

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EFECTO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO FRACCIONADO
(*POLIOMINTHA LONGIFLORA* GRAY) SOBRE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE
LISTERIA INNOCUA/MONOCYTOGENES”

POR

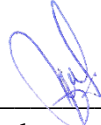
MARIANA FERNANDA PIMENTEL GONZÁLEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS
BIÓTICOS

2024

“EFECTO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO FRACCIONADO
(*POLIOMINTHA LONGIFLORA* GRAY) SOBRE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA
DE *LISTERIA INNOCUA/MONOCYTOGENES*”

Comité de tesis



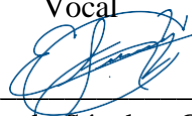
Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández
Presidente



Dra. Catalina Leos Rivas
Secretario



Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal



Dr. Eduardo Sánchez García
Vocal



Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Vocal




Dra. Katiushka Arévalo Nino
Subdirectora de posgrado

“EFECTO DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO FRACCIONADO
(*POLIOMINTHA LONGIFLORA* GRAY) SOBRE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA
DE *LISTERIA INNOCUA/MONOCYTOGENES*”

Dirección de tesis



Dra. Sandra Loruhama Castillo Hernández
Directora



Dr. José Rodríguez Rodríguez
Director externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,
CONACyT con número de becario: 1184786.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por recibirme para realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Sandra Castillo Hernández por aceptarme como miembro en su equipo de trabajo y estar dispuesta a apoyarme en todo momento, profesional y personalmente.

A la coordinación y el personal administrativo del posgrado de la FCB por su disposición y apoyo durante estos dos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por aceptarme dentro del programa nacional de becarios y financiar este proyecto.

A los miembros del comité de tesis, el Dr. José Rodríguez, el Dr. Baez, la Dra. Catalina Leos, el Dr. Carlos Amaya y el Dr. Eduardo Sánchez por su apoyo en cada etapa de este proyecto, así como a otros docentes que siempre estuvieron dispuestos a darme una mano y apoyarme tanto personal como académicamente.

A todos los miembros docentes y estudiantes del Departamento de Ciencia de los Alimentos, especialmente a mis compañeros de laboratorio por brindar soporte en los trabajos experimentales y por su amistad al colaborar día tras día.

A mis amigos por siempre mostrarse pendientes de mi a pesar de la distancia, los quiero siempre; a Eduardo por su apoyo incondicional.

A la Universidad de Córdoba, España, especialmente al Dr. Antonio Valero por aceptarme en su equipo de trabajo durante mi estancia y por creer en mí desde el primer momento. También, agradezco a otros docentes y compañeros del Departamento en Bromatología y Tecnología de los Alimentos: Javi, Olga, Aricia, Fran, Salud, Laura, Jean, Andrea, Cristina, Adolfo, Araceli, Fernando, Elena y más, por recibirme con los brazos abiertos en un país extranjero y brindarme siempre un poco de su conocimiento, siempre con una sonrisa.

Finalmente, y para cerrar con broche de oro, A MI FAMILIA: mamá, papá, Sylvia, Carla y Mauricio, por siempre apoyarme en alcanzar mis metas y objetivos, brindarme todo su amor y comprender los ideales en mi vida; sin dejar de lado a los oficiales integrantes Chui, Lolo y Artura por ser excelentes compañeros.

DEDICATORIA

A la vida, por darme tanto.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
	2.1 Inocuidad alimentaria	3
	2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos	3
	2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	4
	2.3.1 Factores de crecimiento	5
	2.3.2 Listeriosis	6
	2.3.3 Brotes de ETA por <i>Listeria monocytogenes</i>	6
	2.4 Tratamientos térmicos como métodos de conservación en alimentos	7
	2.5 Microbiología predictiva	9
	2.5.1 Modelos predictivos de inactivación	10
	2.6 Aditivos alimentarios	11
	2.6.1 Aditivos sintéticos	12
	2.6.2 Aditivos naturales	13
	2.6.2.1 Aceites esenciales	14
	2.6.2.1.1 Aceite esencial de orégano mexicano	15
3.	JUSTIFICACIÓN	18
4.	HIPÓTESIS	19
5.	OBJETIVO DEL TRABAJO	20
	5.1 Objetivo general	20
	5.2 Objetivos específicos	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	21
	6.1 <i>Listeria innocua/monocytogenes</i>	21
	6.2 Aceite esencial de <i>P. longiflora</i> y sus fracciones concentradas	22
	6.3 Caracterización del aceite de <i>P. longiflora</i>	23
	6.4 Actividad antimicrobiana preliminar	23
	6.5 Concentración Mínima Bactericida (MBC)	25
	6.6 Concentración subletal	25
	6.7 Inactivación térmica de <i>L. innocua</i> : <i>Ensayos In vitro</i>	26

6.8	Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> : Ensayos <i>In vitro</i>	29
6.9	Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> : Ensayos en matriz alimentaria.....	31
6.10	Análisis de color	33
6.11	Análisis sensorial	34
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1	Caracterización del aceite esencial de <i>P. longiflora</i>	35
7.2	Actividad antimicrobiana	37
7.3	Concentración Mínima Bactericida.....	38
7.4	Concentración subletal	39
7.5	Inactivación térmica de <i>L. innocua</i> : Ensayos <i>In vitro</i>	41
7.6	Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> : Ensayo <i>In vitro</i>	44
7.7	Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> : Ensayo sobre matriz alimentaria	51
7.8	Análisis de color	55
7.9	Análisis sensorial	56
8.	CONCLUSIONES	59
9.	PERSPECTIVAS	60
10.	BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de diferentes especies de orégano (%)	17
Tabla 2. Factores definidos en el diseño experimental de la actividad antimicrobiana	24
Tabla 3. Diseño experimental de inactivación térmica de <i>Listeria innocua</i> con aceite esencial de <i>P. longiflora</i> .	27
Tabla 4. Lista de compuestos presentes en el aceite esencial de <i>P. longiflora</i> , sus fracciones y el aceite residual de la destilación en columna y su concentración en porcentaje (%).	35
Tabla 5. Actividad antimicrobiana del aceite de <i>P. longiflora</i> frente a <i>L. innocua</i> ATCC 33090.	37
Tabla 6 Concentración Mínima Bactericida (MBC) del aceite de <i>P. longiflora</i> y sus fracciones frente a <i>L. innocua</i> reportada en porcentaje (%) y en mg/mL.	38
Tabla 7. Concentración subletal del aceite esencial de <i>P. longiflora</i> frente a <i>L. innocua</i> ATCC 33090, expresada en porcentaje (%).	40
Tabla 8. Fiabilidad del ajuste a los modelos predictivos en la inactivación de <i>Listeria innocua</i> obtenido a 52 y 54 °C con aceite de <i>P. longiflora</i> puro (OP) y fraccionado (FIV) a 0.06 % y estimación del valor D.	43
Tabla 9. Estimación de los parámetros de inactivación de <i>Listeria monocytogenes</i> sin y con aceite esencial de <i>P. longiflora</i> puro (OP) y fraccionado (FIV) a 52, 54, 57.5 y 63 °C junto con los valores en la bondad del ajuste al modelo Weibull-Mafart.	48
Tabla 10. Resultados obtenidos del ajuste al modelo secundario Weibull Mafart en un paso utilizando Bioinactivation4 sobre la inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> , considerando 57.5 °C como T°_{ref} . Se representa la bondad de ajuste al modelo y los parámetros z y p.	49

Tabla 11. Comparación de las observaciones <i>In vitro</i> y en la matriz alimentaria en la inactivación de <i>L. monocytogenes</i> con y sin aceite de <i>P. longiflora</i>	52
Tabla 12. Resultados del color LAB y RGB en el almacenamiento de carne cruda de res a 5 °C con aceite esencial de <i>P. longiflora</i> (OP y FIV) y sin aceite (Control).	55
Tabla 13. Resultados de la evaluación del color, olor y aceptación de carne cruda de vaca adicionada con aceite de <i>P. longiflora</i> puro (OP) y fraccionado (FIV) contemplando un control.	57
Tabla 14. Bondad de ajuste a los modelos predictivos de la inactivación térmica de <i>L. innocua</i> a 56 y 60°C, obtenidos en Bioinactivation4, para los tratamientos control, OP y FIV.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>) fresco y a la derecha, hojas de orégano secas y molidas.....	16
Figura 2. Medida del diámetro del halo de inhibición (cm) en el método difusión en disco.	24
Figura 3. Molino eléctrico de acero inoxidable (izquierda) para obtener la carne molida cruda de ternera (derecha).....	31
Figura 4. Muestras de carne picada cruda de vaca empacadas herméticamente sin vacío con los diferentes tratamientos: A = Control, B = carne con OP y C = carne con FIV...	32
Figura 5. Inactivación térmica de <i>L. innocua</i> a 52 °C en software Bioinactivation4. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de <i>P. longiflora</i> (OP y FIV a 0.06 %).	41
Figura 6. Inactivación térmica de <i>L. innocua</i> a 54 °C en el software Bioinactivation4. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de <i>P. longiflora</i> (OP y FIV a 0.06 %).	42
Figura 7. Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> a 52 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de <i>P. longiflora</i> : OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).....	45
Figura 8. Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> a 54 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de <i>P. longiflora</i> : OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).	45
Figura 9. Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> a 57.5 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de <i>P. longiflora</i> : OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).	46
Figura 10. Inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> a 63 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de <i>P. longiflora</i> : OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).....	46
Figura 11. Representación del modelo secundario de la inactivación de <i>L. monocytogenes</i> a 52, 54, 57.5 y 63 °C para los tres tratamientos utilizados: control (puntos verdes), OP (cruces naranjas) y FIV (rombos azules).	50
Figura 12. Validación de la inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> en una matriz cárnica sobre el modelo secundario <i>In vitro</i> : Control.	53

Figura 13. Validación de la inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> en una matriz cárnica sobre el modelo secundario <i>In vitro</i> : adición de OP 0.06 %	53
Figura 14. Validación de la inactivación térmica de <i>L. monocytogenes</i> en una matriz cárnica sobre el modelo secundario <i>In vitro</i> : adición de FIV 0.06 %	54
Figura 15. Modelos primarios de la inactivación <i>In vitro</i> de <i>L. monocytogenes</i> a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidos en Bioinactivation4: Control.	75
Figura 16. Modelo secundario de la inactivación térmica <i>In vitro</i> de <i>L. monocytogenes</i> obtenido de Bioinactivation4: Control.	75
Figura 17. Modelos primarios de la inactivación <i>In vitro</i> de <i>L. monocytogenes</i> a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidos en Bioinactivation4: adición de OP 0.06 %	76
Figura 18. Modelo secundario de la inactivación térmica <i>In vitro</i> de <i>L. monocytogenes</i> obtenido de Bioinactivation4: adición de OP 0.06 %	76
Figura 19. Modelos primarios de la inactivación <i>In vitro</i> de <i>L. monocytogenes</i> a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidos en Bioinactivation4: adición de FIV 0.06 %	77
Figura 20. Modelo secundario de la inactivación térmica <i>In vitro</i> de <i>L. monocytogenes</i> obtenido de Bioinactivation4: adición de FIV 0.06 %	77

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μm	Micrómetros.
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados.
μL	Microlitros.
AE	Aceite Esencial.
AEO	Aceite Esencial de Orégano.
Af	Factor Exactitud.
am	Unidad de masa atómica.
ATCC	Cepa de Referencia Certificada (American Type culture Collection).
ATP	Adenosin Trifosfato.
Bf	Factor Sesgo.
BHI	Brain Heart Infusion.
Cm	Centímetros.
MBC	Concentración Mínima Bactericida.
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria.
DOF	Diario Oficial de la Federación.
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos.
FAO	Food and Agriculture Organization.
FDA	Food and Drug Administration.
g	Gramo.
IE	Ionización Electrónica.
L	Litro.
m/z	Relación masa carga.
mg	Miligramos.
mL	Mililitro.
mm	Milímetros.

RMSE	Raíz del Error Cuadrático Medio.
SER	Error Estándar de Regresión.
TSA	Tryptic Soy Agar.
UFC	Unidad Formadora de Colonia.
v/m	Volumen/masa.
v/v	Volumen/volumen.

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son causadas por el consumo de alimentos o agua contaminados por agentes químicos, físicos o biológico-infecciosos. *Listeria monocytogenes* es una de las bacterias relacionadas a los brotes más relevantes de ETAs, implicada en gran parte, en la contaminación de productos cárnicos. El control del tiempo-temperatura utilizados en los tratamientos térmicos asegura la ausencia de este patógeno, sin embargo, la resistencia térmica de los patógenos ha forzado en encontrar alternativas para evitar el sobreproceso preservando los atributos sensoriales de los alimentos. La implementación de aceites esenciales en tratamientos térmicos a menores temperaturas ha demostrado la reducción de los tiempos de exposición y esto puede medirse a través de parámetros de inactivación como el valor D, utilizado en modelos predictivos para describir el tiempo de reducción decimal a una temperatura específica. El aceite esencial (AE) de orégano posee una importante composición en terpenos a los que se les atribuye propiedades antimicrobianas que contribuyen en disminuir el valor D. En este proyecto se evaluó la inactivación térmica de *L. innocua* y *L. monocytogenes* al añadir AE de orégano mexicano (*P. longiflora*) en su estado puro y fraccionado en un modelo *In vitro* y posteriormente en un modelo alimenticio utilizando carne cruda molida de res. El AE de *P. longiflora* demostró una composición de hasta 60.23 % de carvacrol y 21.17 % de timol. Al evaluar la actividad del aceite, se encontraron inhibiciones de 3.60 ± 0.14 cm con OP y hasta 5.30 cm con FIV. La adición de 0.06 % de aceite de *P. longiflora* a 52, 54, 57.5 y 63 °C permitió el aumento de la inactivación térmica de *L. monocytogenes* con estimaciones en el valor $D_{52\text{ °C}} = 1.75$ min utilizando OP y $D_{52\text{ °C}} = 0.64$ min utilizando FIV, en comparación al tratamiento control ($D_{52\text{ °C}} = 8.47$ min) y un valor $z = 5.75$ °C (control), 5.20 °C (OP) y 5.00 °C (FIV), concluyendo que el AE fraccionado (FIV) si disminuyó los parámetros de inactivación de *L. monocytogenes*, en comparación con el OP y el control.

Palabras clave:

Microbiología predictiva, inocuidad alimentaria, aditivos naturales, enfermedades transmitidas por alimentos.

ABSTRACT

Foodborne diseases are incidents caused by the consumption of food or water contaminated by chemistry, physical or biological-infectious agents. *Listeria monocytogenes* is an anaerobic bacteria related to the most relevant food borne diseases outbreaks globally, largely implicated in the contamination of meat. The control of Time-temperature is important in heat treatments to ensure the inactivation of *L. monocytogenes*, but its thermal resistance has forced to find alternatives to avoid the overprocessing and to preserve the sensory attribution of food products. Essential oils in combination of mild heat treatments have demonstrated the reduction of exposure times, ensuring safety. Predictive models are used in the estimation of parameters like the D value, defined as the time required to reduce the 90 % of the microbial population with a constant temperature. Oregano essential oil have an important composition in terpenes like carvacrol and thymol with high antimicrobial activity that contribute to reducing the D value. In this project the thermal inactivation of *L. monocytogenes* was evaluated with the addition with the sublethal concentration of pure and fractions of Mexican oregano (*Poliomintha longiflora*) in an *In vitro* and then in a food model using ground beef as a food matrix. The EO of *P. longiflora* demonstrated a composition of up to 60.23 % carvacrol and 21.17 % thymol. When evaluating the activity of the oil, inhibitions of 3.60 ± 0.14 cm were found with OP and up to 5.30 cm using FIV fraction and its sublethal concentration was 0.06 % v/v. The addition of 0.06 % of *P. longiflora* oil at 52, 54, 57.5 and 63 °C increased the thermal inactivation of *L. monocytogenes* with values of $D_{52\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1.75$ min using OP and $D_{52\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0.64$ min using FIV in contrast of control group ($D_{52\text{ }^{\circ}\text{C}} = 8.47$ min). The secondary model showed a z value of 5.75 (control), 5.20 (OP) and 5.00 (FIV) °C, so it was concluded that the fractionated EO (FIV) did reduce the inactivation parameters of *L. monocytogenes*, compared with OP and control.

Keywords:

Predictive microbiology, food safety, natural additives, Foodborne diseases.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son causadas por el consumo de un alimento o agua contaminado por agentes químicos, físicos o agentes biológico-infecciosos. Estos últimos, han adquirido especial atención por la alta incidencia de brotes a nivel mundial debido a que las características nutricionales y fisicoquímicas de los alimentos pueden representar un ambiente favorecedor para el desarrollo y crecimiento de patógenos que afectan la salud de los consumidores [Food and Drug Administration (FDA), 2022]. El incremento del número de toxiinfecciones alimentarias es un problema importante de salud pública ya que afecta el desarrollo económico y social, por lo que los sistemas nacionales de salud enfatizan en la importancia de la inocuidad alimentaria, mientras que, a la par, la industria alimentaria busca cumplir también con el desarrollo sostenible (Organización Mundial de la Salud, 2020). *Listeria monocytogenes* es una de las bacterias más problemáticas en la industria alimentaria por su alta prevalencia en el ambiente y resistencia a métodos de conservación tradicionales. Entre los métodos de conservación, el uso de temperaturas elevadas se aplica a alimentos reconocidos como “potencialmente peligrosos” que, debido a su composición o manipulación, pueden favorecer el crecimiento de microorganismos, requiriendo el control tiempo/temperatura en su procesamiento (FDA, 2018). La resistencia de los agentes patógenos ha obligado a aumentar los tiempos o la temperatura de los procesos térmicos para asegurar la inocuidad, buscando la modificación de otros factores como el pH, sales y/o aditivos antimicrobianos que puedan destruir las formas vegetativas y las esporas (Fang et al., 2021). El uso de aditivos sintéticos ha conllevado a problemas en la salud de los consumidores, por lo que, hoy en día, los consumidores tienden a buscar alimentos menos procesados y libres de aditivos de origen químico, explorando nuevas alternativas para preservar los alimentos como el uso de antimicrobianos naturales (La Pergola et al., 2017). Los aceites esenciales son sustancias volátiles que contienen compuestos del metabolismo secundario de plantas y otros componentes aromáticos, obtenidos generalmente por destilación, y han sido utilizados desde la antigüedad por sus propiedades benéficas para la salud (Herman et al., 2019).

El orégano es una planta altamente comercializada por su uso como hierba culinaria en la producción de alimentos, y se ha descrito su elevada composición en compuestos bioactivos de origen fenólico con capacidad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras (Rostro-Alanís et al., 2019; Bautista-Hernández et al., 2021; Leyva-López et al., 2017).

La utilización de modelos de microbiología predictiva permite la optimización de procesos, ya que son capaces de predecir la evolución de una población microbiana en distintas matrices alimentarias. Los modelos de inactivación térmica son de utilidad para describir cuantitativamente la cinética de inhibición microbiana como consecuencia de la aplicación de un tratamiento basado en distintas combinaciones de tiempo y temperatura (Messens et al., 2023). Uno de los parámetros que habitualmente se utilizan para describir la cinética de inactivación microbiana es el valor D, definido como el tiempo necesario para disminuir el 90 % de la población microbiana a una temperatura constante (Membre y Boué, 2018). La disminución de un valor D dado para un microorganismo, asegura la reducción de los tiempos de exposición, reduciendo la energía del proceso y asegurando la inocuidad del alimento final. Esta disminución en la exposición térmica del alimento ayudaría a mantener los atributos de textura, sabor y así como el valor nutricional del mismo. Según las recomendaciones proporcionadas por la FDA, un tratamiento térmico debe asegurar al menos un valor 6D para considerarse inocuo (FDA 2018). Los estudios sobre la aplicación de modelos predictivos con el uso de aceite esencial de orégano mexicano son escasos, por lo que el presente trabajo confiere una oportunidad para el comercio del país y la seguridad de sus productos. En este trabajo se utilizó el aceite esencial de orégano mexicano de la especie *Poliomintha longiflora* en combinación con tratamientos térmicos, evaluando el efecto de sus fracciones concentradas sobre la inactivación térmica de *Listeria innocua/monocytogenes* y se evaluaron los parámetros valor D, p y z, utilizados como índices de validación de gran peso en la industria alimentaria. Esto aporta datos importantes para la sustitución o reducción de aditivos sintéticos por los naturales que incidirán en la reducción en tiempos de procesos térmicos, asegurando la inocuidad del producto final.

2. ANTECEDENTES

2.1 Inocuidad alimentaria

La producción de alimentos conlleva el seguimiento de normas y reglamentos que fomenten y aseguren que estos son inocuos para la población [Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación S.C. (NORMEX) 2016]. En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA (2016) define la inocuidad como *la característica que garantiza que los alimentos no causen daño a la salud y en su producción se disminuya el riesgo de contaminación con agentes químicos, físicos y biológicos*. Al conseguir alimentos en el mercado, los consumidores dan por hecho su inocuidad, sin embargo, 1 de cada 10 personas en el mundo presenta una toxiinfección alimentaria tras la ingesta de alimentos contaminados [Food and Agriculture Organization (FAO) 2020]. "Por ello, es indispensable intensificar las acciones de los sistemas de salud nacionales conducentes a la mejora de la calidad y seguridad alimentaria, reiterando la importancia de la inocuidad de los alimentos para disminuir las problemáticas en temas de salud nacional [Norma Mexicana, (NORMEX) 2016] y cumplir con el desarrollo sostenible, debido a que las ETAs afectan el desarrollo social y económico [Organización Mundial de la Salud (OMS) 2019].

2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son causadas por el consumo de un alimento o agua contaminado por agentes químicos, físicos o agentes biológico-infecciosos. Estos últimos están representados por las formas vegetativas, esporas bacterianas, hongos, parásitos y virus causando intoxicaciones o infecciones ya sea por el consumo de toxinas liberadas por el microorganismo o por el consumo de éstos (FDA 2018).

Los cuadros clínicos dependen del patógeno, sin embargo, se caracterizan por afectar al sistema gastrointestinal, y en casos más graves, pueden llegar a perjudicar el sistema nervioso [Organización Mundial de la Salud (OMS) 2020].

Las características nutricionales y fisicoquímicas de los alimentos constituyen un ambiente favorable para el crecimiento de patógenos y debido a su posible presencia en ambientes de procesado, el alimento es susceptible de contaminarse en todas las etapas de la cadena alimentaria (Cortés-Sánchez et al., 2018). Especies como *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa* son algunas de las bacterias más problemáticas en la industria alimentaria por su alta prevalencia en el ambiente y resistencia a métodos de conservación tradicionales [Food and Drug Administration (FDA) 2022]. Tan solo en el año 2022, en México se registraron 23 mil casos de ETA ocasionadas por bacterias [Instituto Nacional de Personas Adultas Mayores (INAPAM), 2023], y, de acuerdo con los reportes del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), se han acumulado 19, 163 casos al mes de septiembre del 2023 (SINAVE, 2023). *L. monocytogenes*, ha afectado gravemente a países de America del norte y la Unión Europea por contaminación en productos terminados como salchichas, leche pasteurizada, carnes frías y diferentes tipos de queso (Rodríguez-Auad, 2018).

2.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva en forma de bacilo corto, facultativo y anaerobio que puede ser encontrada en agua, plantas y suelo. Sus flagelos le confieren la capacidad de movilidad que la convierte en un agente patógeno severo [FDA 2022; Rogalla y Bomar 2023]. Las cepas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son las más asociadas a infecciones en humanos, causando la enfermedad denominada listeriosis con un cuadro clínico grave caracterizado por fiebre, escalofríos, cefaleas, mareos y/o síntomas gastrointestinales como dolor y diarrea. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Center of Disease Control and Prevention, CDC) estima que el número de personas con listeriosis por año es de 1,600, siendo los más afectados las mujeres embarazadas y sus recién nacidos, personas inmunocomprometidas y adultos mayores a los 65 años (CDC 2023).

En países desarrollados, donde la incidencia de enfermedades por *Listeria* es alta, se han implementado formas de monitoreo y control, por ejemplo, la Unión Europea, en donde al menos en el año 2021 se reportaron 2,400 casos de listeriosis (EFSA, 2023). La información epidemiológica de listeriosis en México es escasa y no existen reportes de brotes de ETA ocasionados por *L. monocytogenes*, sin embargo, se han demostrado resultados positivos en estudios sobre su presencia en alimentos nacionales, indicando que la posibilidad de ocurrencia de casos de listeriosis es elevada; a pesar de esto, no es considerada una enfermedad de declaración obligatoria (Castañeda-Ruelas et al., 2014, 2018; Jiménez-Edeza et al., 2020). Las alternativas a esto se basan en planes de prevención publicados por la Secretaría de Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) dirigidos a las industrias con el objetivo de promover el control de patógenos mediante los Programas de Prerrequisitos y Buenas Prácticas de Higiene (SAGARPA, 2015).

2.3.1 Factores de crecimiento

L. monocytogenes tiene la capacidad de sobrevivir y crecer en condiciones salinas en medios con un a_w entre 0.92 y 0.94. Su crecimiento óptimo se da en con un pH entre 4.4 y 9.4, además, su crecimiento mínimo y máximo se encuentra en el rango de temperaturas entre $-0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FDA 2018), esto permite su desarrollo en condiciones de refrigeración y almacenamiento en anaquel en la vida útil de los alimentos [FDA 2022; Diario Oficial de la Federación (DOF) 2015] como leche y productos lácteos, mantequilla y margarina, pescados y mariscos y todo tipo de productos cárnicos (FDA, 2022).

2.3.2 Listeriosis

Una de las formas clínicas más comunes de listeriosis es la listeriosis gastrointestinal no invasiva, caracterizada por una fiebre leve acompañada de problemas gastrointestinales que por lo general tienen una duración de 24 h, sin embargo, existe la forma invasiva donde puede presentarse en forma de cefalea hasta una meningitis, encefalitis y otros problemas potencialmente fatales (Granda, 2018; FDA 2022). De acuerdo con información relevante de este patógeno reportada por el Bad Bug Book, es asociado a una gran cantidad de alimentos de origen animal y vegetal, tanto vegetales y leche crudos, helado, chocolates, quesos, carnes rojas, embutidos, pescados y mariscos, entre otros, que pueden ser contaminados durante toda la cadena de suministro y su identificación requiere de procesos complejos y consumo de materiales de alto costo (FDA 2018; Rogalla y Bomar, 2023).

2.3.3 Brotes de ETA por *Listeria monocytogenes*

Los brotes de listeriosis más importantes alrededor del mundo se han relacionado al consumo de aquellos alimentos que no requieren de un previo paso de cocción o calentamiento para consumirlos o también llamados los alimentos “listos para el consumo” o “Ready to Eat (RTE)”. En Estados Unidos y la Unión europea, la carne y los embutidos tratados térmicamente son los alimentos RTE con mayor índice de consumo por año y, además, los de mayor asociación con casos de listeriosis, seguidos los pescados y mariscos, el paté y los quesos (Ricci et al., 2018). Por destacar algunos de los brotes de listeriosis, en agosto de 2019, el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias notificó la toxiinfección por el consumo de carne mechada contaminada por *L. monocytogenes* en la región de Andalucía (España), que, en solo un mes, se reportaron 197 casos, se los cuales se presentaron 3 defunciones (Secretaría General de Sanidad y Consumo, 2019). En septiembre del mismo año, la CDC reportó 10 casos de hospitalizaciones y una muerte por el consumo de productos cárnicos listos para el consumo y quesos, contaminados por *L. monocytogenes* en Michigan (EE. UU.). (CDC 2019).

En los siguientes años se reportaron otros brotes de listeriosis relacionados con alimentos listos para el consumo; en enero del 2021 se presentaron 12 hospitalizaciones y una muerte en Florida, Luisiana, Massachusetts y Nueva York; en este último estado, se reportaron 13 hospitalizaciones y 1 muerte en el año 2023 (CDC 2021, 2023). En 2022, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España reportó un aumento en la incidencia de listeriosis con un total de 9 brotes, principalmente relacionados a las ETA (Centro Nacional de Epidemiología 2022). En caso más reciente publicado en septiembre del 2023, se retiró una marca de helados estadounidenses por su contaminación con *L. monocytogenes* que a la fecha provocó dos hospitalizaciones (CDC 2023). Debido a la importación de estos productos en México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) ha recomendado a la población a que no se consuman los productos y se realicen denuncias sanitarias en caso de su comercialización (COFEPRIS 2023).

Encontrar métodos de disminución a la incidencia de este microorganismos en alimentos listos para consumo, es un área de oportunidad en el país, y más aún, encontrar métodos factibles, económicos, rápidos y confiables que le permitan a las industrias disminuir los costos en la cadena de producción, disminuir pérdidas de materia prima y producto terminado, así como mantener el interés de los consumidores por conseguir alimentos inocuos y que conserven sus propiedades organolépticas (Contreras -Soto et al., 2019).

2.4 Tratamientos térmicos como métodos de conservación en alimentos

Los métodos de conservación de los alimentos son estrategias utilizadas para disminuir la actividad enzimática de los componentes de los alimentos y así retrasar su putrefacción, es decir, aumentar la vida útil y, de la misma forma, disminuir la incidencia de enzimas microbianas que pueden causar un efecto negativo en el producto y, por consiguiente, en la salud del consumidor (Kumar, 2019). De acuerdo con la naturaleza del producto, se deben aplicar prácticas de higiene y sanidad, estableciendo puntos críticos de control en los que el producto pueda afectarse y en el que participe un método de conservación (NORMEX 2016).

Entre los métodos de conservación, el uso de temperaturas elevadas es requerido para alimentos conocidos como “potencialmente peligrosos” y según la definición de la Norma Mexicana NMX-F-605-NORMEX-2016 los “alimentos potencialmente peligrosos” son aquellos que en razón a su composición o manipulación pueden favorecer el crecimiento de microorganismos y/o la formación de sus toxinas, por lo tanto, requieren el control de dos factores críticos: la temperatura y el tiempo de exposición (FDA 2018).

La resistencia que han tomado los agentes patógenos obliga a aumentar los tiempos o la temperatura de los procesos térmicos para asegurar la inocuidad, buscando la modificación de otros factores como el pH, sales y/o aditivos antimicrobianos que puedan destruir las formas vegetativas y las esporas (Hwang et al., 2009).

Uno de los aspectos importantes en los alimentos es preservar en la medida de lo posible su composición nutricional, la cual se afecta por los procesos térmicos, que en ocasiones provoca cambios como la desnaturalización de proteínas, por lo que la reducción en los tiempos del proceso térmico aplicado es deseable.

En la industria alimentaria, los estudios en los tratamientos térmicos están dedicados a establecer modelos de inactivación térmica para obtener parámetros y validar nuevos procesos que demuestren ventajas sobre los tratamientos convencionales ((Membré y Boué, 2018), debido a que al utilizar temperaturas elevadas a pesar de que se inactivan los microorganismos en su forma vegetativa o en forma de esporas en ocasiones se altera la calidad nutricional del alimento (Tchuenchieu et al., 2022). Las industrias se han visto en la necesidad de aplicar condiciones excesivas de calentamiento, obteniendo un producto libre de patógenos sacrificando la calidad sensorial del alimento y su valor nutricional (Llenque-Díaz et al., 2017). En estos casos, a pesar de que se consiga un producto seguro desde un punto de vista sanitario, su calidad a nivel nutricional puede verse deteriorada, así como el problema económico derivado de un mayor gasto energético (Castañeda et al., 2014).

2.5 Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es una herramienta con alto potencial en la industria alimentaria para evaluar el comportamiento de la población microbiana bajo condiciones ambientales conocidas utilizada en la evaluación de la eficiencia de los procesos alimenticios para asegurar la inocuidad y la seguridad, además de lograr la disminución del gasto energético y procurar la calidad nutricional de los productos (Stavropoulou y Bezirtzoglou, 2019).

Esta herramienta utiliza modelos matemáticos para describir el crecimiento (Possas et al., 2021) y la inactivación (Soni et al., 2022) de microorganismos patógenos durante la producción y el almacenamiento de productos alimenticios. Los modelos predictivos se clasifican en primarios, secundarios y terciarios en función del grado de desarrollo de estos. El modelo primario describe el cambio en la población microbiana bajo condiciones específicas en función del tiempo, del cual se pueden obtener parámetros cinéticos como la tasa de crecimiento o el tiempo de reducción decimal (valor D), el modelo secundario reúne la información obtenida de los parámetros primarios y describe el comportamiento de la población microbiana bajo diferentes condiciones ambientales, del cual se obtienen otros parámetros cinéticos como el valor z (descrito más adelante), y finalmente, los modelos terciarios reúnen la información obtenida en los modelos primario y secundario para predecir el comportamiento de la población microbiana en los alimentos (Chen et al., 2022; Huang, 2017).

El comportamiento microbiano depende de los dos tipos de factores ambientales, aquellos que dependen de las propiedades del alimento o intrínsecos (pH, actividad de agua, porcentaje de nutrientes, adición de aditivos etc.) y aquellos que provienen de las condiciones del ambiente o extrínsecos (humedad, temperatura, atmósfera, etc.) (Stavropoulou y Bezirtzoglou, 2019). Por tanto, la modificación de uno o más factores y sus combinaciones pueden utilizarse para disminuir la incidencia de ciertos patógenos causantes de brotes de ETA. Los modelos predictivos permiten cuantificar el efecto de un determinado proceso a nivel industrial sobre la calidad y seguridad de un alimento siendo por tanto herramientas de gran utilidad dentro de la evaluación de riesgos microbiológicos (Messens et al., 2023).

2.5.1 Modelos predictivos de inactivación

La capacidad de adaptarse a diferentes medios les confiere a los microorganismos patógenos poseer cierta resistencia al uso de temperaturas elevadas dentro del procesamiento a nivel industrial. La microbiología predictiva apoya en la evaluación de modelos de inactivación térmica, en donde se evalúa el comportamiento microbiano a diferentes temperaturas y, de acuerdo con el tipo de alimento y la sensibilidad al calor de ciertos nutrientes, se pueden seleccionar los mejores parámetros de tratamiento para asegurar la inocuidad sin poner en riesgo la calidad sensorial del producto (Koyama et al., 2019; Soni et al., 2022). Los modelos de inactivación térmica son de utilidad para obtener ciertos parámetros en la disminución de la viabilidad en ciertos patógenos como *L. monocytogenes*.

En modelos primarios, el valor D, es definido como el tiempo necesario para disminuir el 90% de la población microbiana a una temperatura constante, es empleado para calcular los tiempos de cocción necesaria en un proceso y asegurar la eliminación del patógeno al final del tiempo de cocción (Membré y Boué, 2018). La FDA solicita que el proceso térmico aplicado, asegure al menos un valor 6D para considerarse inocuo (FDA 2018). Los valores D de los microorganismos varían, representando su resistencia térmica, y puede ser afectado por factores como pH, a_w , conservadores y/o aditivos. La disminución de un valor D dado para un microorganismo, asegura la reducción de los tiempos de exposición, reduciendo la energía del proceso y asegurando la inocuidad. Esta disminución en la exposición térmica del alimento ayudaría a mantener los atributos de textura, sabor y valor nutricional del mismo (Soni et al., 2022).

La inactivación térmica es reconocida por tener un comportamiento lineal, sin embargo, estudios previos aseguran que el entorno modifica dicho comportamiento en donde puede encontrarse una fase inicial o final de adaptación al medio en donde se pueden observar “hombros” o “colas”, respectivamente, de acuerdo con la resistencia al calor o a los aditivos empleados; estos comportamientos son ajustados al aplicar diferentes modelos predictivos que utilizan el valor p; Este es un parámetro que indica la forma de la curvatura en la inactivación térmica.

Cuando el valor de $p < 1$, la curva es cóncava, cuando $p = 1$, se observa una línea recta y cuando $p > 1$, la curva es convexa; esto se interpreta en términos del comportamiento microbiano, debido a que cuando la curva es convexa, el microorganismo pasa por una etapa de adaptación al medio, denominada “hombro”, y a determinado tiempo comienza a disminuir el crecimiento de forma logarítmica, y cuando la curva es cóncava ($p < 1$), se encuentra una “cola” en donde se observa una disminución de la carga microbiológica hasta determinado tiempo en donde ocurre una adaptación al medio y la carga se mantiene constante (Buzrul, 2022).

La estimación del valor D de un determinado microorganismo bajo diferentes condiciones de temperatura de inactivación permite obtener el modelo secundario y, por lo tanto, la estimación del valor z, que es el parámetro secundario del valor D que indica el cambio de temperatura para lograr la reducción de 1 log (United States Department of Agriculture, USDA, 2022). El software Bioinactivation es una herramienta digital utilizada para modelar datos obtenidos experimentalmente y obtener predicciones de acuerdo con los diferentes modelos utilizados con un formato amigable para los investigadores e industrias (Garre et al., 2017).

2.6 Aditivos alimentarios

Para preservar las cualidades de un alimento y aumentar su vida dentro del mercado se recurre a la incorporación de aditivos. Un aditivo alimentario, es cualquier sustancia que se añade a los alimentos en concentraciones bajas que no provoquen efectos tóxicos al consumidor, ya que estos no se consumen normalmente como alimento ni forman parte de los ingredientes básicos, su uso se justifica en conservar la calidad sanitaria y nutricional del alimento, este no debe afectar ninguna de las características del producto en cualquier fase de la cadena de producción (CODEX alimentarius 2019). Según la norma general para los aditivos alimentarios del Codex alimentarius, los aditivos deben ayudar en la fabricación, transporte o almacenamiento de un alimento, debe cumplir con la conservación de la calidad nutricional del alimento y aumentar su estabilidad o mejorar sus propiedades organolépticas.

El uso de aditivos en la industria moderna es de gran peso ya que se busca la elaboración de alimentos con una vida útil más prolongada que, además, abastezcan a una población con alto consumismo y más exigente (Bondi et al., 2017).

2.6.1 Aditivos sintéticos

Los aditivos sintéticos han sido utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica (Dehghan et al., 2018), tales como el acetato de sodio, sales de nitritos y sales de sorbato como el sorbato de sodio y el sorbato de potasio son compuestos conocidos por tener una elevada actividad antimicrobiana; Dock et al., (2000) emplearon la combinación de aditivos: benzoato de sodio con tratamiento térmico para la inactivación de *E. coli* en sidra de manzana, reportando una disminución en el tiempo de reducción decimal de hasta 5 log de unidades microbianas a 70°C con benzoato de sodio. Sin embargo, se ha reportado su interacción con procesos biológicos humanos, siendo potenciales a desencadenar efectos adversos como daños cerebrales y cardiacos, hasta enfermedades mortales como la diabetes, cáncer y esclerosis múltiple (Dehghan et al., 2018; Mohammadzadeh-Aghdash et al., 2019). Los nitritos son sustancias utilizadas como conservantes en productos ahumados en forma de sales como nitrito de sodio (DOF 2008), empleadas para evitar el crecimiento microbiano y, generalmente, para preservar y mejorar el color de productos cárnicos (Chen et al., 2020). La presencia de compuestos cancerígenos, como las nitrosaminas, se han detectado en productos con los nitritos como conservadores (Niklas et al., 2022) y aunque las cantidades detectadas no se relacionan con los efectos negativos, esto produce preocupación entre los consumidores (Jansen et al., 2020). Bimpizas-Pinis et al. (2022) mencionan la susceptibilidad de aditivos como los nitritos o los concentrados de suero de leche por deteriorarse produciendo una oxidación del empaque en forma de coloración amarillenta.

2.6.2 Aditivos naturales

El uso de aditivos sintéticos ha conllevado a problemas en la salud de los consumidores (Rodríguez, 2011) por lo que, hoy en día, los consumidores tienden a buscar alimentos menos procesados y libres de conservadores sintéticos, conduciendo a explorar nuevas alternativas para preservar los alimentos como el uso de antimicrobianos naturales, tales como ácidos orgánicos, aceites esenciales y extractos de plantas o de residuos agrícolas (Negi et al., 2012; Burt 2004; Lozoya-Castillo et al., 2018), que han demostrado una actividad antimicrobiana de 3.44 mg/mL y >15 mg/mL de cáscara de mango y cáscara de tuna, respectivamente, frente a *S. aureus* (Lozoya-Castillo et al., 2018). En el caso del uso de aceite esencial, la inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas de importancia en alimentos utilizando AE de *Citrus limon* es competencia frente a antibióticos como la gentamicina, mostrando halos de inhibición iguales o superiores en ensayos *in vitro* (Hsouna et al., 2017), y al utilizar otros AE, se ha demostrado que la composición en monoterpenos es proporcional a la actividad antimicrobiana (Hsouna et al., 2017; Rostro-Alanís et al., 2019; Puvača et al., 2021). Estas alternativas, además de ser agradables para el consumidor, tienen la ventaja de aprovechar los residuos agroindustriales (Lozoya Castillo et al., 2018) y disminuir los efectos adversos de los subproductos en el ambiente (Argote et al., 2017). Dado esto, la formulación de alimentos (Moharreri et al., 2021) como la adición de empaques activos (Sharma et al., 2021) con aditivos naturales se ha convertido en el foco de interés industrial para la creación de alimentos más atractivos y seguros para los consumidores.

2.6.2.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son sustancias líquidas volátiles obtenidas por destilación a partir de plantas y sus diferentes componentes conteniendo terpenos, alcoholes, acetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres (Sharma et al.2021; Bautista-Hernández et al., 2021).

Estudios sobre sus actividades potenciales han demostrado su actividad antimicrobiana para el control de enfermedades causadas por microorganismos patógenos (Puvača et al., 2021) o en la industria alimentaria para disminuir o inhibir el crecimiento microbiano en un producto (Mith et al., 2014). Se ha reportado su uso en envases o empaques para proteger directa o indirectamente al alimento ya que son considerados sustancias reconocidas como seguras o “GRAS” (Generally Recognized As Safe) (Nunes et al., 2020).

Mith et al. (2014) evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela, orégano y tomillo midiendo la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida (MBC) encontrando que poseen una fuerte actividad ($MIC \geq 0.125 \mu\text{L}$ y $MBC \geq 0.25 \mu\text{L}$) contra *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *E. coli* O157:H7, probablemente por la composición alta en cinamaldehído, carvacrol, timol y eugenol de los aceites, lo que los convierte en una buena alternativa para prevenir la contaminación de los alimentos en los puntos críticos de control como el calentamiento. La efectividad de los aceites esenciales para inhibir microorganismos en los alimentos se ve afectada por factores como la concentración de este, por el método con el que se aplica el AE al alimento, la patogenicidad del microorganismo y los tiempos de exposición a temperaturas elevadas (Nunes et al., 2020).

La integración de los AE al alimento se ha realizado por medio de biopelículas (Requena et al., 2019), integrados en la superficie de alimentos sólidos por medio de remojo (Stojanović-Radić et al., 2018) y mezclado directamente en la materia prima o alimentos líquidos (Llenque-Díaz et al., 2017). Nunes et al. (2020) demostraron, bajo un modelo de regresión, que, en la producción de queso, las biopelículas muestran una inhibición más rápida al emplearlas en la materia prima (leche) o en la superficie del producto final.

Aunado a esto, el estudio de la compatibilidad de quitosano como agente emulsionante en la formulación de biopelículas con eugenol es una buena alternativa para la producción de empaques bioactivos con actividad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus* (Zheng et al., 2019).

El uso de nanopartículas ha tomado popularidad en la producción de alimentos para añadir sustancias lipídicas a medios acuosos (Moharreri et al., 2021) facilitando la adición de AE a los alimentos por medio de un empaque activo, aumentando la estabilidad de estos compuestos y controlando sus fuertes aromas, disminuyendo la interacción del AE con los componentes del producto evitando la formación de compuestos que puedan ser tóxicos para el consumidor (Mukurumbira et al., 2022).

2.6.2.1.1 Aceite esencial de orégano mexicano

El orégano es una planta de la familia *Lamiaceae* distribuida mundialmente y cuenta con una gran variedad de especies (Hao et al., 2022), como *Oreganum vulgare*, originaria de Europa (Lukas et al., 2015) y las especies mexicanas *Lippia graveolens* y *Poliomintha longiflora*. Sus hojas secas y molidas (Figura 1) son utilizadas comúnmente en la preparación de platillos por sus característico aroma y sabor, además, su composición fenólica le confiere beneficios en el área de la salud, como el tratamiento de infecciones y la mejora del sistema inmune (García y Esteban, 2016). México es uno de los mayores productores de orégano; específicamente los estados de Coahuila y Nuevo León (García et al., 2012).

La especie *Lippia graveolens* es el orégano más utilizado en la cocina mexicana durante los últimos años (Cortés-Chitala et al., 2021) y está reportada su elevada concentración de carvacrol (Cid-Pérez et al., 2016), uno de los compuestos más característicos de estas especies y responsable de sus actividades bioactivas, relacionado con lo obtenido por Rostro-Alanís et al. (2019) donde encontraron que la fracción con mayor actividad antimicrobiana de la especie *Poliomintha longiflora*, fue la que contenía la mayor concentración de este compuesto.



Figura 1. Orégano mexicano (*Lippia graveolens*) fresco y a la derecha, hojas de orégano secas y molidas.

La concentración de los compuestos químicos del orégano depende de múltiples factores como la especie, el método de extracción y la zona de cultivo (ej. Factores climatológicos y altitud) (Hao et al., 2022). Se reporta que los compuestos que caracterizan al orégano, sin importar la especie, incluyen el carvacrol, el timol y los terpenos (Hao et al., 2022; Ortega-Nieblas et al., 2011). Diversas caracterizaciones del aceite esencial de orégano (AEO) mexicano de la especie *Lippia graveolens* (Ortega-Nieblas et al., 2011) y *P. longiflora* (Rostro-Alanís et al., 2019), reportaron que los monoterpenos fenólicos correspondieron al grupo de mayor concentración (y con mayor actividad), seguidos de los monoterpenos hidrocarbonados y los Sesquiterpenos hidrocarbonados, en la Tabla 1 puede observarse los compuestos principales de *L. graveolens* y *P. longiflora*, observando que ambas especies contienen carvacrol y timol, que son los compuestos principales a los que se les atribuyen sus propiedades antimicrobianas con amplio espectro frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos (Rostro-Alanís et al., 2019).

Tabla 1. Caracterización de diferentes especies de orégano (%)

Compuesto	<i>L. graveolens</i>	<i>P. longiflora</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>O. onites</i>	<i>L. palmeri</i>
Carvacrol	25.19	4.58/60.03	8.9	41.09	8.76
Timol	11.27	0.00/5.08	0	0.41	21.39
Linanol	0.97	N.D.	1.47	3.93	0.44
o-cimeno	0.28	38.14/1.31	N.D.	N.D.	N.D.
p-cimeno	13.78	N.D.	N.D.	1.03	22.37
α- Terpineno	11.95	N.D.	N.D.	0.17	N.D.
α-pineno	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.32
β-pineno	3.37	N.D.	N.D.	N.D.	0.12
β-mirceno	N.D.	1.08/0.00	N.D.	0.22	N.D.
mirceno	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.16
Trans-Cariofileno	N.D.	2.97/18.96	2.76	N.D.	N.D.
Cis-sabineno	N.D.	N.D.	18.66	N.D.	N.D.

N.D. = No Detectado.

L. graveolens (Medina-Romero *et al.*, 2021); Fracciones 3 y 4 de *P. longiflora* (Rostro-Alanís M. *et al.*, 2019); *O. vulgare* (Albado E. *et al.*, 2001); *O. onites* (Dogruyol H. *et al.*, 2020); *L. palmeri* (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011).

Diversos autores han demostrado el efecto antimicrobiano que ejercen los aceites esenciales frente a patógenos de transmisión alimentaria. Hao *et al.* (2022), trabajaron con el aceite esencial de orégano y demostraron que el carvacrol y el timol son responsables de la actividad antimicrobiana del orégano contra frente a *E. coli* y *S. aureus*. Otros estudios demostraron también la efectividad de fracciones de *P. longiflora* en la inhibición de *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhi* y *Candida albicans*, en donde puede correlacionarse el contenido de monoterpenos fenólicos con la actividad (Rostro-Alanís *et al.*, 2019), relacionada con la hidrofobicidad de los componentes de los AE y su alta capacidad a interactuar con los lípidos y proteínas de la membrana celular y se ha reportado el amplio espectro en la actividad antimicrobiana del carvacrol contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, alterando la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando la permeabilidad al ATP y alterando la permeabilidad a cationes como H⁺ y K⁺.

3. JUSTIFICACIÓN

La demanda de alimentos seguros e inocuos y las nuevas tendencias por disminuir el uso de aditivos sintéticos, ha obligado a la industria alimentaria a evolucionar y aprovechar los recursos naturales en las formulaciones que no sacrifiquen la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos, manteniendo o hasta prolongando la vida en el anaquel. Los aceites esenciales están participando en este movimiento actual para promover la disminución en el uso de conservadores sintéticos, aunado a su elevado potencial antimicrobiano contra patógenos relacionados a enfermedades transmitidas por alimentos. Estas sustancias contienen compuestos de interés altamente estudiados por poseer la capacidad de actuar directamente sobre la membrana bacteriana, sin embargo, a pesar de ser reconocidos como sustancias seguras (GRAS), es importante controlar la concentración utilizada en alimentos sugiriendo el uso de concentraciones subletales en combinación con otras sustancias y/o métodos de conservación para evitar efectos tóxicos adversos o efectos negativos en la calidad sensorial. Se ha reportado que el aceite esencial de orégano posee terpenos con elevada actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de importancia en alimentos como *L. monocytogenes*. Al combinar bajas concentraciones de este aceite esencial con calentamientos ligeros, se puede alcanzar una actividad sinérgica para disminuir los tiempos de exposición a los tratamientos térmicos, consiguiendo también la disminución del gasto energético, abasteciendo las necesidades, cuidando las características organolépticas y la seguridad alimentaria, y manteniendo la calidad de vida del producto alimenticio.

4. HIPÓTESIS

El aceite esencial de orégano mexicano fraccionado (*Poliomintha longiflora*) tiene efecto en la disminución de los parámetros de inactivación térmica de *L. innocua/monocytogenes*.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del aceite esencial de orégano mexicano fraccionado (*P. longiflora*) sobre la cinética de inactivación de *L. innocua/monocytogenes*.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar el aceite esencial de *P. longiflora* y sus fracciones.
- 2.- Evaluar la actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones de *P. longiflora* frente a *Listeria innocua*.
- 3.- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (MBC) de las fracciones.
- 4.- Estimar la concentración sub-lethal de las fracciones con mayor actividad contra *L. innocua*.
- 5.- Describir la cinética de inactivación utilizando el valor D de *Listeria innocua/monocytogenes* en contacto con la fracción seleccionada como la mejor en un ensayo *In vitro*.
- 6.- Estimar parámetros secundarios de inactivación de *L. innocua/monocytogenes In vitro*.
- 7.- Realizar un estudio de validación de la inactivación de *L. monocytogenes* con aceite de orégano en una matriz cárnica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 *Listeria innocua/monocytogenes*

El microorganismo utilizado en los ensayos preliminares y en la inactivación térmica *In vitro* a 52 y 54 °C fue la cepa de *L. innocua* ATCC 33090 serotipo C6, proporcionada por el Laboratorio de Alimentos Funcionales del Departamento de Ciencia de los Alimentos UANL la cual fue adquirida de forma comercial de la marca KwikStik™. Esta fue activada en Agar Soya Tripticasa (TSA) mediante una estría simple a 37 °C durante 24 h. Posterior al tiempo, se reactivó en caldo Infusión cerebro corazón (ICC) a las mismas condiciones (24 h/37 °C) tomando una asada de la estría en TSA. Se tomó una asada del inóculo activado en caldo y se transfirió en tubos inclinados con agar BHI por medio de una estría sencilla sobre el agar para conservarla bajo refrigeración a 5 °C durante un tiempo máximo de 3 meses. Previo a cada ensayo, se tomó una asada del microorganismo en tubo inclinado y se trasladó a caldo BHI, incubándose a 37 °C durante 18 h, denominando a esto “cultivo activado”.

Los ensayos de inactivación térmica *In vitro* a 52, 54, 57.5 y 63 °C, el modelo cárnico a 56 y 60 °C y para el análisis sensorial y colorímetro se realizaron en el Laboratorio de Bioseguridad nivel 2 del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba en donde se utilizó como microorganismo experimental la cepa “LMPM1” de *L. monocytogenes*, la cual fue aislada de un producto cárnico (carne mechada) causante del brote de ETA en Andalucía, España en 2019. La cepa fue activada tomando una alícuota de 100 µL a partir de un stock almacenado a -80 °C y se transfirió a un tubo que contenía 10 mL de Caldo BHI estéril, se agitó utilizando un vortex y se llevó a incubación a 37 °C durante 24 h, posterior al tiempo, se tomó una alícuota de 100 µL de la cepa activada y se transfirió a un nuevo tubo con 10 mL de BHI estéril y se repitieron las condiciones de incubación para obtener una segunda activación, este proceso se realizó previo a cada uno de los ensayos anteriormente mencionados con ciertas modificaciones especificadas en cada metodología descrita más adelante, conociendo este proceso como “cultivo de LMPM1 activado”.

6.2 Aceite esencial de *P. longiflora* y sus fracciones concentradas

El aceite esencial de *P. longiflora* (AEO) y sus fracciones fueron proporcionadas por la Escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey y a continuación se describen el lugar de recolección, las características del material biológico y el método de obtención del aceite esencial: la planta de orégano (*Poliomintha longiflora*) fue recolectada en los meses de mayo-junio del 2018 en una región de la sierra mexicana en donde convergen los estados de Coahuila, Durango y Zacatecas en las siguientes coordenadas: 24°55" de latitud (norte) y 103°10" de longitud (oeste). El estado fisiológico de la planta al tiempo de cosecha fue durante la floración y 10 días después de esta. Se emplearon las hojas, las flores y el tallo en una proporción 90:9:1, respectivamente. El material fue identificado y depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

El aceite esencial de orégano mexicano (OP) y sus fracciones fueron obtenidas de acuerdo a la metodología descrita por Rostro-Alanís et al. (2019), empleando el método de arrastre de vapor y posteriormente un sistema de destilación fraccionada de la que se obtuvieron 4 fracciones a partir del OP: la primera fracción fue obtenida a 80 °C, la segunda a 100 °C, la tercera a 120 °C y la cuarta a 140 °C y fueron identificadas como FI, FII, FIII y FIV respectivamente, obteniendo a su vez, el aceite que no se destiló a ninguna temperatura denominado como "residuo".

Para los análisis preliminares se utilizó el aceite esencial y sus fracciones solubilizadas en Polisorbato 80 (Tween 80) al 1 % v/v con agua destilada estéril en una relación 60:40 (aceite:tween 80) o 40:60 (aceite:Tween 80) de acuerdo con la fracción utilizada.

6.3 Caracterización del aceite de *P. longiflora*

El aceite esencial de *P. longiflora* puro (OP), las cuatro fracciones (FI, FII, FIII y FIV) y el residuo fueron caracterizados utilizando una cromatografía de gases (CG) (Perkin Elmer-Clarus 690) acoplada a un análisis de espectroscopia de masas (EM) (Perkin Elmer-Clarus SQ8T). La CG fue realizada con una columna de capilaridad TG-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) con helio como el gas portador a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se inició el proceso a una temperatura de 70 °C durante 2 min, que luego fue incrementando en 10 °C por min hasta 200 °C, sostenida por 5 min. Se realizó un segundo calentamiento utilizado a 15°C por min hasta 310 °C y sostenido por 5 min. El tiempo total de proceso fue de 32.33 min. La temperatura del inyector fue de 256 °C. Los parámetros para la EM fueron los siguientes: Ionización Electrónica (IE) como fuente de iones, con una energía de electrones de 70 eV, temperatura de cuadrupolos de 210 °C, temperatura de la interfase 210 °C, m/z = 30-550 am. Los compuestos fueron identificados con la base de datos Library NIST Copyright © 1998.

6.4 Actividad antimicrobiana preliminar

La actividad antimicrobiana preliminar se realizó mediante la metodología reportada por Torres-Álvarez et al. (2017) y Pérez-Narváez et al., (2023) con algunas modificaciones. Se colocaron discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman no. 1 en un frasco cerrado herméticamente y se esterilizaron en autoclave (120°C/15 min). Los discos estériles se impregnaron con 10 μ L de aceite esencial puro y sus fracciones, contemplando dos repeticiones por ensayo independiente y un antibiograma con gentamicina (GE). A la par, se inocularon placas Petri de 15x100 mm que contenían TSA estéril por el método de extensión en superficie con 100 μ L de *L. innocua* previamente activada durante 18-24 h a 37 °C con ayuda de un asa de Drigalsky. Los discos con aceite esencial se colocaron sobre la superficie del medio inoculado con ayuda de pinzas de metal esterilizadas por flameo, procurando colocarlos con suficiente espacio entre cada disco.

Las placas con el inóculo y los discos con aceite se incubaron a 37 °C/18-24 h. Posterior al tiempo de incubación, se midió el diámetro de los halos (cm) formados alrededor de los discos de papel en donde no se detectó crecimiento del microorganismo (Figura 2). Como control negativo, se utilizaron discos impregnados con 10 µL Tween 80 al 1%.



Figura 2. Medida del diámetro del halo de inhibición (cm) en el método difusión en disco.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el software estadístico R, donde se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) unifactorial paramétrico con una variable dependiente con 8 niveles (Tabla 2) utilizando un nivel de significancia del 95 %, completado con una prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey, en donde se rechazó la hipótesis nula (H_0), es decir, en donde se encontró diferencia significativa entre uno o más tratamientos, cuando el valor de P fue menor a 0.05

Tabla 2. Factores definidos en el diseño experimental de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano puro y fraccionado frente a *Listeria innocua*.

Microorganismo	Niveles
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	OP
	I
	II
	III
	IV
	Residuo
	GE (gentamicina)
	Control (sin aceite)

6.5 Concentración Mínima Bactericida (MBC)

Para determinar la MBC, se realizó el método de microdilución propuesto por Pérez-Narváez et al. (2023) con ciertas modificaciones; se utilizaron microplacas estériles de 96 pocillos, a los cuales se les añadió 180 μL de caldo soya tripticasa (TSB) inoculado previamente con *Listeria innocua* activada 18 h previas al ensayo, en una proporción 1:1000. Al pocillo 1 se le añadió aceite esencial de *P. longiflora*: en el caso de la FIII, FIV, OP y Residual se adicionaron 10 μL al 40% (v/v) y en el caso de FI y FII se adicionaron 20 μL al 60 % (v/v). A partir de ese pocillo, se realizaron las diluciones seriadas para obtener concentraciones hasta de 10^{-6} . Se realizaron dos ensayos independientes con dos repeticiones de cada aceite cada uno. Las microplacas se llevaron a incubación a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se tomaron 10 μL de cada pocillo y se sembraron por goteo en placas Petri con TSA estéril. Las placas se incubaron a las mismas condiciones arriba mencionadas y se determinó la MBC como la concentración menor de aceite esencial en donde no se observó crecimiento de *L. innocua*. Como control negativo se utilizó Tween 80 al 1 % (v/v).

6.6 Concentración subletal

Para evaluar el efecto que tiene la aplicación de concentraciones menores a la MBC del AE, se realizó el método de concentración subletal, descrito por Castillo et al. (2017) donde se determinó la concentración máxima del AE que no provocó una disminución en la población bacteriana. Esto fue de vital importancia para realizar las pruebas térmicas y asegurar que la población microbiana, en presencia del AE no disminuyera, obteniendo resultados del efecto térmico y no del efecto letal del AE. Para esto, se aplicó un rango de concentraciones por debajo de la MBC a un cultivo en placa de 96 pocillos con 0.01% de cultivo activado de *L. innocua* (O.D.₆₀₀ aproximadamente. 1×10^8 UFC/mL); la placa se llevó a incubación a 37 °C durante 24 h, realizándose dos ensayos independientes con dos repeticiones cada uno. Posteriormente se tomó una alícuota de 10 μL de cada pocillo y se inoculó en una placa con agar TSA mediante siembra por goteo, se incubó a 37 °C durante 18-24 h y, transcurrido el tiempo, se observó el efecto de las concentraciones subletales de las fracciones de AE de *P. longiflora* sobre la población microbiana.

6.7 Inactivación térmica de *L. innocua*: Ensayos *In vitro*

Se realizó una inactivación térmica suave *in vitro* simulando algunas condiciones nutricionales de productos cárnicos para obtener el valor D de *L. innocua* sin y con aceite esencial de orégano. Paralelamente se evaluó tanto el aceite puro como la fracción seleccionada con mayor efecto antimicrobiano siguiendo la metodología descrita por Pérez-Chabela y Hernández-Alcántara (2016) con algunas modificaciones. Se diseñó un experimento en el que se obtuvo el valor D de *L. innocua* para dos tratamientos: OP y FIV a 0.06 % y dos temperaturas: 52 y 54 °C; se definieron tiempos de muestreo para cada temperatura dependiendo del tratamiento y se contempló un tratamiento control en el que no se añadió aceite esencial (Tabla 3), se contemplaron dos repeticiones independientes con 2 réplicas en cada experimento. El medio en el que se llevó a cabo la inactivación térmica fue un medio líquido en el que se simularon las condiciones de un producto cárnico, de acuerdo con las condiciones utilizadas en Possas et al. (2018). Para ello, se preparó caldo BHI siguiendo las indicaciones del envase y se suplementó con 18 % de glucosa y 3 % de extracto de levadura o peptona de carne. El experimento se realizó en tubos de ensaye de 16 x 150 mm con rosca. El inóculo activo se ajustó mediante la escala de Mcfarland en solución salina O.D.600≈0.5 para tener una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL. A los tubos que contenían los 9 mL del medio simulado se les añadió el AE de orégano a la concentración subletal. Para obtener esta concentración el aceite fue previamente disuelto en polisorbato 80 estéril (Tween 80) al 1 % v/v con agua destilada y agitado en vórtex durante 2 min. En el caso del control se añadió Tween 80 al 1 % estéril para obtener la misma proporción de componentes. Los tubos conteniendo el medio con aceite y Tween se agitaron en vórtex para asegurar la disolución del aceite y se añadió el cultivo ajustado hasta completar 10 mL, este se dejó en contacto durante media hora y, posteriormente, los tubos se colocaron dentro de un baño térmico a una temperatura constante, controlada con un termómetro de mercurio insertado en un tubo con 10 mL de medio simulado estéril. Se tomaron muestras cada determinado tiempo y se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 100 μ L y sembrando por extensión en placas Petri con agar Oxford.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24-48 h y posterior al tiempo, se realizó un recuento del número de colonias viables para obtener el valor D y otros parámetros de inactivación a partir del Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (Log UFC/mL) graficando este en función del tiempo de muestreo.

Tabla 3. Diseño experimental de inactivación térmica de *Listeria innocua* con aceite esencial de *P. longiflora*.

Factores	Niveles
Tratamiento	OP 0.06 % FIV 0.06 % Control
Temperatura (°C)	52°C 54°C
Tiempo (min)	0-60 (dependiendo la temperatura)

Análisis estadístico y modelos predictivos

Los resultados obtenidos de Log-UFC en función del tiempo (min) se ajustaron a un modelo matemático primario utilizando el programa predictivo Bioinactivation4 del software estadístico R donde el valor del error cuadrático medio (RMSE), el error estándar de regresión (SER) el factor de sesgo (B_f) y el factor de exactitud (A_f) se consideraron como índices importantes en la selección del mejor modelo para conseguir una predicción acertada para obtener el valor de los parámetros cinéticos. Los modelos seleccionados que permitieron estimar el valor D tanto de forma directa o indirecta fueron los siguientes: el modelo de Geereard (Ecuación 1) describe la tasa de inactivación mediante el parámetro K_{max} , el modelo de Weibull-Mafart (Ecuación 2) permite estimar el parámetro Delta (δ) a partir del recuento microbiano en función del tiempo y el modelo Metselaar (Ecuación 3) calcula el valor D a través del valor de p de acuerdo con la curvatura en el comportamiento microbiano. Se realizó una comparación de medias utilizando el programa estadístico OpenStat al comparar el valor D (min) obtenido para cada tratamiento con las dos temperaturas experimentales y comparando los resultados de los tres tratamientos con cada temperatura experimental.

Modelo Geeraerd sin hombro (Garre et al. 2017; Geeraerd et al. 2000):

$$k = k_{max} * \gamma \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

K = tasa de inactivación.

K_{max} = tasa máxima de inactivación a una temperatura específica.

γ = efecto de la cola.

Modelo Weibull-Mafart (Albert y Mafart 2005; Garre et al. 2017):

$$\text{Log}S(t) = - \left(\frac{t}{\delta(T)} \right)^p \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

S = es la fracción de colonias sobrevivientes (N/N₀)

t = tiempo

T = Temperatura

δ = la tasa de la distribución tipo Weibull.

p = el factor de forma de la curva.

Modelo Metselaar (Garre 2022; Metselaar et al., 2013):

$$\frac{dN}{dt} = - N * p * \left(\frac{1}{D} \right)^p * \left(\frac{t}{\text{Delta}} \right)^{p-1} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

dN/dt = variación del recuento en un determinado tiempo.

N = Recuento microbiano (UFC/mL).

P = Forma de la curva.

Delta = parámetro de escala.

D = tiempo de reducción decimal (valor D).

6.8 Inactivación térmica de *L. monocytogenes*: Ensayos *In vitro*

Se evaluó la inactivación térmica de *L. monocytogenes* utilizando diferentes temperaturas (52, 54, 57.5 y 63 °C) frente a la concentración subletal de aceite de *P. longiflora* puro (OP) y fraccionado (FIV). Para ello, se utilizó caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con glucosa (18 % m/v) y extracto de levadura (3 % m/v) para simular las condiciones de una matriz cárnica en tubos de ensayo de vidrio con altura de 100 mm y capacidad de 6 mL. El inóculo se ajustó mediante la escala de McFarland en solución salina O.D.600 \approx 0.5 para conseguir una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL del “cultivo LMPM1 activado”. El aceite fue previamente disuelto en polisorbato 80 estéril (Tween 80) al 1 % v/v con agua destilada y se agitó en vórtex durante 2 min para asegurar la disolución del aceite.

A los tubos con 4 mL de medio de cultivo suplementado se les añadió 0.5 mL de aceite esencial con tween OP y FIV para obtener una concentración del aceite de 0.06 %, y para el control se adicionaron 0.5 mL de Tween 80 estéril. Los tubos preparados fueron precalentados dentro de un baño térmico a una temperatura constante, controlada con un termómetro de mercurio insertado en un tubo con medio simulado estéril, posteriormente fueron inoculados con 0.5 mL del inóculo previamente a y una vez que se alcanzó la temperatura deseada, se tomaron muestras a diferentes tiempos, colocando los tubos inmediatamente después en un baño de hielo para detener la inactivación.

Se realizaron diluciones seriadas y se inocularon 100 μ L sobre agar selectivo Oxford en placas Petri de 90 x 14 mm utilizando un sembrador en espiral (Spiral Plater, Eddy Jet 2W). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y, transcurrido el tiempo, se realizó el recuento de colonias utilizando un contador de colonias automático Flash & Go (Interscience ®). Los datos obtenidos se trataron en MS Excel para el posterior análisis y ajuste de modelos predictivos. Se ajustaron diferentes modelos de inactivación microbiana para obtener los parámetros K_{max} (log UFC/h) y valor D (seg) para cada uno de los tratamientos ensayados mediante el software Bioinactivation4.

Análisis estadístico y modelos predictivos

Los resultados obtenidos de Log UFC en función del tiempo (min) fueron analizados utilizando el programa predictivo Bioinactivation4 del software R, en el cual los datos se ajustaron al modelo primario Weibull-Mafart, considerando el RMSE, A_f y B_f para conseguir una predicción acertada, obteniendo el valor de los parámetros cinéticos de inactivación (Ross, 1996). Tras obtener los modelos primarios, se ajustaron los resultados totales a un modelo secundario ($RMSE < 0.50$) para estimar el valor z como parámetro secundario en las condiciones totales para los dos tratamientos y el control. Los datos obtenidos se analizaron mediante una comparación de medias del parámetro primario, utilizando el programa estadístico OpenStat, comparando las diferentes temperaturas para un mismo tratamiento y los diferentes tratamientos para cada temperatura.

6.9 Inactivación térmica de *L. monocytogenes*: Ensayos en matriz alimentaria

Características de la matriz cárnica: como matriz alimentaria en este ensayo se utilizó carne de ternera hembra de raza Parda nacida en España (Castilla y León) en julio del 2022 y sacrificada en julio del 2023 con un peso a la fecha de 381.90 kg, alimentada exclusivamente con piensos de origen vegetal; con un peso de la canal de 236.57 kg, 2 % (v/v) de engrasamiento y pH = 5.60. La carne fue molida con un molino eléctrico de acero inoxidable apto para uso alimentario con un tamaño de navaja de 12 pulgadas (Figura 3).



Figura 3. Molino eléctrico de acero inoxidable (izquierda) para obtener la carne molida cruda de ternera (derecha).

Para validar los resultados de la inactivación térmica de *L. monocytogenes* con aceite de orégano mexicano, se realizó un ensayo de desafío utilizando carne cruda picada de ternera criada con forma de medallones pequeños como matriz alimentaria (Figura 4), siguiendo la metodología reportada en Horn et al. (2016) con modificaciones. El diseño del experimento consistió en 2 temperaturas (56 y 60 °C), 3 tratamientos (adición de aceite: OP y FIV, y sin adición de aceite: control) y 5 tiempos de muestreo para cada temperatura: 0, 2.5 5, 10 y 15 min para 56 °C y 0, 0.5, 1, 2.5 y 5 min para 60 °C.

La carne molida se separó en 3 partes para adicionarla con los diferentes tratamientos (OP 0.06 %, FIV 0.06 % y Control) a los cuales se les midió el pH mediante un medidor multiparamétrico de pH Edge (HANNA® instruments), se formaron los pequeños medallones de 10 g de forma manual y se transfirieron a bolsas con filtro para stomacher, contemplando dos repeticiones por tratamiento y por tiempo de muestreo. Previo a la inoculación, las muestras se llevaron a un baño térmico para alcanzar una temperatura elevada de precalentamiento (aproximadamente 54-58 °C) con el fin de evitar la sobreinactivación; al alcanzar la temperatura, se retiraron del baño y se inocularon por medio de inyección al centro de la carne con 10^8 UFC/mL de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente las muestras inoculadas se colocaron dentro del baño térmico hasta alcanzar la temperatura deseada de tratamiento. Las muestras que contenían la carne se tomaron de forma periódica a cada tiempo; transfiriéndose a un baño de hielo de forma inmediata para detener la inactivación. Las muestras tratadas se diluyeron con agua de peptona al 0.1 % y se trituraron en un Stomacher (interscience Bag Mixer) durante 1 minuto. Se realizaron diluciones seriadas y se inocularon 100 μ L por medio de extensión con asa de Drigalsky en placas Petri con agar selectivo Oxford. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h, realizándose posteriormente el recuento de colonias considerando el factor de dilución.

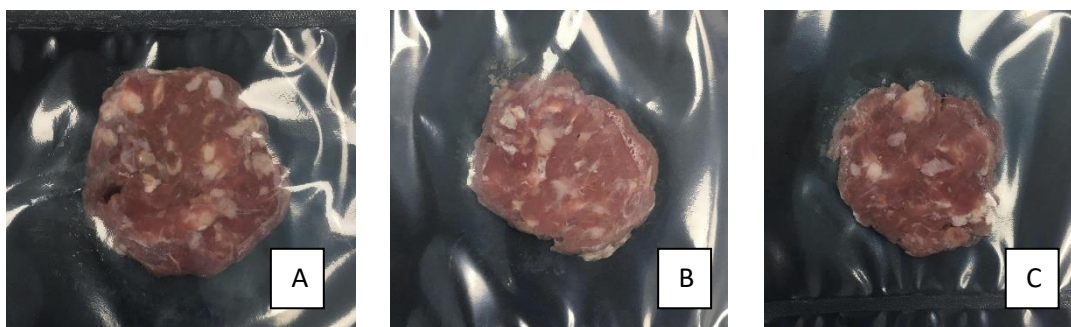


Figura 4. Muestras de carne picada cruda de vaca empacadas herméticamente sin vacío con los diferentes tratamientos: A= Control, B= carne con OP y C= carne con FIV.

Validación mediante un modelo predictivo:

Los resultados obtenidos del recuento en UFC/mL en función del tiempo (segundos) a la temperatura establecida se tabularon en MS Excel para transferir los datos de forma manual al software Bioinactivation4 para obtener el valor D (min) a las dos temperaturas evaluadas, los modelos primarios de Mafart y de Metselaar para el ajuste de los datos observados (ANEXO A). Así, los resultados de las estimaciones fueron interpolados en el modelo secundario de la inactivación térmica de *L. monocytogenes* en forma del logaritmo del valor D o Log D en función de la temperatura (°C) para posteriormente realizar una comparación entre los valores obtenidos en la estimación predicha y los valores observados en la inactivación térmica de *L. monocytogenes* en la matriz cárnica.

6.10 Análisis de color

Se evaluó el color de las muestras utilizando un colorímetro digital (Konica Minolta CM-25cG), midiendo el color de los 3 tratamientos cada 3 días durante 9 días; los resultados fueron obtenidos en valores de L*, a* y b* con el Componente Especular Excluido, es decir, el valor obtenido al excluir el brillo del empaque.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron en el paquete estadístico R mediante un análisis de varianza paramétrico (ANOVA) bifactorial (tratamiento y día) con tres variables dependientes: L*, a* y b* y se realizó una prueba post-hoc Pairwise testing con un ajuste Bonferroni para encontrar diferencias entre las todas posibles combinaciones de los dos factores con un valor de significancia del 95 %.

6.11 Análisis sensorial

Se realizó una encuesta sobre la aceptación de la carne cruda de res con y sin aceite esencial de orégano puro y fraccionado a 0.06 % almacenada a 5 °C. La evaluación se realizó siguiendo la metodología descrita por Kassem et al. (2011) con ciertas modificaciones. Se evaluaron 3 atributos sensoriales: olor, color y la aceptación global. En este caso el sabor no fue evaluado debido al uso en crudo de la carne molida. Se estudiaron un total de 3 muestras diferentes (OP 0.06 %, FIV 0.06 % y control sin aceite) de carne picada en forma de medallones envasada al aire y sellada herméticamente siguiendo una escala hedónica de 5 puntos (ANEXO B), donde 1 = Nada aceptable, 2 = poco aceptable, 3 = ni me gusta ni me disgusta, 4 = aceptable y 5 = muy aceptable, incluyendo una respuesta abierta opcional sobre comentarios personales. La encuesta se aplicó a 7 panelistas entrenados con un rango entre 25 a 45 años del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba durante 9 días, tomando los resultados a los días 0, 3, 6 y 9. Los resultados se graficaron utilizando un gráfico radial para cada tratamiento en función del tiempo.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron en el software estadístico R mediante un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico Kruskal Wallis de un factor (día de aplicación de la prueba) con tres variables dependientes: olor, color y aceptación global. Se realizó una prueba post-hoc de Dunn con un ajuste Bonferroni para encontrar diferencias entre las diferentes combinaciones de los dos factores con un valor de significancia del 95 %.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del aceite esencial de *P. longiflora*

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la caracterización del aceite esencial de *P. longiflora*, sus fracciones FI, FII, FIII y FIV y el aceite residual, representados en porcentaje de área obtenidos de la GC-EM.

Tabla 4. Lista de compuestos presentes en el aceite esencial de *P. longiflora*, sus fracciones y el aceite residual de la destilación en columna y su concentración en porcentaje (%).

COMPOSICIÓN	FI	FII	FIII	FIV	Residual	OP
o-Cimeno	41.95	41.88	24.34	ND	ND	21.51
a-felandreno	2.19	ND	ND	ND	ND	ND
a-Pineno	1.45	ND	ND	ND	ND	ND
Camfeno	1.47	ND	ND	ND	ND	ND
a-Mirceno	7.52	6.48	1.95	ND	ND	2.27
a-Felandreno	1.40	ND	ND	ND	ND	ND
Terpinoleno	5.52	5.32	2.35	ND	ND	ND
D-Limoneno	1.66	1.60	0.80	ND	ND	ND
Eucaliptol	2.74	3.84	6.54	1.13	ND	4.57
ç-Terpineno	26.77	27.32	19.35	ND	ND	12.75
Terpinen-4-ol	ND	ND	1.28	1.55	ND	ND
Timol	1.59	1.92	9.86	21.17	10.42	13.53
Carvacrol	3.48	4.36	22.37	60.23	48.54	34.09
Alfa-tujueno	2.19	1.30	ND	ND	ND	ND
Timil metil eter	ND	ND	1.48	0.69	ND	ND
Cariofileno	ND	ND	4.74	8.33	2.82	6.31
Humuleno	ND	ND	1.78	4.70	3.84	2.90
p-Cymene-2,5-diol	ND	ND	ND	ND	1.61	ND
Fenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-metoxi	ND	ND	ND	ND	9.58	ND
cariofileno oxide	ND	ND	ND	ND	11.07	ND
Humuleno Epoxido II	ND	ND	ND	ND	4.39	ND
α-terpineno	ND	ND	ND	ND	ND	2.08
Monoterpenos Hidrocarbonados (MH)	79.1	75.68	45.64	0.000	0.000	38.60
Monoterpenos Oxigenados (MO)	7.801	10.12	41.53	84.77	70.14	52.19
Sesquiterpenos Hidrocarbonados (SeH)	13.03	8.23	9.67	13.03	22.13	9.21
Total de compuestos identificados	99.92	94.03	96.85	97.79	92.27	97.79

ND= No Detectado.

Se puede observar que el aceite esencial de *P. longiflora* contiene una gran cantidad de terpenos, los cuales están involucrados en las propiedades beneficiosas conocidas de los aceites esenciales (Yousefi et al., 2020). La fracción FIV, el OP y el residual fueron los aceites que presentaron la mayor composición de monoterpenos oxigenados (MO), es decir, aquellos que volatilizaron a las temperaturas más elevadas. Entre los MO identificados en el aceite de *P. longiflora* se encuentran el timol, el eucaliptol y el carvacrol. La FIV presentó la mayor concentración de carvacrol con un 60.23 %, seguido del aceite residual con un 48.04 % y el OP presentó una concentración de 34.09 %, mientras que de timol se observó una concentración de 21.17, 10.42 y 13.53 %, respectivamente, compuesto encontrado también en las fracciones FI, FII y FIII, pero en mínimas concentraciones. Rostro-Alanís et al. (2019) realizaron el mismo método de obtención del AE de *P. longiflora*, sin embargo, se observaron diferencias en la composición de los compuestos identificados, por ejemplo, la proporción de carvacrol difirió en el OP (Carvacrol en Oil = 12.60 %) y en el reporte, no se identificó el carvacrol a las menores temperaturas, mientras que en la Tabla 4 se observó que desde la FI se identificó en bajas concentraciones. También reportaron la mayor concentración de timol de 5.08 % en la F4, fracción obtenida a las mismas condiciones que la FIV, pero esta presentó una concentración de 21.17 %. La mayor concentración de monoterpenos hidrocarbonados fue observada en las fracciones FI y la FII, siendo similares entre sí, con una composición de 41.95 y 41.88 % de o-cimeno y 26.77 y 27.32 % de ζ -Terpineno, resultados similares a los obtenidos en Rostro-Alanís et al. (2019). Además de observar algunas diferencias en la composición del mismo aceite obtenido en diferentes épocas del año, se observó que la composición varía entre especies mexicanas. Herrera-Rodríguez et al., (2019) identificaron la composición del aceite esencial comercial (sin fraccionar) de *Lippia graveolens*, encontrando una concentración más elevada de timol (31.70 %) y una concentración más baja de carvacrol (14.60%) y de p-cimeno (18.70 %). Al emplear otras especies de orégano, se ha reportado una concentración de 41.07 % de carvacrol, 0.41 % de timol y 10.3 % de p-cimeno en el aceite esencial de *Origanum onites* (Dogruyol et al., 2020), mientras que en Rossi et al. (2018), identificaron la composición de *O. vulgare*, la especie europea de orégano más utilizada y reportaron una concentración de 69.1 % de carvacrol, 3.7 % de timol y 5.9 % de o-cimeno.

7.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados cumplieron la prueba de normalidad ($P > 0.05$) y el ANOVA de una vía demostró que existieron diferencia significativa de la inhibición de *L. innocua* entre los tratamientos estudiados ($P < 0.05$). En la Tabla 5 se presentan los resultados de la prueba de difusión en disco sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite de *P. longiflora* contra *L. innocua*. La FIV fue el tratamiento que demostró una mayor actividad con una media en el diámetro del halo de inhibición de 5.30 ± 0.57 cm, seguido del OP con una inhibición de 3.60 ± 0.14 cm. Las fracciones con una menor actividad fueron FI y FII con 0.95 ± 0.07 y 1.05 ± 0.07 , respectivamente y no presentaron diferencias con respecto al control ($P > 0.05$)

Tabla 5. Actividad antimicrobiana del aceite de *P. longiflora* frente a *L. innocua* ATCC 33090.

Tratamiento	Diámetro de halo de inhibición \pm desviación estándar (cm)
OP	3.60 ± 0.14
FI	0.95 ± 0.07
FII	1.05 ± 0.07
FIII	2.85 ± 0.64
FIV	5.30 ± 0.57
Residual	2.90 ± 0.14
GE	2.10 ± 0.14
Control	NI

GE = Gentamicina
NI = No inhibición

La inhibición de *L. innocua* con FIV, además de ser la mayor, fue diferente significativamente con respecto a todos los tratamientos utilizados. La inhibición entre los tratamientos OP, FIII, R y GE fue igual, es decir, no presentó una diferencia significativa, pero sí fue mayor y significativa respecto con al control ($P > 0.05$). Se han reportado halos de inhibición desde 1.87 hasta 4.50 cm con extractos de orégano (Silva et al., 2023) y halos de 6.0 cm con aceite esencial (Kim et al., 2021).

Al utilizar el aceite de *P. longiflora* fraccionado, Rostro-Alanís et al. (2019) reportaron un halo de inhibición de 2.4 cm utilizando la fracción F4 (FIV), siendo la mayor inhibición reportada, seguido del residual (2.3 cm) y el orégano puro presentó una inhibición de 1.4 cm, en este mismo reporte relacionan la actividad contra bacterias patógenas por la elevada composición en carvacrol (60.03 %), sin embargo, no hubo diferencia entre la composición de dicho compuesto con la FIV (60.23 %) ($P > 0.05$), por lo tanto, el incremento de la inactivación aportada por FIV puede atribuirse a la sinergia del carvacrol con el timol (21.17 %).

7.3 Concentración Mínima Bactericida

Los resultados obtenidos la MBC en porcentaje (%) y en $\mu\text{g/mL}$ del aceite esencial de *P. longiflora* puro, sus cuatro fracciones y el aceite residual sobre la inhibición de *L. innocua* se presentan en la Tabla 6. El valor de la MBC fue seleccionado como aquellos pocillos donde el crecimiento fue nulo para todas las repeticiones. La desviación de los resultados en todos los casos fue de cero, debido a la selección de todos los pocillos que mostraran o no mostraran crecimiento, debido al gran rango de diferencia de las concentraciones entre un pocillo y el siguiente. Así, los resultados demostraron que *L. innocua* fue más sensible a la fracción FIV con una MBC de $0.02 \mu\text{g/mL}$, mientras que el orégano sin fraccionar (OP) presentó la mayor MBC ($3.1 \mu\text{g/mL}$) en comparación con las fracciones y el aceite residual, lo que indicó que se requiere una mayor concentración para inhibir el crecimiento de *L. innocua* por la combinación de todos los componentes presentes en el aceite.

Tabla 6 Concentración Mínima Bactericida (MBC) del aceite de *P. longiflora* y sus fracciones frente a *L. innocua* reportada en porcentaje (%) y en mg/mL .

Aceite	MBC (%)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
FI	0.60	1.01
FII	0.60	1.01
FIII	0.10	0.20
FIV	0.10	0.02
Puro	2.00	3.10
Residual	0.10	0.10

Silva et al. (2023) recopilaron información de 22 investigaciones primarias sobre la Concentración Mínima Inhibitoria o MIC (interpretada de la misma forma que se realizó la MBC en este proyecto) de aceites esenciales de diferentes especies de orégano obtenidas por medio de microdilución en caldo, y reportaron un rango de 1.20 a 2.0 mg/mL frente a *L. monocytogenes*, con un valor de $p = 0.850$ (significancia de 90 %), demostrando que no existieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por diferentes autores. No obstante, se desconoce la composición de dichos aceites ya que se han reportado MIC de hasta 4 $\mu\text{L/mL}$ (v/v) utilizando aceite esencial de *O. vulgare* cultivado en zonas de estrés hídrico contra el mismo patógeno, presentando un 1.7 % de carvacrol y 11.90 % de timol (Carhuallanqui Pérez et al., 2020), mientras que, para la misma especie, Maggio et al.(2022) reportaron una MIC de 2.50 $\mu\text{L/mL}$ (v/v) con una composición de aproximadamente 68 % de carvacrol y 3.8 % de timol.

La FI y FII fueron las fracciones en las que se observó una mayor MBC, ambas con un valor de 1.01 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se seleccionaron las fracciones FIII y FIV y el OP para realizar un ensayo más preciso con concentraciones menores a la MBC utilizando las fracciones con mayor actividad sobre *L. innocua* y compararlas con el OP.

7.4 Concentración subletal

Tomando como referencia los resultados anteriores, se estableció un rango de concentraciones menores a la MBC en porcentaje (%) v/v que oscilaron desde el 2 % hasta 0.001 % para encontrar la concentración subletal de *L. innocua* definida como aquella concentración que no cause una disminución en la población microbiana y que permita evaluar la resistencia térmica de esta bacteria en presencia del aceite. Así, se realizó una serie de 12 diluciones del medio de cultivo con aceite esencial (OP, FIII y FIV). La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos del promedio \pm desviación estándar para los tres tratamientos seleccionados. El tratamiento con la menor concentración subletal fue la fracción FIV con una concentración de 0.09 ± 0.05 %. En cuanto al resultado para el OP y la fracción FIII fue muy similar, con una concentración de 0.13 ± 0.00 y 0.14 ± 0.05 , respectivamente, estos resultados son similares a la concentración subletal de *O. vulgare* reportado por Maggio et al. (2022) de 0.13 % (v/v).

Tabla 7. Concentración subletal del aceite esencial de *P. longiflora* frente a *L. innocua* ATCC 33090, expresada en porcentaje (%).

AE	Concentración (%)
OP	0.13 ± 0.00
FIV	0.09 ± 0.05
FIII	0.14 ± 0.05

Conforme a los resultados obtenidos en este ensayo, la fracción FIV continuó siendo la que mostró mayor actividad, debido a que se necesitó una menor concentración para no reducir la población de *L. innocua*. De esta forma, se consideró la fracción FIV y el OP para proseguir con los ensayos de inactivación térmica de *L. innocua/monocytogenes* y comparar los resultados con los obtenidos sin el uso de aceite de *P. longiflora*. Al realizar un ensayo preliminar de inactivación térmica con las concentraciones descritas en la Tabla 6, se encontró una sobre inactivación y por lo tanto los resultados fueron difíciles de analizar, por lo tanto, se eligió disminuir la concentración a 0.06 % v/v en ambos casos debido a que al menos una repetición en ambos casos presentó ésta como la concentración subletal, permitiendo obtener resultados útiles en la estimación de los parámetros de inactivación.

7.5 Inactivación térmica de *L. innocua*: Ensayos *In vitro*

Los resultados obtenidos del ensayo de inactivación térmica de *L. innocua* en caldo BHI suplementado a 56 y 60 °C se reportaron en Log UFC/mL por tiempo de muestreo y el software estadístico Bioinactivation4 permitió ajustar modelos de inactivación (Geeraerd, Mafart y Metselar) a los datos observados para estimar los parámetros valor D y p. Los resultados obtenidos permitieron un acercamiento sobre el comportamiento de *L. innocua* bajo las condiciones descritas antes de implementar el método en *L. monocytogenes* bajo condiciones adecuadas de bioseguridad (Soni et al., 2022).

Las Figuras 5 y 6 muestran las observaciones y las curvas de supervivencia obtenidas de las predicciones de la inactivación térmica a 56 y 60 °C, respectivamente, de *L. innocua* utilizando aceite de *P. longiflora* OP y FIV a 0.06 % y la inactivación sin el uso de aceite (control).

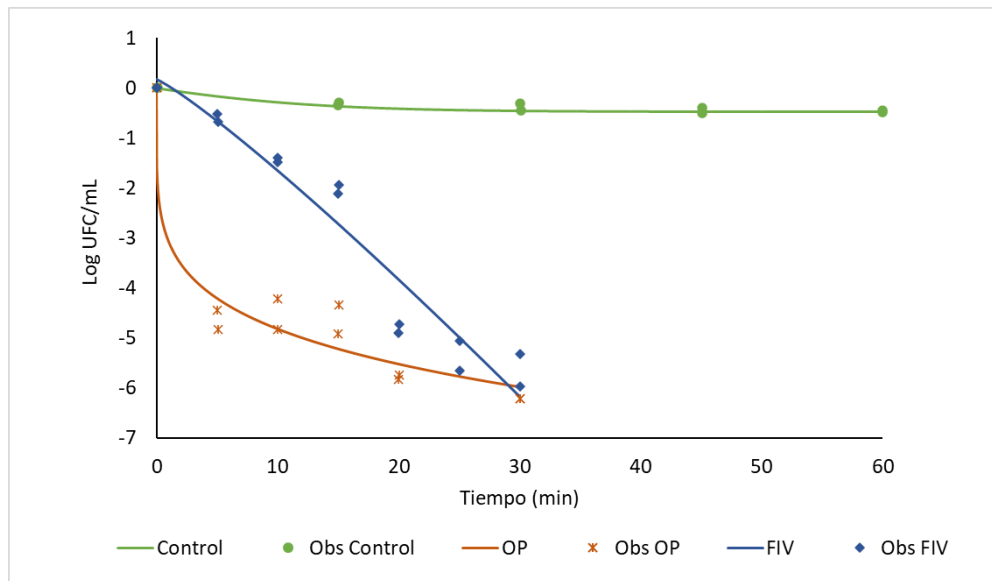


Figura 5. Inactivación térmica de *L. innocua* a 52 °C en software Bioinactivation4. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de *P. longiflora* (OP y FIV a 0.06 %).

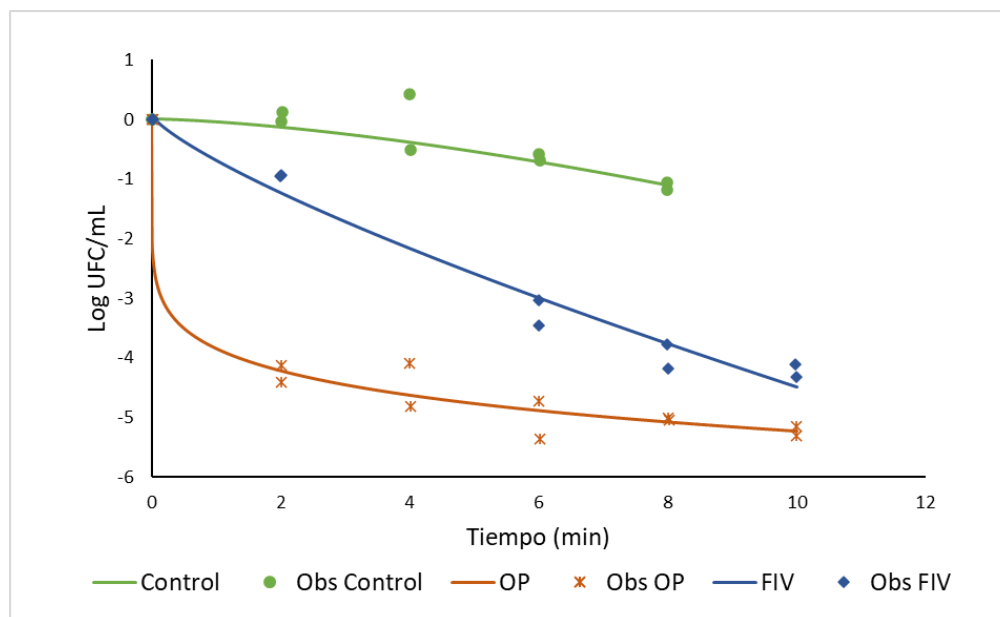


Figura 6. Inactivación térmica de *L. innocua* a 54 °C en el software Bioinactivation4. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de *P. longiflora* (OP y FIV a 0.06 %).

En la Tabla 8 se muestran los modelos seleccionados para ajustar los resultados observados a las predicciones y los valores de la bondad de ajuste para cada uno de los modelos empleados; en la fiabilidad de los resultados, un valor cercano a 0 del RMSE (raíz del error cuadrático medio) y del SER (error estándar de regresión), indicó un mejor ajuste al modelo. Para seleccionar el modelo de ajuste en los resultados observados también se utilizaron el factor sesgo (B_f) y el factor exactitud (A_f) como indicadores de la fiabilidad de los datos, en donde un valor cercano a la unidad indicó un mejor ajuste.

Las estimaciones del valor D (min) en el tratamiento control fueron de 18.07 ± 3.66 min para la temperatura de 52 °C y de 7.49 ± 0.37 min para la temperatura de 54 °C. El uso de FIV al 0.06 % v/v mostró valores D de 5.10 ± 1.78 y 4.76 ± 2.18 min para 52 y 54 °C, mientras que con el uso de OP al 0.06% v/v, se demostraron valores D de 4.76 ± 0.34 y 2.37 ± 0.22 min a 52 y 54°C, respectivamente.

La curva de inactivación en las predicciones para OP y FIV pareciera diferir con los resultados en las estimaciones del valor D debido al descenso tan pronunciado que se observa en los primeros tiempos del proceso térmico al añadir OP, en los cuales se esperaría que el tiempo de reducción decimal (min) fuera menor, sin embargo, se ha reportado que la presencia de “colas” prolongadas ($p < 1$) pueden alterar de forma significativa la estimación (Soni et al., 2022).

Tabla 8. Fiabilidad del ajuste a los modelos predictivos en la inactivación de *Listeria innocua* obtenido a 52 y 54 °C con aceite de *P. longiflora* puro (OP) y fraccionado (FIV) a 0.06 % y estimación del valor D.

Tratamiento	Temp. (°C)	Modelo	RMSE	A_f/B_f	SER	Valor D (min)	p
Control	52	Geeraerd sin hombro	0.05	1.12/1.00	0.05	18.07 ± 3.66	-
	54	Mafart	0.07	1.18/1.00	0.09	7.49 ± 0.37	1.51 ± 0.25
OP	52	Metselaar	0.40	2.50/1.00	0.46	5.10 ± 1.78	0.20 ± 0.05
	54	Metselaar	0.23	1.70/1.00	0.27	4.67 ± 2.18	0.13 ± 0.03
FIV	52	Metselaar	0.55	3.57/1.00	0.62	4.76 ± 0.34	1.14 ± 0.21
	54	Metselaar	0.27	1.87/1.00	0.33	2.37 ± 0.22	0.28 ± 0.12

Se realizó una comparación de medias mediante el software estadístico Openstat empleando un nivel de confianza de 95 %, en donde se encontró que un aumento significativo ($P < 0.05$) de la inactivación térmica al aumentar la temperatura de 52 a 54 °C en el tratamiento control y al añadir el aceite FIV, mientras que con el tratamiento OP, el valor D (min) se mantuvo sin cambios significativos.

Al comparar los resultados del control con la adición de aceite de *P. longiflora*, se encontró una disminución significativa en el valor $D_{52\text{ °C}}$ (min) y $D_{54\text{ °C}}$ con FIV, que en el caso de OP, solamente se encontró una disminución significativa en el valor $D_{52\text{ °C}}$ (min).

Las temperaturas de tratamientos térmicos suaves varían desde 50 hasta 65 °C, esto a causa de inactivar a *Listeria* por encima de su temperatura de crecimiento máxima de 45 °C y por debajo de la temperatura sugerida en alimentos de 70 °C para reducir 6D en 2 min (FDA, 2018).

Miller et al. (2009) evaluaron la inactivación térmica *In vitro* en medio de cultivo sin aditivos de *L. innocua* 10528 con temperaturas entre 52.5 y 65 °C y utilizaron el modelo Gompertz y de Bigelow para ajustar las curvas obtenidas de las predicciones a partir de los datos experimentales, el uso de los dos modelos fue debido a que se encontraron curvas de tipo sigmoidal con un hombro al inicio de la inactivación en las temperaturas más bajas (modelo Gompertz), y al aumentar la temperatura, la cinética de inactivación presentó un comportamiento lineal (modelo Bigelow). Los valores D obtenidos a 52.5 y 55 °C fueron de 16.0 min y 6.80 min, respectivamente, valores similares a los obtenidos con *L. innocua* 33090 en el tratamiento sin aceite (control) a 52 (18.07 min) y 54°C (7.49 min), sin embargo, es necesario aumentar la serie de temperaturas experimentales para realizar una comparación robusta.

7.6 Inactivación térmica de *L. monocytogenes*: Ensayo *In vitro*

El ensayo de inactivación térmica se trasladó de *L. innocua* a *L. monocytogenes* como parte de una estancia de investigación realizada de enero a julio del 2023 en la Universidad de Córdoba, España. En estos ensayos se añadieron las temperaturas de 57.5 y 63 °C para incrementar la complejidad del proyecto y validar los resultados obtenidos en un modelo secundario. En las Figuras 8-11, se presentan las curvas de inactivación de *L. monocytogenes* a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidas en un modelo en caldo BHI suplementado utilizando la adición del aceite de *P. longiflora* OP y FIV a 0.06 % (la concentración empleada fue comprobada en esta cepa mediante ensayos preliminares), contemplando un control sin aceite. Los resultados, en formato de Log UFC/mL en función del tiempo (segundos), se analizaron en el software estadístico Bioinactivation4, que permitió modelar las curvas con modelos primarios para obtener los resultados de las predicciones, estos fueron descargados desde Bioinactivation4 (ANEXO C) y los resultados se graficaron en MS Excel (señalados con líneas sólidas) para posteriormente interpolar los resultados de las observaciones (señalados con marcadores).

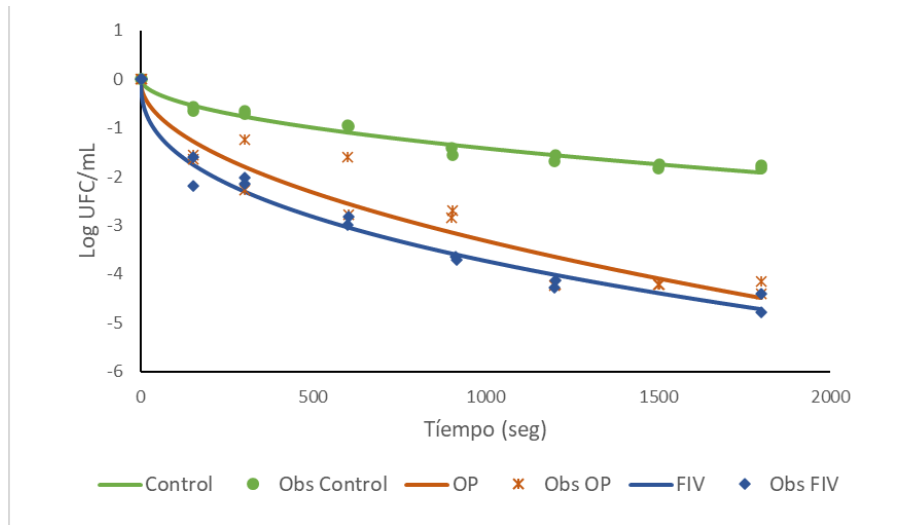


Figura 7. Inactivación térmica de *L. monocytogenes* a 52 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de *P. longiflora*: OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).

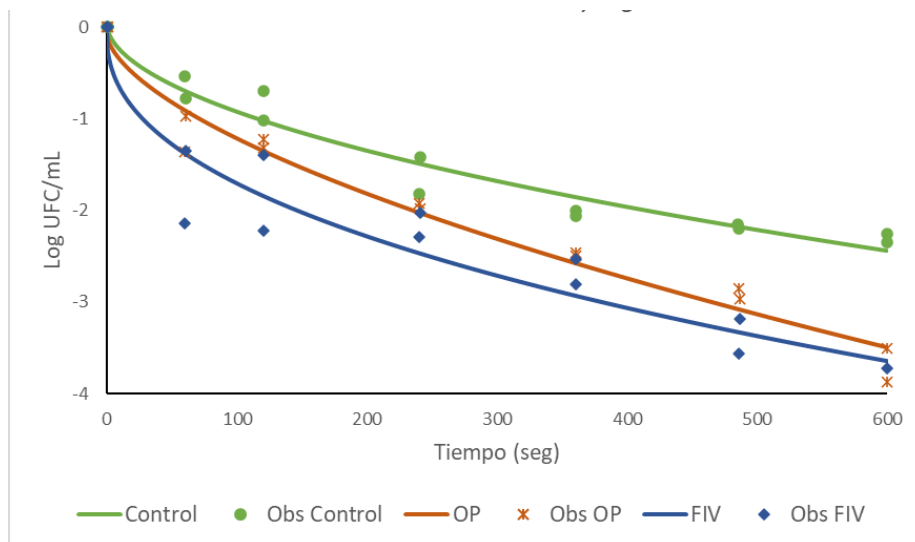


Figura 8. Inactivación térmica de *L. monocytogenes* a 54 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de *P. longiflora*: OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).

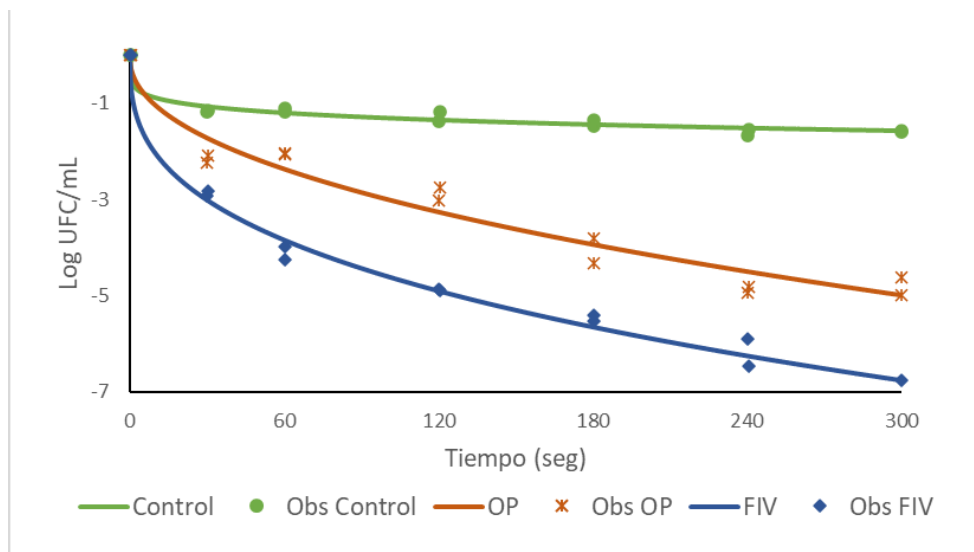


Figura 9. Inactivación térmica de *L. monocytogenes* a 57.5 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de *P. longiflora*: OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).

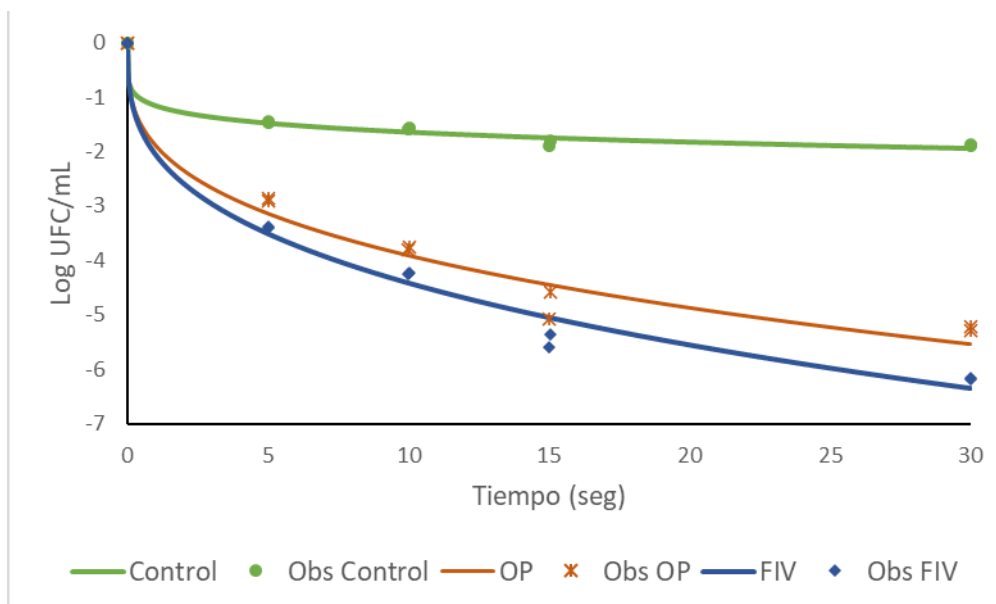


Figura 10. Inactivación térmica de *L. monocytogenes* a 63 °C. Resultados de las predicciones (datos lineales) y observaciones (Puntos) sin y con la adición de aceite de *P. longiflora*: OP (naranja), FIV (azul) y Control (verde).

A diferencia de la inactivación de *L. innocua* con los tratamientos descritos, los resultados obtenidos en este apartado tuvieron un mejor ajuste con el modelo Weibull- Mafart, siguiendo la ecuación descrita anteriormente y considerando el valor Delta como un valor proporcional al valor D como se describió en Garre et al. (2017). La Tabla 9 resume los parámetros obtenidos con este modelo para todos los tratamientos utilizados a las diferentes temperaturas, así como los parámetros utilizados en la fidelidad del ajuste, considerando un valor de RMSE y SER < 0.50 y valores de A_f y B_f cercanos a 1.

El valor δ en el caso de las inactivaciones control fueron 8.47 ± 1.51 , 1.80 ± 0.50 , 0.33 ± 0.17 y 0.007 ± 0.004 min para 52, 54, 57.5 y 63 °C, respectivamente, mientras que, siguiendo el mismo orden de temperaturas, las inactivaciones utilizando *P. longiflora* OP fueron de 1.75 ± 1.05 , 1.35 ± 0.35 , 1.35 ± 0.35 , 0.17 ± 0.09 y 0.002 ± 0.002 min y para FIV los resultados fueron de 0.64 ± 0.24 , 0.54 ± 0.35 , 0.02 ± 0.008 y 0.002 ± 0.001 min. En la Tabla 9 se observa que las estimaciones del valor delta siguen el comportamiento esperado, en donde el tiempo en reducir un logaritmo la población microbiana es menor a medida que aumenta la temperatura.

Se realizó una prueba de comparación de medias empleando una confianza del 95% mediante el software estadístico OpenStat y los resultados demostraron que el valor δ (min) en el tratamiento control disminuyó significativamente ($P < 0.05$) entre cada aumento de la temperatura en comparación con la temperatura más baja de 52°C sin añadir aceite de *P. longiflora*. En cambio, con OP entre las temperaturas 52 y 54°C el valor δ no presentó diferencia significativa ($p = 0.06$) pero al aumentar la temperatura a 57,5 y 63°C si se presentó un valor δ (min) significativamente ($P < 0.05$) bajo en comparación a la temperatura de 52°C, mismo comportamiento que se observó al añadir la fracción FIV.

Al realizar una comparación entre los diferentes tratamientos, a 52 °C el uso de aceite de *P. longiflora* disminuyó significativamente el valor δ (min) en comparación al tratamiento sin aceite, sin embargo, entre el OP y FIV no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Con el uso de las temperaturas medias (54 y 57.5°C) la mayor inactivación térmica se observó en la adición del aceite fraccionado FIV, encontrándose diferencias significativas con el control y el OP y, finalmente, en la temperatura de 63 °C no se observó diferencia significativa entre los tratamientos utilizados ($P > 0.05$).

Tabla 9. Estimación de los parámetros de inactivación de *Listeria monocytogenes* sin y con aceite esencial de *P. longiflora* puro (OP) y fraccionado (FIV) a 52, 54, 57.5 y 63 °C junto con los valores en la bondad del ajuste al modelo Weibull-Mafart.

Tratamiento	Temperatura (°C)	RMSE	A_f/B_f	SER	Delta (min)	p
Control	52.0	0.10	1.26/1.00	0.11	8.47 ± 1.51	0.51 ± 0.01
	54.0	0.16	1.45/1.00	0.18	1.80 ± 0.50	0.53 ± 0.07
	57.5	0.08	1.21/1.00	0.09	0.33 ± 0.17	0.17 ± 0.03
	63.0	0.06	1.15/1.00	0.07	7.00x10 ⁻³ ± 4.00x10 ⁻³	0.15 ± 0.02
OP	52.0	0.42	2.63/1.00	0.47	1.75 ± 1.05	0.52 ± 0.10
	54.0	0.18	1.53/1.00	0.21	1.35 ± 0.35	0.61 ± 0.07
	57.5	0.33	2.13/1.00	0.37	0.17 ± 0.09	0.47 ± 0.01
	63.0	0.34	2.17/1.00	0.40	2.00x10 ⁻³ ± 1.00x10 ⁻³	0.32 ± 0.06
FIV	52.0	0.20	1.59/1.00	0.23	0.64 ± 0.24	0.40 ± 0.04
	54.0	0.33	2.16/1.00	0.38	0.54 ± 0.35	0.44 ± 0.09
	57.5.0	0.20	1.58/1.00	0.22	0.02 ± 0.01	0.35 ± 0.02
	63.0	0.24	1.73/1.00	0.28	2.00x10 ⁻³ ± 1.00 x10 ⁻³	0.33 ± 0.04

Utilizando la interpretación del valor de p en el modelo Weibull-Mafart, se observó en los resultados observados que la inactivación de *L. monocytogenes* se interpretó con una curva de tipo cóncava presentando una cola al transcurrir el tiempo, lo que indicó una adaptación del microorganismo al medio de cultivo (Tabla 1). En reportes previos de la evaluación del valor D de *L. monocytogenes*, Abel et al. (2020) reportaron valores de $D_{50\text{ °C}} = 125.5 \pm 26.4$, $D_{55\text{ °C}} = 29.7 \pm 1.2$ y $D_{60\text{ °C}} = 51 \pm 1.0$ min en un modelo *In vitro* utilizando caldo BHI. Se ha corroborado que el uso de compuestos aromáticos, como el carvacrol, en combinación con tratamientos térmicos suaves disminuye considerablemente la resistencia térmica patógenos como *L. monocytogenes* (Tchuenchieu et al., 2022) y *E. coli* (Di Gregorio et al., 2022). Tchuenchieu et al. (2022) describieron la inactivación de *L. monocytogenes* utilizando carvacrol entre 30 y 50 ppm en tratamientos térmicos de 55 a 65 °C y observaron un aumento en la velocidad de inactivación al aumentar la concentración de carvacrol ajustando los datos a un modelo Weibull (Tchuenchieu et al., 2022).

En el caso de este estudio, al obtener los resultados del recuento para las 4 temperaturas, se realizó un análisis del modelo secundario utilizando el software Bioinactivation4 mediante un ajuste en un paso con el modelo Weibull-Mafart. En la Tabla 10 se muestra el resumen de los resultados obtenidos tomando la temperatura de 57.5 °C como de referencia (T°_{ref}), así para la obtención del valor z se consideró el valor D a la T°_{ref} (DT°_{ref}), siendo 0.33 min para el control, 0.17 min para OP y 0.02 min para FIV, con esto, se calculó un valor z de 5.75 ± 0.28 °C para el tratamiento control, 5.20 ± 0.14 °C para OP y 5.00 ± 0.13 °C para FIV. En la Tabla también se muestran los índices en la bondad del ajuste, utilizando los datos estadísticos de RMSE, AIC, A_f y B_f . Hasta este punto, el RMSE, el A_f y B_f fueron nombrados anteriormente y para el ajuste a un modelo secundario, en Bioinactivation4 se integra el criterio AIC, que, a un menor valor, indica una mejor calidad de la predicción con los datos observados considerando la forma de la curva de inactivación o valor p (Buzrul, 2022). Los modelos que permitieron ajustar los datos observados fueron el modelo de Mafart y Metselaar, y en ambos casos el valor z y el ajuste fueron idénticos, por lo tanto, la decisión por uno u otro no afectó en la predicción.

Tabla 10. Resultados obtenidos del ajuste al modelo secundario Weibull Mafart en un paso utilizando Bioinactivation4 sobre la inactivación térmica de *L. monocytogenes*, considerando 57.5 °C como T°_{ref} . Se representa la bondad de ajuste al modelo y los parámetros z y p.

Tratamiento	DT°_{ref} (min)	RMSE	AIC	A_f/B_f	Valor z (°C)	Valor p
Control	0.33	0.31	31.07	2.02/1.01	5.75 ± 0.28	0.28 ± 0.04
OP	0.17	0.43	67.24	2.67/1.01	5.20 ± 0.14	0.44 ± 0.03
FIV	0.02	0.46	73.07	2.89/1.00	5.00 ± 0.13	0.42 ± 0.03

El ensayo de validación fue realizado para obtener una aproximación a las estimaciones obtenidas en una matriz cárnica y los resultados para el valor z continúan indicando una tendencia a la disminución de la resistencia térmica de *L. monocytogenes* al añadir aceite de *P. longiflora* en comparación del tratamiento control. La fracción FIV fue el tratamiento que presentó la mayor inactivación, sin embargo, se requerirán en un futuro ensayos más robustos incluyendo un número mayor de ensayos independientes para corroborar los datos.

En la Figura 11 se muestra la representación gráfica del modelo secundario, en donde se indica el Log D (seg) en función de la temperatura (52, 54, 57.5 y 63 °C) para los tres tratamientos con valores de R^2 entre 0.96 y 0.99. Las ecuaciones de la recta fueron de utilidad en la aproximación a la validación en una matriz cárnica.

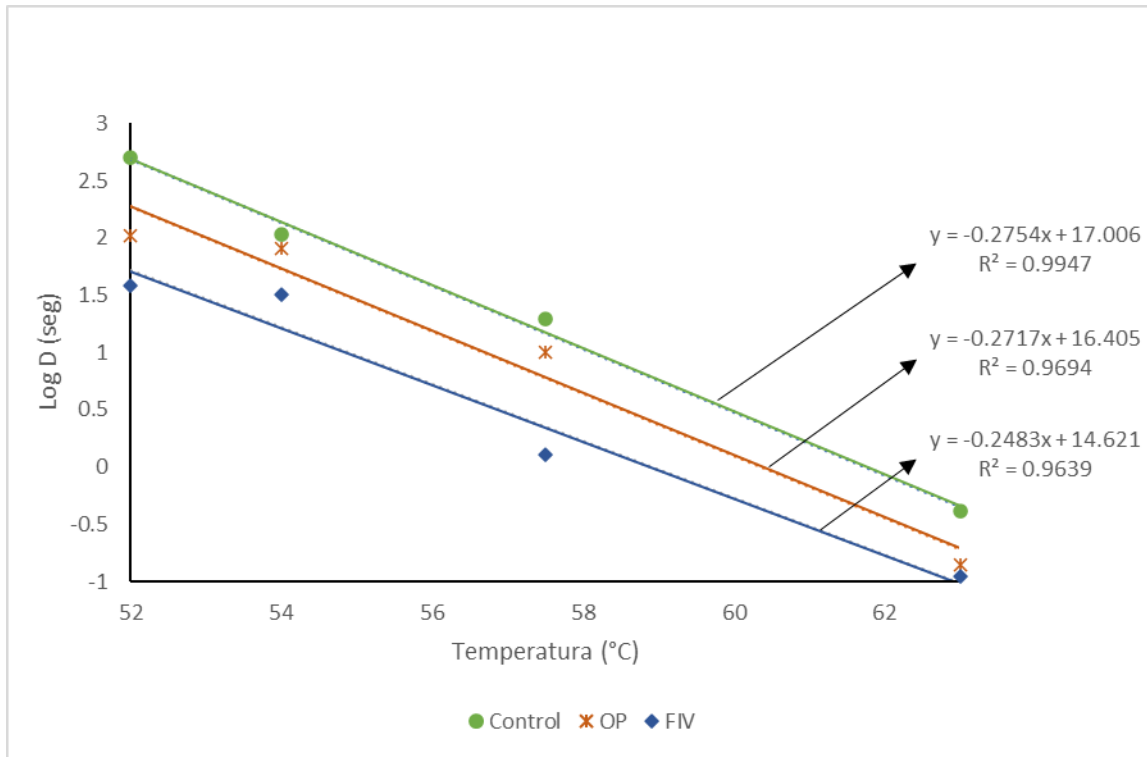


Figura 11. Representación del modelo secundario de la inactivación de *L. monocytogenes* a 52, 54, 57.5 y 63 °C para los tres tratamientos utilizados: control (puntos verdes), OP (cruces naranjas) y FIV (rombos azules).

7.7 Inactivación térmica de *L. monocytogenes*: Ensayo sobre matriz alimentaria

La Tabla 11 muestra las estimaciones del valor D obtenidas en la predicción (obtenidos de forma indirecta a través de la ecuación de la recta), en las observaciones en los ensayos de inactivación de *L. monocytogenes* *In vitro* y las observaciones en el modelo cárnico, para todas las temperaturas empleadas en los ensayos. El valor D en el tratamiento control a 56 °C fue de 0.39 ± 0.17 min y a 60 °C fue de 0.20 ± 0.16 min. Para el tratamiento OP, los valores fueron de $D_{56\text{ °C}} = 0.28 \pm 0.11$ y $D_{60\text{ °C}} = 0.05 \pm 0.03$ min y para FIV: $D_{56\text{ °C}} = 0.23 \pm 0.17$ min y $D_{60\text{ °C}} = 0.23 \pm 0.17$ min. Los resultados para el control, OP y FIV reflejaron una media en el pH de 5.60 ± 0.03 , lo que indicó que el valor del pH de la carne cruda de res no se vio afectado por la adición de AE de *P. longiflora* a 0.06 %.

Dogruiol et al. (2020) evaluaron mediante un modelo alimenticio en salmón, la inactivación térmica de *L. monocytogenes* ATCC 7644 a 55, 57.7, 60 y 62.5 °C bajo el método de sous-vide, aplicando aceite esencial de orégano (AEO) *O. onites* al 1 % v/m y los resultados obtenidos fueron: $D_{55\text{ °C}} = 10.03 \pm 0.56$ min, $D_{57.5\text{ °C}} = 4.88 \pm 0.25$ min, $D_{60\text{ °C}} = 1.81 \pm 0.06$ min y $D_{62.5\text{ °C}} = 0.46 \pm 0.03$ min. En esta misma publicación realizaron el modelo secundario de los resultados, reportando un valor z de 5.62 °C para el grupo con AEO y 5.50 °C para el grupo control.

Tabla 11. Comparación de las observaciones *In vitro* y en la matriz alimentaria en la inactivación de *L. monocytogenes* con y sin aceite de *P. longiflora*.

Tratamiento	T (°C)	Predicción	Obs. <i>In vitro</i>	Obs. matriz alimentaria
		D (min)	D (min)	D (min)
Control	52	8.07	8.47	-
	54	2.27	1.81	-
	56	0.64	-	0.39 ± 0.17
	57.5	0.25	0.33	-
	60	0.05	-	0.20 ± 0.16
	63	8.00x10 ⁻³	7.00x10 ⁻³	-
OP	52	3.15	1.75	-
	54	0.90	1.35	-
	56	0.26	-	0.28 ± 0.11
	57.5	0.10	0.17	-
	60	0.02	-	0.05 ± 0.03
	63	3.00x10 ⁻³	2.00x10 ⁻³	-
FIV	52	0.85	0.64	-
	54	0.27	0.54	-
	56	0.09	-	0.23 ± 0.17
	57.5	0.04	0.02	-
	60	0.01	-	0.03 ± 0.02
	63	2.00x10 ⁻³	2.00x10 ⁻³	-

Los datos obtenidos en la matriz cárnica fueron interpolados en los modelos secundarios de las observaciones *In vitro*, los cuales se muestran en la Figura 12 (control), Figura 13 (OP) y Figura 14 (FIV). Las observaciones de la matriz cárnica se representaron con marcadores en forma de cuadrado y se observó que no todos los resultados se ajustaron a la línea de tendencia de forma perfecta, sin embargo, la adición de aceite de *P. longiflora* a la carne cruda de res, redujo la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, pero sin encontrar cambios significativos de acuerdo con una comparación de medias realizada en el software estadístico OpenStat con una significancia del 95 %. Por lo tanto, es necesario realizar un mayor número de repeticiones para hacer una validación completa.

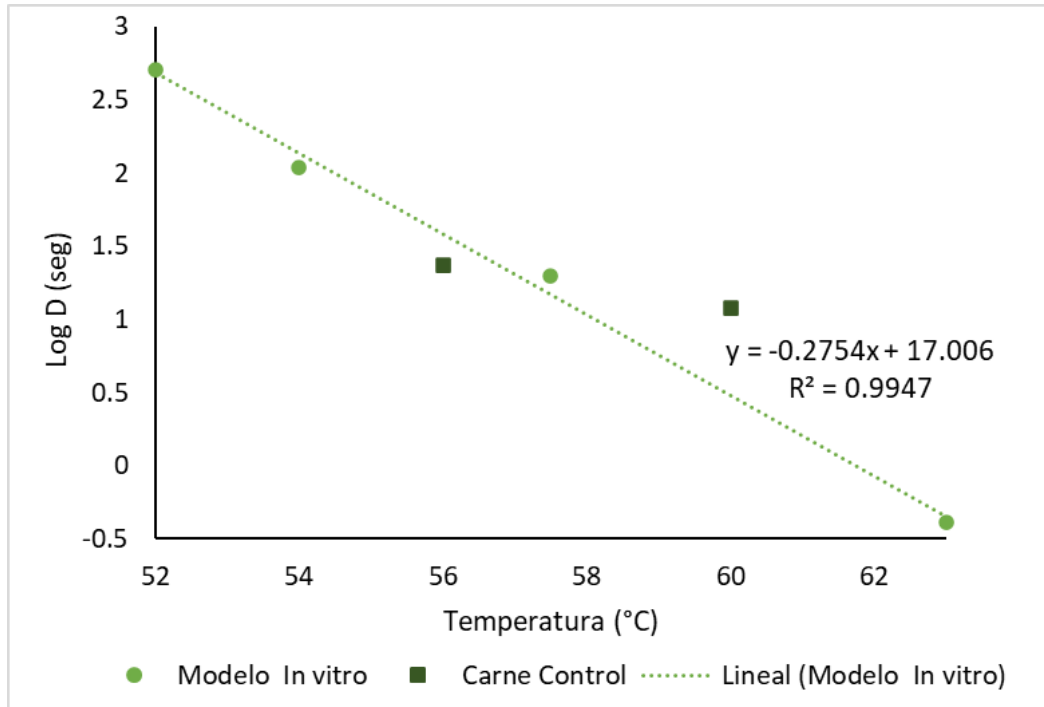


Figura 12. Validación de la inactivación térmica de *L. monocytogenes* en una matriz cárnica sobre el modelo secundario *In vitro*: Control.

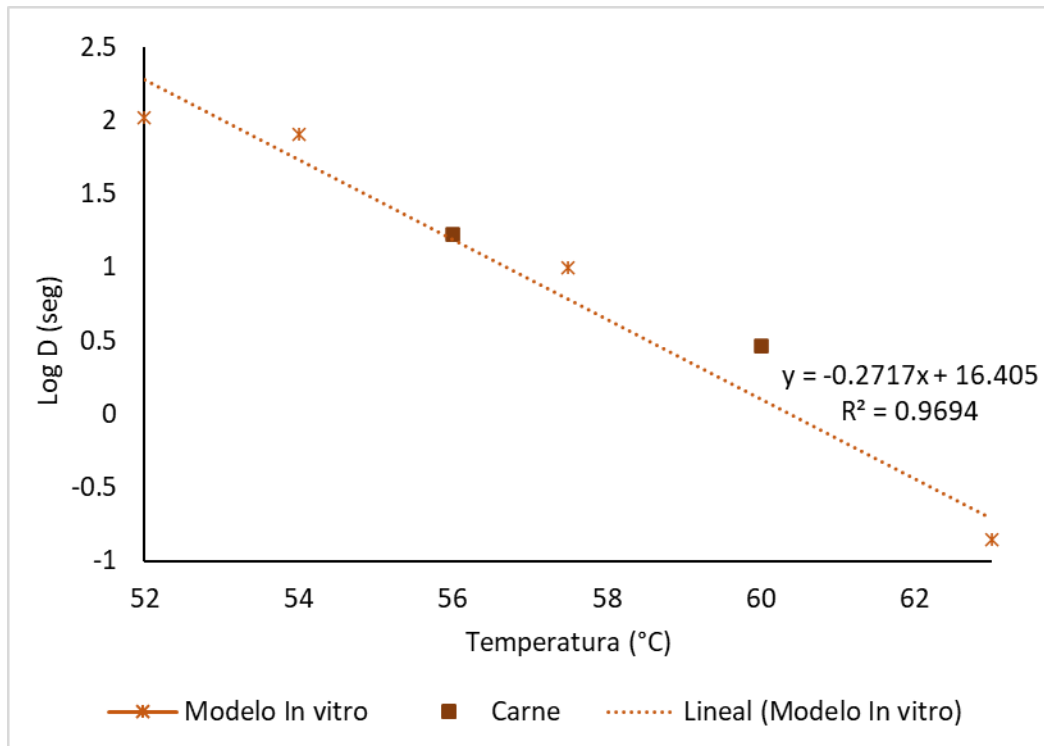


Figura 13. Validación de la inactivación térmica de *L. monocytogenes* en una matriz cárnica sobre el modelo secundario *In vitro*: adición de OP 0.06 %.

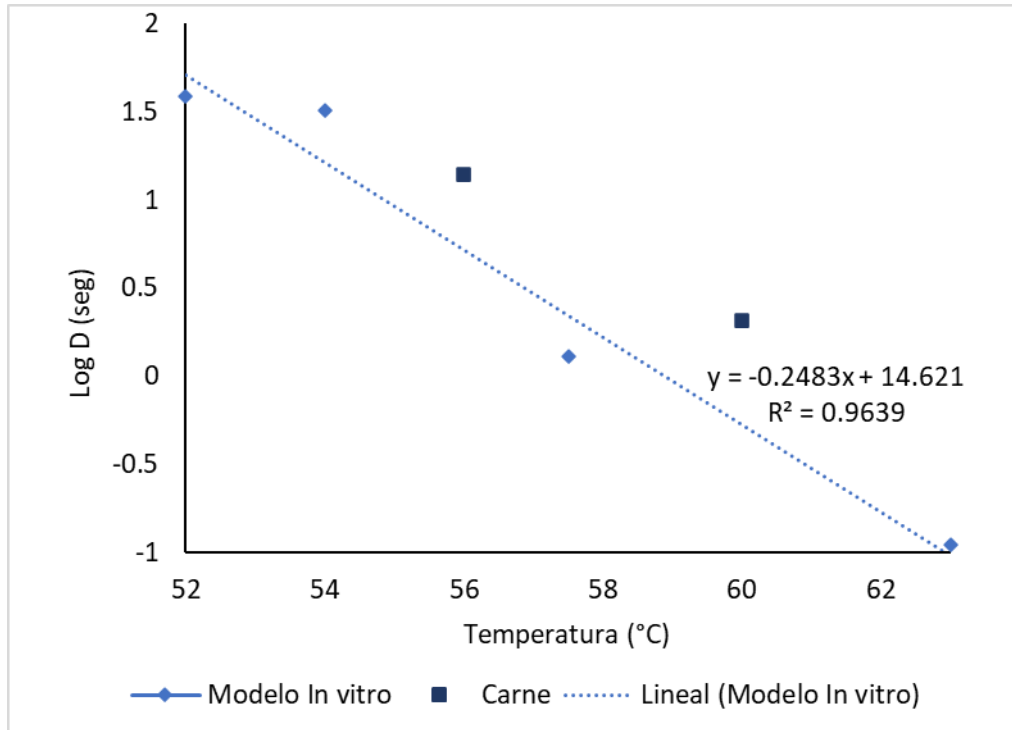





Figura 14. Validación de la inactivación térmica de *L. monocytogenes* en una matriz cárnica sobre el modelo secundario *In vitro*: adición de FIV 0.06 %.

7.8 Análisis de color

Los resultados obtenidos sobre el color L*, a* y b* por medio del colorímetro para la carne cruda de res en función del tiempo, se muestran en la Tabla 12, en donde se indican los resultados para cada día (0, 3, 6 y 9) al añadir y al no añadir aceite de *P. longiflora*. De acuerdo con la escala del color del sistema CIELAB, el colorímetro proporciona el índice de luminosidad representado como L*, y las coordenadas a* y b* indican la tendencia al color rojo/verde y amarillo/azul, respectivamente (Ly et al., 2020). Los valores de L*a*b* fueron traducidos al sistema RGB o RVA (Rojo, Verde y Azul) para aproximar el color a simple vista, representado en la última columna.

Tabla 12. Resultados del color LAB y RGB en el almacenamiento de carne cruda de res a 5 °C con aceite esencial de *P. longiflora* (OP y FIV) y sin aceite (Control).

Tratamiento	Día	L*	a*	b*	RGB
Control	0	47.39 ± 0.59	5.89 ± 1.42	11.59 ± 1.24	
	3	45.69 ± 2.97	8.28 ± 1.54	11.54 ± 0.66	
	6	47.66 ± 4.12	5.57 ± 0.93	10.36 ± 1.62	
	9	45.17 ± 1.29	6.09 ± 0.89	11.91 ± 1.00	
OP	0	49.56 ± 4.34	4.83 ± 0.80	11.87 ± 0.80	
	3	49.93 ± 2.41	6.06 ± 2.80	10.02 ± 2.80	
	6	49.76 ± 4.73	6.26 ± 0.69	12.45 ± 1.76	
	9	45.19 ± 1.57	5.98 ± 0.64	10.56 ± 1.14	
FIV	0	46.66 ± 2.39	7.31 ± 0.20	10.71 ± 1.06	
	3	48.48 ± 5.65	8.16 ± 2.58	10.90 ± 4.05	
	6	44.30 ± 0.54	6.76 ± 0.74	10.18 ± 0.29	
	9	42.60 ± 2.94	6.76 ± 1.02	10.20 ± 0.43	

Los datos analizados para indicar la normalidad de cada tratamiento suponen que la Ho se acepta ($P > 0.05$) y por lo tanto los datos siguen una distribución normal y la prueba de Levene, para analizar la homocedasticidad, indicó que la Ho se acepta ($P > 0.05$) y por lo tanto las varianzas fueron homogéneas.

El análisis estadístico demostró que no existe evidencia para rechazar la hipótesis nula y, por lo tanto, no existe diferencia significativa entre los valores de L^* , a^* y b^* de los tres tratamientos y tampoco en los días de observación ($P > 0.05$), de igual forma no se encontró una interacción entre los factores tratamiento-día ($P > 0.05$), posteriormente, el contraste post-hoc con el valor de P ajustado al método Bonferroni, comprobó que en ninguna interacción tratamiento-día existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) para los resultados del color en la carne cruda. Esto permite comprobar que la adición de aceite esencial de *P. longiflora*, tanto puro y fraccionado, en la concentración aplicada no alteró el color de la carne de ternera cruda a lo largo del tiempo de almacenamiento.

7.9 Análisis sensorial

En la Tabla 13 se muestra el resumen de los resultados obtenidos de la escala hedónica aplicada a los panelistas en cada día analizado (0, 3, 6 y 9). Para cada tratamiento en función del día se indica la media y desviación estándar para los parámetros color, el olor y la aceptación general de la carne cruda de res. El valor menor en la escala fue de 1 y el mayor fue de 5, por lo tanto, los valores cercanos a 5 fueron los que mostraron una mejor aceptabilidad de los parámetros en cada tratamiento. En los tres tratamientos se observa un decremento en la aceptabilidad en el caso de los tres parámetros tanto como fue transcurriendo el tiempo de almacenamiento, sin embargo, el uso de aceite esencial, tanto para OP y FIV, mostró un comportamiento más estable, y en el caso del olor, el uso de la fracción FIV mantuvo un olor agradable en la carne cruda hasta el último día de análisis en donde las observaciones de los panelistas fueron desde “me agrada el olor a condimento” y “el olor podría esconder atributos de descomposición” y esto será importante al momento de realizar una validación utilizando diferentes microorganismos, sin embargo, en estos estudios se ha demostrado una buena actividad antimicrobiana al utilizar aceite de *P. longiflora*, siendo superior con la FIV, por lo tanto, es un factor a considerar a futuro ya que esto no debe suponerse para otros patógenos no evaluados en este estudio.

Tabla 13. Resultados de la evaluación del color, olor y aceptación de carne cruda de vaca adicionada con aceite de *P. longiflora* puro (OP) y fraccionado (FIV) contemplando un control.

Tratamiento	Día	Color	Olor	Aceptación
Control	0	3.57 ± 0.79	3.71 ± 0.95	3.57 ± 0.79
	3	4.29 ± 0.41	3.29 ± 1.25	3.86 ± 1.46
	6	3.43 ± 1.51	1.57 ± 0.79	1.86 ± 1.07
	9	2.86 ± 1.21	1.14 ± 0.38	1.29 ± 0.76
OP	0	4.00 ± 0.82	3.00 ± 1.63	3.14 ± 1.46
	3	4.33 ± 1.21	3.71 ± 1.38	3.43 ± 1.51
	6	3.86 ± 1.35	3.43 ± 1.27	3.29 ± 1.11
	9	3.00 ± 1.15	2.57 ± 1.13	2.15 ± 0.90
FIV	0	4.29 ± 0.49	3.29 ± 1.38	3.43 ± 1.40
	3	4.5 ± 0.55	4.00 ± 1.53	3.86 ± 1.68
	6	4.43 ± 0.79	3.43 ± 0.53	3.57 ± 0.53
	9	3.29 ± 0.95	4.14 ± 0.69	2.86 ± 1.21

Se utilizó el software estadístico R para realizar un ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba Post-Hoc de Dunn de los resultados para los tres tratamientos de forma independiente con el objetivo de evaluar la aprobación de los panelistas para los tres parámetros: color, olor y aceptación general, utilizando un nivel de confianza del 95 %. De acuerdo con las observaciones de los panelistas, el color de los tres tratamientos fue bueno y se mantuvo durante todo el almacenamiento a 5 °C, es decir, tanto en el control, la adición de OP y de FIV no se encontraron diferencias significativas en los resultados de la aceptabilidad del color con un valor de $P > 0.05$.

Para los otros parámetros, solamente en el control se encontró una disminución significativa ($P < 0.05$) de la aprobación del olor a partir del día 6 de almacenamiento, y, por lo tanto, se observó también una aprobación negativa disminuyendo significativamente ($P < 0.05$) a partir del día 3 (en comparación con el día 9) y en el caso del OP y FIV, no se encontraron diferencias significativas en el olor en el transcurso de los 9 días de almacenamiento a 5 °C ($P > 0.05$), que fue de igual forma en la aceptación general, resultados que indican que el olor del producto es fundamental para la aprobación del consumidor, parámetro que indica putrefacción en caso de no encontrar un cambio de color.

Los productos cárnicos no solo pueden considerarse como alimentos potencialmente peligrosos por su elevada susceptibilidad a contaminarse con microorganismos patógenos, también son altamente susceptibles a la deterioración por la presencia de microorganismos deteriorantes (Juneja et al., 2011; FDA, 2018), en consecuencia, se ha estudiado el uso de aceites esenciales con motivo de prolongar la vida útil de estos alimentos por aportar también una actividad antioxidante (Ruiz-Hernández et al., 2023), sin embargo, el tipo de matriz alimenticia utilizada y su composición nutricional tiene un gran efecto en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Hulankova y Borilova (2020) reportaron un descenso en la actividad del aceite esencial de orégano frente a *L. monocytogenes* a partir de porcentajes de grasa mayores a 5 %. Aunado a esto, es importante destacar que los aceites esenciales en altas concentraciones pueden alterar las características sensoriales del producto además de tener un efecto negativo en la salud con su uso indiscriminado, por lo tanto, en las investigaciones para una validación en alimentos debe establecerse un análisis toxicológico para evitar riesgos al consumidor (Ruiz-Hernández et al., 2023). Entre las tendencias actuales consideradas para disminuir las concentraciones subletales de los aceites esenciales sin afectar su efecto inhibitorio contra patógenos, como *L. monocytogenes*, ha sido su uso en combinación con otros aditivos naturales como los ácidos orgánicos (Juneja et al., 2011; Dogruyol et al., 2020) y/o su uso dentro de sistemas alimenticios como las encapsulaciones (Jackson-Davis et al., 2023) y las emulsiones (Verheyen et al., 2020)

8. CONCLUSIONES

1.- Al presentar la mayor concentración de timol (21.7 %) y carvacrol (60.23 %), la fracción FIV fue el tratamiento con mayor actividad antimicrobiana (5.30 ± 0.57 cm) y requerir una menor concentración para mostrar un efecto subletal (0.09 %) contra *Listeria innocua*.

2.- La aplicación de tratamientos térmicos suaves en combinación con AE de *P. longiflora* disminuye la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, disminuyendo el valor $D_{52^\circ C}$ de 8.47 ± 1.51 min sin aceite esencial a 1.75 ± 1.05 min con OP y a 0.64 ± 0.24 min utilizando la FIV.

4.- La aplicación de AE de orégano mexicano no modificó el color de la carne cruda molida de res a los 9 días de almacenamiento a 5 °C y al añadir FIV y OP a 0.06 % el análisis sensorial demostró mejor aceptación del olor que sin la adición de aceite.

9. PERSPECTIVAS

- 1.- Realizar un ensayo de desafío más completo de inactivación térmica en carne cruda molida de res y en otras matrices alimentarias con la fracción FIV.
- 2.- Realizar una comparación en los parámetros de inactivación de *L. monocytogenes* con aceite de *P. longiflora* sin tratamiento térmico.
- 3.- Evaluar parámetros de inactivación en *L. monocytogenes* con diferentes concentraciones subletales de aceite esencial de *P. longiflora* y sus fracciones.
- 4.- Desarrollar análisis de vida de anaquel de productos cárnicos con y sin tratamientos térmicos adicionados con aceite de *P. longiflora* y la fracción FIV.
- 5.- Evaluar la inactivación térmica de otras bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella* sp. con la adición de aceite de *P. longiflora* y sus fracciones.
- 6.- Analizar el efecto de la inactivación térmica con la adición de aceite esencial de *P. longiflora* en las células sobrevivientes de *L. monocytogenes*.
- 7.- Determinar el efecto citotóxico del AE de *P. longiflora* y sus fracciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, T., Boulaaba, A., Lis, K., Abdulmawjood, A., Plötz, M., & Becker, A. (2020). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in game meat applying sous vide cooking conditions. *Meat Science*, 167.
- Albert, I., & Mafart, P. 2005. A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 100:1–3, 197–211.
- Argote, F., Suarez Montenegro, Z., Tobar Delgado, M., Pérez Alvarez, J., Hurtado, A., & Delgado Ospina, J. 2017. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 15:02, 52–60.
- Bautista-Hernández, I., Aguilar, C. N., Martínez-ávila, G. C. G., Torres-León, C., Iliina, A., Flores-Gallegos, A. C., Kumar Verma, D., & Chávez-González, M. L. 2021. Mexican oregano (*Lippia graveolens kunth*) as source of bioactive compounds: A review. In *Molecules*, MDPI. 26:17.
- Ben Hsouna, A., ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. 2017. Citrus lemon essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease*, 16:01.
- Bimpizas-Pinis, M., Santagata, R., Kaiser, S., Liu, Y., & Lyu, Y. 2022. Additives in the food supply chain: Environmental assessment and circular economy implications. *Environmental and Sustainability Indicators*, 14, 100172.
- Bondi M., Lauková A., Nierderhausern S., Messi P., Papadopoulou. 2017. Natural Preservatives to Improve Food Quality and Safety. *Journal of Food Quality*. 4:1-3.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. In *International Journal of Food Microbiology*. pp. 223–253. 94:03.
- Buzrul, S. 2022. The Weibull Model for Microbial Inactivation. In *Food Engineering Reviews*, Springer.14:01, pp. 45–61.

Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., & Ramos Delgado, D. 2020. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22:01, 23–33.

Castañeda, F., García, L., Oaxaca, C., Arciga Maria del Carmen Sabino Castañeda, R. F., García, L., Oaxaca, C., Arciga Sabino, R. M., y Ramos, M. 2014. Evaluación de la capacidad de reducción de la carga microbiana de un sistema de intercambiadores de calor concéntricos, aplicados en un proceso de secado por aspersión de alimentos. *Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos- Ciencias Naturales y Exactas Handbook 2, 2007-1582*, pp. 152-162.

Castañeda-Ruelas, Chaidez-Quiroz, & Salazar-Jiménez. 2018. *Listeria monocytogenes* y la listeriosis, problema de salud pública en México. In *Salud Publica de México, Instituto Nacional de Salud Pública*. 60:04, pp. 375–376.

Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-Del Campo, N., León-Félix, J., & Chaidez-Quiroz, C. 2014. Listeriosis in Mexico: Clinical and epidemiological importance. In *Salud Publica Mex*. 56.

Castillo, S., Dávila-Aviña, J., Heredia, N., & Garcia, S. 2017. Antioxidant activity and influence of Citrus byproduct extracts on adherence and invasion of *Campylobacter jejuni* and on the relative expression of *cadF* and *ciaB*. *Food Science and Biotechnology*, 26:02, 453–459.

Centro Nacional de Epidemiología. (2022). Informe epidemiológico sobre la situación de listeriosis en España. Año 2022.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Deli-Sliced Products. [Online] Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/deliproducts-04-19/index.html>

CDC. 2021. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Deli Meats. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/delimeat-10-20/index.html>

CDC. 2023. *Listeria* Outbreak Linked to Deli Meat and Cheese. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/deli-11-22/index.html>

CDC. 2023. *Listeria* Outbreak Linked to Ice Cream. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-08-23/index.html>

Chen, Q., Zhao, Z., Wang, X., Xiong, K., & Shi, C. 2022. Microbiological predictive modeling and risk analysis based on the one-step kinetic integrated Wiener process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 75.

Chen, Y., Zhao, C., Yue, G., Yang, Z., Wang, Y., Rao, H., Zhang, W., Jin, B., & Wang, X. 2020. A highly selective chromogenic probe for the detection of nitrite in food samples. *Food Chemistry*, 317.

Cid-Pérez, T. S., Nevárez-Moorillón, G. V., Torres-Muñoz, J. V., Palou, E., & López-Malo, A. 2016. Mexican oregano (*Lippia berlandieri* and *Poliomintha longiflora*) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. pp. 551–560.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2023. COFEPRIS alerta por helados contaminados. [Online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cofepris/articulos/cofepris-alerta-por-helados-contaminados>

Contreras-Soto, M., Medrano-Félix, J., Ibarra-Rodríguez, J., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q., & Castro-del Campo, N. 2019. The last 50 years of Salmonella in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias*, 6(SPE).

Cortés-Chitala, M. D. C., Flores-Martínez, H., Orozco-ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. 2021. Identification and quantification of phenolic compounds from mexican oregano (*Lippia graveolens* hbk) hydroethanolic extracts and evaluation of its antioxidant capacity. *Molecules*, 26:03.

Cortés-Sánchez, A. D. J., Díaz-Ramírez, M., & Guzmán-Medina, C. A. 2018. Sobre *Bacillus cereus* y la inocuidad de los alimentos (una revisión). *Revista de Ciencias*, 22:01.

de Rostro-Alanis, M. J., Báez-González, J., Torres-Alvarez, C., Parra-Saldívar, R., Rodríguez-Rodríguez, J., & Castillo, S. 2019a. Chemical composition and biological activities of oregano essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation. *Molecules*, 24:10.

Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. 2018. Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. In *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd. 80, pp. 123–130.

Di Gregorio, L., Tchuenchieu, A., Poscente, V., Arioli, S., Del Fiore, A., Costanzo, M., Giorgi, D., Lucretti, S., & Bevivino, A. 2022. Synergistic Action of Mild Heat and Essential Oil Treatments on Culturability and Viability of *Escherichia coli* ATCC 25922 Tested In Vitro and in Fruit Juice. *Foods*, 11:11.

Dock, L. L., Floros, J. D., & Linton, R. H. 2000. Heat Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Cider Containing Malic Acid, Sodium Benzoate, and Potassium Sorbate. In *Journal of Food Protection*. 63:08.

Dogruiyol, H., Mol, S., & Cosansu, S. 2020. Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid. *Food Microbiology*, 90.

Fang, T., Wu, Y., Xie, Y., Sun, L., Qin, X., Liu, Y., Li, H., Dong, Q., & Wang, X. 2021. Inactivation and Subsequent Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* After Various Mild Bactericidal Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 12.

FDA. 2018. Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Human Food: Guidance for Industry Draft Guidance. 4, pp. 1-15.

Food and Drug Administration. 2022. Bad Bug Book-Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins-Second Edition 2, pp. 99-107.

Garre, A. 2022. biogrowth & bioinactivation-making predictive microbiology a bit easier IAFP Software Fair Series. Wageningen University and Research. pp. 25-28

- Garre, A., Fernández, P. S., Lindqvist, R., & Egea, J. A. 2017. Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Research International*, 93, 66–74.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. In *International Journal of Food Microbiology* 59.
- Hao, Y., Kang, J., Yang, R., Li, H., Cui, H., Bai, H., Tsitsilin, A., Li, J., & Shi, L. 2022. Multidimensional exploration of essential oils generated via eight oregano cultivars: Compositions, chemodiversities, and antibacterial capacities. *Food Chemistry*, 374.
- Herrera-Rodríguez, S. E., López-Rivera, R. J., García-Márquez, E., Estarrón-Espinosa, M., & Espinosa-Andrews, H. 2019. Mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type on the antifungal activity of *Candida albicans*. *Food Science and Biotechnology*, 28:02, 441–448.
- Horn, B., Hewitt, J., Withers, H., Olsen, L., Lymburn, J., & New Zealand. Ministry for Primary Industries. (2016). Review of microbial pathogen inactivation relevant to sous vide cooking at temperatures below 55°C. Ministry for Primary Industries 2017/35, 2253-3923.
- Huang L. Hwang C., Fang T. 2019. Improved Estimation of Thermal Resistance of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry- The Effect of Temperature and Fat and A global Analysis. *Journal Elsevier Ltd Food control* 96, 29-38.
- Hulankova, R., & Borilova, G. 2020. Modeling dependence of growth inhibition of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* by oregano or thyme essential oils on the chemical composition of minced pork. *Journal of Food Safety*, 40:5.
- Hwang, C. A., Sheen, S., & Juneja, V. K. 2009. Effect of salt, smoke compound, and temperature on the survival of *listeria monocytogenes* in salmon during simulated smoking processes. *Journal of Food Science*, 74:9.

Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores (INAPAM). 2023. Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) tienen mayor riesgo de contraerlas las personas adultas mayores.[Online]. Disponible en:

<https://www.gob.mx/inapam/articulos/las-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta-tienen-mayor-riesgo-de-contraerlas-las-personas-adultas-mayores#:~:text=De%20acuerdo%20con%20el%20Sistema,casos%20por%20intoxicaci%C3%B3n%20alimentaria%20bacteriana.>

Jackson-Davis, A., White, S., Kassama, L. S., Coleman, S., Shaw, A., Mendonca, A., Cooper, B., Thomas-Popo, E., Gordon, K., & London, L. 2023. A Review of Regulatory Standards and Advances in Essential Oils as Antimicrobials in Foods. *Journal of Food Protection*, 86:02, 100025.

Jansen, T., Claassen, L., van Kamp, I., & Timmermans, D. R. M. 2020. All chemical substances are harmful, public appraisal of uncertain risks of food additives and contaminants. *Food and Chemical Toxicology*, 136.

Jiménez-Edeza, M., Castillo-Burgos, M., Germán-Báez, L. J., & Castañeda-Ruelas, G. M. 2020. Bulk sales of cold cuts and sausages: a marketing trend associated to the risk of foodborne diseases in Culiacan, Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11:3, 848–858.

Juneja, V. K., Huang, L., & Yan, X. 2011. Thermal inactivation of foodborne pathogens and the USDA pathogen modeling program. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106:01, 191–198.

Kassem, G. M., Atta-Alla, O. A., & Ali, F. H. M. 2011. Improving the quality of beef burger by adding thyme essential oil and jojoba oil. In *Arch. Zootec.* 60:231.

Kim, J., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. 2021. Synergistic antimicrobial activities of plant essential oils against *Listeria monocytogenes* in organic tomato juice. *Food Control*, 125.

Koyama, K., Aspidou, Z., Koseki, S., & Koutsoumanis, K. 2019. Describing uncertainty in salmonella thermal inactivation using bayesian statistical modeling. *Frontiers in Microbiology*, 10:09.

Kumar, A. 2019. Food Preservation: Traditional and Modern Techniques. *Acta Scientific Nutritional Health*, 3:12, 45–49.

La Pergola, A., Restuccia, C., Napoli, E., Bella, S., Brighina, S., Russo, A., & Suma, P. 2017. Commercial and wild Sicilian *Origanum vulgare* essential oils: chemical composition, antimicrobial activity and repellent effects. *Journal of Essential Oil Research*.29:06, 451–460.

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. 2017. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. In *Molecules*. MDPI AG. 22:06.

Llenque-Díaz, L. A., Quintana-Díaz, A., Villanueva De Cueva, E. E., Moreno-Ruiz, N. A., & Segura-Vega, R. M. 2017. Diciembre Kinetics of thermal inactivation of *Salmonella* sp. in juice of *Fragaria* sp. *REBIOL*, 37:02, 36–43.

Lozoya Castillo, D. L., Castillo-Hernández, S. L., Hernández-Marín, D. A., Rivas-Morales, C., & Sánchez-García, E. 2018. Evaluación de la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante de subproductos de *Opuntia ficus-indica* y *Mangifera indica*. 3.

Lukas, B., Schmiderer, C., & Novak, J. 2015. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 119, 32–40.

Ly, B. C. K., Dyer, E. B., Feig, J. L., Chien, A. L., & Del Bino, S. 2020. Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. In *Journal of Investigative Dermatology*, Elsevier B.V. pp. 3-12.e1. 140:01.

Maggio, F., Rossi, C., Chaves-Lópe, C., Valbonetti, L., Desideri, G., Paparella, A., & Serio, A. 2022. A single exposure to a sublethal concentration of *Origanum vulgare* essential oil initiates response against food stressors and restoration of antibiotic susceptibility in *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 132.

María García Beltrán, J., & Ángeles Esteban, M. 2016. Properties and Applications of Plants of *Origanum* Sp. Genus Evaluation of cost-effective feed additives as

immunostimulants in Aquaculture View project Development of a polyvalent vaccine for fish pathogens View project.

Membré, J. M., & Boué, G. 2018. Quantitative microbiological risk assessment in food industry: Theory and practical application. *Food Research International*, 106, 1132–1139.

Messens, W., Bover-Cid, S., Hempen, M., Lindqvist, R., Nauta, M., Skandamis, P. N., Stella, P., & Koutsoumanis, K. 2023. Use of risk assessment and predictive microbiology in regulatory science related to the scientific opinions of the EFSA BIOHAZ Panel. *International Journal of Food Microbiology*, 403, 110302.

Metselaar, K. I., Den Besten, H. M. W., Abee, T., Moezelaar, R., & Zwietering, M. H. 2013. Isolation and quantification of highly acid resistant variants of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 166:3, 508–514.

Miller, F. A., Gil, M. M., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. 2009. Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of strain and growth phase. *Food Control*, 20:12, 1151–1157.

Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2:4, 403–416.

Mohammadzadeh-Aghdash, H., Akbari, N., Esazadeh, K., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. 2019. Molecular and technical aspects on the interaction of serum albumin with multifunctional food preservatives. In *Food Chemistry*. Elsevier Ltd. 293, pp. 491–498.

Moharreri, M., Vakili, R., Oskoueian, E., & Rajabzadeh, Q. 2021. Effects of microencapsulated essential oils on growth performance and biomarkers of inflammation in broiler chickens challenged with *salmonella* enteritidis. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.

Mukurumbira, A. R., Shellie, R. A., Keast, R., Palombo, E. A., & Jadhav, S. R. 2022. Encapsulation of essential oils and their application in antimicrobial active packaging. *Food Control*, 136, 108883.

- Negi, P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. In International Journal of Food Microbiology pp. 7–17. 156:01.
- Niklas, A. A., Herrmann, S. S., Pedersen, M., Jakobsen, M., & Duedahl-Olesen, L. 2022. The occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in cured meat products from the Danish market. Food Chemistry, 378.
- Nunes Silva, B., Cadavez, V., Teixeira, J. A., & Gonzales-Barron, U. 2020. Effects of essential oils on *Escherichia coli* inactivation in cheese as described by meta-regression modelling. Foods, 9:06.
- Ortega-Nieblas M., Robles-Burgueño M., Acedo-Félix E., González-León.A., Morales-rejoT. A., Vázquez-Moreno. L. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) Essential Oil. Rev. Fitotec. Nex.
- Rodríguez-Auad. 2018. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes* Overview of *Listeria monocytogenes* infection. Revista Chilena de Infectología 35:6, 649-657.
- Pérez-Narváez, O. A., Castillo Hernández S, S. L., Leos-Rivas, C., Pérez-Hernández, R. A., Chávez-Montes, A., Verduzco-Martínez, J. A., & Sánchez-García, E. 2023. Antibacterial Effect of Ethanolic Extracts of *Dodonaea viscosa* L. Jacq. and *Mammea americana* L. against Staphylococci Isolated from Skin Lesions. BioMed Research International, 1–9.
- Possas, A., María Bonilla-Luque, O., Valero, A., Gonzales-Barron, A., & Cadavez, V. 2021. From Cheese-Making to Consumption: Exploring the Microbial Safety of Cheeses through Predictive Microbiology Models.
- Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Rincón, F., & García-Gimeno, R. M. 2018. Mathematical approach for the *Listeria monocytogenes* inactivation during high hydrostatic pressure processing of a simulated meat medium. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 47, 271–278.

Puvača, N., Milenković, J., Galonja Coghill, T., Bursić, V., Petrović, A., Tanasković, S., Pelić, M., Ljubojević Pelić, D., & Miljković, T. 2021. Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: In vitro study. *Antibiotics*, 10:05.

Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., ... Lindqvist, R. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16:01.

Rodríguez E. 2011. Uso De Agentes Antimicrobianos Naturales En La Conservación De Frutas Y Hortalizas Natural Antimicrobial Agent Use In The Preservation Of Fruits And Vegetables. 7.

Rogalla D. y Bomar P. 2023. *Listeria monocytogenes*. StatPearls, [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534838/>

Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. In *Journal of Applied Bacteriology*. 81.

Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Anniballi, F., Valbonetti, L., & Paparella, A. 2018. Effect of *Origanum vulgare* essential oil on biofilm formation and motility capacity of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from discoloured Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 124:05. 1220–1231.

Rostro-Alanis, M. J., Báez-González, J., Torres-Alvarez, C., Parra-Saldívar, R., Rodríguez-Rodríguez, J., & Castillo, S. 2019b. Chemical composition and biological activities of oregano essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation. *Molecules*, 24:10.

Ruiz-Hernández, K., Sosa-Morales, M. E., Cerón-García, A., & Gómez-Salazar, J. A. 2023. Physical, Chemical and Sensory Changes in Meat and Meat Products Induced by the Addition of Essential Oils: A Concise Review. In *Food Reviews International*. Taylor and Francis Ltd. pp. 2027–2056. 39:04.

SAGARPA. 2015. Manual de Reducción de Patógenos para la Detección de: *Listeria monocytogenes*, pp. 03-05.

Secretaría General de Sanidad y Consumo. 2019. Brote de listeriosis por el consumo de productos fabricados por la empresa Magrudis S.L. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, Gobierno de España. [Online]. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2019/Brote_Listeria_Carne.htm

Senyo Fometu, S., Ansah Herman, R., & Ayepa, E. 2019. Essential Oils and their applications-A mini review. *Journal Advances in Nutrition and Food Science*. 4:4, 2572-5971.

Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. 2021. Essential oils as additives in active food packaging. In *Food Chemistry*. Elsevier Ltd. 343.

Silva, B. N., Bonilla-Luque, O. M., Possas, A., Ezzaky, Y., Elmoslih, A., Teixeira, J. A., Achemchem, F., Valero, A., Cadavez, V., & Gonzales-Barron, U. 2023. Meta-Analysis of In Vitro Antimicrobial Capacity of Extracts and Essential Oils of *Syzygium aromaticum*, *Citrus L.* and *Origanum L.*: Contrasting the Results of Different Antimicrobial Susceptibility Methods. *Foods*, 12:6.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2023. Boletín Epidemiológico: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de información. Dirección General de Epidemiología. 37:40.

Soni, A., Bremer, P., & Brightwell, G. 2022. A Comprehensive Review of Variability in the Thermal Resistance (D-Values) of Food-Borne Pathogens—A Challenge for Thermal Validation Trials. In *Foods* 11:24.

Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. 2019. Predictive modeling of microbial behavior in food. In *Foods*. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 8:12.

Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Joković, N., Jokanović, M., Ivić, M., Šojić, B., Škaljac, S., Stojanović, P., & Mihajilov-Krstev, T. 2018. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. *Food Control*, 90, 332–343.

Tchuenchieu, A., Sado Kamdem, S., Bevivino, A., Etoa, F. X., & Essia Ngang, J. J. 2022. Development of a predictive model of the microbial inactivation of *L. monocytogenes* during low thermal treatment of fruit juices in combination with carvacrol as aroma compound. *Current Research in Food Science*, 5, 374–381.

Torres-Alvarez, C., Núñez González, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas, C., & Báez-González, J. G. 2017. Perfil químico, actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de naranja y sus aceites concentrados. *CYTA - Journal of Food*, 15:1, 129–135.

United States Department of Agriculture (USDA). 2022. Overview of Predictive Microbiology. [Online]. Disponible en: <https://portal.errc.ars.usda.gov/Overview.aspx>.

Verheyen, D., Govaert, M., Seow, T. K., Ruvina, J., Mukherjee, V., Baka, M., Skåra, T., & Van Impe, J. F. M. 2020. The Complex Effect of Food Matrix Fat Content on Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes*: Case Study in Emulsion and Gelled Emulsion Model Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Yousefi, M., Khorshidian, N., & Hosseini, H. 2020. Potential Application of Essential Oils for Mitigation of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Products. In *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A. 7.

Zheng, K., Xiao, S., Li, W., Wang, W., Chen, H., Yang, F., & Qin, C. 2019. Chitosan-acorn starch-eugenol edible film: Physico-chemical, barrier, antimicrobial, antioxidant and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 344–352.

11. ANEXOS

ANEXO A

Tabla 14. Bondad de ajuste a los modelos predictivos de la inactivación térmica de *L. innocua* a 56 y 60°C, obtenidos en Bioinactivation4, para los tratamientos control, OP y FIV.

Tratamiento	T (°C)	Modelo	RMSE	Bondad de ajuste		
				SER	B_f	A_f
Control	56	Mafart	0.28	0.31	1.00	1.91
	60	Mafart	0.48	0.54	1.00	3.01
OP	56	Metselaar	0.17	0.19	1.00	1.49
	60	Metselaar	0.19	0.22	1.00	1.56
FIV	56	Metselaar	0.23	0.26	1.00	1.71
	60	Metselaar	0.45	0.50	1.00	2.82

ANEXO B

Prueba sensorial de carne picada cruda

Nombre: _____ Fecha: _____

De acuerdo con la muestra proporcionada, por favor contesta las siguientes preguntas marcando una (X) sobre el recuadro que indica tu grado de aceptabilidad de los atributos evaluados (color, olor y aceptación general) en la carne picada. Las respuestas son números del 1 al 5, siendo 1 "nada aceptable" y 5 "muy aceptable".

1= Nada aceptable	2=poco aceptable	3= ni me gusta ni me disgusta	4= aceptable	5= muy aceptable
-------------------	------------------	----------------------------------	--------------	------------------

Muestra: _____

Olor:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Color:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Aceptación general:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Observaciones:

Muestra: _____

Olor:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Color:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Aceptación general:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Observaciones:

Muestra: _____

Olor:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Color:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Aceptación general:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Observaciones:

Muestra: _____

Olor:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Color:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Aceptación general:

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Observaciones:

ANEXO C

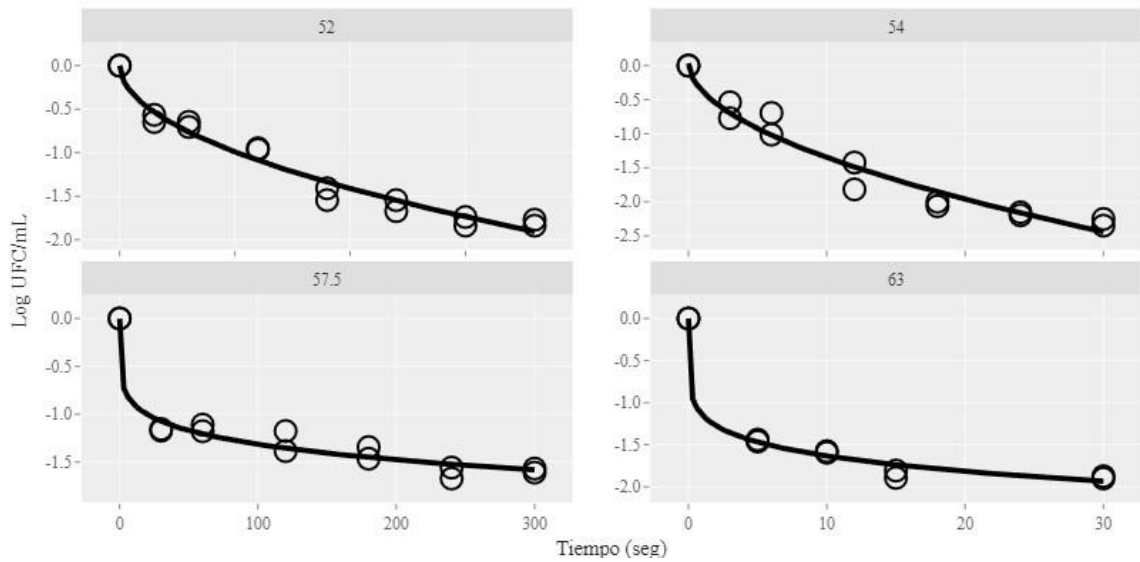


Figura 15. Modelos primarios de la inactivación *In vitro* de *L. monocytogenes* a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidos en Bioinactivation4: Control.

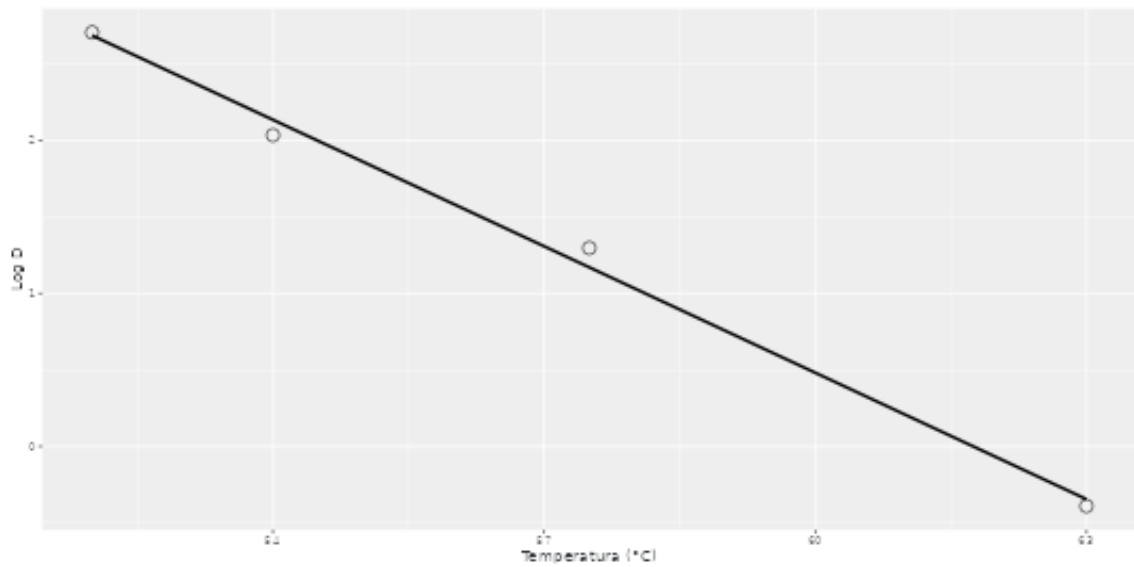


Figura 16. Modelo secundario de la inactivación térmica *In vitro* de *L. monocytogenes* obtenido de Bioinactivation4: Control.

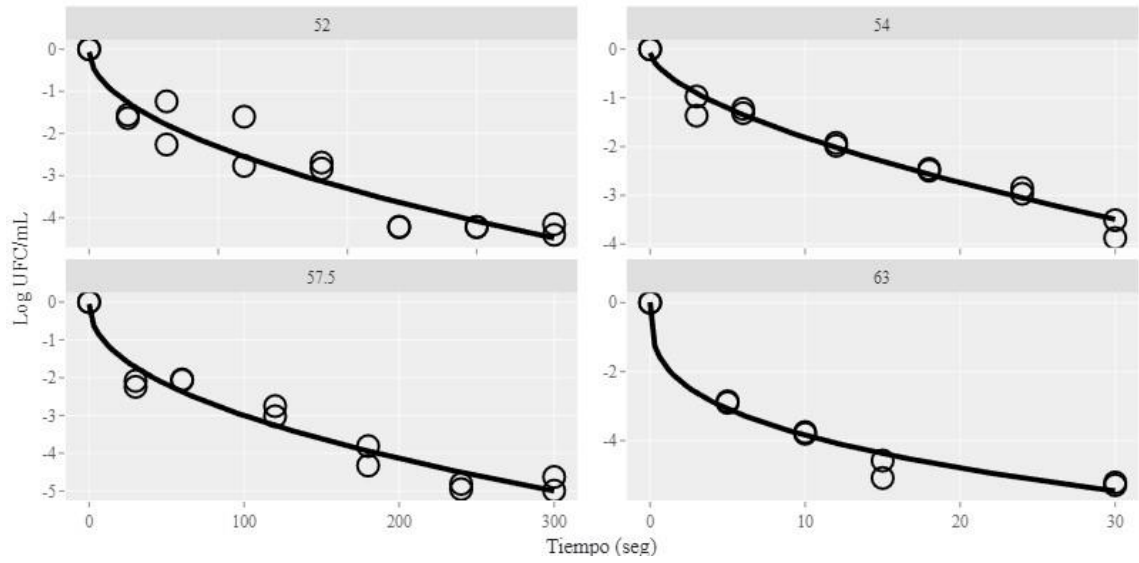


Figura 17. Modelos primarios de la inactivación In vitro de *L. monocytogenes* a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidos en Bioinactivation4: adición de OP 0.06 %.

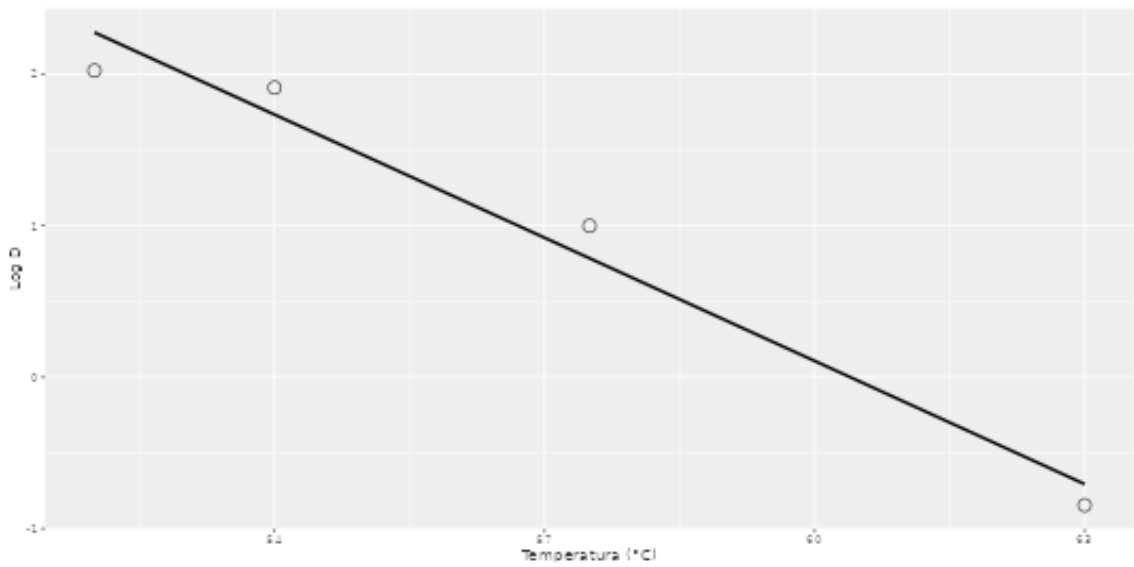


Figura 18. Modelo secundario de la inactivación térmica In vitro de *L. monocytogenes* obtenido de Bioinactivation4: adición de OP 0.06 %.

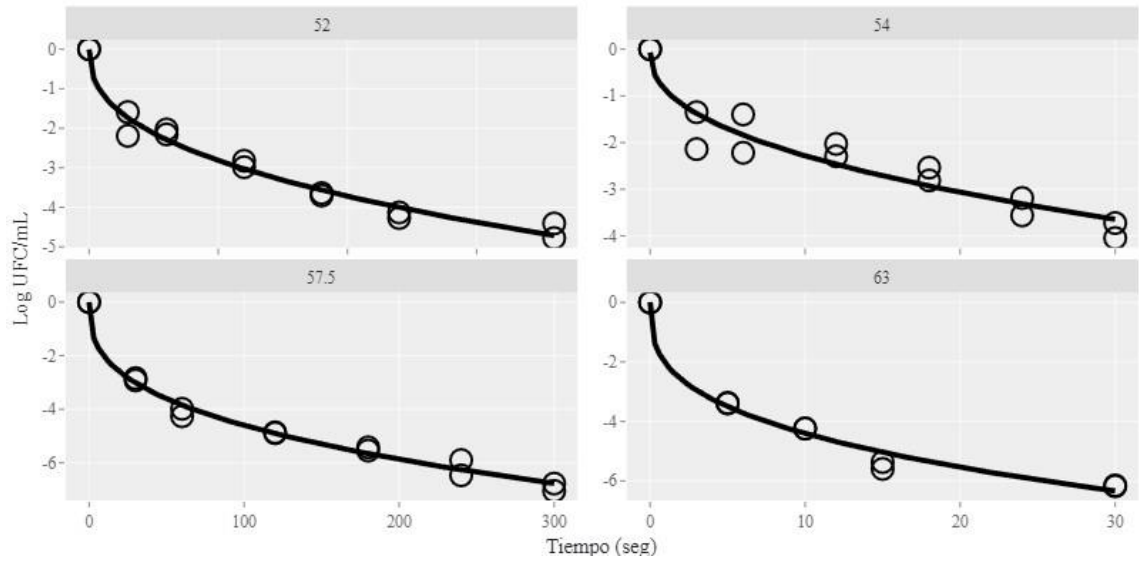


Figura 19. Modelos primarios de la inactivación In vitro de *L. monocytogenes* a 52, 54, 57.5 y 63 °C obtenidos en Bioinactivation4: adición de FIV 0.06 %.

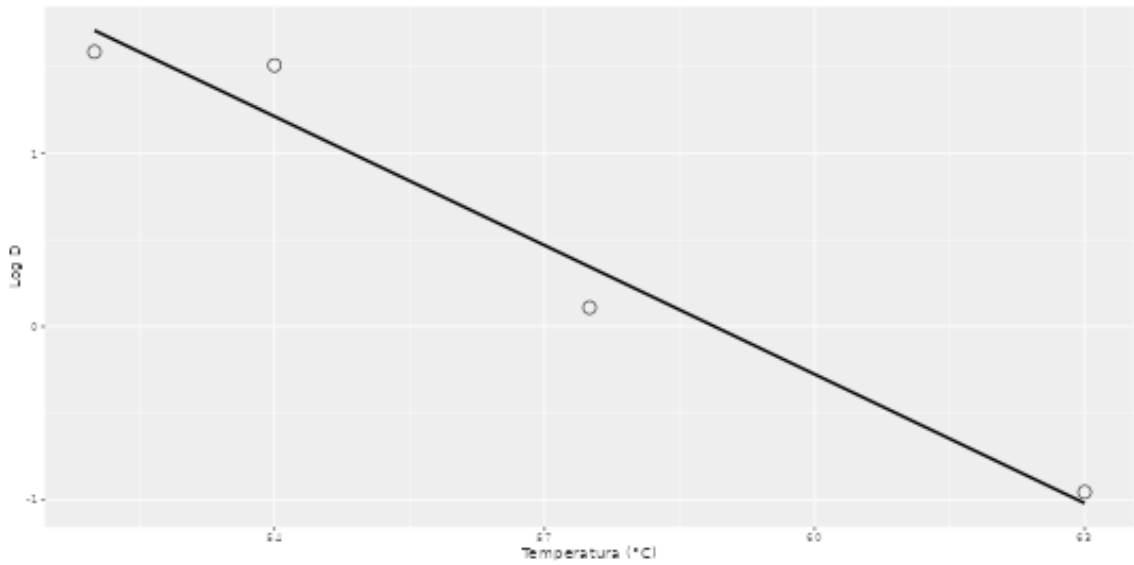


Figura 20. Modelo secundario de la inactivación térmica In vitro de *L. monocytogenes* obtenido de Bioinactivation4: adición de FIV 0.06 %.