



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

CUANTIFICACION "IN VITRO" DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAVANDULA LUISIERI

"IN VITRO" EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE
ESSENTIAL OIL OBTAINED FROM LAVANDULA LUISIERI

Autor/es

Silvia Beaumont Romea

Director/es

M^a Carmen Rota García
Susana Lorán Ayala

Facultad de Veterinaria

2017

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de este trabajo, las Dras. M^a Carmen Rota García y Susana Lorán Ayala por sus ánimos, y, sobre todo por dedicarme su tiempo y sus conocimientos.

Al grupo consolidado de investigación GATHERS y el soporte económico de MINECO-FEDER (Proyecto CTQ20015-64049-C3-2-R), de la Universidad de Zaragoza (Proyecto 2014/0019) y de los grupos consolidados A01 y E52 (Gobierno de Aragón – Fondo Social Europeo).

A Jesús Burillo investigador del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, por facilitarme amablemente el aceite esencial utilizado.

A toda mi familia, en especial a mis padres y mi hermana, quienes han confiado en mí desde el primer día que comencé esta carrera, dándome cariño y comprensión en todo momento. Gracias a ellos todo esto ha sido posible.

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
1.1 Antimicrobianos.....	6
1.2 Aceites esenciales (AEs).....	7
1.3 <i>Lavandula luisieri</i>	9
1.3.1 Composición química del aceite esencial de <i>Lavandula Luisieri</i>	10
1.3.2 Usos y aplicaciones.....	10
1.4 Técnicas para la detección de la acción antimicrobiana.....	11
2. Justificación y objetivos.....	14
3. Materiales y métodos.....	16
3.1 Aceite esencial (AE).....	16
3.2 Cepas bacterianas.....	16
3.3 Revivificación de las cepas bacterianas.....	17
3.4 Estudio de la actividad antimicrobiana mediante el método de dilución en caldo.....	18
4. Resultados y discusión.....	20
5. Conclusiones.....	25
6. Aportaciones en materia de aprendizaje.....	27
7. Bibliografía.....	28

Resumen.

El uso de compuestos antimicrobianos naturales está despertando un gran interés en la industria alimentaria como alternativa al uso de conservantes de síntesis química. La razón la encontramos en que estos últimos, están siendo rechazados por los consumidores dada la percepción que existe sobre los efectos perjudiciales que su uso genera en la salud. Además, la creciente demanda de alimentos más frescos y naturales, junto con la existencia de regulaciones alimentarias cada vez más estrictas, han derivado en una búsqueda de sustancias naturales que puedan mejorar la seguridad y calidad de los alimentos.

En este trabajo, se evalúa la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial (AE) de *Lavandula stoechas* subespecie *luisieri* (Rozeira) Riv-Mart, extraído mediante la técnica de hidrodestilación. Se trata de una planta endémica de la Península Ibérica cuya composición rica en derivados del necrodano, la hace diferente del resto de Lavandulas, aportándole atipicidad y por lo tanto interés en su estudio.

Las bacterias objeto de estudio fueron cuatro Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* meticilina resistente (MRSA) y *Enterococcus faecium*) y tres Gram negativas (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*). Se utilizó la técnica cuantitativa de dilución en caldo para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones del AE frente a cada una de ellas, y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). El extracto natural mostró unos resultados más eficaces frente a las bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas, siendo *S.aureus* la más sensible y *S. Enteritidis* junto con *E. coli* las más resistentes.

Con estos resultados se puede concluir que el AE de *Lavandula luisieri* podría ser utilizado como alternativa al uso de aditivos sintéticos en la industria alimentaria, si bien, es necesario ampliar el estudio y conocer cuál es su comportamiento en la matriz alimentaria.

Abstract.

The use of natural antimicrobial compounds is gaining much attention in food industry. This is due to the negative impact in consumers that nowadays possess chemical synthesis compounds which are thought to be dangerous for human health. In addition, the growing demand of fresh and natural food and strict food regulations have derived in a search of natural substances which improve the safety and food quality.

The *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil (EO) of *Lavandula stoechas* subspecies *luisieri* (Rozeira) Riv.-Mart. has been studied. This EO has been obtained by hydrodistillation (HD). The plant is endemic of Iberian Peninsula and its chemical composition presents high level of necrodane compounds, so, it makes it different of the rest of Lavandulas, being more atypical and interesting to study.

The antimicrobial activity of the EO has been evaluated against four Gram positive strains (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus metilicina* resistente (MRSA) and *Enterococcus faecium*) and three Gram negative strains (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*). The oil was tested by the broth dilution method, by adding growing concentrations of the EO tested. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined, the results showed better effects against Gram positive than Gram negative strains, being *S. aureus* more sensible whereas *S. Enteritidis* and *E.coli* are stronger.

We can conclude that EOs of *Lavandula luisieri* could be used as an alternative of synthetic additives in food industry. However, it is necessary more studies to understand the behavior of these EOs in the food matrix.

1. Introducción

En los últimos años, se ha experimentado un aumento de la preocupación, tanto por parte la industria alimentaria y los organismos de control, como por los consumidores, sobre la seguridad de los alimentos que se consumen, y el tiempo en el que éstos mantienen óptimas sus características organolépticas. Aunque el tiempo de vida útil de un alimento puede depender de diferentes agentes de naturaleza física, química y/o microbiológica, la principal causa de deterioro se asocia a la acción de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) dada su elevada tasa de crecimiento en condiciones adecuadas (Alzamora *et al.*, 2001).

Además de la presencia de microorganismos alterantes responsables de provocar el deterioro en los alimentos, también preocupa la existencia de microorganismos patógenos, los cuales, a través de las distintas fases del proceso productivo, pueden llegar a los alimentos pudiendo ocasionar un riesgo para la salud. En la actualidad, las enfermedades de transmisión alimentaria, siguen siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo, destacando la enfermedad diarreica o hídrica de origen alimentario, la cual se cobra la vida de 2,2 millones de personas cada año (OMS, 2015). Estos hechos unidos a las posibles pérdidas económicas que supone el deterioro de los alimentos tanto para fabricantes, como para distribuidores y consumidores, hacen esencial el establecimiento de medidas de prevención y control de los microorganismos responsables de los procesos de contaminación y alteración de los alimentos (Wu *et al.*, 2015).

Asimismo la industria alimentaria debe garantizar el cumplimiento de unos criterios microbiológicos, tanto para el control de todos aquellos microorganismos indicadores de falta de higiene en el proceso de elaboración, como patógenos responsables de toxiinfecciones alimentarias (Gyawali e Ibrahim, 2014).

Las tecnologías de conservación tradicionales (térmicas y no térmicas) utilizadas en la industria alimentaria, son capaces de inhibir el crecimiento de estos agentes microbianos, pero únicamente los tratamientos térmicos intensos garantizan la completa seguridad del alimento (Morata, 2010). En este sentido, también se utilizan aditivos alimentarios la mayoría obtenidos por síntesis química, los cuales generan una gran preocupación y desconfianza en algunos consumidores. Es por esto, que el sector agroalimentario busca nuevas alternativas de conservación que se adapten mejor al tipo

de alimento demandado por el consumidor, ofreciendo productos más naturales de calidad, seguros y poco procesados (Cubillo, 2007).

En los últimos años se ha generado un gran interés sobre la utilización de sustancias antimicrobianas naturales extraídas a partir de distintas variedades de hierbas, plantas, y especias, y por ello en la actualidad se están estudiando entre otros sus efectos bacteriostáticos, bactericidas, fungistáticos y fungicidas. Se pretende conseguir una interacción sinérgica o aditiva con otros métodos, que permitan controlar la población microbiana y así evitar la aplicación de un solo método más intenso que pueda afectar a la calidad sensorial y nutritiva (tratamientos térmicos). De esta forma se podrán obtener alimentos menos procesados y más naturales, tal y como demanda el consumidor (Beuchat y Golden 1989).

1.2. Antimicrobianos

Hoy en día, los conservantes, compuestos químicos que inactivan o retardan el crecimiento de microorganismos, continúan siendo los aditivos más utilizados en la industria alimentaria. Tanto los antimicrobianos de síntesis química comúnmente utilizados, como los de origen natural, tienen la misma función, con la diferencia de que estos últimos permiten obtener “alimentos más naturales y menos procesados” al mismo tiempo que tratan de mantener los costes de formulación, procesado y comercialización (Cubillo, 2007). Ello sumado a la amplia disponibilidad y biodegradabilidad de los antimicrobianos naturales, en especial los extraídos de plantas, ha generado un creciente interés por ellos (Galvagno *et al.*, 2007).

Globalmente, las plantas sintetizan más de 100.000 compuestos naturales de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios, los cuales ejercen un papel importante en la defensa natural frente a cualquier ataque microbiano, de insectos o de otros animales, y se diferencian con los metabolitos primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad de compuestos se debe principalmente a un proceso evolutivo conducido por la selección que ha permitido a las plantas, adquirir una defensa mejorada frente a cualquier ataque externo (Domingo y López-Brea, 2003).

En función de los métodos utilizados para la obtención de los extractos de plantas, se obtendrá un producto diferente con mayor o menor concentración de los diferentes metabolitos secundarios, y por lo tanto con diferentes propiedades. Particularmente,

destacan los AEs obtenidos de plantas aromáticas y medicinales, los cuales han recibido gran atención y están siendo objeto de numerosas investigaciones.

1.3. Aceites esenciales (AEs)

Son compuestos líquidos oleosos con alto potencial aromático, resultantes de la mezcla de sustancias químicas bioactivas, generadas por más de 17.000 plantas comúnmente procedentes de la familia de las angiospermas (Zeng *et al.*, 2016). Solubles en solventes orgánicos pero insolubles en agua, transfieren aroma, color, sabor y otras propiedades físicas características de cada planta (Camarena, 2016).

La cantidad y calidad de los principios activos, o metabolitos secundarios que contiene un AE, dependen de una serie de factores intrínsecos y extrínsecos como: genotipo, nutrientes, tipo de suelo, agua, sol, viento y prácticas agrícolas, así como el método de obtención, dando lugar a AEs con distinta composición y con ello mayor o menor potencial biológico (Galvagno *et al.*, 2007).

Para su extracción y según la especie, se utiliza la planta entera o alguno de sus órganos, como por ejemplo son el tallo, las hojas, las semillas, las raíces o los frutos. En cuanto a las técnicas de extracción utilizadas, se dividen en procedimientos físicos como la extrusión, y químicos como la extracción con solventes y/o diferentes clases de destilación (Zuzarte *et al.*, 2012).

La hidrodestilación es un proceso comúnmente utilizado descrito por la European Directorate for the Quality of Medicines (1975), para la extracción de AEs de plantas aromáticas y medicinales, ya que se considera que el vapor generado durante la ebullición de la materia vegetal, ayuda a desplazar el oxígeno atmosférico reduciendo la oxidación de los compuestos (Zeng *et al.*, 2016). Sin embargo, el sobrecalentamiento del aceite recolectado durante el proceso, provoca la pérdida de algunos de sus componentes termolábiles (Wu *et al.*, 2015).

En este sentido, se están estudiando nuevos procedimientos que permitan optimizar el proceso de extracción. Por ello algunas técnicas como el método Soxhlet, ultrasonidos, ondas microondas, o la destilación con maceración en frío, ya muestran ventajas y comienzan a reemplazar a los procesos más tradicionales y comunes como la hidrodestilación (Wu *et al.*, 2015). Además, en la última década, se viene desarrollando un nuevo método para la extracción de compuestos aromáticos con gases licuados en condiciones supercríticas, siendo el más común el CO₂. El fraccionamiento supercrítico

antidisolvente es una nueva tecnología sostenible para la obtención de extractos vegetales, más eficaz y limpia, por lo que presenta una serie de ventajas frente a la hidrodestilación y a la extracción con solventes (García vallejo *et al.*, 1992).

En cuanto a la composición química, varios estudios establecen que los principales constituyentes de los AEs son los terpenos, en mayor proporción, así como cetonas, aldehídos, alcoholes, ésteres y fenoles los cuales aportan el perfil aromático (Cubillo, 2007). Aunque la actividad antimicrobiana se asocia principalmente a compuestos fenólicos específicos (Zengin y Baysal, 2014), todavía no se sabe con total certeza cómo influyen las mezclas del resto de componentes minoritarios, los cuales ejercen un papel importante dentro del mecanismo de defensa de la planta (Chrysargyris *et al.*, 2017). Además, la efectividad de estas sustancias naturales puede variar en función de la capacidad para inhibir reacciones bioquímicas específicas de la célula atacada (Sauceda, 2011) y se relaciona con formación de poros en la membrana, pérdidas de electrolitos, y por último desestabilización y muerte de la bacteria (Cubillo, 2007).

Por otro lado, algunas sustancias como eugenol, citral, pineno, timol, ácido cinámico o carvacrol, presentes en especias o condimentos aromáticos y otras más comunes como 1,8-cineol, α -pinenos, limoneno y linalol en AEs, caracterizadas por poseer una gran capacidad antimicrobiana, han sido estudiadas para valorar su efecto en microorganismos de interés en calidad y seguridad alimentaria, demostrándose su efectividad contra algunas bacterias, Gram-negativas y Gram-positivas, patógenas y alterantes transmitidas por alimentos (Asensio, 2013; Baldovini *et al.*, 2005).

También se ha demostrado, que los compuestos terpénicos producen efectos sinérgicos y aditivos sobre agentes patógenos responsables de toxiinfecciones alimentarias. Estos compuestos alteran la membrana externa y la estructura de las células bacterianas, causando la fuga de compuestos intracelulares y provocando un desequilibrio osmótico que altera su integridad y funcionalidad, siendo en general más efectivos frente a bacterias Gram-positivas que frente a bacterias Gram-negativas debido a diferencias en la pared celular (Zengin y Baysal, 2014). Las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa que rodea la pared celular y que actúa como una fuerte barrera de permeabilidad (Ratledge y Wilkinson, 1988). Además también puede inhibir la síntesis de ADN, ARN, lipopolisacáridos o proteínas de la célula bacteriana (Cubillo, 2007).

El interés que despiertan estos extractos de plantas hace que hasta la fecha sean numerosos los estudios científicos que demuestran los efectos bioactivos de diferentes

AEs. De este modo y tal y como se ha mencionado anteriormente es bien conocido el hecho de que su composición, juega un papel determinante en dicha actividad. Por todo ello, diversos autores señalan la necesidad de estudiar el efecto antimicrobiano de los distintos AEs a la vez que se establece la caracterización para conocer la concentración de cada uno de sus componentes, y así, poder ajustar y optimizar su aplicación en alimentos con el fin de prorrogar su vida útil y garantizar su seguridad (Zengin y Baysal, 2014).

1.3. *Lavandula luisieri*

Lavandula stoechas subsp. *luisieri*, o comúnmente conocida como alhucema, cantueso o espliego en las distintas zonas de origen, es una pequeña planta aromática perteneciente a la familia de las lamiáceas, la cual comprende más de 60 especies diferentes (González-Coloma *et al.*, 2011) (Figura 1).



Figura 1. Planta de *Lavandula luisieri* y detalle de su inflorescencia en forma de espiga

Endémica de la Península Ibérica, es muy común de zonas semi-áridas del sur de Portugal y occidente de Extremadura y Andalucía, siendo considerada una fuente importante de AEs bioactivos y compuestos estudiados y de gran interés en los distintos sectores industriales de España (González-Coloma *et al.*, 2011). Debido a los cruces e hibridaciones, se han generado distintas variedades de lavandas las cuales se han adaptado a las condiciones climáticas de cada zona, aunque generalmente todas sobreviven en climas áridos o semiáridos con suelos ácidos (González-Coloma *et al.*, 2006).

Con tallo leñoso, cilíndrico en su base y prismático en las partes jóvenes, tiene hojas de color grisáceo—verdosas o verdes claras, y florece durante los meses de marzo

a septiembre. Además, su inflorescencia en forma de espiga contiene flores violáceas o púrpuras asentadas sobre un pedúnculo más alto que ancho (Vallejo, 1992).

1.3.1. Composición química del aceite esencial de *Lavandula luisieri*

Estudios previos realizados por Julio *et al.*, (2014) sobre la caracterización del AE y extractos supercríticos de *Lavandula luisieri*, cultivada en Toledo y Portugal, han permitido conocer la gran cantidad de compuestos químicos que contiene dicha planta. Entre sus componentes mayoritarios, se encuentra el 1-8 cineol y la fenchona, cuya concentración es mayor en muestras secas que en muestras húmedas, seguidos del β -selineno, alcanfor, cineol, viridiflorol, y acetato de sesquiterpeno respectivamente (González-Coloma *et al.*, 2011).

Aunque se han publicado varios estudios sobre la composición química, pocos informan sobre la fracción volátil que contiene y que distingue a *Lavandula luisieri* del resto de plantas pertenecientes al género *Lavandula*. Los principales constituyentes que aportan atipicidad a este AE, y cuya presencia hay que destacar, son los terpenos irregulares derivados del necrodano, más específicamente el trans- α -necrodol y el trans- α -necrodil, identificados en 1994, seguidos del cis- α -necrodilo, descubierto diez años más tarde en 2004 (Asensio, 2013). Dichos compuestos derivados del necrodano han sido encontrados previamente en secreciones del escarabajo *Necrodes surinamensis* y sugieren un papel defensivo característico únicamente de esta planta y por lo tanto de su AE (González-Coloma *et al.*, 2011).

1.3.2. Usos y aplicaciones

Aunque las Lavandulas han sido generalmente utilizadas como plantas ornamentales y para la obtención de esencias y perfumes, la especie *L. luisieri* no es muy apreciada dentro del sector cosmético y perfumista debido a su elevado contenido en alcanfor (Zuzarte *et al.*, 2012).

El alto contenido de su AE en fenilpropanoides, compuestos fenólicos sintetizados como metabolitos secundarios, característico de los extractos obtenidos de plantas de la familia de las lamiáceas (Raut y Karuppaiyl, 2014), lo convierte en un aceite medicinal con propiedades antiinflamatorias, digestivas, analgésicas, antiacnéicas y que combate vértigos y flatulencias. También existen estudios que hablan sobre una

comprobada acción hipoglucemiante, aunque se requieren dosis elevadas para lograr dicho efecto (Vallejo, 1992).

En un estudio llevado a cabo para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica del AE de *L. luisieri*, así como su citotoxicidad para explorar el potencial de su uso en la industria farmacéutica y cosmética, se destacó la importancia de los monoterpenos, los cuales aportan efectos tóxicos a las células cuanto mayor es su concentración (Zuzarte *et al.*, 2012). También se ha estudiado su eficacia como repelente e inhibidor del asentamiento de insectos (Jaramillo-Colorado *et al.*, 2016).

En cuanto a la actividad antifúngica, se ha demostrado que aquellos aceites con mayor contenido en necrodano, son más eficaces contra cepas de hongos y levaduras implicados en diferentes infecciones humanas transmitidas por alimentos contaminados, como son los pertenecientes al género *Aspergillus*, cuya problemática radica también en las micotoxinas que algunas de las especies de este género pueden sintetizar y que presentan una elevada toxicidad (Zuzarte *et al.*, 2012).

La escasa información encontrada sobre la actividad de este AE, evidencia una fuerte actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas así como Gram-negativas (Helwigh *et al.*, 2012; Zuzarte *et al.*, 2012). Sin embargo son necesarios más estudios que confirmen esta actividad y la evalúen frente a otros microorganismos de interés.

1.4. Técnicas para la detección de la actividad antimicrobiana

Dada la inexistencia de un método oficial, se utilizan diversos métodos para determinar la susceptibilidad bacteriana, *in vitro*, frente a distintos agentes microbianos, y cuya selección se asocia en numerosas ocasiones al coste y la demanda de la técnica en el momento (Faleiro, 2011). En general, estos procedimientos se dividen en métodos cualitativos y cuantitativos, y los más habitualmente utilizados son: las técnicas de difusión en disco, dilución y técnicas autobiográficas (Cavaliere *et al.*, 2005; Faleiro, 2011), cuyos fundamentos y desarrollo se describen ampliamente en la bibliografía existente (Barry, 1976).

Un método cualitativo es el test de difusión en agar, comúnmente utilizado en ensayos rutinarios para la detección de bacterias de crecimiento rápido así como para bacterias patógenas fastidiosas (Prat, 2006), debido a su sencillez, eficacia y bajos costes

en relación con otros métodos (Faleiro, 2011). Utilizado como prueba de screening, su objetivo es verificar la actividad antibacteriana de distintos AEs de tal forma que se obtenga información previa a los estudios cuantitativos (Burt, 2004). El mayor o menor grado de actividad de los AE se revela por la formación de un halo de inhibición alrededor del disco impregnado con el antimicrobiano objeto de estudio. El diámetro del halo medido en mm (incluyendo el diámetro del disco) nos indicará el grado de actividad (Faleiro, 2011) (Figura 2).

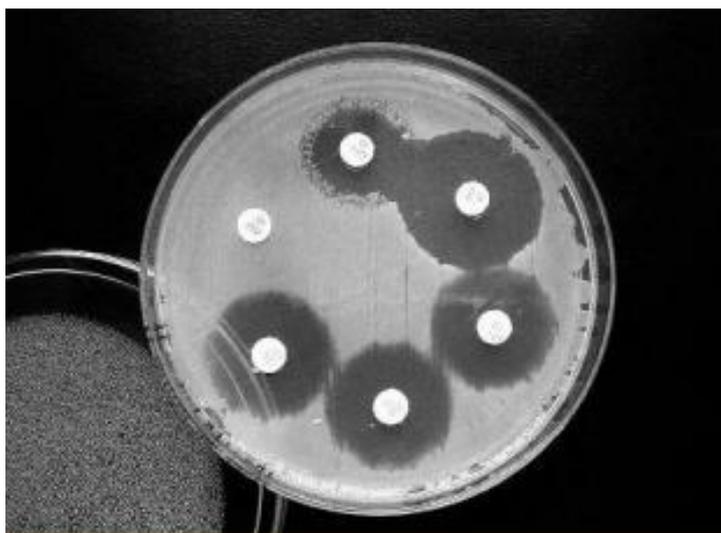


Figura 2. Método de difusión en agar. Fuente: Cona (2002).

Tras haber sido estudiadas las distintas variables influyentes como la temperatura, el medio seleccionado, o el volumen de agar utilizado, el método finalmente recomendado por el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad del NCCLS se basa en el descrito por Bauer et al (1966), conocido como método de Kirby-Bauer (Cavalieri *et al.*, 2005; Faleiro, 2011).

El medio de cultivo utilizado es el Agar Mueller-Hinton, ya que presenta un crecimiento satisfactorio para la mayoría de los microorganismos aunque especies como *Haemophilus spp*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *S. viridans* y *Streptococcus β -hemolítico* requieren de suplementos u otros medios específicos para crecer. En cuanto al pH del medio debe ser entre 7,2-7,4 para evitar la inhibición o potenciación de los AEs. Finalmente, también es importante controlar los cationes Mg^{+} y Ca^{+} ya que un exceso de estos en el agar puede alterar el diámetro del halo de inhibición (Ramírez *et al.*, 2009).

En cuanto a los métodos cuantitativos o métodos de dilución en caldo, sirven para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo, así como la concentración mínima bactericida (CMB) o concentración más baja capaz de destruir el 99,9% de la concentración microbiana (Ramírez *et al.*, 2009).

Estos métodos se clasifican en métodos de dilución en tubos (macrodilución) o métodos de dilución en microplacas (microdilución) y en ambos casos se utilizan concentraciones crecientes de AEs. En el caso de la macrodilución, se utiliza para cada microorganismo una batería de tubos con un volumen determinado de caldo de cultivo, mientras que para la microdilución, son utilizadas microplacas con un total de 96 pocillos en cada una, en donde se inoculan los diferentes microorganismos. Para la preparación del inóculo se debe partir de un cultivo fresco y obtener una suspensión en caldo Mueller-Hilton a una turbidez equivalente a la del estándar 0,5 de la escala McFarland. La CLSI recomienda que se debe partir de una concentración de 1×10^8 ufc/mL, para que la concentración final en cada pocillo de la placa de microtitulación sea de 5×10^5 ufc/mL, aunque se aceptan concentraciones entre 3 y 7×10^5 ufc/mL (García *et al.*, 2000). Esta concentración bacteriana puede ser ajustada por espectrofotometría mediante la medida de la Absorbancia o Transmitancia. Tanto la CMI como la CMB son determinadas después de la incubación mediante observación visual o espectrofotometría (McDermott *et al.*, 2005).

2. Justificación y objetivos

El uso de conservantes con el fin de controlar la presencia de microorganismos, causantes de toxiinfecciones, así como, de alteraciones en los alimentos es una práctica común en la industria alimentaria. Debido a la creciente preocupación sobre los compuestos químicos usados para tal fin, junto con el incremento de la demanda de los alimentos mínimamente procesados por parte de los consumidores, se están estudiando posibles alternativas, como los antimicrobianos naturales procedentes de plantas, que puedan sustituir a estos compuestos de síntesis (Rivera *et al.*, 2004).

De este modo surge la necesidad de evaluar la eficacia de dichos antimicrobianos mediante ensayos *in vitro*, así como en matrices alimentarias de productos alimenticios que permitan obtener información valiosa acerca de la efectividad del compuesto y, evaluar de igual manera, las variables que afectan a su actividad (Sauceda, 2011).

Aunque existen numerosos estudios que demuestran los efectos inhibitorios de los AEs extraídos de una gran variedad de plantas aromáticas, poco se sabe acerca del efecto antibacteriano del AE obtenido de *Lavandula luisieri* cultivada en Aragón.

Este trabajo se desarrolla dentro del Proyecto CTQ2015-64049-C3-2-R, (MINECO) titulado: Tecnologías supercríticas en el desarrollo de bioplaguicidas: formulación, diversificación e impacto ambiental, coordinado por la Dra Ana M^a Mainar (Facultad de Químicas, Universidad de Zaragoza). Uno de los objetivos del proyecto es el estudio de la actividad antimicrobiana de extractos tradicionales (obtenidos con solventes y AEs) y extractos Supercríticos de varias plantas adaptadas a cultivo experimental, por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, entre las que se encuentra *L. Luisieri*. Hasta el momento se ha estudiado la actividad cualitativa mediante el método de difusión en disco del AE obtenido de esta planta y cuantitativa de diferentes extractos Supercríticos; así como la composición química de los diferentes extractos obtenidos.

Por todo ello se plantea como objetivo general de este trabajo contribuir al conocimiento de la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, adaptada a las condiciones edafológicas de Aragón, frente a bacterias de interés en calidad y seguridad alimentaria.

Este objetivo se pretende llevar a cabo mediante los siguientes objetivos parciales:

- Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana *in vitro* del AE obtenido de *L. luisieri* mediante la determinación de la CMI y CMB.
- Correlación de dicha actividad con los principales componentes químicos identificados en el AE de *L. luisieri*.
- Comparación de la actividad del AE con la de otros extractos obtenidos de esta misma planta y evaluados en estudios anteriores.

3. Materiales y métodos

Para determinar la actividad antimicrobiana del AE se llevó a cabo un ensayo *in vitro* mediante la técnica de dilución en caldo. A partir de este estudio se pudo conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Lavandula luisieri* frente a distintos microorganismos de interés en calidad y seguridad alimentaria.

3.1. Aceite esencial (AE)

El AE utilizado ha sido obtenido de la especie *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) originaria de Toledo y adaptada durante el periodo 2008-2009 a cultivo experimental en el campo de Cariñena (Zaragoza). Su extracción se llevó a cabo por Jesús Burillo en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) mediante la técnica de hidrodestilación en un equipo tipo Cleavenger, según el método descrito por *European Directorate for the quality of Medicines* (1975). El aceite obtenido se conservó durante todo el ensayo en viales ámbar en oscuridad y a temperatura de refrigeración.

3.2. Cepas bacterianas

La actividad bacteriostática y bactericida del AE de *Lavandula luisieri* se evaluó frente a un total de 7 cepas bacterianas, siendo 4 de ellas Gram-positivas y las otras 3 Gram-negativas (Tabla 1). Todas ellas se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), a excepción de la cepa C2944 facilitada amablemente por la Dra Torres (Universidad de la Rioja)

Tabla 1. Cepas bacterianas objeto de estudio

Bacterias Gram positivas (G+)	Cepa (nº)
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 934
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 435
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA)	C2944
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 410
Bacterias Gram positivas (G+)	Cepa (nº)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	CECT 4594
<i>Salmonella</i> Enteritidis	CECT 4155
<i>Escherichia coli</i>	CECT 516

3.3. Revivificación de las cepas

Las cepas estudiadas son mantenidas a -80°C en crioviales con líquido criogénico y anillos porosos en los que las bacterias se encuentran adheridas. Por lo que, el primer paso fue la revivificación de las cepas, mediante dos pasos en medio líquido y sólido.

Para ello se sembró un anillo poroso de cada una de las cepas objeto de estudio, en tubos con caldo TSB (*Trypticase Soja Broth*) (Oxoid, Madrid, España) que se incubaron durante 24h a 37°C (estufa Selecta, Abrera, España). Tras la incubación se sembró por agotamiento en placa, en medio TSA (*Trypticase Soja Agar*) (Oxoid, Madrid, España), que se incubó en las mismas condiciones (Figura 3).

Determinación de la concentración bacteriana

Para la realización de los ensayos, se sembró una colonia del medio TSA de 24h de incubación en caldo TSB y se incubó a 37°C durante 16 horas (*overnight*) con el fin de estudiar el microorganismo al final de su fase exponencial de crecimiento.

Dada la necesidad de estandarizar las concentraciones bacterianas utilizadas en los ensayos, a partir del cultivo obtenido, se midió la absorbancia de cada microorganismo por espectrofotometría (espectrofotómetro Jenway 3600, Tirana, Albania) a longitud de onda de 620 nm ajustándola a valores de entre 0,08 y 0,1, que corresponden con una concentración aproximada de 1×10^8 ufc/mL y una turbidez de 0,5 escala McFarland Turbidity (Standart N1 0,5, Beeton Dickinson and Company, Madrid, España).

Paralelamente, se realizaron diluciones decimales seriadas en agua de peptona al 0,1% y posterior siembra en placa por homogeneización en masa y medio TSA. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C , conociendo así de forma exacta la concentración microbiana de partida y poder correlacionar la absorbancia de cada cepa con el recuento bacteriano.

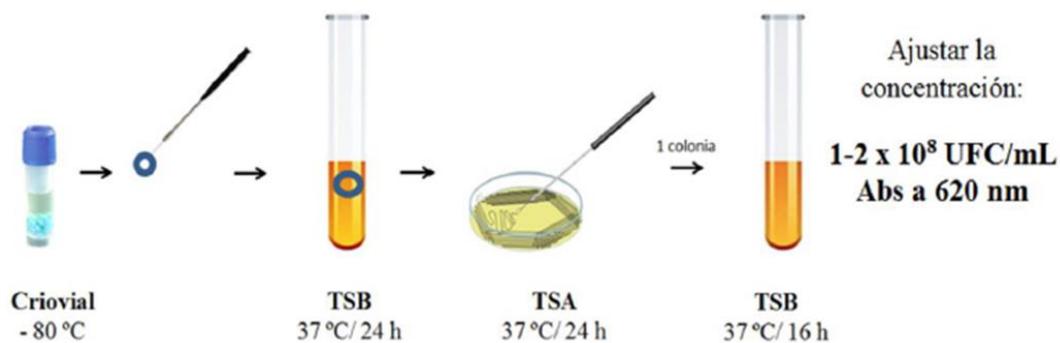


Figura 3. Revivificación de las cepas bacterianas

A partir de esta concentración se preparó mediante dilución en caldo TSB, la concentración de estudio de 1×10^6 ufc/mL (aproximadamente).

3.4. Estudio de la actividad antimicrobiana mediante el método de dilución en caldo

La técnica de dilución en caldo (adaptado del *Clinical & Laboratory Standards Institute*, CLSI), permite conocer la CMI o concentración más baja de AE que inhibe el crecimiento microbiano, así como la CMB o concentración mínima de AE que destruye al 99,9% de la población microbiana inicial. Aunque algunos autores describen distintas metodologías para conocer la actividad antimicrobiana de AEs, no existe un método estandarizado, por lo que resulta difícil comparar los resultados entre diferentes estudios. Por esta razón, en este estudio se siguió la metodología descrita en el CLSI, métodos estandarizados para el cálculo de la actividad antimicrobiana de antibióticos de uso en medicina humana y animal.

Por ello, la concentración del inóculo de estudio para cada una de las cepas bacterianas se ajustó a 1×10^6 ufc/mL (aproximadamente) mediante dilución, en caldo TSB, según la metodología descrita en el punto anterior. Además al inóculo se le adicionó etanol al 3% con el fin de facilitar la disolución posterior del AE, comprobando que esta concentración del disolvente no ejercía efecto sobre las bacterias.

A continuación se prepararon dos series de 8 tubos por cepa con 1 mL de caldo TSB estéril, al que se añadió 1 mL del inóculo anterior y concentraciones crecientes de AE: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7,5; 15 y 30 μ l/mL. . El inóculo (1×10^6 ufc/mL) se diluyó $\frac{1}{2}$, de modo que la concentración bacteriana de estudio fué de 5×10^5 ufc/mL, concentración recomendada por CLSI.

En todos los ensayos se añadió un control positivo (inóculo + etanol) y un control negativo (inóculo + etanol + 5 μ l de AE de *Satureja montana*, aceite cuya marcada

actividad antimicrobiana ha sido ampliamente demostrada (Rota *et al.*, 2004; Mihajilov-Krstev *et al.*, 2014).

A continuación todos los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas en baño termostático en agitación. Tras el periodo de incubación se determinó la CMI del AE frente a los microorganismos por la ausencia de turbidez en los tubos, mientras que, para determinar la CMB, se sembraron 100 µl de inóculo los dichos tubos sin turbidez en medio TSA, homogeneizando con un asa de Drigalsky. Tras incubar a 37°C durante 24 horas se observó el número de colonias y se determinó la CMB.

4. Resultados y discusión

Mediante la técnica de dilución en caldo, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* cuantitativa del AE de *Lavandula luisieri* frente a siete cepas bacterianas de interés en seguridad y calidad alimentaria: En primer lugar se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AE en cada uno de los microorganismos objeto de estudio, para posteriormente, y en el caso de que hubiera inhibición microbiana, calcular la concentración mínima bactericida (CMB) siendo en nuestro caso necesario para 5 de las 7 bacterias estudiadas (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. CMI y CMB ($\mu\text{l}/\text{mL}$) de AE de *L. luisieri* frente a bacterias Gram-positivas

Cepas gram +	CMI ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	CMB ($\mu\text{l}/\text{mL}$)
<i>L. monocytogenes</i>	0,5	3
<i>E. faecium</i>	0,5	1
<i>S. aureus</i>	0,5	0,5
<i>S. aureus</i> (MRSA)	1	1

Tabla 3. CMI y CMB ($\mu\text{l}/\text{ml}$) de AE de *L.luisieri* frente a bacterias Gram-negativas.

Cepas gram -	CMI ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	CMB ($\mu\text{l}/\text{mL}$)
<i>S. Typhimurium</i>	5	5
<i>S. Enteritidis</i>	>30	-
<i>E. coli</i>	>30	-

Los resultados obtenidos variaron ampliamente según el tipo de cepa evaluada con valores de MIC que oscilaron entre 0,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$ para *S. aureus* hasta > 30 $\mu\text{l}/\text{mL}$ para *S. Enteritidis* y *E. coli*. En este sentido es importante destacar que el estudio de la actividad antimicrobiana de un AE es difícil debido a la complejidad de su naturaleza hidrofóbica así como su alta viscosidad, propiedades que en ocasiones pueden interferir en la correcta dilución o distribución del aceite en el medio. Otros factores como el tipo y volumen del medio, el solvente utilizado, la temperatura, el tiempo y la atmósfera de incubación, también han sido determinados como influyentes, y por lo tanto deben tenerse en cuenta a la hora de obtener resultados fiables (Cubillo, 2007). Además, debido a las diferencias en el método utilizado, ya que no existe uno estandarizado, los resultados obtenidos entre trabajos no siempre pueden ser fácilmente comparables.

Comparando las dos tablas, se observa que el microorganismo más sensible fue *S. aureus* cuyos valores de CMI y CMB fueron de 0,5 µl/mL en ambos casos, es decir, fue inhibitorio y bactericida a la concentración más baja de AE utilizada en el ensayo. Sin embargo, la cepa de *S. aureus* meticilin resistente necesitó una concentración de AE ligeramente superior a la cepa CECT, requiriendo 1 µl/mL tanto para inhibir como para destruir la bacteria.

También han mostrado gran sensibilidad al AE, *E. faecium* y *L. monocytogenes* siendo inhibidas a 0,5 µl/mL, aunque la concentración bactericida fue algo superior, de 1 y 3 µl/mL, respectivamente.

Por otro lado los microorganismos más resistentes fueron *S. Enteritidis* junto con *E. coli*, los cuales muestran resistencia a concentraciones mayores de 30 µl/mL, las más elevadas utilizadas, y por lo tanto se descarta la capacidad inhibitoria y bactericida del AE en ambas cepas bacterianas.

Con estas afirmaciones se refuerza la idea de que los microorganismos más sensibles son las bacterias Gram-positivas, mientras que las Gram-negativas poseen una resistencia intrínseca superior. Este hecho se puede asociar a la existencia de una superficie hidrofílica en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, la cual permite crear una barrera contra agentes tóxicos, como son las macromoléculas hidrofóbicas presentes en numerosos constituyentes de los aceites, las cuales son incapaces de penetrar en el microorganismo (Pierre y Ryser, 2006).

Esta mayor efectividad contra bacterias Gram-positivas ya se había recogido en trabajos previos desarrollados por el mismo grupo de investigación en el que se encuadra este trabajo. Dicho trabajo se realiza como continuación al trabajo de Carod (2016) sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana cualitativa del AE de *L. luisieri*, así como de los extractos etanólicos y fracciones supercríticas de esta misma planta. Por ello, se pretende realizar una comparación de los resultados obtenidos mediante el método cualitativo de difusión en disco y la técnica cuantitativa de dilución en caldo, ya que no siempre existe una correlación en los resultados obtenidos.

En el trabajo de Carod (2016) la actividad del AE de *L. luisieri* mediante el método de difusión en agar, el AE mostró una fuerte actividad frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Typhimurium* (diámetro de halo ≥ 20 mm). Sin embargo, no mostraron actividad frente a *E. faecium* y *E. coli* (halo de inhibición ≤ 12 mm).

Por lo que la principal diferencia se encuentra con el microorganismo Gram-positivo *E. faecium*, ya que mientras que en el ensayo cualitativo el AE de *L. luisieri* mostró una actividad relativamente pequeña frente al mismo, con un diámetro de halo de inhibición <10 mm, (incluido el diámetro del halo, 6 mm) en este caso se obtuvo una inhibición completa incluso con la concentración más baja ensayada de 0,5 µl/mL (Figura 6). En el caso de *L. monocitogenes* y *S. aureus* y del mismo modo que en nuestra investigación, el AE de *L. luisieri* mostró una fuerte actividad frente a ellos, siendo sus diámetros de halo mayores a 20 mm y por lo tanto confirmando su inhibición total. Además, con la actividad frente a las bacterias Gram-negativas se pudieron observar grandes similitudes en ambos métodos, ya que aunque para *E. coli* en ningún caso se consiguió un efecto inhibitorio (Figura 4), para *S. Typhimurium* los compuestos del AE consiguieron atravesar la membrana de dicho microorganismo e inhibir su crecimiento, incluso matar al 99,9% de la población bacteriana inicial en ambos casos (Figura 5).

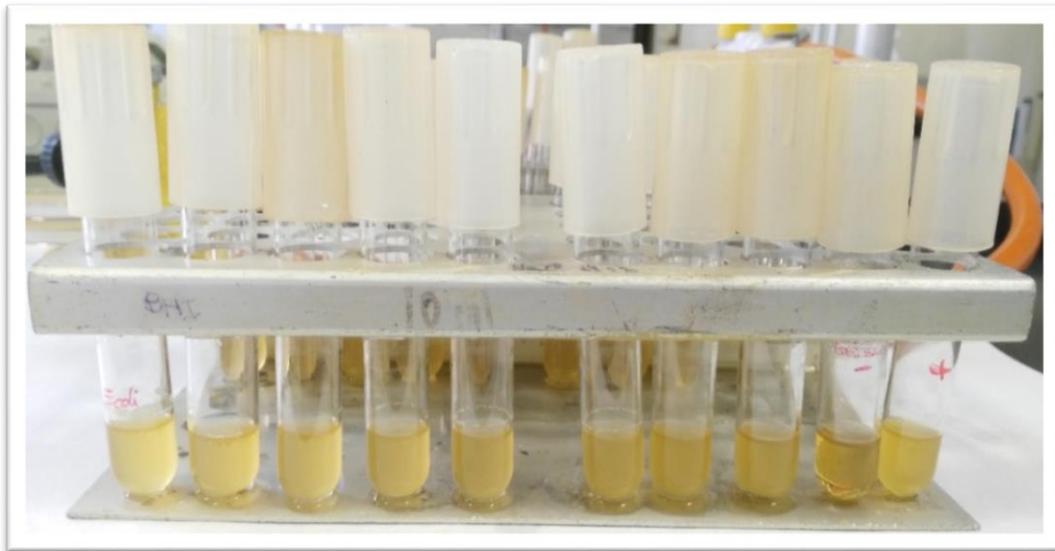


Figura 4. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del AE de *L. luisieri* frente a *Escherichia coli*



Figura 5. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del AE de *L. luisieri* frente a *Salmonella Typhimurium*

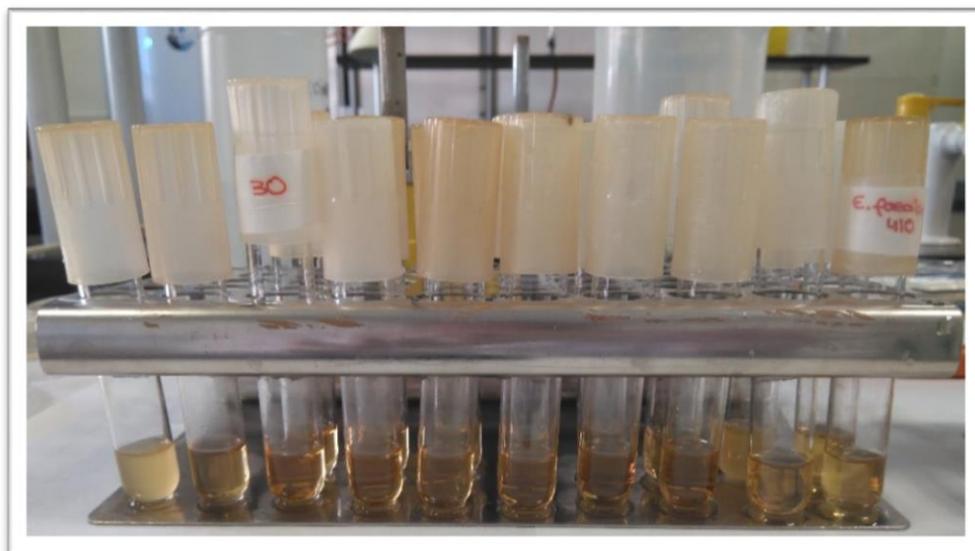


Figura 6. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del AE de *L. luisieri* frente a *Enterococcus faecium*

En relación al género *Salmonella*, el estudio cuantitativo muestra una gran diferencia entre el comportamiento de las dos cepas estudiadas, ya que frente a la inhibición de *S. Typhimurium*, se encuentra la ineficacia del AE de *L. luisieri* para el serotipo *S. Enteritidis*, incluso con concentraciones muy elevadas ($>30 \mu\text{l/mL}$). Cabe destacar el hecho de que estudios previos llevados a cabo por otros autores informan del efecto antimicrobiano frente a *S. Typhimurium* de un gran número de AEs con alto contenido en alcanfor y 1-8cineol, por lo que atribuyen dicha capacidad inhibitoria a la

presencia de estas sustancias en la composición química de los aceites, como es el caso del AE de *L. luisieri* (Lang *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, muestran que el AE de las especies del género *Origanum* presentan en general una gran actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas como *Salmonella* Enteritidis entre otras (Arcila *et al.*, 2004; Valles *et al.*, 2014), un hecho que podría asociarse a la gran sensibilidad de la bacteria ante la presencia de carvacrol ausente en nuestra planta y resistente a compuestos como alcanfor y 1-8cineol (Lang *et al.*, 2012).

En general, el AE de lavándula evaluado no ha dado mostrado una fuerte actividad frente a los dos serotipos de salmonella estudiados; sin embargo, el hecho de que haya sido muy efectivo frente a las bacterias Gram-positivas podría ser atribuido a su alta composición en el compuesto necrodano y sus derivados así como de otros componentes minoritarios (Arantes *et al.*, 2016; Asensio, 2013).

Estos resultados muestran la necesidad de completar los estudios de difusión en disco, con la determinación del CMI y CMB, ya que debido a la diferente capacidad de difusión de los AEs en el medio de cultivo, la composición de este último, así como la diferente velocidad de crecimiento de las bacterias, los resultados podrían no ser fiables.

5. Conclusiones

Primera: El aceite esencial de *L. luisieri* es efectivo en la inhibición del crecimiento de algunas bacterias patógenas y alterantes de los alimentos, en un grado variable según el agente bacteriano evaluado. Aunque esta actividad puede ser asociada, principalmente, al necrodano y sus derivados, identificados en el aceite esencial de la planta, son necesarios estudios que identifiquen todos los compuestos presentes en dicho aceite.

Segunda: El método cuantitativo de dilución en caldo para el estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, aporta datos más precisos para el conocimiento de dicha actividad mediante la determinación de la CMI y CMB, que el método cualitativo de difusión en disco, que podría ser utilizado como método de screening.

Tercera: Las bacterias Gram-positivas son más sensibles a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *L. luisieri* que las Gram-negativas; siendo *Staphylococcus aureus* la bacteria más sensible de las evaluadas, mientras que *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* las más resistentes; hecho que se justifica por la presencia de una membrana externa presente en estas últimas. Sin embargo, la mayor actividad mostrada frente al serotipo *Salmonella* Typhimurium con respecto al resto de bacterias Gram-negativas, señala además la importancia de determinados compuestos y su concentración en los AEs en relación a su actividad antibacteriana.

Cuarta: Estos resultados confirman el posible uso del aceite esencial de *L. luisieri* como aditivo natural, pudiendo ser una buena alternativa para el control de bacterias patógenas y alterantes de los alimentos. Si bien, la posibilidad de uso de estos aceites requiere el estudio de su comportamiento en la matriz alimentaria, así como de su aceptabilidad organoléptica por parte del consumidor.

Conclusions

First: *L. luisieri* essential oil is effective to inhibit the growth of pathogen and spoil bacteria, but its effectivity can change depending on the bacterial agent. This activity can be related with its high content in necrodane and its derivatives which are majority compounds in the plant. More studies are necessary to identify the rest of compounds in the essential oil of *L. luisieri*.

Second: The qualitative method of disc diffusion for the study of the antimicrobial activity of essential oils is valid as a first approximation. Broth dilution method provides more accurate data by quantitative determination of MIC and MBC.

Tirth: Gram-positive bacteria are more sensitive to the antimicrobial activity of *L. Luisieri* essential oil than Gram-negative. *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* were the most resistant strains whereas *Staphylococcus aureus* was the most sensitive. This is because of the external membrane in Gram-negative bacteria. However, different results for *Salmonella* Thypimurium show how important are the concentration and some EO's compounds in antibacterial activity.

Fourth: These results confirm the use of *L. luisieri* essential oil as a natural additive and it can be a good alternative for the control of pathogenic and spoilage bacteria in food. The possibility of using these oils require the study of their behavior in the food matrix, and its organoleptic acceptability by the consumer.

6. Aportaciones en materia de aprendizaje

Con la realización del Trabajo fin de Grado he adquirido nuevas competencias de las que carecía antes de empezarlo.

El trabajo en laboratorio me ha permitido aprender a establecer una rutina organizada mediante la elaboración de protocolos de trabajo. De esta forma he ido mejorando poco a poco mis habilidades para desenvolverme con más fluidez y soltura, y sentir más seguridad y confianza en mí misma.

También he aprendido a aplicar de forma autónoma conocimientos estudiados a lo largo de la carrera, teóricos y prácticos, sobre todo relacionados con la microbiología e higiene de los alimentos.

Por otro lado, tanto en el ensayo experimental en laboratorio, como posteriormente en la redacción del presente trabajo, he mejorado mi capacidad de búsqueda y síntesis de información, así como a redactar y emitir informes científicos y técnicos.

Otro aspecto muy importante ha sido aprender a reconocer errores, y sobretodo, encontrar soluciones eficaces que los eliminasen y evitasen su reaparición.

Finalmente, la motivación y las ganas de realizar un buen trabajo han sido sentimientos que me han acompañado durante todo este periodo de tiempo, y por supuesto y el más importante, la satisfacción final de haberlo realizado con éxito.

7. Bibliografía

1. Arantes, S., Candeias, F., Lopes, O., Lima, M., Pereira, M., Tinoco, T.,... Martins, M. R. (2016). Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*. *Planta médica*, 82(14), 1266-1273.
2. Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.
3. Asensio, C. M. (2013). *Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva*. (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba.
4. Baldovini, N., Lavoine-Hanneguelle, S., Ferrando, G., Dusart, G., y Lizzani-Cuvelier, L. (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry*, 66(14), 1651-1655.
5. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
6. Camarena, M. M. (2016). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica* (TFG). Escuela técnica superior de ingeniería agrónoma y del medio natural, Valencia.
7. Carod, M. (2016). *Estudio de la actividad antimicrobiana de diferentes extractos (tradicionales y supercríticos) obtenidos de Lavandula luisieri*. (TFM). Facultad de Veterinaria, Zaragoza.
8. Cavalieri J, S., Harbeck J, R., McCarter S, Y., Ortez H, J., Rankin D, I., Sautter L, R.,... Spiegel A, C. (2005). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. 1 ed.

Washington: Marie B.Coyle (ed). Available at: <http://www.worldcat.org/title/manual-of-antimicrobial-susceptibility-testing/oclc/144685597> [Accessed 15 May 2017]

9. Chrysargyris, A., Xylia, P., Botsaris, G., y Tzortzakis, N. (2017). Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*, 103, 202-212.
10. Cubillo Arrieta, M. A. (2007). Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especias naturales sobre microorganismos asociados a alimentos. (Trabajo de licenciatura). Facultad de microbiología, Costa Rica.
11. Domingo, D., y López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.
12. European Directorate for the Quality of Medicines, (1975). *European pharmacopoeia* 3, 68-71. European Maisonneuve, France
13. Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 1143-1156.
14. Galvagno, M. A., Gil, G. R., Iannone, L. J., y Cerrutti, P. (2007). Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process. *Revista argentina de microbiología*, 39(3), 170-176.
15. Garcia Vallejo, M. I. V. N., Arturo, G. V., Concepcion, M., Martin, F., Andia, J. L. C., Martinez Rodriguez, R. y Najera, S. J. (1992). Aceites esenciales de las *Lavandulas* ibéricas ensayo de la quimiotaxonomía (No. 581.19 (043.2) (086) 581.1).
16. González-Coloma, A., Delgado, F., Rodilla, J. M., Silva, L., Sanz, J., y Burillo, J. (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 1-8.

17. González-Coloma, A., Martín-Benito, D., Mohamed, N., Garcia-Vallejo, M. C., y Soria, A. C. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(8), 609-616.
18. Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
19. Helwich, B., Korsgaard, H., Gronlund, A. J., Sorensen, A. H., Jensen, A. N., Boel, J., y Hog, B. B. (2012). Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004–2009. *EFSA Supporting Publications*, 9(5).
20. Jaramillo-Colorado, B., Julio-Torres, J., Duarte-Restrepo, E., Gonzalez-Coloma, A., y Julio-Torres, L. F. (2016). Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq Colombiano. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(5).
21. Julio, L. F., Martín, L., Muñoz, R., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Sanz, J., y González-Coloma, A. (2014). Comparative chemistry and insect antifeedant effects of conventional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO₂) of two *Lavandula luisieri* populations. *Industrial Crops and Products*, 58, 25-30.
22. Lang, G., y Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.
23. Mihajilov-Krstev, T.; Radnović, D.; Kitić, D.; Stankov Jovanović, V.; Mitić, V.; Stojanović-Radić, Z.; Zlatković, B. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp *montana* essential oil. *Central European Journal of Biology*, 9, 7.
24. Morata, A. (2010). Nuevas tecnologías de conservación de alimentos. *Madrid: Antonio Madrid Vicente*, 16.

25. OMS. Organización Mundial de la Salud. (2015). Fecha de consulta: 20/5/2017. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200047/1/WHO_FOS_15.02_spa.pdf?ua=1
26. Prat, S. (2006). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. *Gobierno de Chile, Ministerio de Salud, Instituto de Salud Pública de Chile*.
27. Ramírez, A., Stella, L., y Marín Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.
28. Raut, J. S., y Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.
29. Rota, C.; Carramiñana, J. J.; Burillo, J.; Herrera, A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 6, 1252–1256
30. Saucedo, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
31. Vallejo, M. I. G. (1992). Aceites esenciales de las Lavandulas ibéricas: ensayo de la quimiotaxonomía. (Tesis de Doctorado). Facultad de Biología, Madrid.
32. Valles, M. V., Salinas, P. A., Haro, I. R., Sevilla, W. S., Lázaro, W. R., y Huamán, A. V. (2014). Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *Revista Reviol*, 34(1), 57-68.
33. Wu, C., Wang, F., Liu, J., Zou, Y., y Chen, X. (2015). A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration. *Integrative Medicine Research*, 4(3), 171-177.

34. Zeng, Q. H., Zhao, J. B., Wang, J. J., Zhang, X. W., y Jiang, J. G. (2016). Comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC and *Cirsium setosum* (Willd.) M. Bieb. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 595-605.
35. Zengin, H., y Baysal, A. H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19(11), 17773-17798.
36. Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., y Salgueiro, L. (2012). *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chemistry*, 135(3), 1505-1510.