

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Efecto de aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y
orégano (*Origanum vulgare*) en la supervivencia de *Staphylococcus*
aureus y *Escherichia coli* en queso crema Zamorano**

Estudiantes

Carlos Armando Godoy Fonseca

Oswaldo José Zeledón Zeledón

Asesores

Ligia Luna Jarrin MSc.

Honduras, noviembre 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRIGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento Agroindustria alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Figuras	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Materiales y Métodos	12
Ubicación del Estudio	12
Evaluación de Aceites Esenciales en Queso	12
Elaboración del Queso	12
Preparación de los Cultivos de Staphylococcus Aureus y Escherichia Coli	13
Inoculación del Queso Crema	14
Tiempo de Muestreo	15
Análisis Microbiológico de Staphylococcus Aureus	16
Análisis Microbiológico de E. coli	16
Evaluación de Aceites Esenciales In Vitro	17
Preparación de la Cepa	17
Evaluación de Sensibilidad	17
Preparación de Diluciones de Aceites Esenciales	18
Preparación de Cepas para Siembra	18
Antibiograma	18
Diseño Experimental	19
Análisis Estadístico	19
Resultados y Discusión	20
Staphylococcus Aureus	20

	4
Escherichia coli.....	24
Evaluación de Sensibilidad.....	29
Conclusiones.....	32
Recomendaciones.....	33
Referencias.....	34

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Formulación de queso crema.....	12
Cuadro 2 Tratamientos aplicados en la matriz láctea.....	13
Cuadro 3 Tratamientos aplicados en antibiograma.....	18
Cuadro 4 Supervivencia de Staphylococcus aureus bajo la presencia de aceite esencial de tomillo y orégano, y su testigo.....	20

Índice de Figuras

Figura 1 Flujo de proceso de elaboración de queso crema	15
Figura 2 Comportamiento de Staphylococcus aureus en presencia de aceite esencial de tomillo durante 21 días.	22
Figura 3 Comportamiento de Staphylococcus aureus en presencia de aceite esencial de orégano durante 21 días.	23
Figura 4 Comportamiento de Escherichia coli en presencia de aceite esencial de tomillo durante 21 días.	28
Figura 5 Comportamiento de Escherichia coli en presencia de aceite esencial de orégano durante 21 días.	28

Resumen

En la actualidad, la seguridad alimentaria ha adquirido un carácter de preocupación generalizada, siendo un desafío encontrar a alguien que no haya experimentado en el último año algún malestar ocasionado por ETAS. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son microorganismos comunes en productos lácteos, y la adopción de soluciones alternativas para el control biológico se está convirtiendo en una práctica cada vez más relevante en la industria alimentaria. Se evaluó el efecto sobre dichos patógenos en dos fases, la primera en una matriz alimenticia con siete tratamientos divididos en tres tratamientos para tomillo y tres para orégano con un control, realizando una repetición y dos replicas. El diseño experimental consistió en un Diseño Completamente al Azar, con un análisis de varianza y una prueba de separación de medias Duncan, con una significancia al 95%. Se evaluó el efecto en el tiempo en 21 días (simulando la vida de anaquel del queso), almacenado a una temperatura de 4 ± 2 °C. El queso fue inoculado con las cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™) y *Escherichia coli* (ATCC® 35219™). La segunda fase fue la evaluación in vitro de los aceites esenciales como agentes bactericidas, para demostrar la inhibición sobre dichas cepas, el cual consta de ocho tratamientos. En ambas matrices se observa un descenso exponencial, la dosis mínima de orégano limitó el descenso en las curvas de letalidad, y los tratamientos de tomillo resultaron ser los más efectivos como bactericidas naturales. Se recomienda hacer análisis sensoriales y fisicoquímicos para evaluar su aceptación.

Palabras clave: bactericida, carvacrol, in vitro, matriz, timol.

Abstract

Nowadays, food safety has become a widespread concern, and it is a challenge to find someone who has not experienced in the last year some discomfort caused by food-borne illnesses. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are common microorganisms in dairy products, and the adoption of alternative biological control solutions is becoming an increasingly relevant practice in the food industry. The effect on these microorganisms was evaluated in two phases, the first in a food matrix with seven treatments divided into three treatments for thyme and three for oregano and a control, with one repetition and two replicates. The experimental design consisted of a Completely Randomized Design, with an analysis of variance and a Duncan mean separation test, with a significance of 95%. The effect was evaluated over time in 21 days (simulating the shelf life of the cheese), stored at a temperature of 4 ± 2 °C. The cheese was inoculated with *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™) and *Escherichia coli* (ATCC® 35219™) strains. The second phase was the in vitro evaluation of the essential oils as bactericidal agents, to demonstrate the inhibition on these strains, which had eight treatments. In both matrices an exponential decrease was observed, the minimum dose of oregano limited the decrease in the lethality curves, and the thyme treatments proved to be the most effective as natural bactericides. Sensory and physicochemical analyses are recommended to evaluate their acceptability.

Keywords: bactericide, carvacrol, in vitro, matrix, thymol.

Introducción

En la actualidad, la seguridad alimentaria ha adquirido un carácter de preocupación generalizada, siendo un desafío encontrar a alguien que no haya experimentado en el último año algún malestar ocasionado por enfermedades transmitidas por alimentos. Conforme al reporte del año 2005 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se registraron aproximadamente 1.8 millones de fallecimientos asociados a episodios de diarrea, que se consideran enfermedades transmitidas por alimentos; estas tragedias surgieron a raíz del consumo de alimentos y agua contaminados (Samelis, 2006). Las enfermedades transmitidas por alimentos, se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial y representan una de las mayores causas de morbilidad a nivel mundial, estas afecciones suelen ser de carácter leve, sin embargo, en ocasiones pueden tener consecuencias mortales (García Panadero et al., 2019; Jaguey Hernández y Castañeda Ovando, 2023).

Debido al alto impacto que esto tiene en salud pública, los principales focos de atención en cuanto a la seguridad alimentaria se centran en los patógenos transmitidos por alimentos, que incluyen microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Atarés et al., 2010; Doyle y Erickson, 2006).

Según Tohidpour et al., en el 2010, el aumento en la demanda de alimentos frescos sin conservantes químicos plantea desafíos debido a su corta vida útil y riesgos alimentarios. En este sentido, ofrecer productos seguros y duraderos utilizando conservantes naturales, como aceites esenciales extraídos de plantas, es una tendencia actual (Torres Avellán, 2019a). Además, la resistencia de microorganismos a conservantes químicos en la industria alimentaria, junto con su percepción negativa debido a su toxicidad (cancerígena y teratogénica), constituye un gran desafío para esta industria (Odonkor y Ampofo, 2013; Tohidpour et al., 2010). Además, los métodos tradicionales de conservación de alimentos como secado, congelación, fermentación, entre otros, presentan una eficacia reducida en lo que respecta a la prevención del crecimiento de microorganismos patógenos que se transmiten a través de los alimentos en los productos

alimentarios. Esta situación se ve agravada por la creciente demanda de alimentos sin aditivos químicos, lo que ha impulsado la inclusión de antimicrobianos en el ámbito de la industria alimentaria (Rodríguez Saucedo, 2011).

La reciente innovación en la industria alimentaria implica la incorporación de antimicrobianos para mejorar la vida útil y la seguridad de los alimentos. Estos pueden ser de origen natural o sintético, pero hay un creciente interés en los naturales debido a riesgos potenciales en los sintéticos. Aunque los conservantes sintéticos tienen aprobación gubernamental, es urgente investigar el potencial de antimicrobianos naturales en los alimentos (Dorman y Deans, 2000; Elgayyar et al., 2001; Skandamis et al., 2002).

A lo largo de la historia, hierbas y especias han sido esenciales para mejorar el sabor, aromatizar y conservar alimentos. Estos elementos son antimicrobianos naturales utilizados contra patógenos, y su eficacia depende de la composición de sus aceites esenciales, contexto de uso y tipos de microorganismos involucrados (Ivanišová, 2023; Liang et al., 2022).

La eficacia de los aceites esenciales extraídos de hierbas y especias está intrínsecamente relacionada con su estructura química, en especial, la presencia de grupos funcionales hidrofílicos, como los grupos hidroxilo (Macwan et al., 2016). Los aceites esenciales obtenidos de clavo, orégano, romero, tomillo, salvia y vainillina se destacan como los más efectivos debido a su contenido de grupos fenólicos (Arshad y Batool, 2017; Băicuș et al., 2022). Además, estos presentan efectividad contra bacterias gramnegativas y grampositivas, aunque, en menor medida en contra de gramnegativas debido a la principalmente la estructura de su pared celular que está cubierta de una membrana externa (Inamuddin et al., 2021). También, los aceites esenciales, caracterizados por su alta presión de vapor, tienen la capacidad de alcanzar a los microorganismos patógenos tanto en fases gaseosas como líquidas. Numerosos estudios han confirmado la efectividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra diversas microfloras patógenas y de deterioro. Sin embargo, es importante destacar

que la eficacia de estos aceites esenciales está sujeta a factores como el pH, la temperatura de almacenamiento y la concentración de oxígeno (Jiang y Li, 2001).

Debido a su amplio uso y propiedades antimicrobianas se ha seleccionado para este estudio dos tipos de aceites esenciales de tomillo y orégano que han demostrado tener grandes capacidades relacionadas con la preservación de alimentos. En este sentido, el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) posee características antibacterianas al estar compuesto de timol y carvacrol, esta esencia tiene un gran poder antiséptico (Ballester Costa, 2016). Como afirma Torres Avellán en el 2019, esta esencia es capaz de controlar patógenos y está comprobado que es capaz de inhibir algunos procesos como germinación, crecimiento y multiplicación celular. El aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) está compuesto principalmente por carvacrol, siendo aproximadamente un 80.5% de su composición, presentando actividad antibacteriana en contra de bacterias como *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Govaris et al., 2010). En la actualidad, se ha demostrado que los aceites esenciales son una fuente importante de metabolitos secundarios de origen vegetal. Estos aceites son conocidos por ser mezclas complejas de diversas moléculas químicas polares y no polares, tales como terpenos, terpenoides y fenólicos, las cuales, proporcionan propiedades antimicrobianas (Amadio et al., 2011; Aziz et al., 2018).

En este sentido, se ha demostrado que los aceites esenciales pueden prolongar la vida útil de los alimentos, lo que los convierte en una opción atractiva para la industria alimentaria. Además, su uso como conservante natural puede contribuir a reducir la dependencia de los conservantes químicos, que pueden tener efectos negativos en la salud humana (Asensio, 2013). Por lo que, la finalidad de este estudio es evaluar los efectos de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) en la supervivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en queso crema durante su vida de anaquel y analizar la capacidad antimicrobiana de ambos aceites esenciales un estudio in vitro y comparar su efectividad con lo observado en una matriz láctea.

Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

El estudio se llevó a cabo en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano ubicada en el kilómetro 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaré, Municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras. El desarrollo y elaboración de los quesos se realizó en el laboratorio de la planta de lácteos de Zamorano, la inoculación y análisis microbiológico se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LAMZ).

Evaluación de Aceites Esenciales en Queso

Elaboración del Queso

La elaboración del queso crema se llevó a cabo en la planta de lácteos de Zamorano. Para la formulación del queso crema (Cuadro 1) se utilizó leche pasteurizada a 63 °C por 30 minutos con una concentración de grasa estandarizada al 2.5%.

Se realizó un temperado de la leche a 33 °C para añadir el cuajo, cloruro de calcio, bacteria ácido láctica (CHR Hansen R-704) y la cantidad de aceite esencial según tratamiento, las cuales para tomillo fueron 0.5, 0.75 y 1% y para orégano fueron 0.25, 0.5 y 1%. Seguido de esto, se dejó reposar por 30 a 45 minutos para, posteriormente, hacer el corte y mover constantemente por 10 minutos a 42 ± 2 °C. Para finalizar, se desuera, se añade la sal y reposa por 30 minutos, finalmente se almacena por 12 horas.

Cuadro 1

Formulación de queso crema.

Ingrediente	Unidad	Cantidad
Leche fluida al 2.5% grasa	L	100
Cloruro de Sodio	kg	2
Cloruro de Calcio	kg	0.02
Cuajo	L	0.01
Cultivo Láctico R704	Uni	0.000005

Nota. Formulación facilitada por Planta de Lácteos Zamorano.

Se decidió utilizar como mínimo 0.25% de concentración de aceite esencial de orégano considerando el estudio realizado por Souza et al. (2014) da como resultado que a una concentración de 0.25% logra inhibir crecimiento de *S. aureus* in vitro, ya que la información de esta esencia aplicada a quesos es escasa. Respecto al aceite esencial de tomillo, se usó una concentración mínima de 0.5% en tomillo, ya que, según la literatura desde concentraciones de 0.5% en adelante el aceite es capaz de controlar microorganismos en matrices alimenticias como queso fresco (Torres Avellán, 2019). Se establecieron distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo y orégano en queso crema para posteriormente ser inoculados con las bacterias seleccionadas (Cuadro 2).

Cuadro 2

Tratamientos aplicados en la matriz láctea.

Tratamientos	Aceite	Concentraciones (%)
TRT 1	Tomillo	0.5
TRT 2	Tomillo	0.75
TRT 3	Tomillo	1
TRT 4	Orégano	0.25
TRT 5	Orégano	0.5
TRT 6	Orégano	1
Testigo	N. A	N. A

Cabe recalcar que a cada tratamiento se le agregó un 25% más considerando una pérdida similar en el proceso de desuerado, esta información fue proporcionada por la planta de lácteos de Zamorano.

Preparación de los Cultivos de Staphylococcus Aureus y Escherichia Coli

Para preparar los inóculos se activó cepas de *Escherichia coli* ATCC 35219 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LAMZ). Una alícuota de las cepas almacenadas a -20 °C fue tomada y reactivada realizando una siembra de los microorganismos en el medio de cultivo Agar Cuenta Estándar, para lo cual se utilizó la técnica de

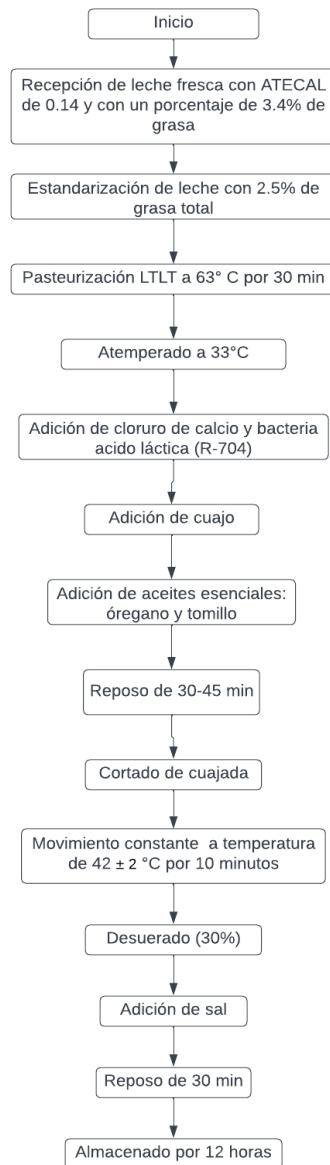
estriado de superficie, los aislados fueron incubados por 24 horas a 37 ± 2 °C. Se verificó que las cepas no presenten contaminación y se aislaron colonias para preparar el inóculo.

Inoculación del Queso Crema

La inoculación se realizó en el laboratorio de microbiología de Zamorano (LAMZ). Para la inoculación del queso se seleccionaron colonias aisladas de las cepas reactivadas. Las colonias seleccionadas de cada una de las cepas fueron diluidas en 9 mL de agua peptonada con el propósito de llevar al inóculo a una concentración conocida. Para realizar esto se ajustó la absorbancia de la suspensión para de *S. aureus* y *E. coli* obteniendo absorbancias de 0.05 y 0.049 respectivamente. Con estas absorbancias se estimó la densidad microbiana a inocular, utilizando como punto de referencia las concentraciones definidas mediante la escala de McFarland considerando que a una absorbancia de 0.08 a 0.1 equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (tubo 0.5 en escala de McFarland). Luego, se añadió 1 mL de la suspensión para cada queso de 150 gramos previamente preparado de acuerdo con las concentraciones definidas de aceites esenciales en cada tratamiento. Posteriormente, para homogenizar el inóculo y que este se distribuya en todo el queso de manera uniforme cada queso inoculado fue sometida al masticador durante 2 minutos. Por último, se almacenó a una temperatura de 4 ± 2 °C durante los 21 días, simulando el tiempo de vida de anaquel del queso. A continuación, se muestra la Figura 1 en donde se representa el flujo de proceso de elaboración e inoculación del queso, que abarca desde la obtención de la leche hasta el almacenado.

Figura 1

Flujo de proceso de elaboración de queso crema.



Tiempo de Muestreo

Se tomaron medidas en el tiempo al día 1, 11 y 21 para poder analizar como actuaban los aceites esenciales durante la vida de anaquel del queso crema, la cual es de 21 días y así poder analizar que tanto reducían las cargas microbianas en el queso, si este era capaz de matar o solo inhibir para ambas bacterias. Se realizaron tres controles, los cuales fueron queso sin aceite esencial e inoculado con bacteria, este para evaluar la carga microbiana presente en el queso inoculado (Control Positivo),

queso solo con los aceites esenciales para así determinar que no existe contaminación en el producto utilizado (Control Negativo I), y queso sin ningún tipo de aditivo para verificar que no existió algún tipo de contaminación durante la preparación del queso (Control Negativo II).

Análisis Microbiológico de *Staphylococcus Aureus*

De cada tratamiento inoculado con *S. aureus* se tomaron muestras de 10 g que fueron añadidas a 90 mL de solución buffer de fosfato, se homogenizó utilizando un masticador durante un minuto para obtener la dilución 10^{-1} . A partir de esto se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-7} Para determinación de *S. aureus*, se utilizó el medio de cultivo Baid-Parker con Yema de Huevo el cual es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *S. aureus* a partir de materiales tales como alimentos, este contiene fuentes de carbono y nitrógeno fundamentales para el crecimiento, también contiene glicina, cloruro de litio y el telurito potásico que actúan como agentes selectivos y la yema de huevo que constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y la producción de lipasas. La técnica de siembra fue extendido en superficie, donde se realizó una modificación del método proporcionado por Tallent et al. (2019), en el que la muestra se dividió en dos de 0.5 mL, sembrados en dos placas Petri con Baid-Parker más Yema de Huevo. Las placas fueron incubadas a 37 ± 2 °C durante 24h. Las colonias características de *S. aureus* adquieren una tonalidad que va desde el gris oscuro hasta el negro, ya que provocan la disminución del telurito. Aquellas bacterias que tienen la capacidad de producir lecitinasa, descomponen la yema de huevo y originan áreas transparentes alrededor de las colonias respectivas.

Análisis Microbiológico de *E. coli*

De cada tratamiento inoculado con *E. coli* se tomaron muestras de 10 g, y que fueron añadidas a 90 mL de solución de fosfato, se homogenizó utilizando un masticador durante 1 min para así obtener la dilución 10^{-1} . A partir de esto se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-7} . Para la identificación de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo Agar Bilis Rojo Violeta con Mug (ABRV-MUG); Este medio contiene una combinación de tejido animal digerido y extracto de levadura, que actúan como

fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos. Adicionalmente, el medio contiene MUG en 4-metilumbeliferona, que es una molécula que emite fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta para evaluar la actividad beta-glucuronidasa característica de *E. coli*. La técnica utilizada para la siembra de las muestras fue vertido en placa de acuerdo con FDA (2020), fueron incubadas por 24 horas a 37 ± 2 °C. Las colonias características de *E. coli* se observan como colonias color rosa a rojo, generalmente rodeadas por una zona rojiza de bilis precipitada y exhiben halos fluorescentes azules cuando se examinan bajo luz ultravioleta de onda larga.

Evaluación de Aceites Esenciales In Vitro

Preparación de la Cepa

Se utilizaron los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 35219 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, los cuales estaban almacenados en una alícuota de -20°C , se tomó de una muestra de ambos cultivos, los cuales fueron reactivados realizando una siembra de los microorganismos en el medio de cultivo de Agar Cuenta Estándar, para lo cual se utilizó la técnica de estriado por superficie para verificar que no exista contaminación y obtener colonias aisladas, los cultivos fueron incubados por 24 horas a 37 ± 2 °C. Estos cultivos se llevaron a la concentración de 0.5 en la escala de McFarland (American Society For Microbiology, 2009).

Evaluación de Sensibilidad

Se realizó un antibiograma mediante el método de difusión por disco o Kirby-Bauer para evaluar la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales en ambas bacterias utilizando el método proporcionado por American Society For Microbiology. Se efectuó mediante diluciones de los aceites esenciales tomando como concentración inicial el agente activo que se encuentra en mayor concentración en cada aceite esencial, los aceites fueron llevados a las concentraciones definidas para los tratamientos, adicionalmente se evaluó cada aceite a la concentración original del producto.

Preparación de Diluciones de Aceites Esenciales

Se realizó diluciones para cada aceite esencial utilizando la Ecuación 1 para lograr las concentraciones similares a las planteadas en los quesos. Las concentraciones utilizadas se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Tratamientos aplicados en antibiograma.

Producto	Agente activo	Concentraciones (%)
Tomillo	Timol	55
Tomillo	Timol	0.5
Tomillo	Timol	0.75
Tomillo	Timol	0.25
Orégano	Carvacrol	83
Orégano	Carvacrol	0.25
Orégano	Carvacrol	0.5
Orégano	Carvacrol	1

Preparación de Cepas para Siembra

De las cepas aisladas de *Escherichia coli* ATCC 35219 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se seleccionaron colonias aisladas, a partir de cada cepa se preparó una dilución en agua peptonada por bacteria y se la llevó a una turbidez de 0.5 en escala McFarland.

Antibiograma

Para cada concentración se sembró en un plato Petri con Agar Cuenta Estándar (ACE) inoculado con cada una de las bacterias utilizando la técnica de siembra en césped o masiva. Posterior a esto, con una micropipeta de 200 μL se colocó 10 μL de cada una de las concentraciones de aceites esenciales previamente preparadas sobre discos estériles de papel filtro Whatman Grado 1. Estos discos fueron colocados en el centro de los platos Petri sembrados con las bacterias. Los platos fueron incubados por 12 h a una temperatura de 37 ± 2 °C (Matuschek et al., 2014). Para su reporte, se mide el diámetro del halo de inhibición alrededor del disco.

$$\text{Ecuación de dilución} = C1 \times V1 = C2 \times V2 \quad [1]$$

Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en un Diseño Completamente al Azar para ambas etapas del experimento. En queso con siete tratamientos (Cuadro 2) que comprendieron los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) que se incorporaron en la formulación del queso crema en tres concentraciones, más el tratamiento testigo que no contiene aceite esencial. Se evaluó el efecto de los tratamientos a través del tiempo en los días 1, 11 y 21 con una repetición con dos replicas con el fin de disminuir la variabilidad experimental causada por la matriz.

Para la evaluación de sensibilidad, se evaluó cada aceite con el agente activo a distintas concentraciones como se observa en el Cuadro 3. Resultando en un total de 8 tratamientos en los cuales se diluye el compuesto activo en 3 concentraciones para cada aceite esencial (Cuadro 3) y 3 repeticiones por microorganismo.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó utilizando el Programa "Statistical Analysis System" (SAS® versión 9.4). Aplicando una significancia de 95% ($P \leq 0.05$) a tratamientos, días y la interacción tratamiento-día. Se realizó un análisis de varianza con separación de medias Duncan.

Resultados y Discusión

Staphylococcus Aureus

Todos los tratamientos tuvieron una disminución de la carga microbiana respecto al testigo en el día 1. El inóculo partió con una concentración inicial de 9 log UFC/g, para el día 1 se observa una disminución de 2-3 log UFC/g. Como se observa en el Cuadro 4, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos desde el día 1 ($P < 0.05$) en los que se puede observar que tomillo 0.75, orégano 0.25 y 0.5% tuvieron diferencia significativa respecto al resto de tratamientos. En el día 11 se presentan los recuentos en los que destacan los tratamientos tomillo 0.5, 0.75 y 1%, y orégano 1% como los mejores. Para el día 21 el tratamiento 0.5 y 1% de tomillo junto con orégano al 1% no presentaron diferencias significativas colocándose como los mejores tratamientos y, por otra parte, el tratamiento de orégano al 0.25, 0.5% y testigo como los más inefectivos. Además, se observa una tendencia a incrementar densidad microbiana en los tratamientos de tomillo 0.75%, orégano 0.5 y 1%. Durante los 21 días evaluados, los días de mayor disminución ocurre en el transcurso del día 0 al día 11, a partir de ese día se presenta una tendencia estacionaria y de incremento leve en ciertos tratamientos.

Cuadro 4

Supervivencia de Staphylococcus aureus bajo la presencia de aceite esencial de tomillo y orégano, y su testigo.

Tratamiento	Media \pm D.E (Log UFC/g)		
	Día 1	Día 11	Día 21
Tomillo 0.5%	5.75 \pm 0.02 ^{ab}	5.30 \pm 0.12 ^{ab}	5.16 \pm 0.10 ^a
Tomillo 0.75%	5.65 \pm 0.13 ^a	5.27 \pm 0.11 ^{ab}	5.48 \pm 0.10 ^{bc}
Tomillo 1%	5.81 \pm 0.27 ^{ab}	5.21 \pm 0.11 ^a	5.12 \pm 0.11 ^a
Orégano 0.25%	6.33 \pm 0.11 ^c	5.79 \pm 0.11 ^d	5.64 \pm 0.19 ^c
Orégano 0.5%	6.01 \pm 0.11 ^b	5.48 \pm 0.11 ^{bc}	5.61 \pm 0.13 ^c
Orégano 1%	5.81 \pm 0.10 ^{ab}	5.24 \pm 0.10 ^a	5.29 \pm 0.26 ^{ab}
Testigo	8.53 \pm 0.15 ^d	5.67 \pm 0.14 ^{cd}	5.67 \pm 0.16 ^c
C.V (%)	2.50	2.23	3.05

Nota. Las medias con diferentes letras (abc) en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamiento.

CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar. UFC: unidades formadoras de colonia.

Se observó que dado el corto periodo de tiempo que se le dio al Día 1 los aceites presentaron reducciones en las concentraciones de log UFC/g de *S. aureus*, a pesar de que algunos presentaron similitudes en el recuento de *S. aureus* entre los tratamientos. Se puede observar como a medida que iban pasando los días la densidad microbiana comenzaba a reducirse como se puede observar en el Día 11, mientras que en el Día 21 se puede observar como algunos no siguieron bajando, sino que tendieron a subir ligeramente, pero nunca excediendo en comparación al Día 1. Podemos decir que el mejor tratamiento para el control de *Staphylococcus aureus* fue tomillo al 1%, 0.5% y orégano al 1%, reduciendo 3.88, 3.84 y 3.71 log UFC/g respectivamente al Día 21, siendo únicamente los ensayos con aceite de tomillo que este efecto bactericida se mantiene en el tiempo. Esto es debido a las concentraciones químicas de timol y carvacrol que poseen el aceite genera una permeabilidad en la membrana ocasionando una liberación de contenido celular que posteriormente lleva a lisis celular (Silva Rodriguez, 2021; Wijesundara et al., 2022).

A continuación, se presentan las Figuras 2 y 3 para representar la curva de letalidad durante los días evaluados.

Figura 2

Comportamiento de Staphylococcus aureus en presencia de aceite esencial de tomillo durante 21 días.

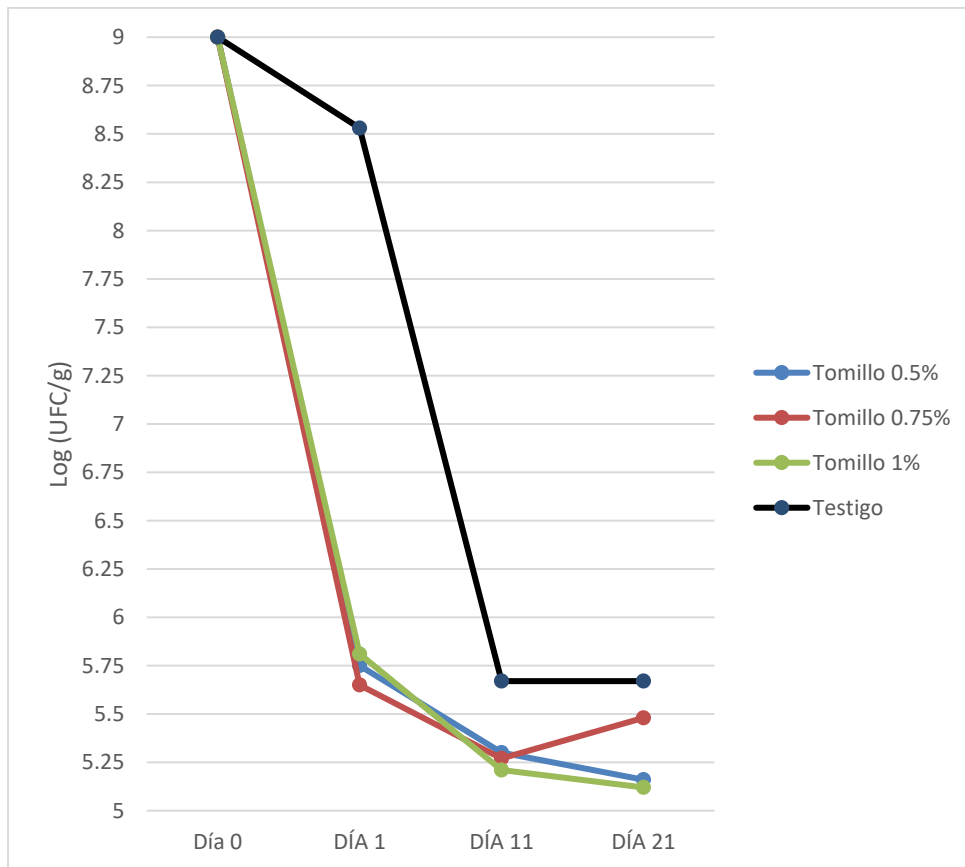
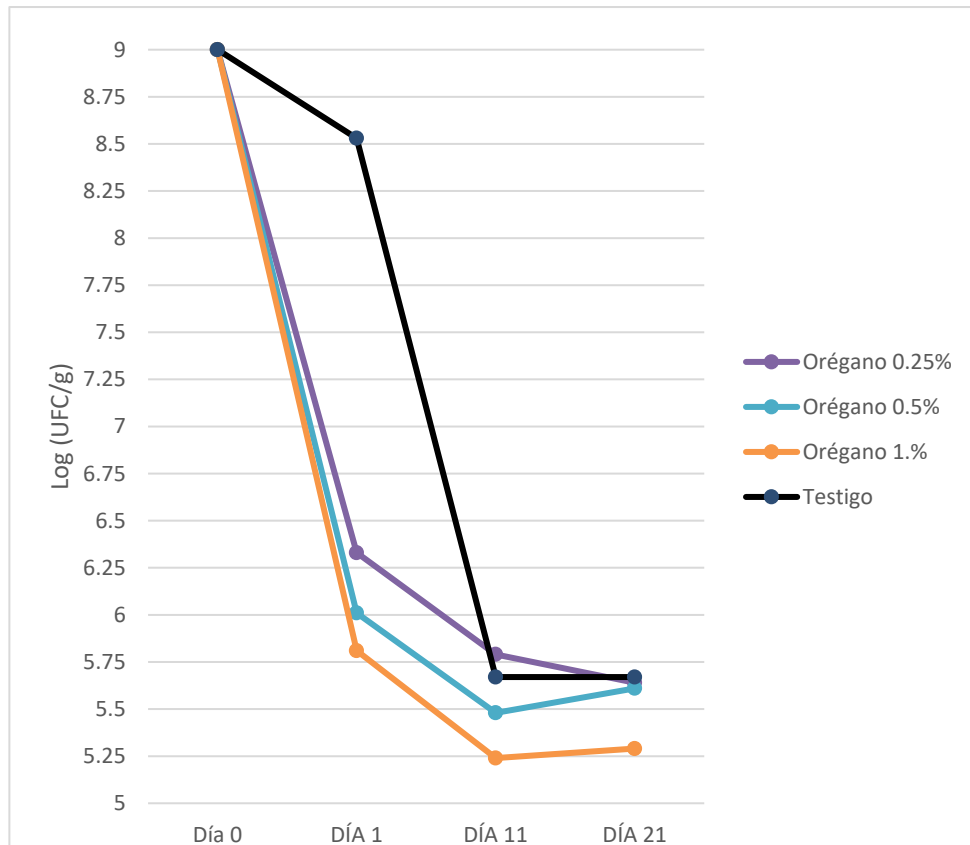


Figura 3

Comportamiento de Staphylococcus aureus en presencia de aceite esencial de orégano durante 21 días.



La pendiente de la curva representa la velocidad a la que las células mueren y se mide en unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de tiempo. Es factible determinar un modelo matemático que estime de manera más precisa esta pendiente, así como calcular las UFC en diferentes momentos y concentraciones. Este modelo es una representación óptima de los datos recopilados y permite comparar las diversas tasas de inactivación que los antimicrobianos pueden tener. Ya se han identificado parámetros cinéticos y modelos matemáticos para describir cómo poblaciones microbianas responden a antimicrobianos naturales en diferentes tipos de alimentos (Alvarez Badel et al., 2022).

Las curvas de letalidad microbiana siguen un descenso exponencial del Día 0 al Día 11, en el que se puede observar cómo los aceites actúan como bactericidas naturales ya que tomillo y orégano poseen compuestos fenólicos, los cuales son timol y carvacrol, los cuales son poderosos antimicrobianos, que pueden romper la membrana microbiana y acceder al interior de la célula, lo que les permite interferir con los procesos metabólicos vitales para los microorganismos, lo que finalmente conduce a la eliminación de las bacterias (Garay Montañez, 2015), del Día 11 al 21 se puede observar cómo empieza una linealidad y un pequeño aumento entre el logaritmo de los supervivientes en relación con el tiempo de los tratamientos, tanto en orégano como en tomillo. En la curva se observa tanto en los tratamientos como el testigo que comienzan en una misma concentración y a medida los días van pasando la letalidad de los aceites hacen que la curva comience un descenso exponencial, se puede observar como el testigo comenzó con 9 log UFC/g y llegó a 5.75 log UFC/g, esto se dio a la temperatura de almacenamiento a la que se tuvo el queso, ya que se mantuvo a temperaturas de 4°C y *S. aureus* sobrevive hasta temperaturas de 7°C (Zendejas Manzo et al., 2014). En el caso de las otras curvas de mortalidad la linealidad que presentan se debe a *S. aureus* comenzó a sobrevivir, ya que estas bacterias son capaces de generar supervivencia cuando son expuestas a ambientes hostiles provocados por antibióticos (Cervantes García et al., 2014). También nuestra matriz alimenticia, en este caso el queso es capaz de proporcionar nutrientes como agua, proteínas y aminoácidos, azúcares (lactosa) y sal (Caycedo Lozano et al., 2021). Esto pudo generar que cierta cantidad de bacteria resistiera a los aceites esenciales generando un pequeño aumento en los logs UFC/g o generando que la curva se mantuviera y no siguiera descendiendo.

Escherichia coli

En el Cuadro 5 se observan los conteos microbiológicos de *E. coli* bajo cada uno de los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los días evaluados. A pesar de esto, si existe diferencia significativa entre tratamientos por día. Por consiguiente, el inóculo partió con una concentración aproximada de 6.5 a 7.5 log UFC/g, para el día 1 el tratamiento de aceite

esencial de tomillo al 0.5% se presenta como el que tuvo menor efecto inhibitorio pues tiene una disminución del 2.36 log UFC/g, mientras que los demás no poseen diferencias significativas entre ellos. A pesar de esto, para el Día 11 los tratamientos menos efectivos fueron aceite esencial de tomillo al 0.5 % y 0.75% junto con el testigo siendo una reducción de 3.83, 3.84 y 3.70 log UFC/g. Por otra parte, tomillo al 1% y orégano al 0.5% y 1% se presentan como los mejores con reducciones en la densidad microbiológica 4.23, 3.97 y 4.14 respectivamente. Aunque, para el Día 21 no existen diferencias significativas entre los tratamientos resultando con una reducción de la carga microbiológica promedio de 4.19 log UFC/g.

Además, se puede apreciar que entre el Día 1 y 11 existe una disminución promedio de 1.07 log UFC/g en comparación al ocurrido entre los Días 11 y 21 es de 0.24 log UFC/g. Es decir, que la efectividad más importante ocurre en los primeros días

Cuadro 1

Sobrevivencia de Escherichia coli bajo la presencia de aceite esencial de tomillo y orégano, y su testigo.

Tratamiento ^{NS}	Media \pm D.E (Log UFC/g)		
	Día 1	Día 11	Día 21
Tomillo 0.5%	5.14 \pm 0.12 ^b	3.67 \pm 0.11 ^c	3.39 \pm 0.17 ^a
Tomillo 0.75%	4.71 \pm 0.74 ^{ab}	3.66 \pm 0.17 ^c	3.37 \pm 0.13 ^a
Tomillo 1%	4.19 \pm 0.26 ^a	3.27 \pm 0.24 ^a	3.31 \pm 0.16 ^a
Orégano 0.25%	4.74 \pm 0.10 ^{ab}	3.56 \pm 0.20 ^{bc}	3.23 \pm 0.18 ^a
Orégano 0.5%	4.22 \pm 0.12 ^a	3.53 \pm 0.13 ^{abc}	3.24 \pm 0.12 ^a
Orégano 1%	4.39 \pm 0.14 ^a	3.36 \pm 0.12 ^{ab}	3.29 \pm 0.11 ^a
Testigo	4.70 \pm 0.12 ^{ab}	3.80 \pm 0.10 ^c	3.36 \pm 0.11 ^a
C.V (%)	6.97	4.05	4.50

Nota. Las medias con diferentes letras (abc) en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamiento.

NS: No hubo diferencias significativas entre días. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar. UFC: unidades formadoras de colonia.

El timol y el carvacrol son compuestos fenólicos que desempeñan un papel preponderante en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y tomillo. El timol exhibe propiedades inhibitorias contra diversas bacterias, incluyendo *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella Typhimurium*, así como frente a levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Carmo et al., 2008;

Gaysinsky, 2007). Según Friedman et al. (2002) la concentración requerida para conferir actividad bactericida de algunas especias, como clavo, orégano, canela y otras, contra *E. coli*, osciló entre el 0.046% y el 0.14%; utilizando concentraciones menores que las aplicadas en este experimento pero resultados favorables a pesar de esto. La razón de esto podría estar dada a que las dosis utilizadas en alimentos son dependientes de la complejidad de la matriz, sus componentes y propiedades intrínsecas, y el microorganismo a tratar. Así como del impacto organoléptico y toxicológico a medida se aumenta la cantidad aplicada (Viuda-Martos et al., 2008). Por ejemplo, los aceites esenciales de tomillo y orégano, cuando se utilizaron en concentraciones del 0.1% al 0.3%, demostraron ser efectivos en la preservación de productos cárnicos sumergidos en ellos y combinados con envasado en atmósfera modificada (Karabagias et al., 2011). Otro ejemplo es el estudio realizado por Cava et al. en el 2007, en donde establece que la cantidad mínima bactericida (CMB) de aceite esencial de canela (hoja y corteza) y clavo de olor varía entre 0.3% a 1.1% según la parte de la planta aplicado a leche semidescremada en la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes*.

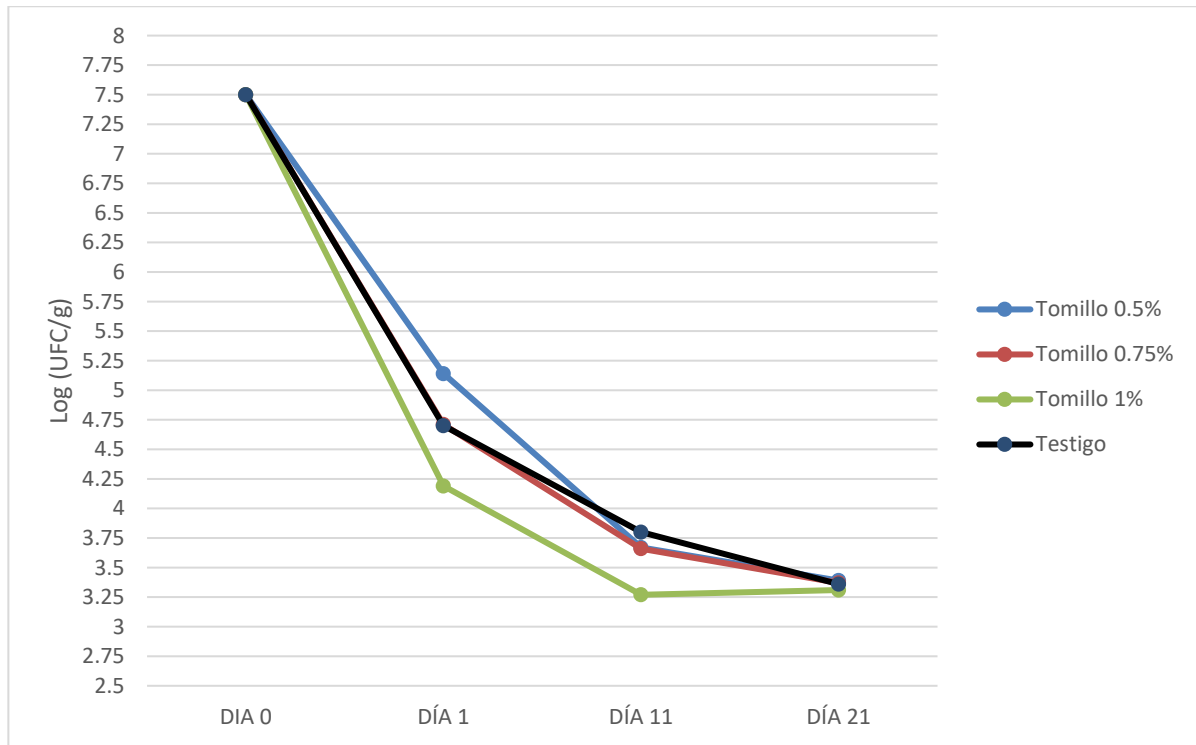
Además, se debe considerar la procedencia de las plantas ya que los compuestos químicos obtenidos de estos y sus concentraciones puede variar dependiendo de diversos factores fenotípicos y genotípicos, así como ambientales y, por ende, afecta la efectividad como bactericida o bacteriostático (Acero Godoy et al., 2019). Otro factor a considerar es la temperatura, Caycedo Lozano et al. (2021) menciona que la temperatura óptima de crecimiento de la *E. coli* es de 37 °C, que es la temperatura del intestino, donde se encuentra normalmente. El autor también declara que es capaz de sobrevivir en rangos entre 10 y 50 °C, aunque por debajo y encima de estos rangos su crecimiento disminuye o se inhibe.

En las Figuras 4 y 5 se observa que del día 11 al día 21 se puede observar como en la curva de muerte comienza a haber una linealidad, la cual no sigue descendiendo, sino manteniéndose, esto se puede deber a varios factores, ya que las bacterias gramnegativas son capaces de producir una combinación de mecanismos de resistencia, algunos de forma natural y otros de forma adquirida, con

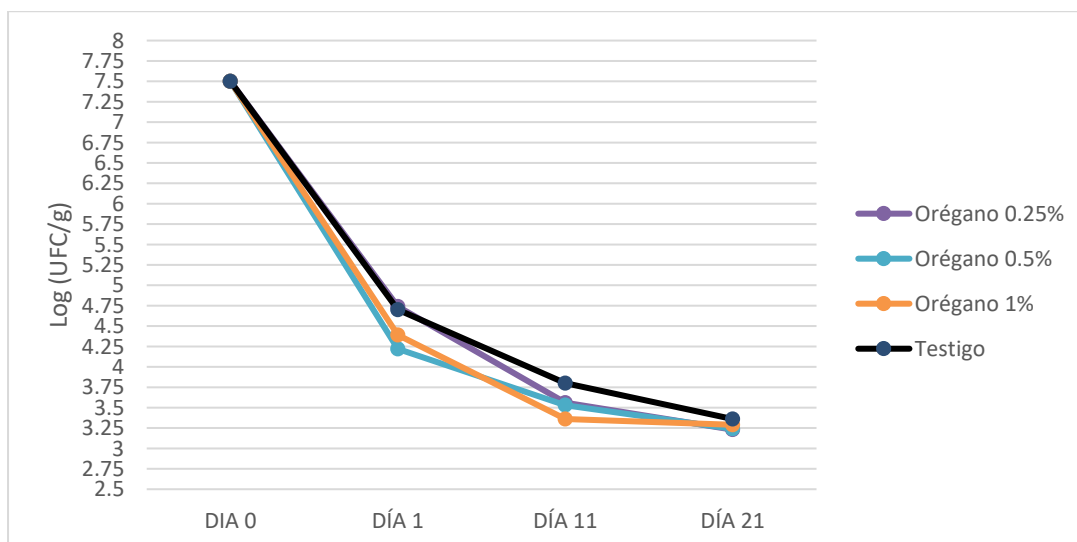
la finalidad de resistir una amplia gama de antibióticos, es muy probable que *E. coli*, para asegurar su supervivencia hacia los aceites comenzara a disminuir la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa, ya que poseen porinas, que son canales proteicos en su membrana externa, las cuales se encargan de transportar moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático, la bacteria una vez que capta las moléculas en el espacio periplasmático cierra porinas y comienza a producir una enzima B-lactamasas tipo ampC la cual es la que confiere la resistencia a el grupo de antibióticos y se encarga de hidrolizar el antibiótico y así registrar la resistencia (Suarez et al., 2006). También es muy probable que *E. coli* haya producido biofilm, es una población de células, las cuales se unen a una superficie en vueltas en una matriz de exopolisacaridos, lo cual usan para protegerse de antibióticos, esto con la finalidad de aumentar la resistencia de los antimicrobianos creando varias defensas como es la inactivación de los antimicrobianos por polímeros extracelulares o modificación enzimáticas y modificaciones bacterianas para crear genes resistentes en las bacterias que están dentro del biofilm (Mendoza y Bac Esp., 2004). De esta forma, *E. coli* pudo mantenerse en un estado de latencia, en el cual la curva no seguía descendiendo, si no que se mantenía de forma lineal.

Figura 4

Comportamiento de Escherichia coli en presencia de aceite esencial de tomillo durante 21 días.

**Figura 5**

Comportamiento de Escherichia coli en presencia de aceite esencial de orégano durante 21 días.



Evaluación de Sensibilidad

En el Cuadro 6 se representan los resultados del antibiograma. El análisis muestra una inhibición más efectiva para *Staphylococcus aureus* de manera general, siendo el mejor el aceite sin diluir de tomillo (55%), seguido de el de orégano (83%), lo que demuestra la efectividad de los aceites esenciales frente a *S. aureus*. Por último, los tratamientos aplicados a la matriz láctea no presentan diferencias significativas entre ellos, sin embargo, se observa una tendencia a aumentar el halo de inhibición conforme aumenta la concentración de componente activo.

Por otra parte, en *E. coli* el aceite esencial de tomillo sin diluir (55%) resulta como el mejor tratamiento seguido de orégano sin diluir (83%) con un halo de inhibición 54 y 47 mm respectivamente. En cuanto a los tratamientos aplicados a la matriz láctea se observa que no existen diferencias significativas entre ellos a excepción de orégano al 0.25% en la cual su halo de inhibición fue nulo.

Cuadro 2

Antibiograma por método Kirby-Bauer evaluando aceite esencial de tomillo y orégano.

Tratamiento	Media \pm D.E (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Tomillo 55%	80 \pm 5.51 ^a	54 \pm 7.00 ^a
Tomillo 0.5%	8 \pm 2.08 ^c	6 \pm 2.00 ^{c d}
Tomillo 0.75%	8 \pm 1.53 ^c	6 \pm 3.06 ^{c d}
Tomillo 1%	11 \pm 0.58 ^c	9 \pm 0.58 ^c
Orégano 83%	65 \pm 5.03 ^b	47 \pm 3.79 ^b
Orégano 0.25%	9 \pm 0.58 ^c	00 \pm 0.00 ^d
Orégano 0.5%	10 \pm 1.00 ^c	6 \pm 2.65 ^{c d}
Orégano 1%	13 \pm 0.58 ^c	9 \pm 1.00 ^c
CV (%)	11.71	19.96

Nota. Las medias con diferentes letras (abc) en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamiento. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar. UFC: unidades formadoras de colonia.

De manera general, *S. aureus* presenta una mayor sensibilidad a los aceites esenciales en comparación a *E. coli*. Por lo que, considerando que *S. aureus* es una grampositiva y *E. coli* es una

gramnegativa, Delaquis en 2002 reporta que la efectividad de los aceites esenciales disminuye en las bacterias gramnegativas en comparación a grampositivas. Esto es confirmado por Oyieng Angienda et al. en el 2010 donde menciona que la susceptibilidad está relacionada a la estructura de la membrana celular, las gram negativas poseen una estructura más compleja compuesta por dos capas que la protegen y dan rigidez; mientras que la grampositiva no posee una capa externa lo que confiere a dichas estructuras mayor vulnerabilidad a los compuesto fenólicos de los aceites esenciales. El autor también hace referencia a que los componentes de la grampositiva al ser hidrofóbicos poseen afinidad por las grasas, lo que les permite distribuirse a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrias alterando su estructura aumentando susceptibilidad.

Una posible razón de la resistencia de la *E. coli* es debido a que las bacterias gramnegativas poseen un sistema de eflujo capaz de expulsar compuestos tóxicos, incluyendo antibióticos y productos químicos fuera de la célula a través de un sistema de transporte de eflujo, siendo uno de estos Resistant-Nodulation-Division (RND), que se reporta como el comúnmente encontrado en esta bacteria (Poole, 2004, 2007). Además, cabe mencionar que las gramnegativa son naturalmente más resistentes que las grampositivas como resultado de su membrana externa que le proporciona impermeabilidad y su función como primera barrera de protección; también de otras características como la modificación o destrucción enzimática, y mutaciones (Poole, 2002).

Según Gonzalez et al. (2021), el aceite esencial de tomillo tiene un mayor efecto en la inhibición de *E. coli* a medida se aumenta su concentración, obteniendo una mayor efectividad en aquellos donde la concentración es alta en comparación al resto de tratamientos. Esto es confirmado por Mollea et al. en su estudio realizado en el 2022, en donde evalúa la efectividad de aceite esencial de tomillo y orégano sobre una bacteria grampositiva y gramnegativa. El autor reporta un comportamiento similar en donde tomillo tiene un poder inhibitorio mayor en comparación a orégano en ambos microorganismos; y la bacteria gram negativa tiene un diámetro de inhibición menor que la gram positiva.

Respecto a la concentración de 0.25% de orégano, su resultado como el peor de los tratamientos y el cual no presenta inhibición alguna en *E. coli* pero sí en *S. aureus* podría estar relacionado a el “umbral de efecto de los aceites esenciales”, es decir, que si la concentración está por debajo del valor necesario, permitirá el crecimiento bacteriano; además, de la resistencia que presentan las bacterias gramnegativas (Saranraj y Durga Devi, 2017). Además, considerando lo anteriormente mencionando por el autor, podría explicar el comportamiento observado en los resultados de *S. aureus* en los cuales se observan que algunos tratamientos empiezan a tener un ligero aumento en su carga microbiana.

Cabe mencionar que la variación entre estudios de sensibilidad utilizando aceites esenciales puede variar en cuanto a su zona de inhibición principalmente por dos factores: de la difusión uniforme de la sustancia en el medio como de la liberación de vapores sobre las bacterias analizadas (Friedman et al., 2002).

Conclusiones

Los aceites esenciales de orégano y tomillo mostraron propiedades antimicrobianas en contra de *Staphylococcus aureus* dificultando el establecimiento de la bacteria en la matriz láctea.

Los tratamientos aplicados a *Escherichia coli* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento y lo que podría estar relacionado con los mecanismos de resistencia a antimicrobianos que presentan las bacterias gramnegativas.

El mejor tratamiento en el queso fue tomillo al 1%, ya que este fue el que presentó un mayor rango de inhibición para ambas bacterias.

Los aceites esenciales de tomillo y orégano presentaron propiedades antimicrobianas sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentando mayor susceptibilidad las bacterias grampositivas en el estudio in vitro.

El aceite esencial de tomillo presentó un mayor poder inhibitorio en comparación a orégano para tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, en el estudio in vitro.

Recomendaciones

Se recomienda llevar a cabo análisis sensoriales exhaustivos para evaluar la aceptación de las personas en relación con el sabor y aroma de los aceites esenciales.

Analizar el efecto de los aceites esenciales sobre otros patógenos de interés alimentario incidentes en productos lácteos, como es el caso de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*.

Evaluar el efecto de los aceites esenciales sobre otras matrices alimenticias, para así observar su comportamientos y actividad antimicrobiana en alimentos como carne a través del tiempo.

Se recomienda realizar análisis químicos con el propósito de cuantificar la cantidad de compuestos activos en la matriz láctea.

Referencias

- Acero Godoy, J., Guzmán Hernández, T. y Muñoz Ruiz, C. (2019). Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Tecnología En Marcha*, 32(1), 3–11. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822019000100003&script=sci_abstract&tlng=es
- Amadio, C., Medina, R., Zimmerman, M. É., Dediol, C. y Miralles, S. (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias*, 43(1), 237–245. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837648017>
- American Society For Microbiology (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. (Protocolo). Washington, DC. <https://asm.org/protocols/kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-pro>
- Arshad, M. S. y Batool, S. A. (2017). Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety. En D. N. Karunaratne y G. Pamunuwa (Eds.), *Food Additives*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70197>
- 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]. Universidad Nacional de Córdoba. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/1692>
- Atarés, L., Jesús, C. de, Talens, P. y Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.004>
- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A. y Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
- Băicuș, A., Mattuzzi, F. C., Paraschiv, A. M., Dinu, R.-S., Dumitrescu, M. C., Marinescu, A. A., Ionescu, D. y Dragos, D. (2022). Antibacterial Activity of Clove, Oregano, Thyme, Eucalyptus, and Tea Tree Essential Oils against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Revista Romana De Medicina De Laborator*, 30(3), 327–338. <https://doi.org/10.2478/rrlm-2022-0023>
- Ballester Costa, C. (2016). *Composición química y propiedades antibacterianas y antioxidantes de aceites esenciales de especies de thymus procedentes de cultivo ecológico y su aplicación a películas de quitosano*. Universidad Miguel Hernández de Elche. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=64432>
- Carmo, E. S., Lima, E. d. O. y Souza, E. L. de (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 362–367. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200030>
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A. y Marin-Iniesta, F. (2007). Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 70(12), 2757–2763. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.12.2757>

Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C. y Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Cervantes García, E., García Gonzáles, R. y Salazar Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>

Delaquis, P. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00734-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00734-6)

Dorman, H. J. y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

Doyle, M. P. y Erickson, M. C. (2006). Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science*, 74(1), 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.009>

Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A. y Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1019–1024. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.1019>

Food and Drug Administration (2020). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>

Friedman, M., Henika, P. R. y Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1545–1560. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>

Garay Montañez, H. E. (2015). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *origanum vulgare* L. "Orégano" sobre cepas de *escherichia coli* y *staphylococcus aureus*, in vitro. Cajamarca. 2015. <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/1643>

García Panadero, I., Álvarez-Ortí, M., Rabadán, A. y Pardo, J. E. (2019). El sistema APPCC como herramienta para reducir el riesgo de aparición de *Listeria monocytogenes* en vegetales congelados. En P. Martín Ramos y F. J. García Ramos (Eds.), *Congreso Ibérico de Agroingeniería* (pp. 1209–1220). Servicio de Publicaciones Universidad. https://doi.org/10.26754/c_agroing.2019.com.3357

Gaysinsky, S. (2007). *Emulsions and microemulsions as antimicrobial delivery systems*. University of Massachusetts Amherst, Estados Unidos. <https://scholarworks.umass.edu/dissertations/AAI3289244>

Gonzalez, K., Johnson, A., Gonsalves, V. y Santos, A. (2021). The Effect of Thyme Essential Oil on *Escherichia coli*. *The FASEB Journal*, 35(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.04658>

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. y Chatzopoulou, P. S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.017>

Inamuddin, Ahamed, M. I. y Prasad, R. (Eds.). (2021). *Environmental and Microbial Biotechnology. Advanced Antimicrobial Materials and Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-7098-8>

Ivanišová, E. (Ed.). (2023). *Herbs and Spices - New Advances*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104270>

Jaguey Hernández, Y. y Castañeda Ovando, A. (2023). Intoxicación alimentaria, un padecimiento más común de lo que pensabas. *Con-Ciencia Boletín Científico De La Escuela Preparatoria No. 3, 10(20)*, 56–58. <https://doi.org/10.29057/prepa3.v10i20.10773>

Jiang, Y. y Li, Y. (2001). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry, 73(2)*, 139–143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00246-6)

Karabagias, I., Badeka, A. y Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science, 88(1)*, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.010>

Liang, J., Huang, X. y Ma, G. (2022). Antimicrobial activities and mechanisms of extract and components of herbs in East Asia. *RSC Advances, 12(45)*, 29197–29213. <https://doi.org/10.1039/D2RA02389J>

Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D. y Prajapati, J. B. (2016). Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(5)*, 885–901. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.092>

Matuschek, E., Brown, D. F. J. y Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 20(4)*, O255-66. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>

Mendoza, H. y Bac Esp., M. T. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova, 2(2)*, 71. <https://doi.org/10.22490/24629448.10>

Mollea, C., Bosco, F. y Fissore, D. (2022). Agar Plate Methods for Assessing the Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils against *S. Epidermidis* and *E. Coli*. *Antibiotics (Basel, Switzerland), 11(12)*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121809>

Odonkor, S. T. y Ampofo, J. K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research, 4(1)*, 2. <https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>

Oyieng Angienda, P., Miruka Onyango, D. y Hill, D. J. (2010). Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research, 4*, 1678–1684. https://academicjournals.org/article/article1380294980_Angienda%20et%20al.pdf

Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology, 92*, 55S-64S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>

Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10(1)*, 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>

Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 39(3), 162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>

Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7, 153–170. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

Samelis, J. (2006). Managing microbial spoilage in the meat industry. En *Food Spoilage Microorganisms* (pp. 213–286). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.2.213>

Saranraj, P. y Durga Devi, V. (2017). Essential oils and its antibacterial properties—A review. *Life Science Archives*, 3(2), 991–1011. https://www.researchgate.net/publication/319302027_ESSENTIAL_OILS_AND_ITS_ANTIBACTERIAL_PROPERTIES_-_A_REVIEW

Silva Rodriguez, D. (2021). *Efecto antibacteriano del aceite esencial de Thymus vulgaris sobre Staphylococcus aureus y Escherichia coli: una revisión sistemática*. Universidad César Vallejo, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/88084>

Skandamis, P., Tsigarida, E. y Nychas, G.-J. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of Salmonella typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19(1), 97–103. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0447>

Souza, G. T. de, Carvalho, R. J. de, Souza, N. T. de, Rodrigues, J. B. d. S., Xavier, D. E., Souza, E. L. de y Magnani, M. (2014, October). Antimicrobial Activity of the Origanum Vulgare L. Essential Oil Against Pathogenic and Starter Bacteria Species Related To Brazilian Semi-Hard Cheese (Coalho). En *Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene* (pp. 111–112). Editora Edgard Blücher. <https://doi.org/10.5151/foodsci-microal-325>

Suarez, C. J., Kattan, J. N., Guzmán, A. M. y Villegas, M. V. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en P. aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2), 85–93. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922006000200006&script=sci_arttext

Tallent, S., Hait, J., Bennett, R. W. y Lancette, G. A. (2019). *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 12: Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A. y Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17(2), 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.007>

Torres Avellán, D. A. (2019). *Efecto de la concentración del aceite esencial de tomillo (thymus vulgaris) sobre la vida útil del queso fresco artesanal* [Tesis de maestría]. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Torres Avellán, D. A. (2019). *Efecto de la concentración del aceite esencial de tomillo (thymus vulgaris) sobre la vida útil del queso fresco artesanal* [Tesis de maestría]. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/1070>

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean

diet. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3), 526–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01489.x>

Wijesundara, N. M., Lee, S. F., Cheng, Z., Davidson, R., Langelaan, D. N. y Rupasinghe, H. P. V. (2022). Bactericidal Activity of Carvacrol against *Streptococcus pyogenes* Involves Alteration of Membrane Fluidity and Integrity through Interaction with Membrane Phospholipids. *Pharmaceutics*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101992>

Zendejas Manzo, G. S., Avalos Flores, H. y Soto Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>