

**Efecto antimicrobiano de aceites esenciales de  
orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo  
(*Thymus vulgare*) individuales y en  
combinación contra *Salmonella* Typhimurium**

**Carlos Francisco Araujo Cruz**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto antimicrobiano de aceites esenciales de  
orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo  
(*Thymus vulgare*) individuales y en  
combinación contra *Salmonella* Typhimurium**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Carlos Francisco Araujo Cruz**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2019

## **Efecto antimicrobiano de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgare*) individuales y en combinación contra *Salmonella* Typhimurium**

**Carlos Francisco Araujo Cruz**

**Resumen.** Por años, la industria alimentaria ha investigado nuevas alternativas para conservar alimentos con compuestos no sintéticos y de origen natural. El uso de aceites esenciales surge como efecto de esta necesidad caracterizado por poseer poder antimicrobiano. El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y tomillo, y la interacción que existe entre ellos contra *Salmonella* Typhimurium. Primero, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada aceite, evaluando su efecto sobre *Salmonella* Typhimurium bajo tres concentraciones en intervalos de 0 y 24 horas. Los tratamientos de 0.06 y 0.12% para ambos aceites presentaron reducciones de 6 Log UFC/ml con respecto al tratamiento control. La reducción del tercer tratamiento de 0.03% no fue significativa. Se tomó como MIC la concentración de 0.06% para ambos aceites. A partir de la MIC se prepararon ocho tratamientos de combinaciones fraccionarias de aceite esencial de orégano y tomillo, evaluando su efecto contra *Salmonella* Typhimurium en intervalo de 0 y 24 horas. Se determinó el índice de concentración fraccional inhibitoria mediante el uso de una ecuación, y luego mediante una tabla se determinó el efecto de la interacción. En conclusión, se determinó tomando las 24 horas como resultado de inhibición, que la interacción de aceite esencial de orégano y tomillo es de efecto aditivo o sinérgico. Se recomienda realizar interacciones con diferentes aceites esenciales o entre sus componentes aislados.

**Palabras clave:** Combinación fraccionaria, FICI, interacción, MIC.

**Abstract.** For years, the food industry has been investigating new alternatives to preserve foods with non-synthetic compounds and from natural origin. The use of essential oils arises as an effect of this need characterized by having antimicrobial power. The objective of this study was to determine the antimicrobial activity of the essential oils of oregano and thyme, and the interaction between them against *Salmonella* Typhimurium. First, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each oil was determined, evaluating its effect on *Salmonella* Typhimurium under three concentrations at intervals of 0 and 24 hours. The 0.06 and 0.12% treatments for both oils showed reductions of 6 Log CFU/ml with respect to the control treatment. The third treatment reduction of 0.03% was not significant. The concentration of 0.06% for both oils was taken as MIC. From the MIC, eight treatments of fractional combinations of oregano and thyme essential oil were prepared, evaluating its effect against *Salmonella* Typhimurium in a range of 0 and 24 hours. The fractional inhibitory concentration index was determined, using an equation, and then using a table the effect of the interaction was determined. In conclusion, it was determined by taking 24 hours as a result of inhibition, that the interaction of oregano and thyme essential oils is of additive or synergic effect. Interactions with different essential oils or between their isolated components are recommended to be studied.

**Key words:** FICI, fractional combination, interaction, MIC.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de Cuadros y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>11</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>12</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>13</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>16</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Concentraciones finales de las combinaciones fraccionales de aceite esencial de orégano (AEO) y tomillo (AET) .....	4
2. Diseño de las combinaciones fraccionarias de AEO y AET con el índice fraccional inhibitorio y la interpretación del efecto. ....	5
3. Recuentos de <i>Salmonella</i> Typhimurium (Log UFC/ml) en agar soya tripticasa de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano y tomillo. ....	6
4. Recuentos de <i>Salmonella</i> Typhimurium (Log UFC/ml) a exposición de diferentes concentraciones fraccionarias de la combinación de aceite esencial de orégano y tomillo.....	8
5. Efecto de <i>Salmonella</i> Typhimurium expuesta a diferentes concentraciones fraccionarias de aceite esencial de orégano y tomillo. ....	10
Anexos	Página
6. Análisis de varianza de actividad antimicrobiana de aceites esenciales de orégano y tomillo.....	16
7. Análisis de varianza de la combinación de aceites esenciales de orégano y tomillo.....	17

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe alta tendencia hacia el consumo de productos frescos y parecidos a su forma original, debido a que se han asociado diversas enfermedades e intoxicaciones con el consumo de conservadores de origen sintético (Rodríguez 2011). Se estima que alrededor del 30% de personas de países industrializados ha sufrido y sufrirá algún tipo de enfermedad transmitida por alimentos, y en el año 2000 al menos dos millones de personas fallecieron debido a diarrea en el mundo (WHO 2002). Según la OMS las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen una causa importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. La OMS en 2017, estima que al año alrededor de 600 millones de personas se enferman por alimentos y que 420,000 mueren por esta causa, siendo *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *E. coli* patógena las mayores responsables. Por ello, se han buscado nuevas alternativas para la conservación de alimentos que sean de origen natural. En los últimos años los extractos de plantas como los aceites esenciales se han estudiado por su actividad antimicrobiana y preservante (Calo *et al.* 2015).

Los aceites esenciales son extractos líquidos aromáticos y volátiles que son extraídos de partes de la planta como las hojas, raíces, flores, semillas, fruto, madera, o la planta entera (Hyldgaard *et al.* 2012). Inicialmente, estos compuestos eran utilizados para la medicina y cosmética, pero luego se fueron incorporando mediante diversos estudios a la industria alimentaria por su actividad antimicrobiana. Se han identificado alrededor de 3000 diferentes aceites esenciales, de los cuales 300 podemos encontrar en el mercado (Burt 2004).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas lipofílicas y altamente volátiles, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. En un estudio por Friedman *et al.* (2002) se probaron 96 aceites esenciales contra bacterias patógenas, de los cuales 27 resultaron tener actividad antibacterial entre los cuales encontraron: orégano, canela, laurel, tomillo, pimienta, entre otros. Los aceites esenciales de orégano y tomillo tienen un marcado efecto antibacterial, asociado a la presencia de sus compuestos fenólicos, carvacrol y timol.

Los compuestos fenólicos de los aceites esenciales interrumpen la función de la membrana celular de las bacterias resultando en la inhibición de las propiedades funcionales de la célula, y así eventualmente causan una fuga del contenido interno de la célula ocasionando lisis celular y su posterior muerte (Bajpai *et al.* 2012). Los componentes carvacrol y timol encontrados en los aceites esenciales de orégano y tomillo han demostrado una alta efectividad contra bacterias patógenas. Estudios indican que la combinación de aceites esenciales puede aumentar la efectividad contra bacterias y reducir en cierta forma el impacto sensorial en los productos a los cuales son aplicados (Reyes *et al.* 2016). Cuando

se realizan combinaciones de aceites esenciales puede resultar en una relación sinérgica, aditiva o antagónica, dependiendo la efectividad y concentraciones utilizadas (Burt 2004). Estudios anteriores reportan que concentraciones de 0.05 a 0.50% (vol/vol) son eficaces para la inhibición del crecimiento de *Salmonella*, *Listeria* y *S. aureus* (Reyes *et al.* 2016). En dicho estudio se percibieron efectos inhibitorios para los patógenos estudiados con concentraciones de 0.15-0.40% con orégano y 0.10-0.12% con tomillo, indicando la alta eficacia del aceite esencial de orégano y tomillo por estar compuestos por carvacrol y timol, que han demostrado alta efectividad contra bacterias patógenas (Tongnuanchan-Benjikul 2014). Por tanto, los objetivos planteados en esta investigación fueron los siguientes:

- Comparar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano y tomillo contra *Salmonella Typhimurium*
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Salmonella Typhimurium*.
- Determinar el efecto de la combinación fraccional de los aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Salmonella Typhimurium*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización del estudio.**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Microbiológico de Zamorano (LAMZ), perteneciente al Departamento de Agroindustria Alimentaria, de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano localizado en el Km 30 en la carretera de Tegucigalpa hacia Danlí, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

### **Etapas I. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y tomillo.**

**Preparación del cultivo.** Se utilizó un cultivo puro de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 brindado por el LAMZ. Partiendo del cultivo congelado, se inoculó en CST (Caldo Soya Trypticasa) a 37 °C por 24 horas. Luego, se tomó una asada y mediante la técnica de estriado en placa se aisló una colonia incubándose a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se transfirió una colonia a un tubo con caldo soya tripticasa, luego incubándose a 37 °C por 24 horas, para obtener un inóculo de aproximadamente  $10^9$  UFC/ml. Se agregó a cada tubo con el tratamiento 0.1 ml del inóculo con una concentración final de aproximadamente  $10^7$  UFC/ml.

**Preparación tratamiento de orégano.** Los tratamientos se realizaron a partir de una solución de aceite esencial de orégano al 98% y DMSO (dimetildisulfoxido). Primeramente se prepararon soluciones al 1.5, 3, y 6% de aceite esencial de orégano. Para el tratamiento de 1.5% se añadieron 30 µl de aceite en 1.97 ml de DMSO, para 3% se agregaron 60 µl de aceite en 1.94 ml de DMSO y para 6% se añadieron 120 µl de aceite en 1.88 ml de DMSO. Una vez realizadas las soluciones, se añadieron 0.2 ml de cada solución a tubos con 9.7 ml de caldo soya tripticasa para obtener concentraciones finales de 0.03, 0.06, y 0.12% de aceite esencial de orégano. Posteriormente, en cada tubo se agregó 0.1 ml del inóculo. Se realizaron diluciones con buffer de fosfato y se sembró para realizar los conteos.

**Preparación tratamiento de tomillo.** De igual forma que el orégano, los tratamientos de tomillo se realizaron a partir de una solución de aceite esencial de tomillo y emulsificado con dimetildisulfoxido. Se prepararon soluciones al 1.5, 3, 6% de aceite esencial de tomillo con DMSO. Para los diferentes tubos con 9.7 ml de caldo soya tripticasa, se colocaron 0.2 ml de cada solución para obtener los tratamientos deseados con concentraciones finales de 0.03, 0.06 y 0.012%. Posteriormente, se añadió 0.1 ml del inóculo puro previamente preparado, con una concentración final de aproximadamente  $10^7$  UFC/ml.



**Monitoreo de resultados.** Cada repetición tuvo una duración de seis días desde la preparación del inóculo hasta el conteo de 24 horas. Los tratamientos fueron sembrados a las 0 y 24 horas en platos con Agar Soya Trypticase (AST) mediante la técnica de siembra por superficie, con siembra directa (0.1 y 0.5 ml) y diluciones ( $10^{-1}$ ) en 9ml de buffer de fosfato. Finalmente se incubaron a 37 °C por 24 horas para realizar el respectivo conteo. Los datos se expresan en Log UFC/ml.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones. El nivel de significancia usado fué  $P < 0.05$ , y se realizó una separación de medias usando el método de cuadrados mínimos (LSMEANS).

## **Etapa II. Efecto de la Interacción de los aceites esenciales.**

**Preparación de cultivo.** La preparación del cultivo fue realizada de la misma manera que la etapa anterior. Para los diferentes tratamiento, se colocó 0.1 ml del inóculo puro en cada tubo con 9.7 ml de CST con 0.2 ml de cada tratamiento de aceite esencial para obtener una concentración final aproximada de  $10^7$  UFC/ml.

**Preparación de los tratamientos.** A partir de los resultados de la primera etapa de tomaron como MIC los tratamientos de aceite esencial de orégano y tomillo al 0.06%. Luego, en base a las concentraciones minimas inhibitorias obtenidas, se realizaron las diferentes combinaciones fraccionarias, utilizando como control un tratamiento solo con el dimetildisulfoxido. Las combinaciones fraccionarias de ambos aceites que representan los tratamientos evaluados se encuentran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones finales de las combinaciones fraccionales de aceite esencial de orégano (AEO) y tomillo (AET).

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
Control	Dimetildisulfoxido
AEO 0.06%	Concentración mínima inhibitoria
AET 0.06%	Concentración mínima inhibitoria
AET 0.03% + AEO 0.03%	$\frac{1}{2}$ MIC AET + $\frac{1}{2}$ MIC AEO
AET 0.045% + AEO 0.045%	$\frac{3}{4}$ MIC AET + $\frac{3}{4}$ MIC AEO
AET 0.045% + AEO 0.015%	$\frac{3}{4}$ MIC AET + $\frac{1}{4}$ MIC AEO
AET 0.015% + AEO 0.045%	$\frac{1}{4}$ MIC AET + $\frac{3}{4}$ MIC AEO
AET 0.015% + AEO 0.015%	$\frac{1}{4}$ MIC AET + $\frac{1}{4}$ MIC AEO

Se prepararon los diferentes tratamientos y se añadieron 0.2 ml de cada tratamiento para obtener una concentración final especificada en el cuadro anterior. Posteriormente, se añadió 0.1 ml del inóculo puro de *Salmonella* Typhimurium, para luego realizar las respectivas diluciones y siembras en placa.

**Monitoreo de resultados.** El experimento tuvo una duración de seis días desde la preparación del inóculo hasta el recuento de 0 y 24 horas para cada tratamiento. Para los recuentos, se realizaron diluciones y siembra directa en platos con agar soya tripticasa y se incubaron a 37 °C por 24 horas, realizándose siembra a las 0 y 24 horas. Los resultados se expresan en Log UFC/ml.

**Efecto de la Interacción.** Para determinar el índice de concentración fraccional se utilizó la ecuación 1:

$$FICindex = \frac{MIC\ A/B}{MIC\ A} + \frac{MIC\ B/A}{MIC\ B} \quad [1]$$

El efecto de la interacción de ambos aceites se describe en el cuadro 2, en el cual dependiendo el resultado de inhibición se determinó si la interacción fue sinérgica, aditiva y antagónica.

Cuadro 2. Diseño de las combinaciones fraccionarias de AEO y AET con el índice fraccional inhibitorio y la interpretación del efecto.

Proporción de aceites				
A	B	FICI	Resultado bacteriano	Efecto
0	0	0	Crecimiento	Control
1	0	1	No crecimiento	MIC
0	1	1	No crecimiento	MIC
1/2	1/2	1	Crecimiento	Aditivo o antagónico
			No crecimiento	Aditivo
3/4	3/4	1.5	Crecimiento	Antagónico
			No crecimiento	Aditivo o sinérgico
3/4	1/4	1	Crecimiento	Aditivo o antagónico
			No crecimiento	Aditivo
1/4	3/4	1	Crecimiento	Aditivo o antagónico
			No crecimiento	Aditivo
1/4	1/4	0.5	Crecimiento	Aditivo o antagónico
			No crecimiento	Sinérgico

MIC= concentración mínima inhibitoria

FICI= índice de concentración fraccional inhibitoria

AEO= aceite esencial de orégano

AET= aceite esencial de tomillo

(Techathuvanan *et al.* 2014)

**Análisis Estadístico.** Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones. La separación de medias se hizo mediante el método de cuadrados mínimos (LSMEANS) con un nivel de significancia  $P < 0.05$ . Los resultados fueron reportados en Log UFC/ml.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Parte I. Concentración mínima inhibitoria de manera individual.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria, se analizaron tres diferentes concentraciones. Todos los tratamientos mostraron diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) con respecto al tratamiento control (cuadro 3) demostrando así el efecto inhibitorio que poseen ambos aceites esenciales. Si existió diferencia significativa entre tiempos de exposición ( $P = 0.0153$ ).

Cuadro 3. Recuentos de *Salmonella* Typhimurium (Log UFC/ml) en agar soya tripticasa de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano y tomillo.

Aceite Esencial	Concentración	Log UFC/ml	
		0 horas	24 horas
Control	0.00%	7.74 ± 0.28 <sup>xA</sup>	9.54 ± 0.22 <sup>yA</sup>
Orégano	0.03%	6.75 ± 0.68 <sup>xA</sup>	4.98 ± 0.93 <sup>yB</sup>
	0.06%	0.61 ± 0.53 <sup>xB</sup>	0.49 ± 0.50 <sup>xC</sup>
	0.12%	1.42 ± 1.48 <sup>xB</sup>	1.24 ± 1.22 <sup>xC</sup>
Tomillo	0.03%	6.68 ± 0.53 <sup>xA</sup>	5.86 ± 0.37 <sup>yB</sup>
	0.06%	0.26 ± 0.24 <sup>xB</sup>	0.76 ± 0.67 <sup>xC</sup>
	0.12%	1.22 ± 1.63 <sup>xB</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>xC</sup>
	R <sup>2</sup>	0.98	
	CV%	21.29	

<sup>xyz</sup> Medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre horas ( $P < 0.05$ )

<sup>ABC</sup> Medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre tratamientos ( $P < 0.05$ )

Todos los tratamientos a las 0 horas mostraron una reducción de  $\geq 1$  Log UFC/ml y a las 24 horas una reducción de  $\geq 4$  Log UFC/ml. Los mejores tratamientos se obtuvieron con concentraciones de 0.06 y 0.12%, tomando como concentración mínima inhibitoria el tratamiento de 0.06% para ambos aceites esenciales ya que es la concentración más baja que presenta porcentajes de inhibición mayores al 90% (Torrenegra *et al* 2017).

En un estudio en el cual se utilizó aceite esencial de orégano y tomillo contra *Salmonella* Typhimurium aislada de diferentes especies animales, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.048 a 0.126% para ambos aceites (Solarte 2015), valores muy similares a los obtenidos en el presente estudio. Otros estudios utilizando cepas clínicas de *S. Typhimurium*, los aceites de orégano y tomillo inhibieron y destruyeron casi todas las cepas en concentraciones entre 0.012-0.1% (Mith *et al.* 2014). Las diferencias se pueden

dar debido a las distintas variedades de aceite y bajo número de cepas ensayadas. Diversos autores indican diversas diferencias en la sensibilidad de cepas de *Salmonella* utilizando el mismo aceite, por lo que se deberían aumentar el número de estudios para obtener una distribución de sensibilidad (Naveed *et al.* 2013).

El método de acción de los aceites esenciales se basa en daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, degradación de proteínas, filtración de contenido celular y asimismo afecta la fuerza motriz de las bacterias (Skandamis-Nychas 2001). Se ha estudiado que las bacterias Gram positivas son más sensibles a los aceites esenciales, en cambio las Gram negativas son más resistentes debido a que poseen una membrana externa en la pared celular hidrofílica, formada por lipopolisacáridos, lo que ayuda a prevenir la penetración de componentes hidrofóbicos (Ravichandran 2011). Sin embargo, el timol, carvacrol, que son compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales de orégano y tomillo, son capaces de desintegrar esta membrana de las bacterias gram negativas como es el caso de *Salmonella Typhimurium* (Usano *et al.* 2014).

En el estudio de Özkan *et al.* (2017) sobre la composición química del aceite esencial de orégano, determinaron que el principal componente es carvacrol (63.97%), p-cymene (17.98%) y linalool (3.67%), siendo los fenoles los grupos de terpenos más abundantes. En cuanto al tomillo, estudios de su composición química demuestran que el principal componente es el timol, el cual, puede llegar a alcanzar el 80% en algunas variedades (Wianowska *et al.* 2009). Los aceites esenciales poseen mayor capacidad antimicrobiana cuando contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos (Burt 2004).

El carvacrol es un compuesto fenólico presente en los aceites esenciales que más ha recibido atención en su mecanismo de acción y capacidad bactericida, capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, provocando la salida de lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana plasmática (Lambert *et al.* 2001). El carvacrol es un monoterpenoide fenólico y componente mayoritario del orégano. Estudios sugieren que el modo de acción del carvacrol es incrementar la fluidez y permeabilidad de la membrana. Se ha establecido que incrementar la fluidez de la membrana incrementa la permeabilidad. Dicha permeabilidad ha sido confirmada mediante el monitoreo del flujo de H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y ATP, y la entrada de ácidos nucleicos (Hyldegaard *et al.* 2012).

El timol, considerado por muchos autores como uno de los componentes con mayor actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, el cual, contiene una estructura química muy similar a la del carvacrol, diferenciándose por la posición de un grupo hidroxilo. Así mismo, posee un mecanismo de acción parecido al de carvacrol. El timol es un monoterpenoide fenólico y uno de los mayores componentes del aceite de tomillo. Al igual que el carvacrol, el timol causa daño a la membrana citoplasmática. Su modo de acción aún no ha sido estudiado a fondo, pero se cree que causa disrupción en la membrana interna y externa, e interactúa con las proteínas presentes en la membrana celular (Hyldegaard *et al.* 2012).

## Etapa II. Interacción de los aceites esenciales de orégano y tomillo.

En la segunda etapa se realizaron las diferentes combinaciones entre los aceites de orégano y tomillo, utilizando el método de macro dilución en caldo, en la cual todos los tratamientos mostraron inhibición en comparación con el control el cual no contenía ningún aceite esencial (Cuadro 4). Hubo inhibición desde la hora 0 e igualmente se mantuvo a las 24 horas. Estadísticamente existió diferencia significativa entre los diferentes tratamientos ( $P < 0.0001$ ). Igualmente hubo diferencia significativa entre horas ( $P = 0.0352$ ) y también en la interacción de tratamiento por tiempo ( $P = 0.0150$ ).

Cuadro 4. Recuentos de *Salmonella Typhimurium* (Log UFC/ml) a exposición de diferentes concentraciones fraccionarias de la combinación de aceite esencial de orégano y tomillo.

Tratamiento	Log UFC/ml	
	0 horas	24 horas <sup>‡</sup>
Control <sup>1</sup>	7.35 ± 0.67 <sup>A</sup>	9.53 ± 0.0.26 <sup>A</sup>
AEO 0.06%	1.81 ± 0.78 <sup>BC</sup>	1.01 ± 0.88 <sup>BC</sup>
AET 0.06%	1.95 ± 1.07 <sup>BC</sup>	1.00 ± 1.00 <sup>BC</sup>
AET 0.03% + AEO 0.03%	1.59 ± 1.14 <sup>BC</sup>	1.10 ± 0.85 <sup>BC</sup>
AET 0.045% + AEO 0.045%	1.29 ± 1.02 <sup>C</sup>	0.16 ± 0.27 <sup>C</sup>
AET 0.045% + AEO 0.015%	2.12 ± 0.81 <sup>BC</sup>	1.43 ± 0.98 <sup>BC</sup>
AET 0.015% + AEO 0.045%	1.76 ± 0.68 <sup>BC</sup>	0.33 ± 0.57 <sup>BC</sup>
AET 0.015% + AEO 0.015%	3.20 ± 1.15 <sup>B</sup>	2.12 ± 0.97 <sup>B</sup>
R <sup>2</sup>	0.96	
CV%	34.26	

<sup>ABC</sup> Medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre tratamientos ( $P < 0.05$ )

AET Aceite esencial de tomillo

AEO Aceite esencial de orégano

<sup>1</sup>Control con Caldo Soya Trypticase y dimetilsulfóxido

<sup>‡</sup> No existe diferencia significativa entre tiempos ( $P > 0.05$ )

En las mezclas de aceites en base a la MIC de cada uno, existió inhibición desde la hora 0 mostrando reducciones de  $\geq 4$  Log UFC/ml en contraste con el tratamiento control el cual no contenía ningún tipo de aceite, solamente caldo soya tripticase y dimetilsulfóxido. Comparando entre la hora 0 y 24 horas, la inhibición se mantuvo estable, siendo todos los tratamientos estadísticamente iguales entre ambas horas, sin embargo, hubo una mayor reducción en los conteos de 24 horas.

El tratamiento con mayor reducción es AET 0.045% + AEO 0.045%, el cual contenía  $\frac{3}{4}$  del MIC de tomillo y  $\frac{3}{4}$  del MIC de orégano con reducción de 6 Log UFC/ml a las 0 horas con respecto al tratamiento control, igualmente a las 24 horas fue el tratamiento con el conteo más bajo de UFC, y el tratamiento que menor reducción tuvo fue el de AET 0.015% + AEO 0.015%, el cual contenía  $\frac{1}{4}$  del MIC de tomillo y  $\frac{1}{4}$  del MIC de orégano, siendo este el tratamiento que contenía las cantidades más bajas de cada aceite.

Los aceites de orégano y tomillo han tenido un reconocido efecto antimicrobiano, asociado a sus componentes fenólicos, refiriéndonos a carvacrol y timol. Partiendo de ello se genera la posibilidad de combinar ambos aceites. Sin embargo, el uso de aceites esenciales en la industria alimentaria ha sido limitado debido a su olor y sabor, que afectan fuertemente las propiedades organolépticas de forma negativa (Lambert *et al.* 2001). Realizando mezclas de aceites esenciales genera la posibilidad de reducir el impacto sensorial que se dé cuando se utilizan de manera individual.

Para determinar si existe una interacción sinérgica, aditiva o antagónica entre ambos aceites se utilizó la interpretación del cuadro 2, basándose en los recuentos mostrados en el Cuadro 4. Se calculó el índice de concentración fraccional inhibitoria de cada mezcla de aceites partiendo de la concentración mínima inhibitoria de cada aceite de manera individual. Basado en el resultado del FICindex de cada combinación de aceites el resultado indicó la posible relación sinérgica  $< 0.5$ , aditiva  $1.0$ , y antagónica  $> 1.5$  si estos no presentan crecimiento luego de la incubación, tomándose como referencia el conteo de Log UFC/ml a las 24 horas. Para el cálculo del FICindex se utilizará la ecuación 2:

$$FICindex = \frac{MIC\ A/B}{MIC\ A} + \frac{MIC\ B/A}{MIC\ B} \quad [2]$$

Donde MIC A se refiere a la concentración mínima inhibitoria del compuesto A de manera individual, y MIC A/B se refiere al MIC del compuesto A en combinación con el MIC del compuesto B. MIC B y MIC B/A son el compuesto B de manera individual y la debida combinación (Valcourt *et al.* 2016).

El cuadro 5 muestra la interpretación de la interacción de los aceites esenciales de orégano y tomillo basados en los recuentos obtenidos en el cuadro 4. El tipo de interacción de ambos aceites puede ser antagónica, sinérgica o aditiva. Un efecto es aditivo cuando la actividad antibacteriana de los aceites esenciales en combinación es igual a su actividad antimicrobiana si estuviesen individuales. En cambio, se considera efecto sinérgico cuando la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en combinación es mayor que la actividad de los aceites por sí solos (Goñi *et al.* 2009).

El efecto se interpretó según los recuentos de *Salmonella* Typhimurium de la siembra de 24 horas, determinando si hubo o no crecimiento. Según los recuentos del cuadro 4, ningún tratamiento tuvo crecimiento luego de 24 horas de exposición a los aceites esenciales de orégano y tomillo ya sea en combinación o de manera individual tomando como base la concentración mínima inhibitoria.

Cuadro 5. Efecto de *Salmonella* Typhimurium expuesta a diferentes concentraciones fraccionarias de aceite esencial de orégano y tomillo.

Tratamiento	FICI	<i>S. Typhimurium</i>	Efecto
Control <sup>1</sup>	0	Crecimiento	Control
AEO 0.06%	1	No crecimiento	MIC
AET 0.06%	1	No crecimiento	MIC
AET 0.03% + AEO 0.03%	1	No crecimiento	Aditivo
AET 0.045% + AEO 0.045%	1.5	No crecimiento	Aditivo o sinérgico
AET 0.045% + AEO 0.015%	1	No crecimiento	Aditivo
AET 0.015% + AEO 0.045%	1	No crecimiento	Aditivo
AET 0.015% + AEO 0.015%	0.5	No crecimiento	Sinérgico

<sup>1</sup>Control con Caldo Soya Trypticase y dimetilsulfóxido.

FICI Índice de concentración fraccional inhibitoria.

AET Aceite esencial de tomillo

AEO Aceite esencial de orégano

MIC Concentración mínima inhibitoria.

Los cinco tratamientos de las combinaciones de aceites mostraron inhibición por lo que se determinó que no existió crecimiento a las 24 horas comparado con las 0 horas, ya que fueron estadísticamente iguales entre tiempos. Como resultado se obtuvo que la combinación de los aceites esenciales de tomillo y orégano tuvieron un efecto aditivo, es decir, actividad antimicrobiana igual cuando están combinados comparado con su actividad de manera individual basados en el MIC.

Como establecido anteriormente, la actividad antimicrobiana de estos aceites se debe a sus compuestos fenólicos, que son carvacrol en su mayoría del aceite de orégano y timol componente mayoritario del aceite de tomillo. En un estudio se encontró un efecto aditivo cuando se utilizó carvacrol y timol de manera combinada contra *S.aureus* y *P.aeruginosa* (Lambert *et al.* 2001). En otro estudio en el cual se combinó timol y carvacrol, se obtuvo un efecto sinérgico contra *Salmonella* Typhimurium (Zhou *et al.* 2007), considerando así que el mecanismo de acción de timol y carvacrol pueden ser diferentes o ambos actúan en distintos puntos de la bacteria.

Al usar combinaciones de aceites se crea la posibilidad de que le sea más difícil sobrevivir a la bacteria. A pesar de que el mejor efecto es el sinérgico, incluso obtener un efecto aditivo puede beneficiar procesos agroindustriales, generando alternativas para combinar diferentes concentraciones de aceites basados en la obtención de menores costos, reducción del impacto negativos en las propiedades sensoriales en la aplicación de alimentos, a su vez asegurando un producto inocuo evitando niveles altos de microorganismos patógenos (Techathuvanan *et al.* 2014).

#### 4. CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de orégano y tomillo poseen una actividad antimicrobiana similar contra *Salmonella Typhimurium*.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias correspondientes a los aceites esenciales de orégano y tomillo fueron de 0.06%, presentando reducciones mayores al 99.999% de la población de *Salmonella Typhimurium* comparado al tratamiento control el cual no contenía ningún aceite.
- La combinación de los aceites esenciales de orégano y tomillo mostro una relación aditiva contra *Salmonella Typhimurium*, generando la posibilidad de realizar mezclas a diferentes concentraciones para reducir costos, minimizar impacto sensorial negativo y asegurar productos inocuos.



## **5. RECOMENDACIONES**

- Utilizar combinaciones de aceites esenciales en matrices alimenticias que son más susceptibles a bacterias patógenas.
- Comparar la actividad antibacteriana de las interacciones de los aceites esenciales de orégano y tomillo contra bacterias de interés Gram negativas y Gram positivas.
- Evaluar la estabilidad de los aceites esenciales utilizando un mayor rango de tiempo.
- Evaluar el impacto sensorial de los aceites esenciales una vez es aplicado en una matriz alimenticia.

## 6. LITERATURA CITADA

- Bajpai VK, Baek K-H, Kang SC. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Journal of Food Research International*. [2019 Jun 25]. 45(2):722–734. Doi:10.1016/j.foodres.2011.04.052.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Food Microbiology Journal*. 94(3):223–253. Eng. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control Journal*. 54:111–119. Doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040.
- Friedman, M., P. Henika, and R. Madrell. 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*. [2019 Jun 23]. 65:1545–1560.
- García R.M., García E.P. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*; [consultado el 2 de mar. De 2019]. 2:41–51.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. Y Nerín, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapor phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 116:982- 989.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology journal*. 3:12–15. Eng. Doi:10.3389/fmicb.2012.00012.
- 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*. 91:453-462.
- Mith H, Dure R, Delcenserie V, Zhiri A, Daube G Clinquart A. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science and Nutrition*. [consultado el 26 de ago. De 2019]. 2(4): 403-416.
- Naveed R, Hussain I, Tawab A, Muhammad T, Moazur R, Sohail H, Shahid M, Abu B, Mazhar I. 2013. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *Journal of Biomedical Science*. [consultado el 26 de ago. De 2019]. 13: 265.

- Özkan OE, Güney K, Gür M, Pattabanoğlu ES, Babat E, Khalifa MM. 2017. Essential Oil of Oregano and Savory; Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Indian Journal of Pharmaceutical Research*. 51(3s):s205-s208. Doi:10.5530/ijper.51.3s.13.
- Ravichandran, M. *et al.* 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31.p. 462–471.
- Reyes-Jurado F, López-Malo A, Palou E. 2016. Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Protection*. [2019 Jun 25]. 79(2):309–315. Eng. Doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-392.
- Rodriguez Saucedo EB. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista Ra Ximhai*. [consultado el 26 de ago. De 2019]. (19):153–170.
- Skandamis, P. N. Y Nychas, G. J-E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91:1011-1022.
- Solarte AL. 2015. Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella* Typhimurium aislada de casos clínicos en diferentes especies animales. Córdoba: Universidad de Córdoba. [consultado el 26 de ago. de 2019].
- Techathuvanan C, Reyes F, David JRD, Davidson PM. 2014. Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*; 77(2):269–275. Eng.doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-288.
- Tellez LA, Nolazco DM. 2017. Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) De Tacna. Lima,Peru: Universidad Nacional Agraria La Molina; [consultado 26/8/19].
- Tongnuanchan, P., and S. Benjakul. 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Food Science Journal*. [2019 Jun 25]. 79:1231–1248.
- Torrenegra Alarcón ME, Pájaro NP, León Méndez G. 2017. Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Rev. Colomb.Cienc. Quim. Farm*; [consultado el 26 de ago. De 2019]. 46(2). Doi:10.15446/rcciquifa.v46n2.67934.
- Usano J, Pala J, Diaz S. 2014. Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca*; [consultado 26/8/19]. 7(2):60–70. ISSN:1989-3620.
- Valcourt C, Saulnier P, Umerska A, Zanelli MP, Montagu A, Rossines E, Joly-Guillou ML. 2016. Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. *Int J Pharm*; 498(1-2):23–31. eng. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.042.

- WHO, World Health Organization. 2002. Food safety and foodborne illness. [2018 Ago 12]. World Health Organization Fact sheet 237. <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/food-safety>
- Wianowska D, Mardarowicz M, Gawdzik J., Dawidowicz AL, Rado E. 2008. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*. 76(4):878–884. eng. doi:10.1016/j.talanta.2008.04.050.
- Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang Hui, Yang Z, Li J, Yan W. 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Safety*. 27(2):124–133. Doi:10.1111/j.1745-4565.2007.00064.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de varianza de actividad antimicrobiana de aceites esenciales de orégano y tomillo.

<b>Origen</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr&gt;F</b>
<b>Modelo</b>	27	443.5921619	16.4293393	31.37	<.0001
<b>Error</b>	14	7.332	0.52372		
<b>Total Corregido</b>	4	450.9241619			

<b>R-cuadrado</b>	<b>Var Coef.</b>	<b>Raíz MSE</b>	<b>Media de LOG</b>
0.9837	21.29	0.723681	3.399048

<b>Origen</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr&gt;F</b>
<b>REP</b>	2	0.8929762	0.4464881	0.85	0.4473
<b>TRT</b>	3	419.8849452	139.9616484	267.25	<.0001
<b>REP*AE*TRTR</b>	15	9.5263405	0.6350894	1.21	0.3617
<b>HORA</b>	1	0.7150095	0.7150095	1.37	0.2621
<b>AE*TRT*HORA</b>	6	12.5728905	2.0954817	4	0.0153
<b>AE*TRT</b>	0	0			

**Anexo 2.** Análisis de varianza de la combinación de aceites esenciales de orégano y tomillo.

<b>Origen</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr&gt;F</b>
<b>Modelo</b>	31	301.5199146	9.7264489	15.39	<.0001
<b>Error</b>	16	10.1151667	0.6321979		
<b>Total Corregido</b>	47	311.6350812			

<b>R-cuadrado</b>	<b>Var Coef.</b>	<b>Raíz MSE</b>	<b>Media de LOG</b>
0.967542	34.2627	0.795109	2.320625

<b>Origen</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr&gt;F</b>
<b>REP</b>	2	7.7978375	3.8989188	6.17	0.0103
<b>TRT</b>	6	271.6531563	45.275526	71.62	<.0001
<b>REP*AE*TRT</b>	15	3.9707375	0.2647158	0.42	0.9503
<b>HORA</b>	1	3.6135187	3.6135187	5.72	0.0295
<b>TRT*HORA</b>	6	14.4612563	2.4102094	3.81	0.015
<b>AE*TRT*HORA</b>	1	0.0234083	0.0234083	0.04	0.8498