



Publicación Cuatrimestral. Vol. 5, No 1, Enero/Abril, 2020, Ecuador (p. 41-50). Edición continua.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO EN UNA PELÍCULA BIODEGRADABLE ACTIVA DE ÁCIDO POLILÁCTICO

Anderson Pazmiño Castro^{1*}, Ana Campuzano Vera², Karina Marín Morocho²

¹Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Técnica de Manabí, Av. José María Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Ecuador. E-mail: apazmino@utm.edu.ec

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Agraria del Ecuador, Av. 25 de Julio y Pio Jaramillo, Guayaquil, Ecuador. E-mail: acampuzano@uagraria.edu.ec, kmarin@uagraria.edu.ec.

*Autor para la correspondencia: apazmino@utm.edu.ec

Recibido: 02-10-2019 / Aceptado: 14-4-2020 / Publicación: 30-04-2020

Editor Académico: María del Rosario Brunetto

RESUMEN

Con la finalidad de reducir el número de personas afectadas por enfermedades transmitidas por alimentos, se elaboraron películas biodegradables activas con propiedades antibacterianas a partir de ácido poliláctico, polietilenglicol, y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) al 1% (p/p) y 2% (p/p). Las películas biodegradables activas fueron elaboradas mediante el método de evaporación del solvente. Se evaluó la acción antibacteriana de las películas biodegradables activas mediante un ensayo de inhibición a la adhesión microbiana contra *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Se pudo establecer que los porcentajes de aceite esencial aplicados tienen poco efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Salmonella* spp. hay un efecto directo sobre la inhibición, cuando la concentración de aceite esencial es del 2% (p/p). Para una concentración del 1% (p/p), el efecto inhibitorio observado fue pobre. Los resultados indican que las bacterias Gram-negativas *Salmonella* spp son más susceptibles al daño en la pared celular provocado por el aceite esencial de orégano, debido al menor espesor de la misma. En contraste, el mayor grosor de la pared celular que presentan las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* exige, en principio, de un tiempo mayor para poder producir la lisis celular. Las películas biodegradables activas con aceite esencial de orégano pueden emplearse para la conservación de los alimentos como una tecnología de barrera en conjunto con otros mecanismos de control microbiano y así minimizar tratamientos térmicos severos o reducir la utilización de aditivos alimentarios, que en concentraciones inadecuadas pueden producir cierta toxicidad.

Palabras clave: películas biodegradables activas, contaminación de alimentos, inhibición bacteriana.

INHIBITION OF *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* GROWTH BY *Origanum vulgare* ESSENTIAL OIL IN A POLYLACTIC ACID BIODEGRADABLE FILM

ABSTRACT

In order to reduce the number of people affected by foodborne illnesses, active biodegradable films with antibacterial properties were made with polylactic acid, polyethylene glycol, and essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) at 1% (w/w) and 2% (w/w). The active biodegradable films were made using solvent evaporation method. The active biodegradable films antibacterial action was evaluated by microbial adhesion inhibition test against *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. It was established that the percentages of essential oil used have little inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, while for *Salmonella* spp. there is a direct effect on inhibition, when the essential oil concentration is 2% (w/w). For a concentration of 1% (w/w), the observed inhibitory effect was poor. The results indicate that Gram-negative bacteria *Salmonella* spp are more susceptible to cellular wall damage caused by oregano essential oil, due to its lower thickness. In contrast, the greater thickness of the cell wall that *Staphylococcus aureus*, Gram-positive bacteria has, requires, in principle, a longer time to produce cell lysis. Biodegradable active films with oregano essential oil can be



used for food preservation as a barrier technology in conjunction with other microbial control mechanisms, thus minimizing severe heat treatments or reducing the use of food additives that, in inadequate concentrations can produce some toxicity.

Keywords: active biodegradable films, food pathogens, bacterial inhibition.

EFEITO DE INIBIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM UM FILME ATIVO BIODEGRADÁVEL DE ÁCIDO POLILÁCTICO

RESUMO

Para reduzir o número de pessoas afetadas por doenças transmitidas por alimentos, filmes biodegradáveis ativos com propriedades antibacterianas foram feitos de ácido polilático, polietilenoglicol e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) com 1% (p/p) e 2% (p/p). Os filmes biodegradáveis ativos foram feitos usando o método de evaporação do solvente. A ação antibacteriana dos filmes biodegradáveis ativos foi avaliada por meio de um teste de inibição da adesão microbiana contra *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Foi estabelecido que as porcentagens de óleo essencial aplicado exercem pouco efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus*, enquanto *Salmonella* spp. há um efeito direto na inibição, quando a concentração do óleo essencial é de 2% (p/p). Para uma concentração de 1% (p/p), o efeito inibitório observado foi baixo. Os resultados indicam que as bactérias Gram-negativas são mais suscetíveis a danos na membrana causados pelo óleo essencial de orégano, devido à sua menor espessura. Por outro lado, a maior espessura da parede celular apresentada pelas bactérias altamente positivas requer, em princípio, mais tempo para produzir a lise celular. Filmes ativos biodegradáveis com óleo essencial de orégano podem ser usados para preservação de alimentos como uma tecnologia de barreira em conjunto com outros mecanismos de controle microbiano, minimizando tratamentos térmicos severos ou reduzindo o uso de aditivos alimentares, que em concentrações inadequadas podem produzir alguma toxicidade.

Palavras-chave: biopolímero; comida; inibição bacteriana; patógenos

Citaci3n sugerida: Pazmiño, A., Campuzano, A., Marín, K. (2020). Inhibici3n del crecimiento de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* por efecto del aceite esencial de orégano en una película biodegradable activa de ácido poliláctico. *Revista Bases de la Ciencia*, 5(1), 41-50. DOI: 10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v5i1.2035 Recuperado de: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/2035>

Orcid IDs:

MSc. Anderson Pazmiño Castro: <https://orcid.org/0000-0002-0706-7692>

MSc. Ana Campuzano Vera: <https://orcid.org/0000-0003-0010-4267>

MSc. Karina Marín Morocho: <https://orcid.org/0000-0001-5333-3819>

Dra. María del Rosario Brunetto: <https://orcid.org/0000-0003-3848-5130>

1. INTRODUCCIÓN

El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero semicristalino obtenido de recursos renovables, como el maíz y el azúcar, tras un proceso de polimerización controlada de ácido láctico. Sus características de transparencia, inocuidad y biodegradabilidad lo hacen un polímero idóneo para el envasado alimentario y para reducir el uso de poliolefinas (Blanot, 2014; Burgos Martino, y Jiménez, 2013; Ruellan, Guinault, Sollogoub, Ducruet y Domenek, 2015).

La industria de alimentos y la academia dentro de este campo, además de intentar reducir el uso de polímeros de lenta degradación, deben sumar mecanismos que permitan reducir el número de personas que padecen de enfermedades transmitidas por alimentos y con ello también disminuir el impacto socioeconómico que estas enfermedades suscitan (Jahid y Ha, 2012; Jorquera, Galarce y Borie, 2015; Tauxe, Doyle, Kuchenmüller, Schlundt y Stein, 2010). A nivel mundial, se estima que las enfermedades de transmisión alimentaria afectan a uno de cada diez personas, ocasionan 420000 muertes al año. Esta estimación mundial involucra a 31 agentes alimentarios causantes de 32 enfermedades: 11 agentes etiológicos de enfermedades diarreicas (1 virus, 7 bacterias y 3 protozoos), 7 de enfermedades infecciosas invasivas (1 virus, 5 bacterias y 1 protozoo), 10 helmintos y 3 productos químicos. Las enfermedades diarreicas representan el 95% de la enfermedades de transmisión alimentaria en la región, siendo los principales agentes etiológicos, Norovirus, *E. coli*, *Campylobacter*, y *Salmonella* no tifoidea (WHO, 2015).

Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades estiman que sólo en los Estados Unidos, 48 millones de personas son afectadas por enfermedades transmitidas por alimentos (CDC, 2018). Del total de esta estimación, el 20% se enferman a causa de 31 patógenos conocidos transmitidos por los alimentos, y 80% son afectados por agentes no especificados que están en los alimentos pero que no han sido verificados. Los patógenos que causan la mayoría de las enfermedades son, el norovirus (58%), *Salmonella* spp. (11%), *C. perfringens* (10%), *Campylobacter* spp. (9%), y *Staphylococcus aureus* (3%). A pesar de que los virus son los principales patógenos, el 64% de las hospitalizaciones estimadas, son causadas por bacterias, de las cuales el 35% de ellas son por *Salmonella* spp. y 15% por *Campylobacter* spp. De igual manera, el 64% de las muertes estimadas son causadas por bacterias, provocadas principalmente por *Salmonella* spp. (28%) y *Listeria monocytogenes* (19%) (Scallan et al., 2011).

La aplicación de aceites esenciales puede mejorar las propiedades antimicrobianas de los empaques, y así sumar esfuerzos ante el desafío de reducir la contaminación de los alimentos con bacterias patógenas (Lv, Liang, Yuan, y Li, 2011; Sung et al., 2013). El efecto antimicrobiano de diferentes aceites esenciales contra patógenos que producen enfermedades alimentarias ha sido reportado (Calo,

Crandall, O'Bryan, y Ricke, 2015; Franz y Novak, 2009), incluido entre ellos el aceite de orégano (*Origanum vulgare*), que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, por ser reconocido como seguro por la FDA y por su alto poder antioxidante y antimicrobiano, que tiene efecto en la preservación de la calidad química, sensorial, nutricional y microbiológica de los alimentos (Asensio, 2013; Patiño, Moreno, y Chaparro, 2012; Ventura, Millones, Auquiñivin, Vásque, y Tafur, 2011).

El aceite esencial de orégano puro tiene diferentes proporciones de carvacrol, timol, 1,8-cineol, p-cimeno y otros, que varían en concentración dependiendo de la especie, edad fisiológica de la planta, ubicación geográfica y condiciones ambientales en las que se encuentra (Albado Plaus, Saez Flores, y Grabiél Ataucusi, 2001; Asensio, 2013; Franz y Novak, 2009; Ventura et al., 2011). La actividad antimicrobiana de este aceite esencial ha sido atribuida a sus compuestos terpenoides y partículas fenólicas volátiles, principalmente carvacrol y timol, que provocan daño en la membrana citoplasmática de los microorganismos, causando la muerte celular (Calo et al., 2015; Rhayour, Bouchikhi, Tantaoui-Elaraki, Sendide, y Remmal, 2003; Sung et al., 2013).

Con la finalidad de evitar la contaminación bacteriana de alimentos frescos o mínimamente procesados, y con ello reducir el número de personas que son afectadas por enfermedades transmitidas por alimentos, el objetivo de este estudio es desarrollar un envase biodegradable activo con propiedades antibacterianas a base de PLA y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), con posible uso potencial para la industria de los alimentos, tomando como modelo para su evaluación a los microorganismos patógenos *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* que se encuentran entre los cinco principales microorganismos que contribuyen al contagio de enfermedades transmitidas por alimentos (CDC, 2018).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ácido poliláctico (PLA-IngeoTM Biopolymer 2003D) fue adquirido en forma de pellets de Nature Works® Co. LLC (Estados Unidos). El plastificante polietilenglicol (PEG400) y el solvente cloroformo fueron adquiridos de Loba Chemie Pvt. Ltd (India).

El aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) fue adquirido en Nowfoods (Estados Unidos), 100% puro, con un contenido mínimo de 55% de carvacrol, derivado de la región del Mediterráneo oriental, obtenido por arrastre de vapor.

Lo medios de cultivos y reactivos para las pruebas microbiológicas fueron comprados en Difco (Estados Unidos). Las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y *Samonella* spp. utilizadas en esta investigación, fueron aisladas y cultivadas por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE, Ecuador).

2.1. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano, se procedió de acuerdo a la metodología descrita por Haba et al. (2014) con ligeras modificaciones. Brevemente, la CMI fue determinada mediante ensayo de microdilución en caldo nutritivo y suplementado con agar nutritivo al 0,15% (p/v). Se adicionaron 50 μ L de este caldo que se distribuyeron desde el segundo hasta el doceavo pocillo en cada fila de una placa de microtitulación de polipropileno (HDM Cia. Ltda, Ecuador) de 96 pocillos.

Una dilución de aceite esencial de orégano al 4% fue preparada, y de esta dilución se vertieron 100 μ L al primer pocillo de cada fila de la placa de microtitulación; y luego 50 μ L en dilución escalar fueron transferidos desde el segundo al onceavo pocillo. Al pocillo 12 no se le agregó el aceite esencial y se lo consideró como control de crecimiento. Posteriormente, a cada pocillo, exceptuando al pocillo 11 de cada fila que sirvió como blanco, se le agregaron 50 μ L de una suspensión microbiana con una concentración aproximada de 10^5 - 10^6 UFC/mL. El ensayo se hizo por cuadruplicado, de tal manera que 4 filas de la placa fueron llenadas con *Salmonella* spp. y 4 filas con *Staphylococcus aureus*. De esta forma, la concentración final del aceite esencial en el primer pocillo fue de 2% (v/v) y en el undécimo pocillo de 0,00196% (v/v). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h.

2.2. Elaboración de películas biodegradables activas

Las películas biodegradables activas fueron preparadas a través de la modificación del método de evaporación del solvente descrito por Concilio et al. (2015), en el cual 0,45 g de PLA fueron mezclados con 0,045 g (10% con respecto al PLA) de PEG400. La mezcla fue disuelta en 20 mL de cloroformo a temperatura ambiente hasta que el PLA se disuelva, con agitación continua a 250 rpm y agregando la cantidad suficiente de cloroformo para mantener el volumen. El aceite esencial de orégano en concentraciones de 1% (p/p) y 2% (p/p) con respecto al PLA, fue añadido a la solución de cloroformo y PLA/PEG400, con agitación hasta que el aceite estuviera disuelto. A continuación, la solución fue vertida en cajas Petri, agregando $5 \pm 0,5$ g de solución en cada una de ellas, y finalmente se dejó durante 24 h a temperatura ambiente dentro de la cámara de extracción para que el solvente se evapore. El espesor final de las películas fue medido en un micrómetro (Qualitest, USA).

2.3. Ensayo de anti-adherencia en superficie de la película activa con aceite esencial de orégano

El efecto de adherencia de los microorganismos sobre la película activa con aceite esencial de orégano fue realizada modificando el método aplicado por Coronel-León, Marqués, Bastida, y Manresa (2015). En resumen, las películas activas recibieron un pretratamiento de esterilización con luz UV durante 24 horas. De allí, una película activa fue inoculada con *Salmonella* spp. ha una concentración

de 10^4 UFC/mL y se dejó incubar a temperatura ambiente por 24 horas. Igual procedimiento se realizó con otra película activa, pero con inoculación de *Staphylococcus aureus*. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada microorganismo y concentración de aceite esencial de orégano. Como control se tuvo una película activa a la cual no se inocularon microorganismos, tan solo caldo nutritivo. Después del tiempo de incubación, las películas activas fueron lavadas dos veces con 1 mL de agua destilada, y luego las bacterias adheridas fueron fijadas con 1 mL de etanol. Se colocaron en la estufa a 80°C hasta evaporar el etanol, y de allí se tiñeron con 200 μL de cristal violeta. Posteriormente, las películas activas fueron lavadas con abundante agua. Las películas activas teñidas fueron comparadas con el control, para establecer cualitativamente el efecto de inhibición sobre los dos microorganismos evaluados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano

La CMI alcanzada con el aceite de orégano para *Salmonella* spp. es de 0,016% (v/v) y para *Staphylococcus aureus* de 0,031% (v/v). Estos resultados demuestran la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano, que es desarrollada fundamentalmente por sus principios activos, carvacrol y timol, que provocan la lisis bacteriana (Calo et al., 2015; Lambert et al., 2001; Rhayour et al., 2003).

La CMI para *Salmonella* spp. es menor a la CMI reportada por Pesavento et al., (2015) para *Salmonella enteritidis* (0,25% - 0,125 %, v/v), y la CMI reportada por Oussalah, Caillet, Saucier, y Lacroix (2007) para *Salmonella typhimurium* (0,05 %, v/v).

La CMI para *Staphylococcus aureus* se encuentra dentro del rango de CMI reportado por Nostro et al. (2007) para varias cepas de este microorganismo; los cuales estuvieron entre 0,015-0,062 % (v/v). Sin embargo, la CMI para *Staphylococcus aureus* es baja frente al valor de CMI de 2% reportado por Carhuallanqui, Salazar, y Ramos (2020), en donde el resultado fue atribuido a una baja concentración de carvacrol y timol.

Las diferencias encontradas pueden deberse principalmente al método empleado para encontrar la CMI, y también a las características inherentes al aceite esencial empleado, que involucra la variedad, edad fisiológica, zona geográfica y periodo de cosecha de la planta utilizada (Asensio, 2013; Burt, 2004; Franz y Novak, 2009; Ventura et al., 2011).

3.2. Elaboración de películas biodegradables activas

Las películas activas elaboradas por el método evaporación del solvente fueron transparentes, con un espesor promedio de $30 \pm 5 \mu\text{m}$ y con un diámetro aproximado de 9 cm.

Se logró obtener una película activa en donde se pudo observar una buena solubilidad de los componentes con el polímero. La compatibilidad del aceite esencial de orégano con la matriz polimérica fue notable, y está acorde con lo expuesto por Sung et al. (2013), en donde la utilización de este aceite esencial en cantidades razonables no interrumpe la fase cristalina y la interacción intermolecular de las cadenas de polímeros, impregnándose adecuadamente entre ellas porque el tamaño de las partículas que lo componen así lo permite; y por ende no afecta notablemente las propiedades físicas y mecánicas, y la estabilidad térmica de los polímeros.

3.3. Ensayo de anti-adherencia en la superficie de la película activa con aceite esencial de orégano

Los resultados de comparación de la tinción de las películas activas con el control (**Figura 1**), permiten determinar que los porcentajes de aceite esencial aplicados tienen poco efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Salmonella* spp., la mayor concentración de aceite (2% p/p) tuvo un buen efecto de inhibición y un menor efecto en la concentración más baja (1% p/p).

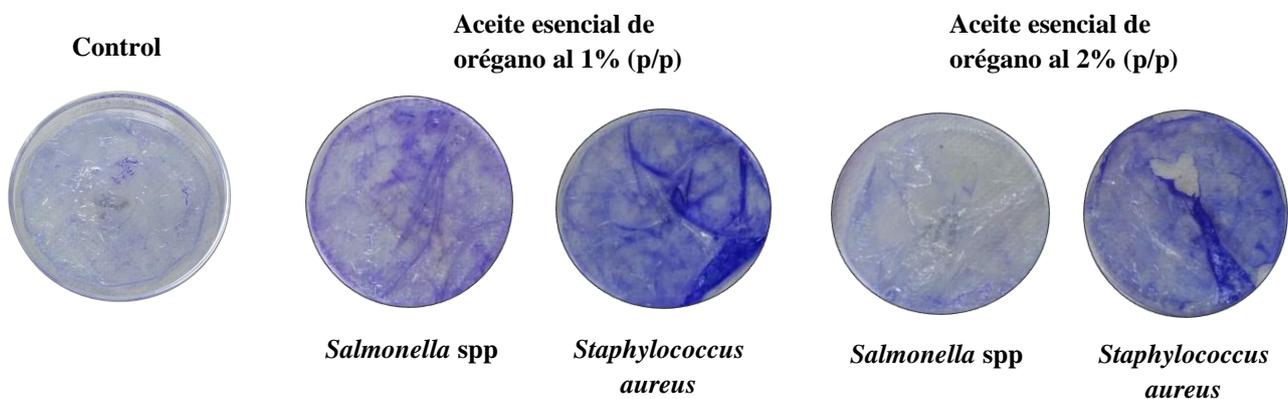


Figura 1. Comparación de inhibición a la adhesión de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en las películas biodegradables activas de PLA con 1% (p/p) y 2% (p/p) de aceite esencial de orégano.

Los resultados de inhibición obtenidos en el presente trabajo son similares al estudio realizado por Patiño et al. (2012), donde concentraciones de 1% y 2% (p/p) de aceite esencial de orégano en películas comestibles de pectina sobre lechuga mínimamente procesada evidencia una gran inhibición de bacterias entre ellas *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos potencian la aplicación del aceite esencial de orégano en polímeros biodegradables como el PLA, logrando una película en donde las propiedades antibacterianas del

aceite esencial pueden ser aprovechadas para impedir que patógenos usen a los alimentos como vehículos para causar enfermedades a las personas que los ingieren.

Tomando en cuenta la CMI obtenida en este trabajo de investigación para los microorganismos probados y los porcentajes de aceites aplicados, es posible considerar que una proporción del aceite esencial está siendo empaquetado en la matriz, condición que no permite una rápida liberación del aceite sobre la superficie, retardando por esta vía el efecto sobre las bacterias que ofrezcan mecanismos de resistencia o aquellas con un capa más gruesa de peptidoglicano, como en el caso de *Staphylococcus aureus*.

4. CONCLUSIONES

Se logró obtener películas biodegradables activas que pueden ayudar a reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos. Se pudo agregar satisfactoriamente el aceite esencial de orégano en la matriz polimérica en concentraciones de 1% (p/p) y 2% (p/p). En el caso de la *Salmonella* spp el uso del aceite de orégano a la concentración del 2% (p/p) fue exitosa. Sin embargo, para la *Staphylococcus aureus* los resultados observados no fueron satisfactorios. Se observó un efecto de inhibición pobre incluso a la mayor concentración del aceite esencial estudiada. Estos resultados preliminares hacen necesario extender el estudio utilizando concentraciones de aceite superiores al 2% (p/p). Las bacterias Gram-negativas, como *Salmonella* spp., son más susceptibles al daño en la membrana provocado por el aceite esencial de orégano, debido a un menor espesor en la misma; en cambio, en las Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, tomaría más tiempo para producir la lisis celular debido a su membrana celular más gruesa.

Las películas biodegradables activas con aceite esencial de orégano pueden ser utilizadas en el campo de la conservación de los alimentos como una tecnología de barrera orgánica eficaz asociada a otros mecanismos de control. Estas películas biodegradables también pueden utilizarse para minimizar tratamientos térmicos severos o la utilización de aditivos alimentarios que a concentraciones inadecuadas pueden causar toxicidad. Es recomendable ampliar el estudio inhibitorio hacia otros microorganismos, como los hongos, debido a que muchos alimentos son susceptibles al deterioro fúngico. Las películas biodegradables activas pueden ser apropiadas para el envasado de productos a base de carne y para vegetales mínimamente procesadas.

5. REFERENCIAS

- Albado Plaus, E., Saez Flores, G., y Grabiell Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12(3), 16–19.
- Asencio, C.M. (2013). Variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: queso cottage, ricota y aceite de oliva (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba. Recuperada de <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1692/Asencio%20->

[%20Utilizaci%C3%B3n%20de%20aceites%20esenciales%20de%20variedades%20de%20or%C3%A9gano%20como%20conservante...pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

- Blanot, V. (2014). *Desarrollo de formulaciones (PLA) con actividad antimicrobiana para el uso en envasado activo en aplicaciones alimentarias* (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia. Recuperada de https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/36134/TFM_Victoria%20Blanot_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Burgos, N., Martino, V. P., y Jiménez, A. (2013). Characterization and ageing study of poly(lactic acid) films plasticized with oligomeric lactic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 98(2), 651–658. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.11.009>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., y Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111–119. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Carhuallanqui, A., Salazar, M., y Ramos, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, 22(1), 25–33.
- CDC. (2018). Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos. Recuperado de <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
- Concilio, S., Iannelli, P., Sessa, L., Olivieri, R., Porta, A., De Santis, F., ... Piotto, S. (2015). Biodegradable antimicrobial films based on poly(lactic acid) matrices and active azo compounds. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(33). Recuperado de <https://doi.org/10.1002/app.42357>
- Coronel-León, J., Marqués, A. M., Bastida, J., y Manresa, A. (2015). Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 99–111. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/jam.12992>
- Franz, C., y Novak, J. (2009). Sources of essential oils. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Vol. 2, pp. 217–220).
- Haba, E., Bouhdid, S., Torrego-Solana, N., Marqués, A. M., Espuny, M. J., García-Celma, M. J., y Manresa, A. (2014). Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmaceutics*, 476(1–2), 134–141. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.039>
- Jahid, I. K., y Ha, S. Do. (2012). A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 299–316. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0041-1>
- Jorquera, D., Galarce, N., y Borie, C. (2015). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: Bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista Chilena de Infectología*, 32(6), 678–688. Recuperado de <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010>
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., y Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057–3064. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., ... Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 519–523. Recuperado de <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., y Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414–420. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
- atiño, N. R., Moreno, H. M., y Chaparro, M. P. (2012). Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible

antimicrobial y antioxidante a partir de aceite de orégano (*Origanum vulgare*) en la calidad y vida útil de la lechuga (*Lactuca sativa* L) mínimamente procesada refrigerada. *Alimentos Hoy; Vol 21, No 26 (2012)*. Recuperado de http://acta.org.co/acta_sites/alimentos hoy/index.php/hoy/article/view/121/115

- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., ... Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188–199. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., y Remmal, A. (2003). The Mechanism of Bactericidal Action of Oregano and Clove Essential Oils and of their Phenolic Major Components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*, 15(4), 286–292. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712144>
- Ruellan, A., Guinault, A., Sollogoub, C., Ducruet, V., y Domenek, S. (2015). Manufacturing of advanced biodegradable polymeric components. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(48). Recuperado de <https://doi.org/10.1002/app.42889>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., ... Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15. Recuperado de <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Sung, S.-Y., Sin, L. T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., ... Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 110–123. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.001>
- Tauxe, R. V., Doyle, M. P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J., y Stein, C. E. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S16–S28. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.014>
- Ventura, M., Millones, C. ., Auquiñivin, E. A., Vásque, E. ., y Tafur, A. R. (2011). Evaluación del rendimiento y la acción conservante en carne de cerdo del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) cultivado en seis zonas altoandinas de Amazonas. *Aporte Santiguino*, 4(2), 185–194. Recuperado de <https://doi.org/10.32911/as.2011.v4.n2.544>
- WHO. (2015). *Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria*. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1