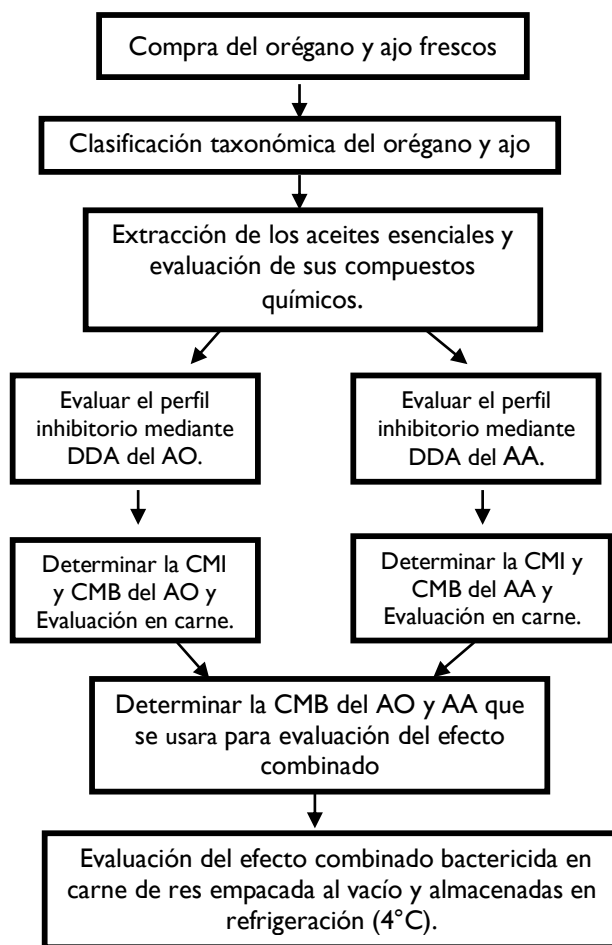


Figura 6. Flujograma del diseño experimental del estudio.

5. Ensayo de difusión en disco (DDA)

El efecto antimicrobiano de los aceites esenciales se analizó mediante el ensayo de difusión en disco (DDA) (Zaika, 1987). Se prepararon placas Petri con agar Mueller-Hinton (MHA, Himeda, Vadhani, India), asimismo se preparó el inóculo bacteriano en solución salina, hasta obtener una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland. Se realizó la siembra del inóculo uniformemente sobre la superficie del agar con un hisopo estéril, después se procedió a colocar, en la superficie del agar, los discos de papel filtro (Whatman No.1, 6 mm de diámetro, GE Healthcare, Madison, WI, EE. UU.), que contenían 20 µl de aceite esencial (García Díez *et al.*, 2017).

Las placas se incubaron a 37 °C y 30°C para *S.aureus* y *L. monocytogenes* respectivamente, durante 24 h. La actividad antimicrobiana se evaluó visualmente como

la zona de inhibición que rodea el disco, y sus diámetros, incluidos los diámetros del disco, asimismo los halos se midieron usando una regla especial para dicho efecto (Figura 7). La inhibición solo se consideró si los halos eran mayores de 10 mm, según lo descrito por Carvalho *et al.* (2018). Los resultados que representan la zona neta de inhibición, son la media de 3 determinaciones para cada aislamiento probado.

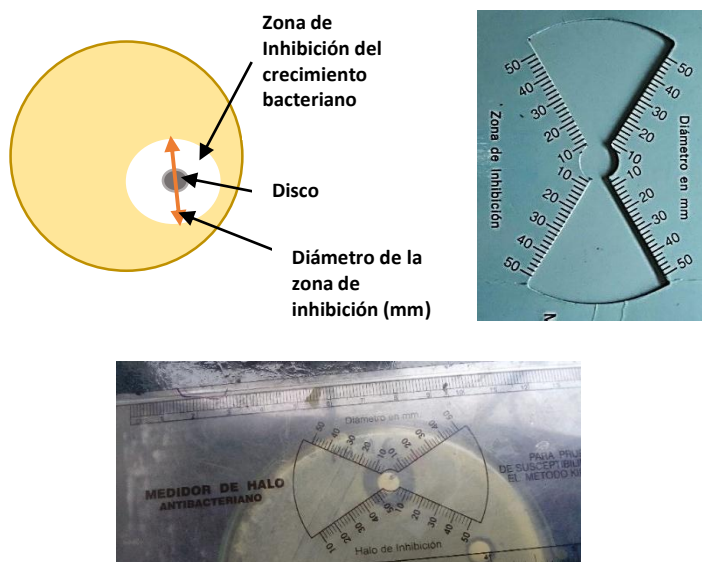


Figura 7. Evaluación de la zona de inhibición del aceite esencial.

6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida (CMB)

El CMI y el CMB se estudiaron solo para los aceites esenciales (EO) que dieron como resultado halos de inhibición mayores de 10 mm (Carvalho *et al.*, 2018). La determinación del CMI y CMB, se basó en el procedimiento del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio con placas de microdilución de 96 pocillos (CLSI, 2012).

Las diluciones de los EO se prepararon directamente en el caldo Mueller-Hinton (MHB, Biokar, Francia) para obtener en los micropozos, cada una de las siguientes concentraciones: 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.195%, 0.0975%, 0.0488%, 0.0244%, 0.0129% y 0.0060%, posteriormente se ajustaron a 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%. En cada pocillo, se mezclaron 80 µl de MHB, 100 µl de cada dilución EO y 20 µl de suspensión estándar de cada microorganismo

objetivo (preparado en MHB para lograr una densidad celular final en cada pocillo de 5 unidades formadoras de colonias logarítmicas / ml). Se cubrieron las placas, se incubaron durante 24 h y luego se verificó el crecimiento visible (turbidez) en cada pocillo.

La CMI se consideró la concentración más baja de EO, a la que las bacterias no pudieron crecer, según lo detectado a simple vista, coincidiendo con el control negativo sin inoculación incluida en la prueba (Andrews, 2001). La evaluación visual se complementó con la siembra de un bucle de 10 µl en MHA para confirmar la ausencia de crecimiento como lo describe García Díez *et al.* (2017), así también se confirmó la ausencia de crecimiento en agar Baird Parker (BP). Para evaluar la CMB, se extendieron 10 µl de cada pocillo, en el que no se observó crecimiento microbiano, en placas de MHA y BP (*S. aureus*). La CMB se consideró como la concentración más baja que determina una reducción en la población del 99,9%.

7. Evaluación en la Carne

La evaluación en carne se realizó en dos etapas del trabajo: (1) evaluación de la CMB de cada aceite de forma independiente, concentración obtenida anteriormente, frente a *S.aureus* y *L. monocytognes*, y (2) la evaluación de 4 combinaciones de ambos aceites: CMB (AO) + CMB (AA), 50% CMB (AO) + CMB (AA), CMB (AO) + 50% CMB (AA), 50% CMB (AO) + 50% CMB (AA).

Se adquirieron diez kilos de carne (músculo cuadrado de *Bos taurus*) en un mercado local del distrito de San Luis (Lima- Perú). La carne permaneció almacenada en refrigeración hasta el momento de la compra, se trasladó inmediatamente al Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental de la FMV- UNMSM en una caja térmica con temperatura de refrigeración, al llegar al laboratorio se midió el pH.

La esterilización de la superficie externa de cada músculo se hizo por inmersión en etanol al 95% (v / v) y luego se quemó del etanol residual en la superficie de la carne, como lo describe Solomakos *et al.* (2008). Después de la eliminación aséptica de la superficie externa, el núcleo interno de la carne estéril se cortó asépticamente por medio de un cuchillo estéril (autoclave a 121 °C durante 15 min), se cortaron en filetes con un peso promedio de 25g y un grosor mínimo de 0.5 cm. Asimismo se realizó el descarte de

la presencia de aerobios mesófilos, *S. aureus* (Lancette y Bennett, 2001), *L. monocytogenes* y la presencia de residuos de antibióticos (prueba STOP “Prueba *in situ* con torundas” modificada). El Anexo 5 muestra los protocolos utilizados para estas pruebas de descarte.

Se colocaron en una bolsa esteril de empaque al vacío, un mililitro del inóculo bacteriano (10^4 UFC/g *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus*) más los EO (etapa 1) o la combinación de las concentraciones de ambos EO (etapa 2). El inóculo bacteriano se preparó traspasando colonias de cultivos previos de *S. aureus* y *L. monocytogenes* a tubos con TSB hasta alcanzar una turbidez visualmente equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, que corresponde a una población microbiana aproximada de 10^8 UFC/mL. Esta mezcla se diluyó decimalmente cuatro veces para obtener la concentración final de 10^4 bacterias/mL,

Se homogenizaron en el Stomacher® 400 Circulator durante 5 minutos. Las muestras de control negativo se prepararon usando el mismo método sin los aceites esenciales. Posteriormente las bolsas se sellaron al vacío y se almacenaron a 4°C, las muestras se analizaron en los días 0, 1, 3, 6, 9 y 12. Se realizó cuatro repeticiones independientes de los análisis para cada tratamiento. El protocolo para determinar la presencia de *L. monocytogenes* y el recuento de *Staphylococcus aureus* se muestra en el Anexo 5.

8. Análisis de la información

Los datos se colectaron en hojas de cálculo de Microsoft Excel y se evaluaron mediante estadística descriptiva.

III. RESULTADOS

El perfil por cromatografía de gases del AO mostró la siguiente composición química: cis- β -terpineol (20.68%), timol (11.90%), γ -terpineno (11.8%), entre otros componentes mostrados en el Cuadro 8 y el cromatograma se muestra en la Figura 8. El Cuadro 9 muestra los 5 principales compuestos químicos del AA: disulfuro de dialilo (24.8%), trisulfuro, di-2-propenilo (23.15%), sulfuro de dialilo (4.91%), α -pineno (14.13%), y β -pineno (13.55%), asimismo en el Anexo 3 se muestra los compuestos químicos completos del AA, y el cromatograma se muestra en la figura 9.

Los datos de la actividad antimicrobiana evaluada por DDA mostraron que, en general, las actividades antimicrobianas de los aceites esenciales analizados fueron variadas y dependientes del tipo de aceite y tipo de microorganismo (Cuadro 10). A través de los resultados obtenidos en el DDA, ambos aceites tuvieron halos superiores a 10 mm y se analizaron para determinar la CMI y CMB. Los resultados de CMI y CMB de los aceites esenciales probados se presentan en el Cuadro 10.

Cuadro 8. Composición química del *Origanum vulgare* del orégano por GC-MS.

Número	Nombre del compuesto	Area %	Tiempo Retención (min)
1	α -Tujeno	0.77	13.08
2	α -Pinoeno	0.52	13.38
3	Sabineno	4.44	14.64
4	β -Pinoeno	0.23	14.87
5	β -Mirceno	1.44	15.01
6	α -Felandreno	0.32	15.72
7	α -Terpineno	5.57	16.06
8	o-Cimeno	2.73	16.30
9	1-metil-5-(1-metiletenil)-Ciclohexeno	1.98	16.47
10	β -Felandreno	1.27	16.56
11	β -cis-Ocimeno	0.16	16.85
12	γ -Terpineno	11.8	17.37
13	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O)	3.46	17.79
14	1-metil-4-(1-metiletiliden)-Ciclohexeno	1.57	18.25
15	β -Linalool	0.81	18.57
16	Cis- β -Terpineol	20.68	18.82
17	Trans-1-metil-4-(1-metiletil)-2-Ciclohexen-1-ol	1.39	19.53
18	Cis-1-metil-4-(1-metiletil)-2-Ciclohexen-1-ol	0.65	20.07
19	Borneol	0.16	21.10
20	L-4-terpineol	10.09	21.30
21	α -Terpineol	2.5	21.69
22	trans-Piperitol	0.37	21.76
23	cis-Piperitol	0.35	22.07
24	Timol metil eter	0.85	22.53
25	1-metoxi-4-metil-1-(1-metiletil)-benceno	1.77	22.83
26	3,7-dimetil-2-aminobenzoate 1,6-octodien-3- ol	5.05	23.02
27	Timol	11.90	24.24
28	Carvacrol	1.7	24.51
29	β -Cariofileno	3.31	28.21
30	α -Cariofileno	0.3	29.17
31	γ -Elemeno	1.86	30.22

El AO mostró la concentración inhibitoria más baja contra *S. aureus* (2%), y el AA mostró la concentración inhibitoria mas alta frente a *L. monocytogenes* (5%). La CMB del AO contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* fue 4% para ambos bacterias, asimismo la CMB del AA contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* fue 5 y 4% respectivamente.

Cuadro 9. Composición química del *Allium sativum* (ajo) por GC-MS.

Número	Componente	Area %	Tiempo de retención (min)
1	Disulfuro de dialilo	24.8	34.536
2	Trisulfuro, di-2-propenilo	23.15	51.953
3	Sulfuro de dialilo	4.91	7.066
4	α -pineno	14.13	11.898
5	β -pineno	13.55	16.222

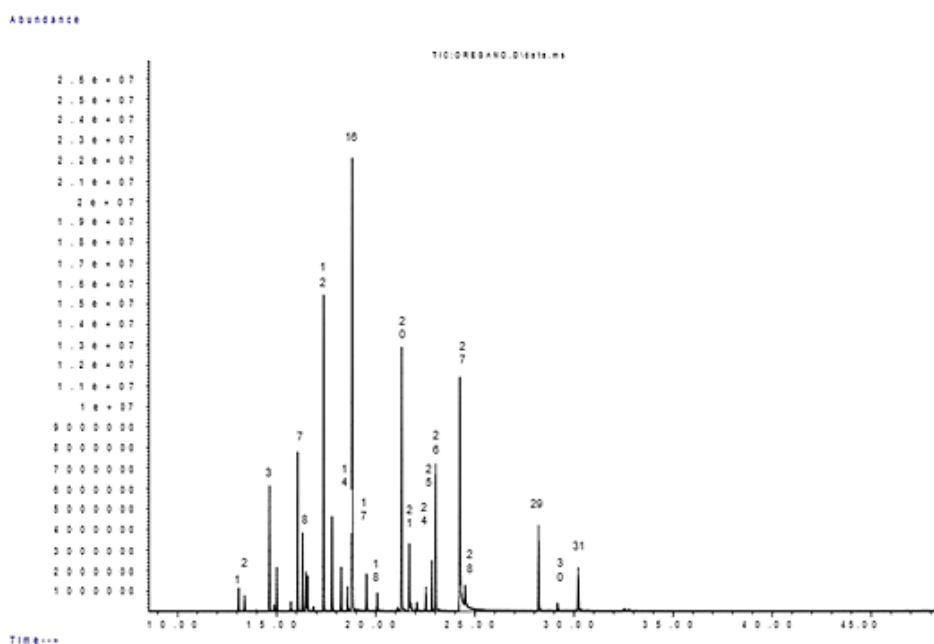


Figura 8. Cromatograma de GC-MS del aceite esencial de orégano

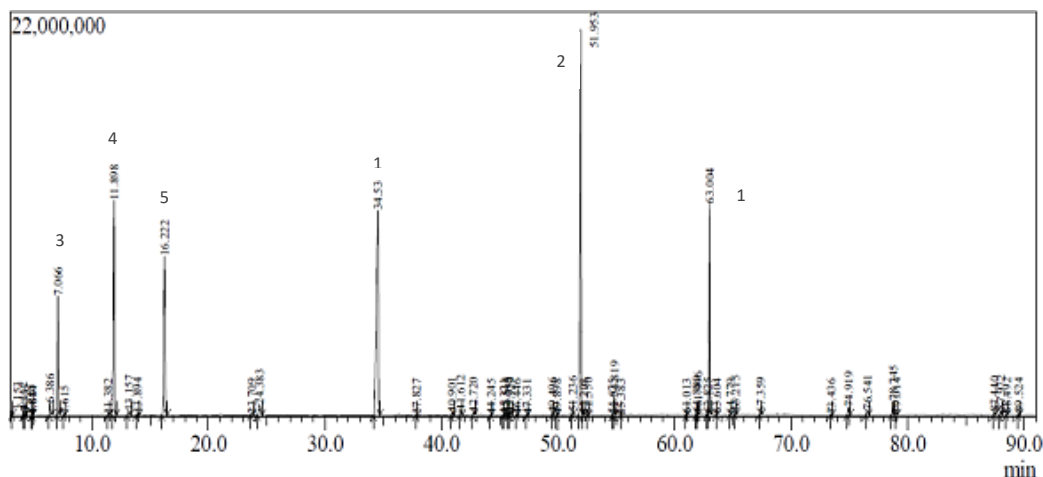


Figura 9. Cromatograma de GC-MS del aceite esencial de ajo.

Cuadro 10. Valores obtenidos en el Ensayo de Difusión en Disco (DDA: media \pm desviación estándar), Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y Concentración Mínima de Bactericida (CMB) del aceite esencial de orégano y ajo contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Aceite esencial	PRUEBA	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Orégano	Halo de inhibición	23.97 \pm 0.81mm	11.95 \pm 0.81 mm
	CMI	2 %	4 %
	CMB	4 %	4 %
Ajo	Halo de inhiación	16.97 \pm 0.81 mm	14.86 \pm 1.63 mm
	CMI	4 %	5%
	CMB	4 %	5%

(promedio de 3 evaluaciones)

Antes de la evaluación en la carne de res, se descartó la presencia de aerobios mesófilos, *S.aureus*, *L. monocytogenes* y residuos de antibióticos en la carne, obteniéndose negativo en los resultados. Las CMB obtenidas fueron evaluadas en carne, no se evidenció crecimiento en el AO (4%) y AA (4%) frente a *S.aureus* desde el día 1 hasta el día 5, como se muestra en los Cuadros 11 y 12. Asimismo en los Cuadros 13 y 14 se evidenció la ausencia de crecimiento de *L. monocytogenes* en el AO (4%) y AA (5%), estos resultados confirman las CMB obtenidos anteriormente.

Cuadro 11. Recuento de *Staphylococcus aureus* (promedio; UFC/g) frente AO en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.

Días de evaluación	CONTROL	CONCENTRACIONES DE AO			
		2%	3%	4%	8%
0	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
1	2.4x 10 ⁴	1.5x10 ³	8.1x 10 ²	0	0
2	8.6x10 ⁴	9.3x10 ²	5.3x10 ²	0	0
3	1.1x10 ⁵	7.9x10 ²	1.35x10 ²	0	0
5	1.3x10 ⁵	7.8x10 ²	1.35x10 ²	0	0

(promedio de 4 evaluaciones)

Cuadro 12. Recuento de *Staphylococcus* (promedio: UFC/g) *aureus* frente AA en carne de res empacada al vacío y almacena en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.

Días de evaluación	CONTROL	CONCENTRACIONES DE AA			
		2%	3%	4%	8%
0	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
1	3x 10 ⁴	1.9x10 ³	9.7x10 ²	0	0
2	7.2x10 ⁴	9.3x10 ²	7.4x10 ²	0	0
3	1.2x10 ⁵	7.6x10 ²	5.9x10 ²	0	0
5	1.5x10 ⁵	7.8x10 ²	5.4x10 ²	0	0

(promedio de 4 evaluaciones)

Cuadro 13. Detección de *Listeria monocytogenes* frente a AO en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.

Días de evaluación	CONTROL	CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES																	
		2 %				3%				4%				8%					
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(-): ausencia; (+): presencia

Cuadro 14. Detección de *Listeria monocytogenes* frente a AA en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 2, 3 y 5 días.

Días de evaluación	CONTROL	CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES																	
		2 %				4%				5%				8%					
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(-): ausencia; (+): presencia

El cuadro 16 muestra el recuento de *S. aureus* frente a las diferentes combinaciones de aceite, en el día 1 se observó las medias más bajas para las combinaciones S1 (4%AO+ 4% AA) y S2 (2%AO+ 4%AA) en comparación a las combinaciones S3 (4%AO + 2%AA) y S4 (2%AO + 2 % AA). En el día 3, las combinaciones S1 y S2 no presentaron crecimiento de *S.aureus* y, en los días 6, 9 y 12, las combinaciones S1, S2 y S3 no presentaron crecimiento de *S. aureus*. El cuadro 15 muestra la ausencia y presencia de *L. monocytogenes*. La combinación L2 (4%AO +5%AA) fue la única en la se obtuvo ausencia de *L. monocytogenes* desde el día 1 hasta el día 12, sin embargo también se obtuvo ausencia de *L. monocytogenes* a partir del día 6 en la combinación L1 (2 % AO + 5 % AA).

Cuadro 15. Detección de *Listeria monocytogenes* frente a las combinaciones de AO y AA en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 3, 6, 9 y 12 días

Días de evaluación	CONTROL	CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES																	
		2 % AO + 5 % AA (L1)				4%AO +5%AA (L2)				2 %AO + 2.5 %AA (L3)				4 %AO + 2.5 %AA (L4)					
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(-): ausencia; (+):presencia

Cuadro 16. Recuento de *Staphylococcus aureus* (promedio: UFC/g) frente a las combinaciones de AO y AA en carne de res empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración durante 0, 1, 3, 6, 9 y 12 días

Días de evaluación	CONTROL	CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES			
		2%AO + 2 % AA (S4)	4%AO + 2%AA (S3)	2%AO+ 4% AA (S2)	4%AO+ 4% AA (S1)
0	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
1	10 ⁴	100	10	2.5	2.5
3	1.3x 10 ⁵	107.5	10	0	0
6	2x10 ⁵	113.5	0	0	0
9	4.7x10 ⁶	10	0	0	0
12	7.5x10 ⁶	10	0	0	0

(promedio de 4 evaluaciones)

IV. DISCUSIÓN

La composición química del AO y AA presentado en el Cuadro 8 y 9, depende de diversos factores como la genética, la temporada de cosecha y el lugar geográfico (Shange *et al.*, 2019). El orégano utilizado en el estudio, fue recolectado por el productor antes de la floración, en la provincia de Concepción, Región Junín (Perú) ubicada a 3068 msnm. Este orégano fue adquirido en un mercado de la ciudad de Lima para la preparación de alimentos. La literatura indica que el tiempo ideal para la recolección es cuando el porcentaje de floración es del 15 a 20%, y alcanzan entre 45 a 55 cm de altura. En este momento las hojas presentan un aroma intenso y se encuentran bien desarrolladas (Yilmaz y Jasinskas, 2016).

Un estudio en Perú evaluó los ecotipos de *Origanum vulgare* ssp. Procedentes del valle de Urubamba-Cusco y presentó porcentajes de timol (entre 18.3 y 2.3%) y carvacrol (entre 2.04 y 0.20%) valores similares obtenidos en el presente estudio. Estos bajos porcentajes fueron asociados, al bajo estrés hídrico que se presenta cuando la planta se desarrolla a una elevada altitud (3260 - 3092 msnm) (Tellez Monzon, 2017). El orégano usado en este estudio fue cultivado en Concepción, provincia que cuenta con condiciones similares a las descritas por Téllez; por ello, los valores encontrados de timol y carvacrol son similares.

Este bajo porcentaje de carvacrol y timol también ha sido reportado en otros estudios. Así tenemos que Asencio *et al.* (2015), encontraron niveles bajos de carvacrol (0.1 - 3.5%) y timol (12.1 - 17.4%) en el AO de *Origanum* spp. del centro de Argentina (provincia de Córdoba). Tellez y Nolzco (2017), reportaron carvacrol (2.24%) y timol (18.8%) de AO de *Origanum vulgare* ssp. cultivado en la ciudad de Tacna (Perú). Así

también Amadio *et al.* (2011), encontraron en el AO de *Origanum x applii* y *Origanum x majoricum* concentraciones menores a 1 (<1%) de carvacrol y, 33.8 y 12.9% de timol respectivamente.

La variación de los porcentajes de los principales compuestos antimicrobianos como se puede observar en el Cuadro 4, que muestra la composición química de los AO provenientes de diferentes especies de orégano, y lo mencionado anteriormente, puede deberse a a múltiples factores como la época de cosecha, el método de extracción, las condiciones geobotánicas, tipo de suelo, y época de recolección de la planta, entre otros (Farías *et al.*, 2010).

El AA se compone principalmente de compuestos que contienen azufre, como los sulfuro de dialilo. La composición química del AA del presente estudio presenta disulfuro de dialilo (24.8%) y solo un 4.9% de sulfuro de dialilo. Garcia-Diez *et al.* (2017), reportaron en su investigación como principales compuestos del AA: disulfuro de dialilo (18.86 %) y trisulfuro de dialilo (33.84%). Asimismo, Casella *et al.* (2012) encontraron 29.8% de disulfuro de dialilo y 21.56% de trisulfuro de dialilo. La actividad antimicrobiana de AA se atribuye a la presencia de derivados de sulfuro de dialilo, como monosulfuro de dialilo (DAS), disulfuro de dialilo (DADS), trisulfuro de dialilo (DATS) y tetrasulfuro de dialilo (Lawson *et al.*, 1991).

La actividad antimicrobiana de AA esta relacionada con la presencia de sulfuros de dialilo, y el gradiente de actividad antimicrobiana de estos compuestos que siguen el orden tetrasulfuro> trisulfuro> disulfuro> monosulfuro de acuerdo con la literatura (Shyh-Ming y Mei-Chin, 2001; Arbach *et al.*, 2019). Por ello el AA del estudio (disulfuro de dialilo (24.8%) y sulfuro de dialilo (4.9%) presenta una limitada actividad antimicrobiana frente a los reportados por otros estudios mencionados anteriormente. Esta variación en la composición del AA va depender de múltiples factores como la genética, la temporada de cosecha y el lugar geográfico. Así también, algunos estudios atribuyen una menor actividad antimicrobiana, a la pérdida de alicina y sus derivados sulfuros de dialilo de azufre durante la destilación al vapor (Javed *et al.*, 2011; Sharifi-Rad *et al.*, 2016).

Las propiedades hidrofóbicas de los aceites esenciales, le permite interferir en la membrana fosfolipídica de la célula bacteriana, aumentando así su permeabilidad, causando la pérdida de constituyentes celulares y, finalmente, la muerte celular (Burt, 2004). La pared celular de las bacterias grampositivas, como *L. monocytogenes* y *S. aureus*, son menos complejas que la de las bacterias gramnegativas, eso hace que la acción antimicrobiana de los AA y AO sea más efectiva. (Kyung, 2012).

Un estudio realizado en el año 2017 en México determinó que el timol y carvacrol alteran las proteínas y lípidos de la pared celular y membrana citoplasmática; además de alterar la síntesis de ARN, la actividad ATPasa, etc. El AO causa desequilibrio en la presión osmótica intracelular debido a la fuga de contenido citoplasmático producto de la lesión a nivel de la pared celular y la membrana citoplasmática. Finalmente, la formación de vacuolas citoplasmáticas pueden llegar a producir la necrosis celular (Tapia-Rodriguez *et al.*, 2017).

Las CMI y CMB del aceite esencial de orégano y del ajo, frente a *L. monocytogenes*, presentaron los mismos valores, esto nos indica que el AO y el AA son bactericidas frente a *L. monocytogenes*, asimismo la CMI y CMB del AA también presentaron los mismos valores frente a *S. aureus*. Por el contrario el CMI (2%) y el CMB (4%) del AO, frente a *S. aureus*, presentaron diferentes valores, esto significa que tiene que haber más AO para matar a *S. aureus* que para inhibirlo.

Dussault *et al.* (2014) reportó una CMI del 5% y 0.729% del AA frente a *L. monocytogenes* y *S.aureus* respectivamente, resultados similares al presente estudio frente a *L. monocytogenes*. Asimismo Kumar y Berwal (1998) reportaron una CMI (5%) y CMI (8.8%) de ajo triturado, frente a *S.aureus* y *L. monocytogenes* respectivamente. Shyh-Ming y Mei-Chin (2001) encontraron una CMI (2.4%) frente a *S.aureus* asimismo, Garcia-Diez *et al.* (2017) reportaron la CMB (2%) y CMI (4%) de AA frente a *L. monocytogenes*. Los bajos valores de CMI y CMB se asocian a los altos valores de disulfuro de dialilo.

El Cuadro 10 indica la CMI y CMB del aceite esencial de orégano, estas concentraciones son altas si lo comparamos con otros estudios debido al bajo contenido

de timol y carvacrol discutidos anteriormente. Un estudio en Chile obtuvieron una CMI de 0,04% para *S. aureus* multirresistente (Lofa *et al.*, 2019). Otro estudio determinó que las CMI y CMB del AO mexicano (*Poliomintha longiflora*) enfrentado a *S. aureus*, fueron de 0,025% y 0,05% respectivamente, esto debido a los altos contenidos de timol (28,31%) y carvacrol (17,06%) presentes en el AO (Cid-Perez *et al.*, 2019)

Un estudio realizado en el año 2018 en Houston (Estados Unidos) encontró que no hay diferencia en la susceptibilidad al AO, de cepas de *S. aureus* resistente (MRSA) y sensibles a la meticilina (MSSA), observándose que el AO tiene actividad antimicrobiana. En este estudio se determinó valores de 6.62% para timol y 72.25% para carvacrol, Lu *et al.* (2018) concluyen que el alto valor de carvacrol es responsable de la alteración de la pared bacteriana y otras estructuras celulares produciendo la muerte de la bacteria. Por ello, el AO puede ser una alternativa al uso de antibióticos en infecciones bacterianas susceptibles a antibióticos.

La CMI y CMB del AO frente a *Listeria monocytogenes* obtenida en el presente estudio fue de 4% para ambos. Garcia-Diez *et al.* (2017), evaluaron la influencia de la composición del alimento y de aditivos alimentarios (lactato de sodio, fosfato y nitrito sódico) sobre el efecto antimicrobiano del AO. Este estudio determinó una CMI y CMB del AO de 0,005% y >0,005%, respectivamente, frente a *L. monocytogenes*. Ellos atribuyen la actividad antimicrobiana del AO para *L. monocytogenes* a su principal compuesto químico que fue el timol (93,34%). Sin embargo, en el presente estudio el valor de timol fue de 11,9%, este bajo valor hace que la CMI y CMB sean más elevados. Asimismo Garcia-Diez *et al.* (2017), reportan que la composición de alimentos (proteína, grasa, pH) y conservantes no influyeron en su efecto antimicrobiano del AO y AA. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, debido a que la CMB de AO y AA presentaron el mismo efecto bactericida en la carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración.

Hay pocos estudios sobre la actividad antimicrobiana de la combinación de AO y AA en carne, en este estudio se determinó la ausencia de crecimiento de *L. monocytogenes* frente a la 4%AO +5%AA (L2), esta combinación evitó el crecimiento de la bacteria a partir del día 1 hasta el día 12 de evaluación, sin embargo la evaluación

individual de cada aceite (4%AO o 5% AA) tuvo un similar resultado que la combinación L2. No se observó una actividad antagónica, que provocara el crecimiento de *L. monocytogenes*, al utilizar ambos aceites. Para confirmar el efecto sinérgico se debería realizar un recuento del microorganismo en periodos de tiempos más cortos. Asimismo la Norma Sanitaria Peruana N° 071, que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, establece que *L. monocytogenes* debe estar ausente en 25 g de carne. La actividad bactericida de la combinación L2 ayuda a cumplir con el parámetro microbiológico requerido por la norma.

No se evidenció crecimiento de *S. aureus*, desde el día 1 hasta los 12 días de almacenamiento, en las combinaciones del 4%AO+ 4% AA (S1) y 2%AO+ 4%AA (S2), asimismo la evaluación individual de cada aceite (4%AO o 4% AA) presentó un similar resultado que las combinaciones S1 y S2. No se observó una actividad antagónica, que provocara el crecimiento de *S. aureus* al utilizar las combinaciones S1 y S2. Sin embargo el recuento de *S. aureus*, de la combinación 2%AO + 2 % AA (S4), disminuye durante los días de evaluación en comparación al grupo control, para confirmar el efecto sinérgico se debería realizar un recuento del microorganismo en periodos de tiempos más cortos. Estos resultados sugieren el potencial de las mezclas de los aceites esenciales estudiados, para inhibir el crecimiento microbiano en la carne y/o productos cárnicos, sin embargo se debe evaluar el efecto de la calidad sensorial.

V. CONCLUSIONES

1. El efecto combinado del aceite esencial de orégano y ajo presenta un efecto bactericida sobre *L. monocytogenes* (ATCC 19115) y *S. aureus* (ATCC 25923) en carne de res empacada al vacío y almacenada en refrigeración.
2. El aceite esencial de orégano presenta un efecto bactericida sobre a *S. aureus* (ATCC 25923) y *L. monocytogenes* (ATCC 19115).
3. El aceite esencial de ajo presenta un efecto bactericida sobre a *S. aureus* (ATCC 25923) y *L. monocytogenes* (ATCC 19115).

VI. RECOMENDACIONES

- Se debe evaluar su efecto sobre la calidad sensorial en la carne de las diferentes combinaciones de AO y AA.
- Utilizar el AO de *Origanum vulgare* recolectados cuando el porcentaje de floración sea del 15 a 20%, y alcancen entre 45 a 55 cm de altura; para poder obtener aceites esenciales con altos porcentajes de compuestos antimicrobianos.
- Investigar el AO y AA de diferentes regiones del Perú, ya que hay diversos factores que influyen en el porcentaje de los compuestos antimicrobianos propios de la planta.
- Evaluar el efecto combinatorio bactericida de AA y AO contra otras bacterias causantes de ETAS.
- Se recomienda investigar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas oriundas del país.

VII. LITERATURA CITADA

1. Alarcón M, Oyarzo C, Escudero C, Cerda F, Valenzuela F. 2017. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. Rev Med Chile. 2017;145: 1559-1564. doi: 10.4067/s0034-98872017001201559.
2. Altuntas E, Kocan D, Cosansu S, Ayhan K, Juneja VK, Materon L. 2012. Antibiotic and bacteriocin sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different foods. Food Nutr Sci 3:363-368.
3. Amadio C, Zimmermann M, Medina R, Miralles S, Dediol C. 2011. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. Rev. FCA UNCUYO. ISSN 0370-4661. 2011; 43 (1): 237-245.
4. Amany S, Reham A, Gehan S. 2010. Afifi Studies on Antimicrobial and Antioxidant Efficiency of Some Essential Oils in Minced Beef Journal of American Science, 2010:6(12).
5. AMSA. Meat Color Measurement Guidelines. 2012. Chicago. In: Hunt, M. C. & King, A. American Meat Science Association.
6. Andrews J, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48(1):5.16.
7. Andújar G, Pérez D, Venegas O. 2003. Química y bioquímica de la carne y los productos cárnicos. Cuba. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia - Editorial Universitaria.

8. Arana-Sánchez A, Estarrón-Espinosa M, Obledo-Vázquez E, Padilla-Camberos E, Silva-Vázquez R, Lugo-Cervantes E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 585-590.
9. Arbach M, Santana T, Moxham H, Tinson R, Anwar A, Groom M, Hamilton M. 2019. Antimicrobial garlic-derived diallyl polysulfanes: Interactions with biological thiols in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj Jun*;1863(6):1050-1058. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.012.
10. Asensio C, Grosso N, Juliani H. 2015. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) Essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 63, 203–213. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.056.
11. Atrea I, Papavergou A, Amvrosiadis I, Savvaidis I. 2009. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. *Food Microbiology* 26: 166–172.
12. Bagamboula C, Uyttendaele M, Debevere J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 2004, 21, 33–42.
13. Bajpai VK, Al-Reza SM, Choi UK, Lee JH, Kang SC. 2009. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* miki ex hu. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1876-1883.
14. Baranauskien R, Venskutonis P, Dambrauskien E, Viškelis P. 2013. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and ssp. *hirtum*. *Ind. Crop. Prod.* 2013, 49, 43–51.
15. Barnhart M, Chapman M. 2006. Curli biogenesis and function. *Annual review of microbiology*, 60,131–147.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>.
16. Belcher J. 2006. Industrial packaging developments for the global meat market. *Meat Science*, 74: 143–148.

17. Bell R, Garout A. 1994. The effective product life of vacuum-packaged beef imported into Saudi Arabia by sea, as assessed by chemical, microbiological and organoleptic criteria. *Meat Science* 36:381-396.
18. Bender. 1992. Role of meat and meat products in human nutrition. En: *Meat and meat products in human nutrition in developing countries*. Capitulo 228. [Internet], [28 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0562e/T0562E00.htm#Contents>.
19. Bersot L, Gillio C, Tavolaro P, Landgraf M, de Melo Franco B, Destro M. 2008. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. *Braz J Microbiol.* 2008 Jul; 39(3):514-6. doi: 10.1590/S1517-838220080003000020.
20. Bertsch D, Rau J, Eugster M, Haug M, Lawson P, Lacroix C, Meile L. 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 526–532.
21. Biswas A, Kondaiah N, Anjaneyulu A, Mandal P. 2011. Cause, concern, consequences and control of microbial contaminants in meat- A Review. *International Journal of Meat Science* 1: 27 – 35.
22. Block E. 2010. *Garlic and Other Alliums. The Lore and the Science*; Royal Society of Chemistry 1^{ed}. Cambridge, UK: Roy. 456 p.
23. Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, Espuny M, Manresa A. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* 106:1558-1568.
24. Bouton P, Howard A, Lawrie R. 1957. Spec. Rept. Fd. Invest. Bd., Lond., No. 66.
25. Brightwell G, Clemens R, Ulrich S, Boerema J. 2007. Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. *International Journal of Food Microbiology* 119:334–339.
26. Bueno M, Resconi V, Campo M, Cacho J, Ferreira V, Escudero A. 2013. Effect of freezing method and frozen storage duration on odor-active compounds and sensory perception of lamb. *Food Research International* 54: 772-780.

27. Buncié S. 1991. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *International Journal of Food Microbiology*. 12: 173-180.
28. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int J Food Microbiol* 94(3): 223–253.
29. Busatta C, Vidal R, Popiolski A, Mossi A, Dariva C, Rodrigues M, Corazza F, Corazza M, Oliveira J, Cansian R. 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol*. 25: 207-211.
30. Caballero B, Trugo L, Finglas P. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2^{ed}. The Netherlands Amsterdam: Elsevier Academic Press. p 134-146.
31. Cabrita P, Trigo M, Ferreira RB, Brito L. 2014. Is the exoproteome important for bacterial pathogenesis Lessons learned from interstrain exoprotein diversity in *Listeria monocytogenes* grown at different temperatures. *OMICS* 18(9):553-569. doi:10.1089/omi.2013.0151.
32. Calo J, Crandall P, O'Bryan C, Ricke S. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control* 54: 111-119. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>.
33. Carvalho H, Albano P, Teixeira P. 2018. In Vitro Antimicrobial Activities of Various Essential Oils Against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Quality and Hazards Control* 5(2): 41-48.
34. Casagrande Proietti P, Coppola G, Bietta A, Luisa Marenzoni M, Hyatt D, Coletti M, Passamonti F. 2010. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy. *J. Vet. Med. Sci*, 72: 1443–1448.
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks-United States, 2009-2011. [Internet], [4 abril 2017]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6222a4.htm#tab1>.

36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. Listeria outbreaks. [Internet], [6 marzo diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>.
37. Chae MH, Nam HM, Jang GC, Kim HJ, Kim SR, Jung SC, Kang DJ, Kim JK, Lim SK. 2011. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food animals and raw meats in slaughterhouse in Korea during 2010. *Kor J Vet Publ Hlth* 35: 239-245.
38. Chambers HF, DeLeo FR. 2009. Waves of resistance: staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7(9):629-641. doi:10.1038/nrmicro2200.
39. Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D, Fang W. 2009. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol* 26:103-111.
40. Chen J, Rossman M, Paward D. 2007. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture médium. *Food Sci Technol.*, 40: 249 -254.
41. Chmielewsky R, Frank J. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, pp: 22 32.
42. Choe J, Stuart A, Kim Y. 2016. Effect of different aging temperatures prior to freezing on meat quality attributes of frozen/thawed lamb loins. *Meat Science*, 116, 158-164.
43. Cid-Perez T, Avila-Sosa R., Ochoa-Velasco C, Rivera-Chavira B, Nevarez-Moorillon G. 2019. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Mexican Oregano (*Poliomintha longiflora*) Essential Oil, Hydrosol and Extracts from Waste Solid Residues. *Plants (Basel)*, 8(1). doi: <http://dx.doi.org/10.3390/plants8010022>
44. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard – 9^{ed}. Clinical and Laboratory Standard Institute.
45. Cohen P. 2000. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J. Biol. Chem* 275: 11181–11190. doi: 10.1074/jbc.275.15.11181.

46. Conislla A, Guerra R. 2019. Resistencia microbiana y capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de mercados de Lima Metropolitana. Tesis de Químico Farmacéutico. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48 p.
47. Corbin C, O'Quinn T, Garmyn A, Legako J, Hunt M, Dinh, T, Rathmann, Brooks, J, Miller M. 2015. Sensory evaluation of tender beef strip loin steaks of varying marbling levels and quality treatments. *Meat Science*, 100, 24-31.
48. Cosge B, Turker A, Ipek A, Gurbuz B, Arslan N. 2009. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Letswaart, an endemic species to turkey. *Molecules* 14: 1702-1712.
49. Cossart P, Lecuit M. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17: 3797–3806.
50. Dainty R, Mackey B. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 73: 103S-114S.
51. Dambolena J, Zunino P, Lucini E, Olmedo R, Banchio E, Bima P, Zygodlo J. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *origanum* species from different populations. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 1115–1120.
52. Dantes R, Mu Y, Belflower R, Aragon D, Dumyati G, Harrison LH, Lessa FC, Lynfield R, Nadle J, Petit S, Ray SM, Schaffner W, Townes J, Fridkin S. 2013. Emerging Infections Programme Active Bacterial Core Surveillance MRSA Surveillance Investigators: National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011. *JAMA Intern Med* 173: 1970-1978.
53. de Boer E, Zwartkruis JT, Wit B, Huijsdens XW, de Neel-ing AJ, Bosch T, van Oosterom R, Vila A, Heuvelink A. 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* 134: 52-56. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007>.

54. De Falco E, Mancini E, Roscigno G, Mignola E, Taglialatela-Scafati. 2013. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. *subsp. vulgare* L. under different growth conditions. *Molecules* 18(12):14948-14960. doi:10.3390/molecules181214948.
55. Den Bakker H, Warchocki S, Wright E, Allred A, Ahlstrom C, Manuel C, Stasiewicz M, Burrell A, Roof S. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 1882–1889.
56. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem* 55: 4863–4870.
57. Dimitrijević S, Mihajlovski K, Antonović D, Milanović-Stevanović M, Mijin 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chem.* 104: 774-782.
58. Dorman H, Deans S. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 308–316.
59. Dussault D, Dang Vu K, Lacroix M. 2014. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science* 96 (2014) 514–520.
60. Egan A, Eustace I, Shay B. 1988. Meat packaging – maintaining the quality and prolonging the storage life of chilled beef, pork and lamb. *Meat* 88: Proceedings of Industry Day 1: 68-75.
61. Erkmen O, Bozoglu F. 2016. *Food Microbiology: Principles into Practice*, 1^a ed: Wiley & Sons. doi: 10.1002/9781119237860.
62. Eskin N., Shahidi F. 2013. Meat and Fish. En: *Biochemistry of Foods* (127-185). Reino Unido: Elsevier. 127p.
63. FAO/OMS. 1996. *Informe de la 29^a reunión del Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos*. ALINORM 97/13A. Washington, D.C., 21 - 25 de octubre. FAO, Roma.

64. Farías G, Brutti O, Grau G, Di-Leo-Lira R, Rettad D, Van-Baren C, Bandoni A. 2010. Bandoni A. Morphological, Yielding and Quality Descriptors of Four Clones of *Origanum* spp. (Lamiaceae) from the Argentine Littoral Region Germplasm Bank. *Industrial Crops and Products*, (32): 472-480.
65. Feldhusen F, Kirschner T, Koch R, Giese W, Wenzel S. 1995. Influence on meat colour of spray-chilling the surface of pig carcasses. *Meat Science* 40: 245–251.
66. Ferens W, Bohach G. 2000. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *J Lab Clin Med*, 135: 225-230.
67. Forrest J. 1975. *Fundamentos de ciencia de la carne*. España: Acribia. 365 p.
68. Foster T, Bohach A. 2000. *Staphylococcus aureus* exotoxins. En: Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy J, eds. *Press Gram positive pathogens*. Washington DC: ASM Press. p 367-378.
69. Fox J, Barthold S, Davisson M, Newcomer C, Quimby F, Smith A. 2007. *The Mouse in Biomed Research: Diseases*. 2^a ed. New York: Academic Press. p 234-257.
70. Friedman M, Henika P, Mandrell R. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65 (10): 1545– 1560.
71. Fritz S, Epplin E, Garbutt J, Storch G. 2009. Skin infection in children colonized with community-associated methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect.* 59: 394–401. doi: 10.1016/j.jinf.2009. 09.001.
72. García A, Brugnini G, Rodriguez S, Mir A, Carriquiry J, Rufó C, Briano B. 2015. Vida útil de carne fresca de res envasada al vacío a 0°C y +4°C. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 4, 27. doi:10.5377/payds.v4i0.3962
73. García A, Leyva, M, Martínez J, Stashenko E. 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* (Piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *ScientiaET Technica*, 13:.439-442.
74. García M. 2006. *Higiene e inspección de carnes-I*: Ediciones Díaz de Santos.259 p.

75. García-Díez J, Alheiro J, Falco V, Fraqueza M, Patarata L. 2016. Chemical characterization and antimicrobial properties of herbs and spices essential oils against pathogens and spoilage bacteria associated to dry-cured meat products. *Journal of Essential Oil Research*, 29:2, 117-125.
76. García-Díez J, Alheiro J, Pinto A, Soares L, Falco V. 2017. Influence of Food Characteristics and Food Additives on the Antimicrobial Effect of Garlic and Oregano Essential Oils. *Foods* 6: 44. doi: 10.3390/foods6060044.
77. Gheisari H, Ranjbar V. 2012. Antioxidative and antimicrobial effects of garlic in ground camel meat. *Turk. J. Vet. Anim. Sci* 36(1): 13-20. doi:10.3906/vet-1012-620.
78. Giannuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. 1998. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 39: 101-110.
79. Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79: 199-203.
80. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. 2008. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis* 2008, 197:1226e1234
81. Govaris A, Solomakos N, Pexara A, Chatzopoulou P. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol* 137: 175-180.
82. Grau F, Vanderlinde P. 1992. Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *Journal of Food Protection* 55: 4-7.
83. Graves L, Helsel L, Steigerwalt A, Morey R, Daneshvar M, Roof S, Orsi R, Fortes E, Milillo S. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1280–1288.
84. Gribble A, Mills J, Brightwell G. 2014. The spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and two psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in vacuum

- packed lamb and the comparison between high and low pH cuts. *Meat Science*, 97: 83-92.
85. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol* 124: 91-97.
86. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S.aureus* adhesins in relations to adhesion to biomaterials: Review. *Eur Cells Mater* 4(2): 39-60.
87. Hasman H, Moodley A, Guardabassi L, Stegger M, SkovRL, Aarestrup FM. 2010. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Micro-biol* 141: 326- 331.
88. Helander I, Alakomi H, Latva K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid E, Gorris L, von Wright. 1998. A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem* 46: 3590–3595.
89. Hoffman L, Wiklund E. 2006. Game and venison - meat for the modern consumer. *Meat Sci* 74(1):197-208. Doi: 10.1016/j.meatsci.2006.04.005.
90. Hopkins L, Thompson M. 2002. Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact of tenderisation in beef and sheep meat. *Australian Journal of Agricultural Research* 53: 149-166.
91. Hughes JM, McPhail N, Kearney G, Clarke F, Warner R. 2015. Beef longissimus eating quality increases up to 20 weeks of storage and is unrelated to meat colour at carcass grading. *Animal Production Science* 55: 174-179.
92. Hui Y, Guerrero I, Rosmini M. 2006. *Ciencia y Tecnologia de Carnes*. Ed. Limusa S.A. Mexico.
93. Hussain A, Anwar F, Rasheed S, Nigam, Janneh O, Sarker S. 2011. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in pakistan. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21: 943-952.

94. Hygreeva D, Pandey MC, Radhakrishna K. 2014. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Sci* 2014; 98: 47–57.
95. ICMSF. 1996. *Microorganisms in Food. 5 Characteristics of Microbial Pathogens.* Blackie Academic and Professional, Aspen Publishers, Inc.
96. ICMSF. 2000. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en muestras de alimentos. 2da ed. Traducción de la versión 1988: Acribia. 12 p.
97. Ivanek R, Grohn Y, Tauer L, Wiedmann M. 2005. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 513–523.
98. Jackson C, Davis J, Barrett J. 2013. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat and humans in Georgia. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1199–1207. doi: 10.1128/JCM.03166-12.
99. Jamshidi A, Zeinali T. 2019. Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *Int J Food Sci* 3: 7835253. doi:10.1155/2019/7835253.
100. Javed MS, Khan MI, Randhawa MA, Sajid MW, Ahmad A, Khan MAN. 2011. Garlic (*Allium Sativum* L.) as an antimicrobial and antioxidant agents in beef sausages. *Pak J Food Sci* 21(1-4): 22–32.
101. Jenkins W, Harrington J. 1991. *Packaging foods with plastics: CRC Press.* 234p.
102. Jevon M, Guo B, Ma N, Mordan S, Nair M, Harris B, Henderson G, Bentley S, Meghji S. 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun*, 67: 2677-2681.
103. Johnson B. 1974. Chilled vacuum-packed beef. *C.S.I.R.O. Food Res. Quarterly*, 34, 14-20.
104. Kamenetsky R, Rabinowitch H. 2010. The Genus *Allium*: A Developmental and Horticultural Analysis. *Horticultural Reviews* 32: 329-378.
105. Kamenik J. 2013. The microbiology of meat spoilage: a review. [Internet], [4 abril 2018]. Disponible en: <http://www.maso-international.cz/wpcontent/uploads/2013/08/maso-international-2013-1-page-003-010.pdf>

106. Kemp C, Parr T. 2012. Advance in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Journal of Meat Science* 92: 252-259.
107. Kerro Dego O, Van Dijk J, Nederbragt H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q* 24: 181-198.
108. Keskinen L, Todd E, Ryser E. 2008. Transfer of Surface Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. *Journal of Food Protection* 71: 176-181.
109. Khan I, Jo C, Tariq R. 2015. Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors – A systematic review. *Meat Science* 110: 278-284.
110. Khelef, N. 2005. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York: Springer. 235p.
111. Khen BK, Lynch OA, Carroll J, McDowell DA, Duffy G. 2015. Occurrence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* in the beef chain in the republic of Ireland. *Zoonoses Public Health* 62:11-17.
112. Kiermeier A, Tamplin M, May D, Holds G, Williams M, Dann A. 2013. Microbial growth, communities and sensory characteristics of vacuum and modified atmosphere packaged lamb shoulders. *Food Microbiology* 36: 305-315.
113. Kim Y, Nam G, Yoon K. 2018. Growth and survival of *Staphylococcus aureus* on beef jerky as a function of temperature. *Journal of Food Safety* 38:5.
114. Kim Y, Warner R, Rosenvold K. 2014. Influence of high pre-rigor temperature and fast pH fall on muscle proteins and meat quality: a review. *Animal Production Science* 54: 375-395.
115. Kirkpinar F, Ünlü H, Serdaroğlu M, Turp G. 2014. Effects of dietary oregano and garlic essential oils on carcass characteristics, meat composition, colour, pH and sensory quality of broiler meat, *British Poultry Science* 55(2): 157-166. DOI: 10.1080/00071668.2013.879980.
116. Klauer G. 2009. Manual tecnico de cultivo ecologico de oregano (*Origanum sp L.*).El taller asociacion de promocion y desarrollo. Arequipa- Peru. 9 p.

117. Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L. 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1121–1128. doi: 10.1128/jcm.33.5.1121-1128.1995.
118. Kocks C. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68: 521–531.
119. Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol* 99: 8788-8795.
120. Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. 2013. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 2013, 19:860e868
121. Krisch P, Pardi Z, Tserennadmid R, Papp T, Vágvölgyi C. 2010. Antimicrobial effects of commercial herbs, spices and essential oils in minced pork. *Acta Biol Szeged* 54(2):131-134.
122. Kumar M, BerwalJ. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *Journal of Applied Microbiology* 84: 213–215.
123. Kyung KH. 2012 Antimicrobial properties of *Allium* species. *Curr Opin Biotechnol* 23(2): 142–147.
124. La Stora A, Ercolini D, Marinello F, di Pasqua R, Villani F, Mauriello G. 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Res. Microbiol* 162: 164–172.
125. Lancette G.A, Bennett W. 2001. “*Staphylococcus aureus*, and Staphylococcal Enterotoxins”. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4^a ed. Washington: Downs F.P. & Ito K. APHA. p 387-403.
126. Lang Halter E, Neuhaus K, Scherer S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 641–647.

127. Larsen H, Seeliger H. 1966. A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. In Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis. Bilthoven, the Netherlands. p 35–39.
128. Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG. 1991. Identification and HPLC quantification of the sulphides and dialk(en) y lthiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Med* 57: 363–370.
129. Leclercq A, Clermont D, Bize, C, Grimont P, Le Monnier, A. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2210–2214.
130. Lim SK, Lee JE, Lee HS, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Park YJ, Jung YG, Jung SC, Wee SH. 2014. Trends in antimicrobial sales for livestock and fisheries in Korea during 2003–2012. *Korean J Vet Res* 54:81-86.
131. Lim SK, Nam HM, Jang GC, Kim SR, Chae MH, Jung SC, Kang DJ, Kim JK. 2011. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from raw meats in slaughterhouse in Korea during 2010. *Kor J Vet Publ Hlth* 35:231-238.
132. Lim SK, Nam JM, Park HJ, Lee HS, Choi MJ, Jung SC. 2010. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in korea. *J MicrobiolBiotechnol* 20: 775—8.
133. Lofa A, Velasco V, Gerding M, Lopez M, Vallejos D, Bonilla A, Logue C. 2019. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains of swine origin: molecular typing and susceptibility to oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) extract. *J Appl Microbiol*, 127(4): 1048-1056. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14393>.
134. Lu M, Dai T, Murray C, Wu M. 2018. Bactericidal Property of Oregano Oil Against Multidrug-Resistant Clinical Isolates. *Frontiers in microbiology*, 9, 2329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02329>
135. Lucquin I, Zagorec M, Champomier-Vergés, Chaillou S. 2011. Article in press. Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage processs and seasonal changes. *Food Microbiology* 29(2):187-196. doi:10.1016/j.fm.2011.08.001.
136. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson

- DL, Wilson LE, Fridkin SK. 2014. Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team: Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 370: 1198-1208.
137. Mancini R, Hunt M. 2005. Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100- 121.
138. Manfredi E, Rivas M. 2018. Brote de intoxicación alimentaria en un jardín de infantes de la provincia de Buenos Aires. *Rev Argent Microbiol* 51(4): 354-358. doi: 10.1016/j.ram.2018.08.008 81.
139. Martínez S. 2005. Influencia de la catalasa y de la β - toxina en la patogénesis de *Staphylococcus aureus*. Tesis de doctorado en Salud Animal. Madrid: Univ. Complutense de Madrid. 6 p.
140. Martínez-Rocha A, Puga R, Hernández-Sandoval L, Loarca-Piña G, Mendoza S. 2008. Antioxidant and antimutagenic activities of mexican oregano (*Lippia graveolens Kunth*). *Plant Food Hum. Nutr.* 63: 1-5.
141. Martins N, Petropoulos S, Ferreira I. 2016. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chem*, 211: 41-50. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.029.
142. McCaffrey R. 2004. A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc. Natl Acad. Sci* 101: 11386–11391.
143. Mechergui K, Coelho J, Serra M, Lamine S, Boukhchina S, Khouja M. 2010. Essential oils of *Origanum vulgare* L. sp. glandulosum (Desf.) Ietswaart from Tunisia: Chemical composition and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 90: 1745-1749.
144. Meloni D, Piras F, Mureddu A, Fois F, Consolati SG, Lamon S, Mazzette R. 2013. *Listeria monocytogenes* in five Sardinian swine slaughterhouses: Prevalence, serotype, and genotype characterization. *J Food Prot* 76:1863-1867.
145. Mhone T, Matope G, Saidi P. 2011. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk

- from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *Int. J. Food Microbiol* 151: 223–228.
146. Mills J, Donnison A, Brightwell G. 2014. Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: A review. *Meat Science* 98: 71-80.
147. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú Vol 28 - SE 08-2019. Lima, Peru: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. p 190-212.
148. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú Vol 28 - SE 15-2019. Lima, Peru: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. p 372-395.
149. Mnayer D, Fabiano-Tixier A, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, Chemat F. 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(12): 20034-20053. doi:10.3390/molecules191220034.
150. Mohamed N, Timofeyeva Y, Jamrozy D, Rojas E, Hao L, Silmon de Monerri N. 2019. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States. *PLoS One* 14(1): 208- 356. doi: 10.1371/journal.pone.0208356.
151. Monin G, Sellier P. 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post mortem period: the case of the Hampshire breed. *Meat Science* 13: 49.
152. Moreno B. 1991. Capítulo 9: Posibilidades teóricas y reales de descontaminación de la carne. En: *Higiene e Inspección de carnes*. España: Volumen I. p135-155.
153. Moreno B. 2003. *Higiene e Inspección de carnes Tomo II*. Madrid: Ediciones Diaz de Santas S.A. 493p.
154. Morshedloo MR, Craker LE, Salami A, Nazeri V, Sang H, Maggi F. 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare L.*) subspecies. *Plant Physiol. Biochem* 111: 119–128.

155. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2015. Medical microbiology, 8thed. London: Elsevier Health Sciences. p 210–213.
156. Nikaido H, Outer Membrane. 1996. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular biology Neidhardt, F.C. Washington, DC, USA: ASM. p 29–47.
157. Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 1994, 264, 382–388.
158. Nurzynska-Wierdak R, Bogucka-Kocka A, Sowa I, Szymczak G. 2012. The composition of essential oil from three ecotypes of *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* cultivated in Poland. *Farmacia* 60: 571–577.
159. Nychas G, Panos P, Skanadamis P, Tassou C, Koutsoumanis K. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78: 77-89.
160. Nychas G. 1995. Natural antimicrobial from plants. *New methods of food preservation*. Glasgow: Blackie Academic & Professional. p 59–89.
161. O'Brien A, Hanson B, Farina S, Wu J, Simmering J, Wardyn S. 2012. MRSA in conventional and alternative retail pork products. *PLoS One* 7: 30092. doi: 10.1371/journal.pone.0030092.
162. Ockerman H, Basu L. 2004. Carcass chilling and boning. *Encyclopedia of Meat Sciences*. Oxford: Elsevier In J. Werner Klith. p. 144–149
163. Olaimat AN, Al-Holy MA, Shahbaz HM, Al-Nabulsi AA, Abu Ghoush MH, Osaili TM, Ayyash MM, Holley RA. 2018. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17:1277–1292.
164. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. 2018. *Toxins (Basel)* 10(6):252. doi:10.3390/toxins10060252.
165. Ordóñez J, Cambero M, Fernández L, García M, García G, De la Hoz L, Selgas M. 1999. *Tecnología de los Alimentos*. Vol II – Alimentos de origen animal. España: Síntesis. 366 p.
166. Ortega-Nieblas M, Robles-Burgueno M, Acedo-Felix E, Gonzalez-Leon A, Morales-Trejo A, Vazquez-Moreno L. 2011. Chemical composition and

- antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Rev Fitotec. Mex.* 34: 11-17.
167. Ospina M, Cartagena V. 2008. La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Redalyc Sistema de Información Científica.* 5 (2): 112-123.
168. Pamer E. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Rev. Immunol* 4: 812–823.
169. Seeliger H, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont P, Jones, D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 34: 336–337.
170. Pérez M. 2013. Prevalencia de *Listeria Monocytogenes* en salchichas tipo Huacho provenientes de los mercados de abastos del Cercado de Lima. Tesis de maestría. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 654 p.
171. Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Nostro AL. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. Isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 21:708-713.
172. Pettersen M.K., Mielnik M.B., Eie T., Skrede G., Nilsson A. 2004. Lipid oxidation in frozen, mechanically deboned turkey meat as affected by packaging parameters and storage conditions. *Poultry Science* 83: 1240-1248.
173. Pirie, J. H. (1940). The Genus *Listerella* Pirie. *Science* 91: 383.
174. Ponnampalam N, Norng S, Burnett F, Dunshea F, Jacobs J, Hopkins D. 2014. The synergism of biochemical components controlling lipid oxidation in lamb muscle. *Lipids*, 49, 757-766.
175. Pozzatti P, Loreto E, Nunes Mario D, Rossato L, Santurio J, Alves S. 2010. Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *Journal of Medical Mycology.* 20: 185-189.
176. Prakash B, Kedia A, Mishra P, Dubey. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control*, 47: 381-391. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>.

177. Pu S, Han F, Ge B. 2009. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 75: 265—7
178. Pyun M, Shin S. 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13(6): 394-400. doi:10.1016/j.phymed.2005.03.011.
179. Qazi S, E Counil J, Morrissey C, Rees A, Cockayne K, Winzer W, Chan P, Williams P, Hill P. 2001. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun*, 69: 7074-7082.
180. Răduică D, Popescu V. 2010. Research on the biology, technology and use of shallots (*Allium ascalonicum*). [Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology](#) 14(2): 250-257.
181. Ramirez Bribiesca J, Cruz Monterrosa R. 2013. Empaque para la conservación de carne y productos cárnicos. *Agroproductividad* 6(1): 10-23.
182. Ramírez-Concepción H, Castro-Velasco L, Martínez-Santiago E. 2016. Efecto Terapeutico del Ajo (*Allium sativum*). *Salud y Administración* 3 (8): 39 - 47.
183. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. 2010. *J. Biosci. Bioeng* 110: 614–619.
184. Risvik E. 1994. Sensory properties and preferences. *Meat Science* 36: 67-77.
185. Rocourt J, Grimont P. 1983. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 33: 866–869.
186. Rodas-González A. 2011. Evaluation of the storage life of vacuum packaged Australian beef. *Meat Science* 88: 128-138.
187. Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza B, Ortega-Ramireza L, Leyva M, Siddiquib W, Cruz-Valenzuelaa M, Gonzalez-Aguilara G, Ayala-Zavalaa J. 2015. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (10): 1717-1727.

188. Rodriguez J. 2018. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. Rev. Chil Infectol. 2018; 35(6): 649-657. doi: 10.4067/S0716-10182018000600649.
189. Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri M, Mallamaci R. 2009. In vitro synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* 16: 972-975.
190. Russo F, Ercolini D, Mauriello G, Villani F. 2006. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other spoilage microbial groups. *Food Microbiology* 23: 797-802.
191. Saidu N, Touma R, Asali I, Jacob C, Montenarh M. 2013. Diallyl tetrasulfane activates both the eIF2 α and Nrf2/HO-1 pathways. *Biochim Biophys Acta* 1830(1): 2214-2225. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.003.
192. Sarikurkcu C, Zengin G.; Oskay, M.; Uysal, S.; Ceylan, R.; Aktumsek, A. 2015. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Ind. Crop. Prod* 70: 178–184.
193. Satyal P, Craft J, Dosoky N, Setzer W. 2017. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (*Allium sativum*) and Wild Garlic (*Allium vineale*). *Foods* 6(8): 63. doi:10.3390/foods6080063.
194. Seeliger H. 1981. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). *Zentralbl Bakteriol Hyg 1 Abt Orig A* 249: 487–493.
195. Seideman S. 1975. The effect of degree of vacuum on the physical and organoleptic properties of vacuum packaged beef wholesale cuts. M. S. Thesis. Texas A&M University, College Station, TX. 67 p.
196. Shaaban H, El-Ghorab A, Shibamoto T. 2012. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2): 203-212. doi:10.1080/10412905.2012.659528.
197. Sharifi-Rad J, Hoseini Alfatemi S, Sharifi Rad M, Iriti, M. 2014. Antimicrobial Synergic Effect of Allicin and Silver Nanoparticles on Skin

Infection Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* spp. *Ann Med Health Sci Res*, 4(6), 863-868. doi:10.4103/2141-9248.144883

198. Sharifi-Rad J, Mnayer D, Tabanelli G, Stojanovic-Radic Z, Sharifi-Rad M, Yousaf Z, Iriti M. 2016. Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 62(9): 57-68.
199. Sharifi-Rad J, Mnayer D, Tabanelli G, Stojanović-Radić Z, Sharifi-Rad Z. 2016. Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cell. Mol. Biol* 62 (9): 57-68.
200. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103: 501-10.
201. Shompole S, Henon L, Liou K, Dziwanowska G, Bohach K, Bayles W. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol Microbiol* 49: 919-927.
202. Shyh-Ming T, Mei-Chin Y. 2001. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol* 50: 646–649.
203. Sikkema J, de Bont J, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev* 59: 201–222.
204. Skovgaard N, Norrung B. 2009. The incidence of *Listeria* sp. in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *International Journal of Food Microbiology* 8: 59-63.
205. Small A, Jenson I, Kiermeier A, Sumner J. 2012. Vacuum-packed beef primals with extremely long shelf life have unusual microbiological counts. *Journal of Food Protection* 75: 1524-1527.
206. Soyiri N, Agbogli H, Dongdem J. 2008. A pilot microbial assessment of beef in the Ashaima market, a suburb of Accra Ghana. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development* 8: 91-103.

207. Sumner J, Jenson I. 2011. The effect of storage temperature on shelf life of vacuum-packed lamb shoulders. *Food Australia*, 63: 249-251.
208. Sung S, Sin L, Tee T, Bee S, Rahmat A. 2014. Effects of *Allium sativum* essence oil as antimicrobial agent for food packaging plastic film, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 26: 406–414. doi: 10.1016/j.ifset.2014.05.009.
209. Tarladgis B, Watts B, Younathan T, Dugan L. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society* 37: 44-48.
210. Tellez L, Nolazco D. 2017. Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna. *Ingeniería Industrial*, (35):195-205.
211. Tibaldi G, Fontana E, Nicola S. 2011. Growing conditions and postharvest management can affect the essential oil of *Origanum vulgare* L. sp. hirtum Letswaart. *Ind Crop Prod* 34: 1516-1522.
212. Tiwari U, Adams SJ, Begums N, Krishnamurthy KV, Ravikumar K, Padma V. 2014. Pharmacognostic studies on two Himalayan species of traditional medicinal value: *Allium wallichii* and *Allium stracheyi*. *Not Sci Biol* 6(2):149–154.
213. Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi, J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine* 17(2), 142-145.
214. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother* 49: 2474–2478.
215. Tsao S, Yin M. 2001. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol*, 50(7): 646-649. doi:10.1099/0022-1317-50-7-646.
216. Ultee A, Bennik M, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 1561–1568.

217. Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev* 56: 395–411.
218. Vale-Silva L, Silva M, Oliveira D, Gonçalves M, Cavaleiro, C, Salgueiro L, Pinto E. 2012. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *J. Med. Microbiol* 61: 252–260.
219. Vazirian M, Mohammadi M, Farzaei M, Amin G, Amanzadeh Y. 2015. Chemical composition and antioxidant activity of *origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. *Res. J. Pharmacogn* 2: 41–46.
220. Veiga E, Guttman J A, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, Lin AE. 2007. Invasive and adherent bacterial pathogens co-opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* 2: 340-51.
221. Veldhuizen E, Tjeerdsma-Van Bokhoven J, Zweijtzer C, Burt S, Haagsman H. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem* 54: 1874–1879.
222. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. 2013. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación *Rev Chilena Infectol*; 30 (4): 407-416
223. Verbeke W, Pérez-Cueto F, Barcellos M, Krystallis A, Grunert K. 2010. European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science* 84: 284–292.
224. Villanueva D, Salazar M. 2017. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del Cercado de Lima. *An Fac med.* 78(3): 322-325. doi: 10.15381/anales.v78i3.13768
225. Wagner M, McLauchlin J. 2008. Chapter 1: Biology. Liu D, editor. *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press: Taylor & Francis Group. p. 3-25.
226. Waters A, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu C, Watson L, Pearce K. 2011. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and poultry. *Clin. Infect. Dis.* 52: 1227–1230. doi: 10.1093/cid/cir181.

227. Weese JS, Avery BP, Reid-Smith RJ. 2010. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett Appl Microbiol* 51:338—342.
228. Wood J, Enser M, Fisher A, Nute G, Richardson R, Sheard P. 1999. Manipulating meat quality and composition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58: 363-370.
229. Yadav A, Singh R. 2004. Natural preservatives in poultry meat products. *Natural Product Radiance* 3(4): 300-303.
230. Yilmaz D, Jasinskas A. 2016. effect of harvest date and stalk section on selected strength characteristics of turkish oregano (*Origanum onites* L). *Afr J Tradit Complement Altern Med* 13(4): 191-198. doi: <http://dx.doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.25>
231. Yücel N, Çitak S, Önder M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiol* 22:241-245.
232. Zhang P, Baranyi J, Tamplin M. 2015. Interstrain interactions between bacteria isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 2753-2761.
233. Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, White D, Wagner D, Meng J. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Bacillus cereus* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 67: 5431-5436.
234. Zhou G, Xu X, Liu Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat- A review. *Meat Science* 86: 119–128.

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 45-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (cabeza de ajo), recibida de **Juan Antonio ARELLANO LEANDRO**; de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Allium sativum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: LILIOPSIDA

SUB CLASE: LILIIDAE

ORDEN: LILIALES

FAMILIA: LILIACEAE

GENERO: Allium

ESPECIE: *Allium sativum* L.

Nombre vulgar: "Ajo"

Determinado por: Blga. María Isabel La Torre Acuy

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 12 de febrero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) San Marcos - USM



ACE/yhr.

Anexo 2



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 44-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama con hojas), recibida por **Juan Antonio ARELANO LEANDRO**; de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Origanum vulgare* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Origanum*

ESPECIE: *Origanum vulgare* L.

Nombre vulgar: "Orégano"

Determinado por: Blgo. Severo Matías Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 12 de febrero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/yhr.

Av. Armadas 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 anexos 5701, 5703, 5704

E-mail: museoh@unmsm.edu.pe
<http://museoh.unmsm.edu.pe>

Anexo 3
Compuestos químicos totales del aceite esencial de ajo.

Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	3.153	537669	0.10	218405	0.28	n-Propyl acetate
2	4.112	685099	0.13	217732	0.28	Toluene
3	4.305	323693	0.06	90282	0.12	Thiophene, tetrahydro-
4	4.840	32214	0.01	17570	0.02	Sulfide, allyl methyl
5	4.884	133326	0.02	38199	0.05	3-Penten-2-one, 4-methyl-
6	6.386	4166755	0.77	656939	0.84	tert-Butyl Hydroperoxide
7	7.066	26641388	4.91	6462321	8.26	Diallyl sulfide
8	7.615	201881	0.04	43218	0.06	Benzene, 1,3-dimethyl-
9	11.382	160405	0.03	30897	0.04	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
10	11.898	76647244	14.13	11658620	14.91	.alpha.-Pinene
11	13.157	1688597	0.31	228453	0.29	Camphene
12	13.894	823225	0.15	94526	0.12	Ethanethioamide, N,N-dimethyl-
13	16.222	73450520	13.55	8638225	11.05	.beta.-Pinene
14	23.709	351552	0.06	44601	0.06	p-Cymene
15	24.383	6525508	1.20	568636	0.73	D-Limonene
16	34.536	134480366	24.80	11130254	14.23	Diallyl disulphide
17	37.827	238212	0.04	40231	0.05	Linalool
18	40.901	881617	0.16	148448	0.19	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-
19	41.612	2074405	0.38	271010	0.35	Thiirane, methyl-
20	42.720	708346	0.13	130086	0.17	2-Propenoic acid, 2-methyl-
21	44.245	101260	0.02	25868	0.03	Terpinen-4-ol
22	45.321	274740	0.05	57195	0.07	.alpha.-Terpineol
23	45.514	778327	0.14	116978	0.15	Methyl salicylate
24	45.732	593103	0.11	122846	0.16	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-
25	45.929	500826	0.09	99151	0.13	Estragole
26	46.446	164052	0.03	31296	0.04	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene
27	47.331	116259	0.02	29284	0.04	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-
28	49.496	428376	0.08	84165	0.11	Thiophene, 2,3-dihydro-5-methyl-
29	49.898	187219	0.03	40917	0.05	1,2-Dithiolane
30	51.236	642353	0.12	149013	0.19	Estragole
31	51.953	125547125	23.15	20968216	26.82	Trisulfide, di-2-propenyl
32	52.208	336010	0.06	67624	0.09	3,6-Heptadien-2-ol, 2,5,5-trimethyl-, (E)-
33	52.550	321964	0.06	78023	0.10	Isobutyl isothiocyanate
34	54.675	125904	0.02	30321	0.04	3-(Methylthio)-2-butanone
35	54.819	4878964	0.90	978582	1.25	1,2-Dithiolane
36	55.383	60636	0.01	20282	0.03	Linalyl isobutyrate
37	61.013	175696	0.03	46804	0.06	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-
38	61.880	625105	0.12	147416	0.19	6-Methoxy-9-thia-bicyclo[3.3.1]non-2-ene
39	61.996	1834975	0.34	399023	0.51	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.a
40	62.825	266664	0.05	68557	0.09	Silane, methylenebis(trimethyl-
41	63.004	58414114	10.77	11448773	14.64	Diallyl disulphide
42	63.604	169349	0.03	49807	0.06	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.a
43	64.779	252143	0.05	58170	0.07	Trisulfide, di-2-propenyl
44	65.215	842182	0.16	191803	0.25	Trisulfide, di-2-propenyl
45	67.359	647035	0.12	105843	0.14	1,3,5-Trithiane
46	73.436	222279	0.04	37523	0.05	2,6,9,11-Dodecatetraenal, 2,6,10-trimethyl-, (E,E,E)-
47	74.919	3182372	0.59	426904	0.55	Trisulfide, di-2-propenyl
48	76.541	1924982	0.35	236965	0.30	Diallyl disulphide
49	78.745	4516090	0.83	747222	0.96	Trisulfide, di-2-propenyl
50	79.014	466214	0.09	63962	0.08	2,6,9,11-Dodecatetraenal, 2,6,10-trimethyl-, (E,E,E)-
51	87.440	807056	0.15	151444	0.19	Diallyl disulphide
52	87.972	1388289	0.26	229069	0.29	Cyclic octatomic sulfur
53	88.492	349229	0.06	74608	0.10	Silane, methylenebis(trimethyl-
54	89.524	374992	0.07	83143	0.11	Trisulfide, di-2-propenyl
		542267906	100.00	78195450	100.00	

Anexo 4

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

Materiales:

- Embudo de decantación.
- Probeta florentino o pera de decantación.
- Vaso Beaker.

Equipo:

- Hidroextractor de destilación de acero.
- Deshidratador de alimentos (BLANICK modelo BDA020)

Reactivos:

- Sulfato de sodio anhídrido.
- Agua destilada

Procedimiento para la extracción del aceite esencial de orégano.

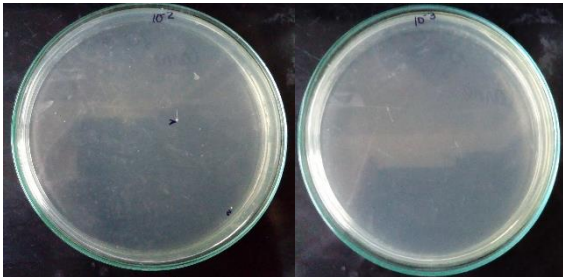
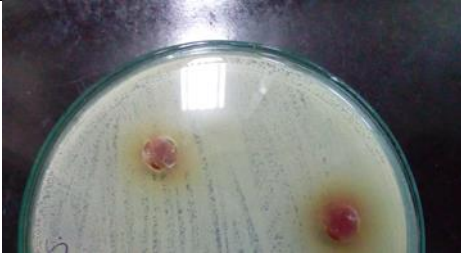
1. Las plantas frescas enteras se lavan con agua destilada.
2. El orégano se deshoja y coloca en un deshidratador de alimentos (BLANICK modelo BDA020) a 35°C durante 9 horas.
3. Las hojas secas son tratadas en un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua a presión y temperatura controlada durante dos horas.
4. Se realiza una extracción y el destilado del aceite esencial se recibe en una probeta florentino.
5. La deshidratación del aceite esencial se realiza utilizando 5 gramos de sulfato de sodio anhidro, con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio de color ámbar a temperatura de 4°C.

Procedimiento para la extracción del aceite esencial de ajo.

1. Los ajos son lavados con agua corriente y escobillados suavemente hasta remover la tierra y restos vegetales
2. Se desinfecta por inmersión en una solución de agua e hipoclorito de sodio (20 ppm)

3. Se enjuaga con agua destilada, se seca con papel toalla y posteriormente se pela.
4. Los bulbos frescos son tratadas en un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua a presión y temperatura controlada durante tres horas.
5. Se realiza una extracción y el destilado del aceite esencial se recibe en una probeta florentino.
6. La deshidratación del aceite esencial se realiza utilizando 5 gramos de sulfato de sodio anhidro, con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio de color ámbar a temperatura de 4°C.

Anexo 5

PRUEBA	PROCEDIMIENTO
RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS Procedimeint o según ICMSF, 2000	<ul style="list-style-type: none"> • Tomar una muestra de 25 g de carne y añadirla a un vaso homogeneizador con 225 ml de agua peptona para realizar diluciones. De este modo se obtiene una dilución 10^{-1} y posteriormente homogeneizar. • Medir 1 ml de la dilución 10^{-1} del homogeneizado, evitando la formación de espuma y pasar a uno de los blancos de dilución conteniendo 9 ml de diluyente (agua peptonada) y agitar. Repetir esta operación utilizando las diluciones progresivamente más elevadas para preparar las diluciones 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}. • Tomar dos o tres alícuotas de 0.1 ml de la dilución más elevada y depositarlas en la superficie del agar Plate Count contenido en 2 o 3 placas de Petri (3 placas por dilución, sembrando en cada una 0.1 ml). • Repetir esta operación con cada dilución hasta llegar a la más concentrada. <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-around;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>RESULTADOS: (Solo se observó 2 colonias en una de las placas de la dilución 10^{-2}) En 10^{-1}: < 1UFC/g En 10^{-3}: < 1UFC/g</p> </div> </div> <p>ICMSF. 2000. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en muestras de alimentos. 2^{da} ed. Traducción de la versión 1988: Acribia. 12 p.</p>
DESCARTE DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTI COS	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar las colonias de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) en tubos de 5 ml de caldo Tripticasa de Soya (TSB), hasta que alcancen la turbidez del estándar para el inóculo (0.5 en la escala de Mc Farland). • Sumergir un hisopo estériles dentro de los tubos que contiene el inóculo bacteriano. • Realizar la siembra de <i>Bacillus subtilis</i>, utilizando el hisopo embebido en placas con agar Müller-Hinton, hasta que cubra toda la superficie del agar, con una espátula de drigalsky y se dejar reposar por 5 minutos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. • Realizar 3 orificios circulares de aproximadamente 5 mm de diámetro en el agar MH que contenía la cepa. • Introducir, con un ansa estéril, en cada uno de los orificios las muestras trituradas de carne. • Para que sean considerados positivos los halos de inhibición deben ser mayores a 2 mm. <div style="text-align: center;">  <p style="text-align: right;">Prueba Negativa</p> </div>
	<p>Adaptado de MORENO, (2003) Moreno B. 2003. Higiene e Inspeccion de carnes Tomo II. Madrid: Ediciones Diaz de Santas S.A. 493p.</p>

PRUEBA	PROCEDIMIENTO
<p style="text-align: center;">Recuento <i>S. aureus</i>.</p> <p style="text-align: center;">(Lancette y Bennett, 2001)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La preparación de la muestra para la evaluación microbiológica se realiza pesando 25 gramos de carne, y se homogeniza con 225 ml de agua peptonada (0.1%). A partir de esta dilución (10^{-1}) se haran diluciones seriadas. • Medir 1 ml de la dilución 10^{-1} del homogeneizado, evitando la formación de espuma y pasarlo a uno de los blancos de dilución conteniendo 9 ml de diluyente (agua peptonada) y agitar. Repetir esta operación utilizando las diluciones progresivamente más elevadas para preparar las diluciones 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}. • Sembrar 0.1 ml de cada dilución en el agar Baird Parker (Lancette y Bennett, 2001), se siembra por triplicado para cada dilución. Extender el volumen inoculado a cada una de las placas de Petri con una espátula de drigalsky (Método de inoculación por extensión en superficie). • Incubar a 37°C durante 48 horas. • Después de la incubación, examinar las placas para ver la presencia de colonias sospechosas de <i>S. aureus</i> y realizar el recuento. • Las colonias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre agar Baird-Parker son redondas, de bordes lisos, convexas, de 2-3 mm de diámetro, húmedas, brillantes, negras, con un borde blanco fino, rodeadas de una zona opaca y de un halo claro de 2-5 mm.
<p style="text-align: center;">Presencia de <i>L. monocytogenes</i></p>	<p>La determinación de la presencia de <i>L. monocytogenes</i> en carne se realizó mediante el kit <i>Gene Quence</i> de <i>L. monocytogenes</i> (<i>NEOGEN</i>[®]) mediante hibridación de ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Realizar un hisopado (hisopo estéril) en toda la superficie del filete de carne, y se coloca el hisopo en un tubo de 10 ml de caldo LESS (<i>NEOGEN</i>[®]), se agita vigorosamente por 10 segundos y posteriormente se incuba a 30°C durante 48 horas. • Separar 0.4 ml del caldo enriquecido LESS post incubación, para la prueba mediante el kit Gene Quence de <i>L. monocytogenes</i>. • Colocar los 0.4 ml en viales, luego preparar el reactivo de pre tratamiento y el reactivo de lisis (según como lo indica el fabricante) para después adicionar 0.2ml e incubar a 37°C por 5 minutos, lo que permite la liberación del material genético de la bacteria. • Trasladar 0.150 ml de cada muestra y control a los micropozos debidamente rotulados, donde se agrega 0.125 ml de la solución mezcla (solución de hibridación más la solución de sonda). Después los micropozos se incubarán a 45°C durante una hora. • Luego de realizar el lavado de los micropozos con la solución de lavado del kit, después se adicionar 0.150 ml de la solución sustrato cromógeno a todos los micropozos y se incubó a temperatura ambiente durante veinte minutos. • Posterior a la incubación adicionar 0.05ml de la solución stop a cada micropozo y se leer la reacción es un espectrofotómetro a 450 nm. • Después de realizar los pasos indicados por el fabricante, analizar las absorbancias según el protocolo del kit.