

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**ESTUDIO DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD SINERGICA DE COMPUESTOS DE  
ACEITES ESENCIALES MEDIANTE EL ENSAYO MTT, PARA SU USO  
EFECTIVO EN MATERIALES DE ENVASADO**

Curso 2017/2018

**Alumno:** Carles Àvila Sanz

**Tutora:** Amparo Chiralt Boix

**Cotutora experimental:** Raquel Requena Peris

Mayo 2018, Valencia

# ESTUDIO DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD SINERGICA DE COMPUESTOS DE ACEITES ESENCIALES MEDIANTE EL ENSAYO MTT, PARA SU USO EFECTIVO EN MATERIALES DE ENVASADO

Valencia, de 2018

**Alumno:** Carles Ávila Sanz

**Tutora:** Amparo Chiralt Boix

**Cotutora experimental:** Raquel Requena Peris

## RESUMEN

Se empleó el ensayo de bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a fin de estudiar la potencial actividad sinérgica entre diferentes compuestos activos de aceites esenciales de plantas (carvacrol, eugenol, cinamaldehído, timol y eucaliptol), usados como agentes antibacterianos, contra *Escherichia coli* y *Listeria innocua*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada compuesto activo y el índice de concentración fraccional inhibitoria (CFI) para las combinaciones binarias de los diferentes compuestos activos. De acuerdo con los valores del índice CFI, algunas combinaciones binarias mostraron un efecto aditivo, pero otras, tales como carvacrol-eugenol y carvacrol-cinamaldehído exhibieron un efecto sinérgico contra *L. innocua* y *E. coli*, que se vio afectada por las proporciones de cada compuesto. Algunas proporciones de eugenol-cinamaldehído exhibieron un efecto antagonista contra *E. coli*, pero un efecto sinérgico contra *L. innocua*. El efecto sinérgico más notable se observó para las mezclas de carvacrol-cinamaldehído tanto para *E. coli* como para *L. innocua*, pero usando diferentes proporciones de ambos compuestos (1: 0.1 y 0.5: 4 respectivamente para cada bacteria).

**Palabras clave:** compuestos de aceites esenciales, sinergia antimicrobiana, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, ensayo MTT, CMI, índice CFI.

## ABSTRACT

A thiazolyl blue tetrazolium bromide assay was used to study the potential synergy between different active compounds from plant essential oils (carvacrol, eugenol, cinnamaldehyde, thymol and eucalyptol) used as antibacterial agents against *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. The minimum inhibitory concentration of each active compound and the fractional inhibitory concentration (FIC) index for the binary combinations of active compounds were determined. According to FIC index values, some binary combinations showed an additive effect, but others, such as carvacrol-eugenol and carvacrol-cinnamaldehyde exhibited a synergistic effect against *L. innocua* and *E. coli*, which was affected by the compound ratios. Some eugenol-cinnamaldehyde ratios exhibit an antagonistic effect against *E. coli*, but a synergistic effect against *L. innocua*. The most remarkable synergistic effect was observed for carvacrol-cinnamaldehyde mixtures for both *E. coli* and *L. innocua*, but using different compound ratios (1:0.1 and 0.5:4 respectively for each bacteria).

**Key words:** essential oil compounds, antimicrobial synergy, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, MTT assay, MIC, FIC index

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. NUEVAS TECNOLOGÍAS DE ENVASADO.....	1
1.1.1. Envases inteligentes.....	1
1.1.2. Películas comestibles.....	3
1.1.3. Envase activo.....	4
1.1.3.1. Envases activos antioxidantes.....	6
1.1.3.2. Envases activos que generan dióxido de carbono.....	7
1.1.3.3. Envases activos antimicrobianos.....	7
1.2. ACEITES ESENCIALES COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	9
1.2.1. Carvacrol.....	10
1.2.2. Eugenol.....	10
1.2.3. Timol.....	11
1.2.4. Cinamaldehído.....	11
1.2.5. Eucaliptol o 1,8- cineol.....	11
1.3. SINERGIA ENTRE ACEITES ESENCIALES Y SUS COMPUESTOS.....	11
1.4. ENSAYO MTT.....	12
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. MATERIALES.....	13
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE LOS DIFERENTES COMPUESTO.....	13
3.3. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS DIFERENTES COMPUESTOS.....	15
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
4.1. CMI DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS.....	16
4.2. INTERACCIONES ENTRE COMPUESTOS ACTIVOS EN MEZCLAS BINARIAS.....	18
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>26</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de dispositivos inteligentes utilizados en envases inteligentes y sus principios operacionales (Fang et al., 2007) .....	2
<b>Tabla 2.</b> Ejemplos de sistemas de envasado activo para su uso en la industria alimentaria (Restuccia et al., 2010) .....	5
<b>Tabla 3.</b> Aplicaciones de tecnologías de envasado activo (Restuccia et al., 2010) .....	5
<b>Tabla 4.</b> Estudios recientes sobre films antimicrobianos con aceites esenciales en alimentos (Requena et al., 2017) .....	9
<b>Tabla 5.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes compuestos activos estudiados frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria innocua</i> .....	17
<b>Tabla 6.</b> Combinaciones binarias con mayor efecto sinérgico (menor índice CFI) frente a <i>Listeria innocua</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ejemplos de envases inteligentes comercializados en la actualidad: a) indicador de frescura para carnes; b) indicador de temperatura para bebidas.....	2
<b>Figura 2.</b> Principales compuestos empleados para la obtención de películas comestibles (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009).....	4
<b>Figura 3.</b> Principales sistemas de envasado activo de alimentos (Ahmed et al 2017) .....	5
<b>Figura 4.</b> Placa desechable de 96 pocillos para ensayos de microtitulación con alfombrilla selladora para evitar tanto las perdidas como la contaminación por evaporación de los compuestos volátiles.....	13
<b>Figura 5.</b> Esquema del diseño experimental para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres compuestos activos (A, B y C) con 9 diluciones seriadas: ● pocillos vacíos para evitar pérdidas por evaporación durante el ensayo; ○ pocillos con medio de cultivo pero sin bacteria (controles de esterilidad); ⊙ pocillos con suspensión bacteriana pero sin compuesto activo (controles de crecimiento).....	14
<b>Figura 6.</b> Principio del ensayo MTT donde la deshidrogenasa mitocondrial actúa transformando el MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de color amarillo en formazán de color purpura.....	15
<b>Figura 7.</b> Esquema del diseño experimental para la determinación de las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de cada activo en una mezcla binaria: ● pocillos vacíos para evitar pérdidas por evaporación durante el ensayo; ○ pocillos con compuesto medio de cultivo pero sin bacteria (controles de esterilidad); ⊙ pocillos con suspensión bacteriana pero sin compuesto activo (controles de crecimiento).....	16
<b>Figura 8.</b> Isoblograma teórico representando los 3 posibles resultados a la hora de combinar dos compuestos antimicrobianos.....	16
<b>Figura 9.</b> Aspecto visual del resultado de un ensayo MTT para estudiar la interacción entre dos compuestos A y B en una mezcla binaria, donde los pocillos amarillos representan diferentes concentraciones de ambos activos a las cuales no hay células viables capaces de transformar el reactivo MTT en formazán de color purpura.....	18
<b>Figura 10.</b> Isoblogramas CFI para las diferentes mezclas binarias de activos estudiadas frente a <i>Listeria innocua</i> .....	19
<b>Figura 11.</b> Isoblogramas CFI para las diferentes mezclas binarias de activos estudiadas frente a <i>Escherichia. coli</i> .....	22

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Nuevas tecnologías de envasado**

Desde el comienzo del ser humano, la preservación de los alimentos ha sido imprescindible para su supervivencia. Aunque todavía sin ningún conocimiento microbiológico, las primeras técnicas de conservación se basaban en la inactivación de microorganismos perjudiciales mediante operaciones como el secado, la salazón, la cocción o la fermentación, las cuales se siguen usando a día de hoy. El deterioro de los alimentos se caracteriza por cualquier cambio en el alimento que lo hace inaceptable para el consumidor desde un punto de vista sensorial o de seguridad. Dicho rechazo por parte del consumidor puede deberse a diferentes causas tales como daños físicos, cambios químicos (oxidación, cambios de color), aparición de sabores desagradables y olores extraños como resultado del crecimiento microbiano y el metabolismo del producto. El deterioro microbiano es la causa más común de deterioro en productos perecederos, el cual puede manifestarse con crecimiento microbiano visible, cambios de textura, malos olores y/o sabores desagradables (Gram et al., 2002). Aunque en la actualidad las cadenas de frío, los conservantes químicos y el mayor conocimiento del deterioro microbiano han permitido prolongar la vida útil de la mayor parte de los alimentos, permitiendo a su vez su comercialización en mercados lejanos, se ha estimado que el 25% de la producción mundial de alimentos se pierde después de la cosecha o bien después del sacrificio animal a causa del deterioro microbiano (Gram et al., 2002).

La creciente presión a la que está sometida la industria alimentaria para alimentar a una población mundial en crecimiento exponencial, junto con la rigurosa legislación en seguridad alimentaria y la demanda por parte del consumidor de productos seguros, sostenibles y más naturales, ha promovido el desarrollo de nuevas tecnologías de envasado diseñadas con el objetivo de completar su función convencional. Así, la industria alimentaria considera la aplicación de envases activos e inteligentes como una solución de futuro que permite extender la vida útil, simplificar los procesos de producción, mejorar la calidad y la variedad de los productos, así como proporcionar información esencial para garantizar la seguridad del consumidor (Janjarasskul y Suppakul, 2016).

#### **1.1.1. Envases inteligentes**

La función tradicional del envase alimentario es la de dar soporte mecánico y protección al alimento frente a influencias externas tales como calor, luz, presencia o ausencia de humedad, oxígeno, presión, enzimas, microorganismos, insectos, suciedad, etc., permitiendo así retrasar su deterioro, extender su vida útil y mantener tanto la calidad como la seguridad del producto envasado. Prolongar la vida útil de los alimentos habitualmente implica estrategias como el control de la temperatura, la humedad, el oxígeno y el uso de aditivos químicos como los conservantes, estabilizantes, etc. No obstante, el envase lleva a cabo otras funciones importantes tales como el confinamiento, la conveniencia, el marketing y la comunicación, puesto que el envase sirve como link entre el consumidor y el productor de alimentos. Esto se debe a que el envase contiene información, la cual es obligatorio por ley, acerca del peso, material, ingredientes, valor nutricional y precauciones para su uso. En este sentido, surge el concepto de envase inteligente entendido como aquel que permite monitorizar la condición del alimento envasado o bien del ambiente que rodea al alimento (Restuccia et al., 2010). Existen muchos tipos de envases inteligentes como por ejemplo los indicadores de calidad y seguridad

del alimento, los dispositivos de trazabilidad/antirrobo, integridad del envase y evidencia de manipulación, autenticidad de producto, etc. (Tabla 1) (Fang et al., 2007; Ozdemir y Floros, 2004). Todos ellos tienen en común que contienen dispositivos inteligentes, pequeñas y asequibles etiquetas desde el punto de vista económico que son capaces de adquirir, almacenar y transferir información acerca de las funciones y propiedades del alimento envasado (Figura 1) (Fang et al., 2007). Por tanto, el concepto “inteligente” aporta un valor añadido al envase ya que permite el seguimiento de forma detallada el producto a lo largo de la cadena de suministro, manteniendo así su calidad y seguridad al identificar los puntos críticos.

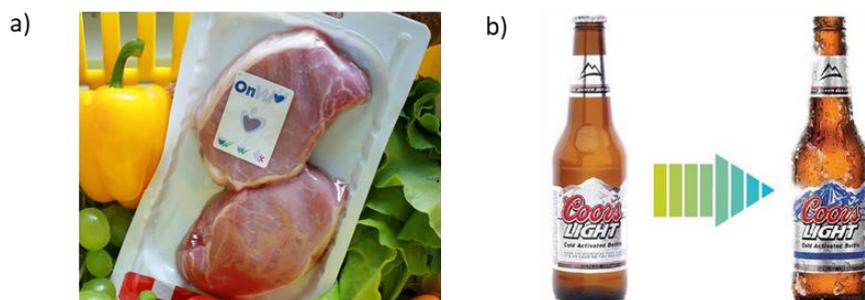


Figura 1. Ejemplos de envases inteligentes comercializados en la actualidad: a) indicador de frescura para carnes; b) indicador de temperatura para bebidas

Tabla 1. Ejemplos de dispositivos inteligentes utilizados en envases inteligentes y sus principios operacionales (Fang et al., 2007)

Dispositivo	Principio/ reactivos	Información dada	Aplicaciones
Código de barras	Simbología	Información de producto y fabricante	Identificación del producto, y facilitando el control de inventarios, el reordenamiento de existencias, el pago y envío
Etiqueta de radio frecuencia	Ondas de radio	Información de producto y fabricante	Identificación del producto, y gestión de la cadena de suministro, seguimiento de activos, control de seguridad
Indicadores de tiempo-temperatura	Mecánico, químico, enzimático, microbiológico	Condiciones de almacenamiento	Alimentos almacenados en condiciones refrigeradas y congeladas
Indicadores gaseosos	Colorantes redox, colorantes pH, enzimas	Condiciones de almacenamiento, fugas del paquete	Alimentos almacenados en paquetes con la composición de gas requerida
Indicadores de frescura (crecimiento microbiano)	Colorantes de pH y que reaccionan con metabolitos volátiles	Calidad microbiana de alimentos	Alimentos perecederos tales como carne, pescado y aves de corral
Indicadores patógenos	Métodos químicos e inmunoquímicos que reaccionan con toxinas	Bacterias patógenas específicas como <i>Escherichia coli</i> 0157	Alimentos perecederos tales como carne, pescado y aves de corral

### 1.1.2. Películas comestibles

Las películas comestibles son delgadas láminas de material que pueden ser consumidas con el propio alimento y proporcionan a este una barrera efectiva al vapor de agua, a los gases o a la transferencia de solutos, lo cual permite extender significativamente la vida útil de los productos así envasados. Las películas comestibles se pueden aplicar como recubrimiento directamente sobre los alimentos (recubrimiento comestible) o como películas independientes (Bourtoom, 2008). En los últimos años se han desarrollado numerosas investigaciones encaminadas a desarrollar este tipo de películas ya que presentan numerosas ventajas frente a las películas sintéticas. Su ventaja principal es que pueden ser consumidas con el propio producto envasado y, por tanto, al no haber envase que desechar minimizan los problemas ambientales asociados, incluso si no son consumidos puesto que son completamente biodegradables. A diferencia de los materiales sintéticos, no dependen de fuentes fósiles, puesto que se obtienen a partir de materias renovables. Las películas comestibles también pueden emplearse con el objetivo de potenciar las propiedades organolépticas de los productos envasados incorporando en su formulación componentes como saborizantes, colorantes, edulcorantes, etc. Además, permiten envasar pequeñas porciones de alimentos, las cuales por razones prácticas no se suelen envasar de forma individual como por ejemplo peras, judías, nueces o fresas (Bourtoom, 2008).

Las películas comestibles pueden estar compuestas por hidrocoloides o compuestos hidrofóbicos (lípidos) (Figura 2). Los hidrocoloides incluyen proteínas, derivados de celulosa, alginatos, pectinas, almidones y otros polisacáridos. Por su parte, los lípidos engloban los ácidos grasos, acilgliceroles y ceras. Además, también es posible obtener películas mixtas, bien en forma de bicapa, en la que una de las capas está compuesta por uno o varios hidrocoloides y la otra capa está compuesta por uno o varios tipos de lípidos, o bien en forma de composite, donde el lípido y el hidrocoloide se distribuyen a lo largo de una misma película. Las películas comestibles a base de polisacáridos como la celulosa, el almidón y el quitosano mejoran la permeabilidad al oxígeno y otros gases, mientras que las películas a base de proteínas como la gelatina, el gluten y la caseína aportan estabilidad mecánica. Por último, las películas comestibles a base de lípidos como la cera de carnauba o la lecitina se utilizan para reducir la transferencia del vapor de agua (Gilbert et al., 1995; Olivas & Barbosa-Cánovas, 2009).

El quitosano se ha considerado un recubrimiento ideal para frutas y verduras ya que permite formar buenas películas en la superficie de dichos productos, a la vez que controla el crecimiento de microorganismos dada su naturaleza antimicrobiana (No et al. 2007). Recubrimientos de metilcelulosa han sido también aplicados con éxito sobre aguacates, preservando su color y firmeza, así como reduciendo su tasa de respiración durante el almacenamiento (Maftoonazad y Ramaswamy 2005). De forma similar, recubrimientos a base de metilcelulosa y ácido esteárico aplicados a albaricoques y pimientos redujeron de forma efectiva las pérdidas de agua. Además, cuando se incorporó ácido cítrico o ácido ascórbico, se redujeron las pérdidas de vitamina C (Ayrancy y Tunc 2004).

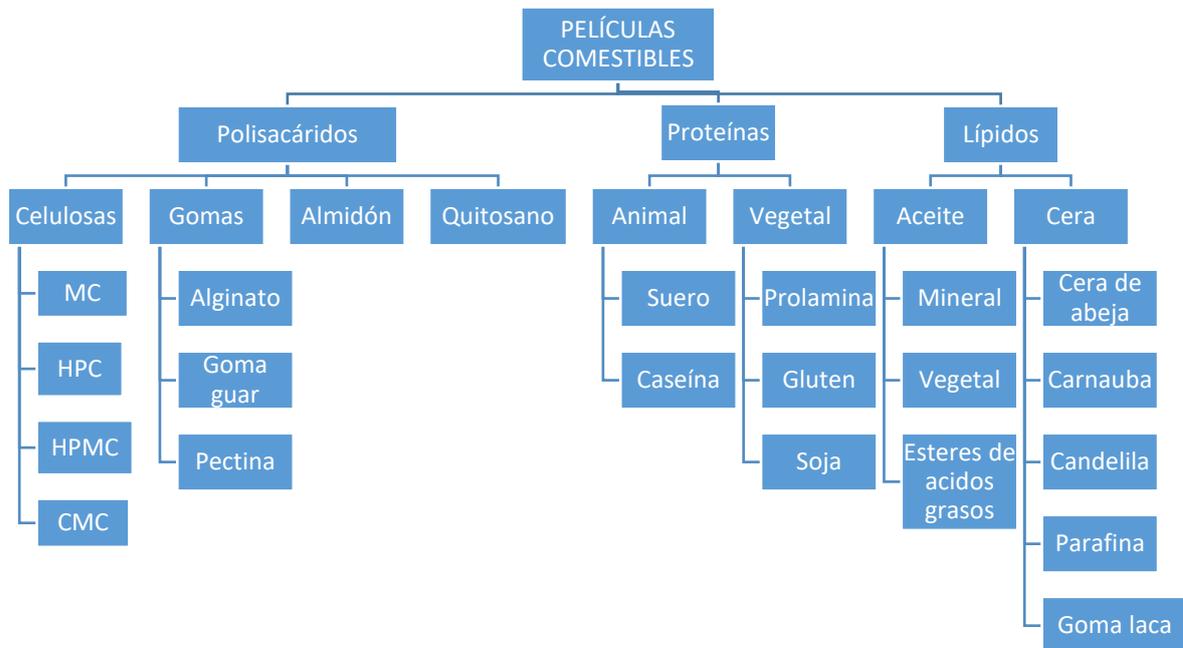


Figura 2. Principales compuestos empleados para la obtención de películas comestibles (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2009). MC: metilcelulosa; HPC: hidroxipropilcelulosa; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa; CMC: carboximetilcelulosa.

### 1.1.3. Envase activo

Se entiende como envase activo un sistema alimento/envase/entorno que actúa de forma coordinada para mejorar la salubridad y la calidad del alimento envasado y aumentar su vida útil. Es decir, el envase pasa de ser un mero contenedor a desempeñar un papel activo en el envasado mejorando la calidad del alimento envasado. Los envases activos están diseñados para liberar o absorber sustancias en o desde el alimento envasado o el ambiente que lo rodea (Figura 3). En la actualidad se han desarrollado envases activos con funciones muy diversas, pero básicamente se basan en dos modos de actuación: introducción el compuesto activo en el interior del envase, junto con el producto a envasar, por ejemplo en el interior de pequeños dispensadores; o bien formando parte del propio material de envase. Estos aditivos son capaces de secuestrar o absorber oxígeno, dióxido de carbono, etileno, humedad y/o olores y sabores desagradables; liberar oxígeno, dióxido de carbono, humedad, etanol, sorbatos, antioxidantes y/o otros conservantes y antimicrobianos; y/o mantener el control de la temperatura (Tabla 2) (Restuccia et al., 2010). Se han llevado a cabo numerosos estudios para aplicar estas nuevas tecnologías de envasado activo a la industria alimentaria (Tabla 3).

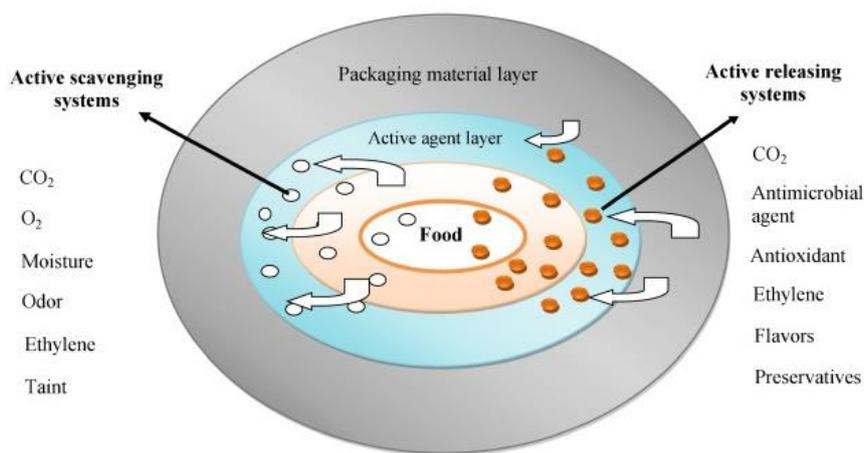


Figura 3. Principales sistemas de envasado activo de alimentos (Ahmed et al 2017).

Tabla 2. Ejemplos de sistemas de envasado activo para su uso en la industria alimentaria (Restuccia et al., 2010).

Propiedades secuestrantes	Oxígeno, dióxido de carbono, humedad, etileno, sabores, manchas, luz UV.
Propiedades de liberación	Etanol, dióxido de carbono, antioxidante, conservante, dióxido de azufre, sabores y pesticidas.
Propiedades de eliminación	Catalizar la eliminación de componentes alimenticios: lactosa, colesterol.
Control de temperatura	Materiales aislantes, envases de auto calentamiento y auto enfriamiento, susceptores y modificadores de microondas, empaques sensibles a la temperatura.
Control de calidad y microbiológico	Materiales de embalaje tratados con luz UV.

Tabla 3. Aplicaciones de tecnologías de envasado activo (Restuccia et al., 2010).

Tipo de aplicación	Alimentos
Secuestrador de oxígeno	Café molido, te, nueces tostadas, patatas fritas, chocolate, leche en polvo, bebida en polvo, pan, tortilla, pizza, corteza de pizza, pasta fresca refrigerada, fruta, pasteles, galletas, cerveza, fiambres, carne curada y ahumada, pescado, queso
Absorbedor de dióxido de carbono	Café molido
Emisor de dióxido de carbono	Carne, pescado
Absorbedor de humedad	Productos secos y deshidratados, carne, aves de corral, pescado
Absorbedor de etileno	Kiwi, banana, aguacate, persimons
Emisor de etanol	Pan, pasteles, pescado
Película liberadora de antimicrobianos	Albaricoques secos
Película liberadora de antioxidantes	Cereales
Película absorbente de sabor	Zumo de naranja Navel
Película liberadora de sabores	Café molido
Película contenedora de color	Surimi
Película anti-vaho	Algunos envases de fruta y verdura fresca
Película antiadherente	Caramelos blandos, rebanadas de queso
Absorbedor de luz	Pizza, leche
Indicador de tiempo y temperatura	Pasta refrigerada, panqueques para microondas, productos delicatessen

Película permeable al gas/transpirable	Ensaladas listas para comer
Susceptor de microondas	Platos precocinados listos para comer

Así, el envasado activo permite prolongar el tiempo de permanencia de los alimentos en los supermercados, así como mejorar el margen de inocuidad alimentaria al modificar la condición de los alimentos. A su vez, podría suponer una alternativa efectiva para las técnicas tradicionales de procesamiento de alimentos (tratamientos térmicos intensos, salmuerado, acidificación, deshidratación y uso de conservantes químicos) (López-de-Dicastillo et al., 2011).

### **1.1.3.1. Envases activos antioxidantes**

Elevados niveles de oxígeno en los alimentos favorecen el crecimiento microbiano, la oxidación lipídica, la aparición de sabores y olores desagradables, cambios de color y pérdidas nutricionales. A su vez, la oxidación lipídica conlleva rancidez, formación de aldehídos tóxicos y degradación de ácidos grasos poliinsaturados. Por lo tanto, el control de los niveles de oxígeno es un factor determinante a controlar para minimizar el deterioro de los alimentos. En este sentido, los envases activos antioxidantes pueden mejorar la calidad y extender la vida útil de los productos envasados mediante el control de los niveles de oxígeno a los cuales está expuesto el alimento. Estos sistemas de envasado activo se clasifican en dos grupos: a) dispositivos antioxidantes independientes, y b) materiales de envase antioxidante (Gomez-Estaca et al., 2014). Los dispositivos antioxidantes independientes pueden ser saquitos, almohadillas o etiquetas que contienen secuestradores de oxígeno de diferente naturaleza, los cuales se incorporan al envase tradicional. Entre los captadores de oxígeno, el óxido ferroso y el óxido de hierro son los más utilizados, aunque también se utilizan el ácido ascórbico, los sulfitos y enzimas como la glucosidasa, los cuales reaccionan con el oxígeno disminuyendo así su concentración (Kerry et al., 2006). Los envases activos antioxidantes donde el propio material es el elemento activo compuesto que forma parte de las paredes del envase, ejercen su acción absorbiendo compuestos indeseables del espacio de cabeza alrededor del producto, o bien liberando compuestos antioxidantes al alimento o al espacio de cabeza que lo rodea. En este caso, la elección tanto del material como del antioxidante es fundamental, puesto que si el antioxidante debe migrar al alimento para ejercer su acción, este debe estar aprobado como aditivo alimentario y no superar los niveles permitidos según la legislación vigente. Además, el compuesto antioxidante debe ser compatible con el material de envasado y tener la capacidad de distribuirse homogéneamente tanto en el espacio de cabeza del envase, como en el alimento. (Decker, 1998).

### **1.1.3.2. Envases activos que generan dióxido de carbono**

El dióxido de carbono inhibe el crecimiento de un gran número de bacterias y hongos en ciertos alimentos como la carne fresca, queso y productos de panadería, no solo mediante la disminución de los niveles de oxígeno sino también por su efecto antimicrobiano directo. Por lo tanto, esta estrategia podría utilizarse de forma complementaria al envase secuestrador de oxígeno. Los niveles de CO<sub>2</sub> necesarios para inhibir el crecimiento microbiano varían entre 10-80% puesto que depende en gran medida del tipo de microorganismo (Brody et al., 2008; Fang et al., 2017). Además, el CO<sub>2</sub> también se utiliza para reducir la tasa de respiración de productos frescos y para

solucionar el colapso de envases o el vacío parcial causado por los absorbentes de oxígeno. El dióxido de carbono se puede utilizar en formas diferentes, como químicos a base de bicarbonato activados por la humedad en el interior de bolsas y almohadillas absorbentes. Por el contrario, niveles elevados de CO<sub>2</sub> como resultado de reacciones de oxidación y de deterioro del alimento podrían tener efectos adversos sobre la calidad del alimento envasado. Dicho exceso de CO<sub>2</sub> puede ser eliminado utilizando materiales altamente permeables a dicho gas cuya permeabilidad aumenta a mayor temperatura (Brody et al., 2008).

### **1.1.3.3. Envases activos antimicrobianos**

Los patógenos transmitidos a través de alimentos, así como los microorganismos responsables de su deterioro, son algunas de las principales preocupaciones de las industrias alimentarias, ya que generan grandes cantidades de residuos, con las consecuentes pérdidas económicas, así como importantes intoxicaciones alimentarias (Ghabraie et al., 2016; Mostafa, et al 2017). En este contexto surgen los envases activos antimicrobianos cuya función principal es extender la vida útil y garantizar la seguridad de los productos envasados, puesto que los compuestos activos que incorporan permiten reducir o retardar el crecimiento microbiano (Fang et al., 2017). Esta estrategia permite solventar los inconvenientes que conlleva la adición de los agentes antimicrobianos directamente sobre el producto, como por ejemplo la pérdida de actividad por lixiviación y reacciones con otros compuestos como lípidos y proteínas, lo que se traduce en un efecto antimicrobiano más duradero a lo largo de toda la cadena de distribución (Jokar et al, 2009). Los envases activos antimicrobianos se pueden clasificar en tres categorías: 1) aquellos que incorporan las sustancias antimicrobianas en dispensadores o almohadillas en el interior de envase; 2) aquellos que incorporan directamente el agente antimicrobiano en el material de envase; 3) aquellos que se basan en la utilización de polímeros antimicrobianos per se, como el quitosano y la poli-L-lisina.

Se han utilizado con éxito numerosos conservantes químicos durante décadas a fin de mantener la calidad, extender la vida útil y garantizar la seguridad de los alimentos envasados (Jaiswal & Jaiswal, 2015). No obstante, su aplicación repetida a largo plazo da lugar a la acumulación de residuos químicos a lo largo de la cadena alimentaria, desarrollo de resistencias microbianas y efectos adversos en la salud humana (Akinyemi et al, 2006; Bialonska et al., 2010). Por estas razones, las preferencias del consumidor han cambiado hacia conservantes más seguros y naturales, lo que ha promovido el estudio de compuestos antimicrobianos naturales como las bacteriocinas y los aceites esenciales, cuya actividad antimicrobiana ha sido demostrada en numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* (Fang et al., 2017).

Las bacteriocinas son compuestos proteínicos letales para otras cepas bacterianas distintas a la cepa productora. Son un grupo muy heterogéneo de compuestos habitualmente clasificado en base a su diferente peso molecular. Así, mientras algunas solo son péptidos de entre 19 y 37 aminoácidos, hay otras cuyo peso molecular puede alcanzar 9000 Da (Joeger, 2003). Las bacteriocinas sintetizadas por algunas bacterias ácido lácticas presentan un amplio potencial como conservantes de alimentos dada su capacidad para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Su espectro antibacteriano puede ser muy estrecho y limitado a especies cercanas, o mucho más amplio e incluir especies bacterianas muy diversas. La bacteriocina conocida como nisina está considerada como sustancia GRAS (generalmente reconocida como

segura), por lo que ha sido muy estudiada ya sea como aplicación directa en alimentos, o bien de forma indirecta en envases antimicrobianos (Nithya et al., 2013).

Por su parte, el quitosano es un biopolímero que puede emplearse para obtener envases activos antimicrobianos per se, puesto que es el propio polímero el que presenta tanto actividad antibacteriana como antifúngica. Su potencial antimicrobiano depende en gran medida de factores como el microorganismo diana (especie y fase de desarrollo), factores intrínsecos del biopolímero (peso molecular, solubilidad, grado de desacetilación, densidad de carga positiva y capacidad quelante), estado físico del polímero (líquido o sólido) y factores ambientales (pH, temperatura). En hongos el quitosano suprime la esporulación y posterior producción de esporas, mientras que su efecto en bacterias difiere entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Hosseinnejad y Jafari, 2016; Valencia, 2015).

## 1.2. Aceites esenciales como agentes antimicrobianos

Los aceites esenciales (AEs) son líquidos aceitosos aromáticos y volátiles obtenidos a partir de distintas especies vegetales, los cuales se concentran habitualmente en regiones concretas como las hojas, la corteza o los frutos (Gutiérrez et al., 2008). Los AEs pueden estar constituidos por hasta 60 compuestos diferentes, aunque los componentes mayoritarios representan hasta el 85%, mientras que el resto de componentes están presentes en cantidades traza (Burt et al., 2004). Los AEs y varios de sus constituyentes, representan una alternativa natural y segura a los conservantes químicos para alimentos, dada su capacidad para inhibir el crecimiento de una amplia variedad tanto de patógenos humanos transmitidos por alimentos, como de microorganismos responsables del deterioro de los alimentos (Ghabraie et al., 2016; Mostafa et al., 2017). Además de sus propiedades antimicrobianas, los AE y sus componentes han mostrado actividad frente a virus, hongos, toxinas, parásitos e insectos, probablemente debido a la función específica de estos compuestos en las plantas (Burt et al., 2004). Numerosos trabajos de investigación han demostrado el potencial de los AEs cuando se utilizan para obtener envases activos antimicrobianos aplicados a alimentos (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios recientes sobre films antimicrobianos con aceites esenciales (AEs) en alimentos (Requena et al., 2017).

<b>Matriz polimérica</b>	<b>Componente/AE</b>	<b>Aplicación en alimentos</b>
Quitosano	Carvacrol	Pechuga de pollo
	AE de limón	Fresas
	AE de albahaca y tomillo	Carne de cerdo
	AE de bergamota	Uvas de mesa Moscatel
	Extracto de té verde	Hamburguesas
Quitosano-gelatina	Extracto de semilla de uva y AE de Ziziphora clinopodioides	Filete de trucha
	AE de clavo	Filete de bacalao
HPMC	AE de orégano	Ciruela
Alginato	AE de palmarosa	Melón fresco
	AE de hierba de limón	Manzana fresca
Gelatina	AE de orégano o quitosano	Sardina ahumada
Gelatina-alginato	AE de orégano	Filete de trucha
Pectina	AE de hoja de canela	Melocotón fresco
Manzana y pectina	Carvacrol y cinamaldehído	Jamón y mortadela

Gliadina	Cinamaldehído	Pan y queso untado
Proteína de soja	AE de orégano y tomillo	Empanada de carne
Proteína de leche	AE orégano y pimentón	Tenera
	AE de orégano	Tenera
	AE de orégano o clavo	Pechuga de pollo

HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa

### 1.2.1. Carvacrol

El carvacrol (CA) es un monoterpenoide fenólico procedente principalmente del AE de orégano y del AE de tomillo, en los cuales está presente en un porcentaje que puede variar desde un 5% a un 80% (Burt et al., 2004). Se ha demostrado que tiene efecto antimicrobiano frente a una amplia variedad de patógenos transmitidos por alimentos y microorganismos responsables del deterioro, tales como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* (de Sousa et al., 2012) y diferentes cepas de *Escherichia coli* (Stratakos et al., 2018). Análogamente, se han obtenido efectos antimicrobianos significativos al incorporar el CA en films de diferente naturaleza, tanto en estudios *in vitro* (Requena et al., 2016) como en estudios *in vivo* (Higuera et al., 2014)

### 1.2.2 Eugenol

El eugenol (EU) es un derivado fenólico presente principalmente en los AEs del clavo, la nuez moscada, hojas de laurel, pimienta y canela. En el AE de hoja de canela es el componente mayoritario (70-95%) (Vangalapati et al., 2012). Es una sustancia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con un aroma característico, muy poco soluble en agua y soluble en solventes orgánicos. Este compuesto ha mostrado efectos antimicrobianos significativos frente a patógenos transmitidos por alimentos como *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.* (Moleyar, & Narasimham, 1992), *Escherichia coli* (Pei et al., 2009) y *Helicobacter pylori* (Ali et al., 2005). Cuando se ha incluido en films se han observado efectos antimicrobianos significativos frente a *Listeria innocua* y *E. coli* (Requena et al., 2016; Valencia-Sullca et al., 2016). De forma similar, films de algitano y pectina con eugenol como compuesto activo demostraron actividad antimicrobiana frente a hongos, levaduras y mesófilos aerobios cuando se aplicaron a frambuesas (Guerreiro et al., 2016).

### 1.2.3 Timol

El timol (TI) es una sustancia cristalina incolora presente en los AEs de tomillo y orégano. Numerosos estudios *in vivo* han demostrado la actividad antimicrobiana del TI frente a un amplio espectro de bacterias, tanto Gram +, como Gram - (Moon y Rhee, 2016; Xue et al., 2017). Incorporado en films de zeína resultó efectivo en el control del crecimiento de microorganismos responsables del deterioro en estudios *in vitro* (Del Nobile et al., 2008), mientras que en films de almidón inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* al aplicarlos en melón (Sarkar et al., 2017).

#### 1.2.4 Cinamaldehído

El cinamaldehído (CIN), un fenol terpenoide, es uno de los principales constituyentes de la corteza de canela (60-90%). Es uno de los compuestos derivados de AEs con mayor poder antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio y antioxidante (Muller et al., 2017). Films biodegradables con CIN como puesto activo han demostrado actividad antimicrobiana tanto en estudios *in vitro* frente a *E. coli* y *L. innocua* (Muller et al., 2017; Makwana et al., 2014), como *in vivo* en champiñones (Qin et al., 2015) y jamón (Ravishankar et al., 2009).

#### 1.2.5 Eucaliptol o 1, 8-cineol

El eucaliptol (EUCA), presente en diferentes plantas aromáticas como eucaliptus, orégano, tomillo, romero y jengibre, también ha demostrado actividad antimicrobiana de amplio espectro que incluye la inhibición tanto de bacterias Gram + (*L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis*), como de bacterias Gram - (*E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Mosaxella catarrhalis*) (de Oliveira et al., 2015; Van Vuuren & Viljoen, 2007).

### 1.3. Sinergia entre aceites esenciales y sus compuestos

Las concentraciones de AEs o sus constituyentes requeridas para inhibir el crecimiento microbiano en alimentos suelen ser superiores a las concentraciones determinadas en condiciones *in vitro*, lo cual puede modificar tanto el sabor como el olor de los alimentos tratados (Gutierrez et al., 2008). En este sentido, la potencial actividad sinérgica de estos compuestos de AEs ha surgido como una alternativa para reducir las dosis de activo necesaria para lograr efectos antimicrobianos en alimentos, puesto que varios autores han demostrado efectos sinérgicos frente a patógenos transmitidos por alimentos en estudios *in vitro* con diferentes combinaciones de CA, TI, EU, CIN y EUCA (de Sousa et al., 2012; Guarda et al., 2011; Hill et al., 2013; Pei et al., 2009; Van Vuuren & Viljoen, 2007).

#### 1.4. Ensayo MTT

Pese a que varios autores han demostrado interacciones sinérgicas entre estos compuestos de AEs, algunos estudios son contradictorios. Así, varios estudios han confirmado la actividad antibacteriana sinérgica entre CA y TI frente a *E. coli* (Pei et al., 2009) mientras que otros lo contradicen (Gallucci et al., 2009; Rivas et al., 2010). Por lo tanto, resulta muy difícil comparar los resultados publicados para los mismos compuestos de AEs, ya que hay varios factores que influyen en sus efectos antimicrobianos. Una de las variables importante es el método utilizado para estudiar la posible sinergia entre los compuestos antimicrobianos, que incluye temperatura de incubación, la concentración del inóculo y el tipo de cepa (Lambert y Lambert, 2003; Lambert y Pearson, 2000; Nostro et al., 2000). Por lo tanto, es necesario estandarizar la evaluación de la actividad antimicrobiana para obtener resultados comparables y reproducibles.

Los métodos de difusión se han utilizado ampliamente para estudiar la actividad antimicrobiana de los AEs y sus compuestos principales (Burt et al., 2007; Huang et al., 2012; Noshad et al., 2018; Stratakos et al., 2018), sin embargo, estas pruebas no permiten la cuantificación de su bioactividad en términos de concentración mínima inhibitoria (CMI), ya que son pruebas cualitativas (Ncube et al., 2008). Del mismo modo, los métodos en fase vapor, ampliamente

utilizados para determinar la actividad antimicrobiana de AEs en fase de vapor, solo permiten identificar el compuesto más eficaz entre varios activos (Bueno, 2015; Houdkova et al., 2017). Además, estas pruebas no permiten realizar un barrido masivo con diferentes compuestos activos en diferentes concentraciones. Otros métodos utilizados para determinar la actividad antimicrobiana de los compuestos de AEs, como el recuento en placa de bacterias totales, consumen mucho tiempo y recursos (Clark, 1965), mientras que estudios más sofisticados, como la citometría de flujo o las pruebas en base a la medición de la absorbancia, requieren equipos especiales que no siempre están disponibles (Gunasekera et al., 2000; Krepker et al., 2017). El ensayo colorimétrico bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es uno de los métodos más útiles para la evaluación de la viabilidad celular *in vitro* utilizando el método de microdilución (Houdkova et al, 2017). Las enzimas oxidorreductasas celulares dependientes de NADPH pueden reflejar el número de células viable presentes, ya que son capaces de reducir el tinte de tetrazolio (amarillo) a su formato insoluble, el formazán (púrpura). Este ensayo evita la necesidad de procedimientos de cultivo y nos permite distinguir entre efectos bacteriostáticos y bactericidas y, por lo tanto, determinar de forma cuantitativa fácil y rápidamente la CMI de diferentes activos de forma simultanea (Ncube et al., 2008). Además, el ensayo MTT es un test económico y reproducible que se puede usar para una amplia variedad de microorganismos, ya que el uso del reactivo MTT como indicador colorimétrico evita la necesidad de robots de espectrofotometría. No obstante, los compuestos de AEs pueden alterar los resultados de los ensayos de toxicidad en placas de microtitulación, dada su naturaleza volátil (Novy et al., 2014). Por lo tanto, es aconsejable utilizar alfombrillas selladoras de material inerte a modo de barrera a los vapores de AEs, para evitar la transmisión de vapor entre los pocillos adyacentes (Houdkova et al., 2017; Rondevaldova et al., 2017)

## **2. OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo fue determinar la CMI, así como analizar la potencial actividad sinérgica entre algunos de los compuestos antimicrobianos más efectivos de aceites esenciales (carvacrol, eugenol, cinamaldehído, timol y eucaliptol), frente a *E. coli* y *L. innocua*, utilizando el ensayo MTT.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Materiales**

Los compuestos cuyo potencial antibacteriano se analizó durante el trabajo, tales como carvacrol, eugenol, cinamaldehído, timol y eucaliptol, así como el reactivo MTT fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El DMSO se obtuvo de Panreac (Barcelona, España).

Los cultivos stock de *L. innocua* (CECT 910) y *E. Coli* (CECT 101) fueron facilitados por la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT, Burjassot, España), mientras que el Phosphate Buffered Saline (PBS) y los medios de cultivo, Tryptone Soy Broth (TSB) y Tryptone Soy Agar (TSA), se obtuvieron de Scharlab (Barcelona, España).

### 3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes compuestos

Los cultivos de *L. innocua* (CECT 910) y *E. coli* (CECT 101) suplementados con glicerol al 30% se mantuvieron en TSB en congelación a -25 °C. Una vez descongelados, se transfirió una alícuota de cada uno de los cultivos a un tubo con 10 mL de TSB y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron nuevamente alícuotas de 10 µL de estos cultivos y se transfirieron a nuevos tubos de 10 mL de TSB, los cuales se incubaron de nuevo a 37 °C durante 24 horas. Así, se obtuvieron los cultivos de trabajo en fase de crecimiento exponencial, los cuales se diluyeron apropiadamente para obtener a una concentración de  $10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL. De esta suspensión bacteriana se tomaron alícuotas de 100 µl que se depositaron en cada uno de los pocillos de la placa de 96 pocillos (Figura 4), dejando los pocillos exteriores vacíos para evitar pérdidas.



Figura 4. Placa desechable de 96 pocillos para ensayos de microtitulación con alfombrilla selladora para evitar tanto las pérdidas como la contaminación por evaporación de los compuestos volátiles

En paralelo, se prepararon disoluciones madre de los diferentes compuestos activos en DMSO con una concentración inicial de 10 mg activo/mL DMSO, a partir de las cuales se obtuvieron disoluciones diluidas en el rango 2.5-0.05 mg activo/mL, empleando como disolvente una disolución de DMSO al 10% en TSB. Así, se transfirieron 100 µl de cada una de las disoluciones con los activos a las diferentes posiciones de la placa multipocillos previamente identificadas (Figura 5). Seguidamente, con el objetivo de evitar la contaminación de los pocillos adyacentes con los compuestos volátiles, se colocó una alfombrilla sobre la placa a modo de barrera a los gases (Figura 4), y se procedió a la incubación de los microorganismos durante 24h a 37°C. Determinadas posiciones de la placa se destinaron al control del ensayo, de manera que los pocillos con suspensión bacteriana, pero sin disolución de activo (control crecimiento) verificaron el correcto crecimiento de las bacterias durante el ensayo, mientras que los pocillos con medio de cultivo, pero sin bacteria se utilizaron como control de esterilidad

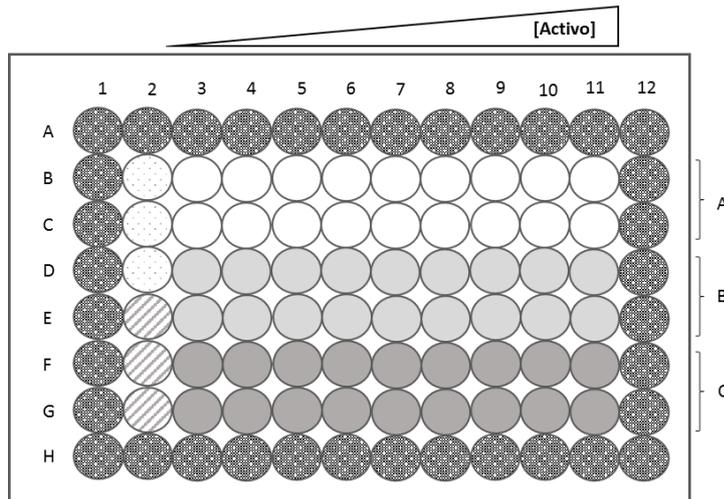


Figura 5. Esquema del diseño experimental para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres compuestos activos (A, B y C) con 9 diluciones seriadas: ● pocillos vacíos para evitar pérdidas por evaporación durante el ensayo; ○ pocillos con medio de cultivo pero sin bacteria (controles de esterilidad); ○ pocillos con suspensión bacteriana pero sin compuesto activo (controles de crecimiento).

Pasadas las 24h de incubación, se preparó una disolución del reactivo MTT en PBS (5mg/mL) y se incorporaron 10 µl en cada uno de los pocillos de la placa. La placa así inoculada se volvió a incubar durante 4h a 37 °C y pasado este tiempo se procedió a la lectura visual de los resultados. Aquellos pocillos en los que se observó cambio de color de amarillo a purpura informaban de la presencia de bacterias viables, puesto que han sido capaces de metabolizar el reactivo MTT en formazan, el cual da una coloración purpura (Figura 6). De esta forma, la CMI de cada uno de los compuestos activos fue la concentración más baja a la cual no se observó cambio de coloración (crecimiento microbiano).

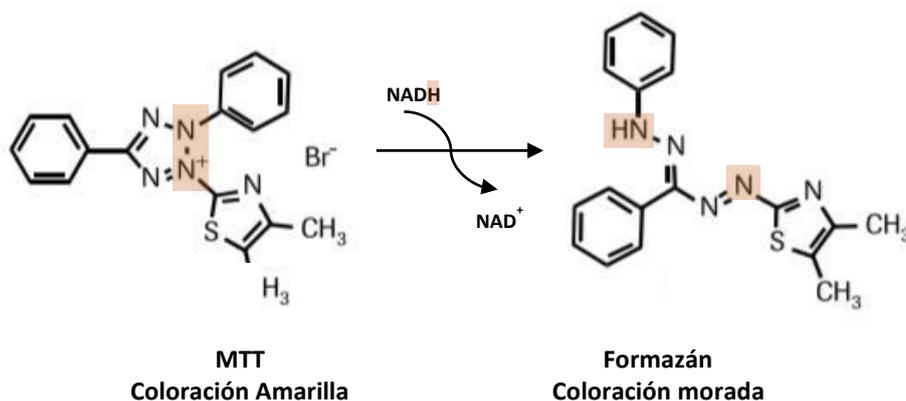


Figura 6. Principio del ensayo MTT donde la deshidrogenasa mitocondrial actúa transformando el MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de color amarillo en formazan de color purpura.

### 3.3. Estudio de las interacciones entre los diferentes compuestos

Los diferentes compuestos activos se combinaron dos a dos una vez conocidas sus CMI a fin de identificar las posibles sinergias entre ellos. Para cada combinación de activos se llevó a cabo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Así, se obtuvieron suspensiones bacterianas en fase de crecimiento exponencial diluidas adecuadamente ( $10^5$  UFC/mL), de las cuales se tomaron 100  $\mu$ l para inocular cada uno de los pocillos de la placa. Nuevamente en paralelo, se prepararon disoluciones diluidas de los activos, pero en este caso se combinaron dos activos en diferentes proporciones, desde 0,05 mg activo/mL hasta la CMI de cada uno de ellos. De estas disoluciones se tomaron 100  $\mu$ l los cuales se depositaron en cada uno de los pocillos previamente identificados (Figura 7). Seguidamente se cubrieron las placas con la alfombrilla selladora y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Análogamente, pasado el periodo de incubación, se añadieron 10  $\mu$ l del reactivo MTT reconstituido en PBS y se incubaron nuevamente las placas durante 4 h a 37 °C.

Una vez pasado el tiempo de reacción, se leyeron los resultados y se calcularon para cada una de las combinaciones de activos las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de cada activo en la mezcla correspondiente a través de la Ecuación 1 (Ec. 1):

$$CFI_A = CMI_{A \text{ en presencia de B}} / CMI_{A \text{ sola}} \quad (\text{Ec. 1})$$

A partir de las CFI de cada activo en una mezcla dada, se calcularon los índices CFI para cada mezcla binaria a través de la Ecuación 2 (Ec. 2) y se construyeron sus isobogramas correspondientes. Así, se consideraron acciones sinérgicas cuando el índice CFI fue menor de 1, aditivas cuando el índice CFI fue 1, y antagónicas cuando el CFI fue superior a 1 (Figura 8).

$$\text{Índice CFI} = CFI_A + CFI_B \quad (\text{Ec. 2})$$

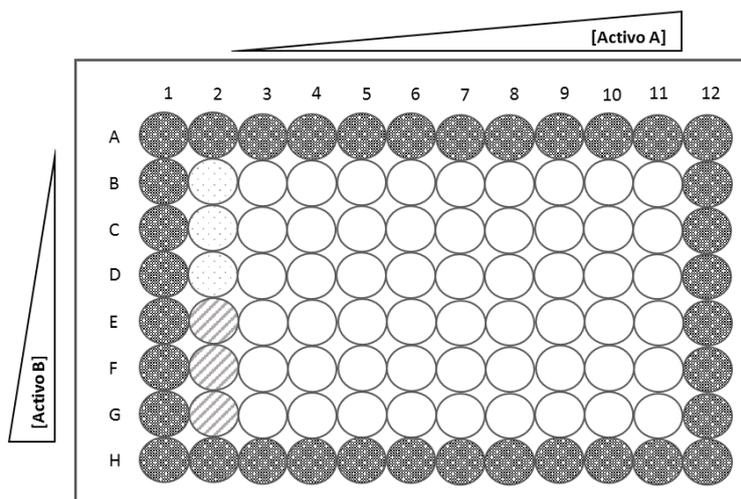


Figura 7. Esquema del diseño experimental para la determinación de las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de cada activo en una mezcla binaria: ● pocillos vacíos para evitar pérdidas por evaporación durante el ensayo; ○ pocillos con compuesto medio de cultivo pero sin bacteria (controles de esterilidad); ◐ pocillos con suspensión bacteriana pero sin compuesto activo (controles de crecimiento).

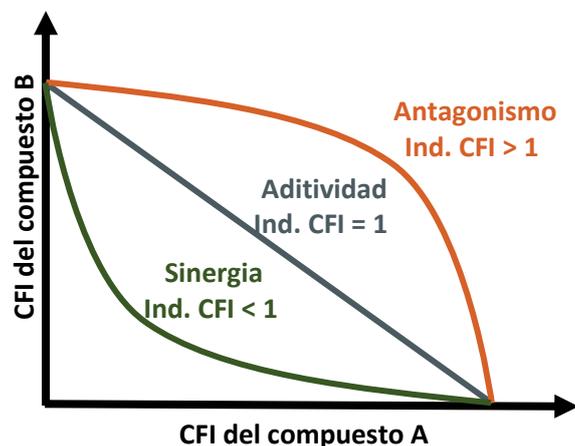


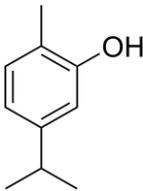
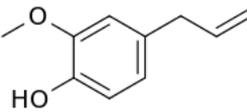
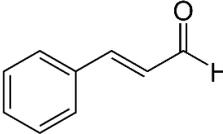
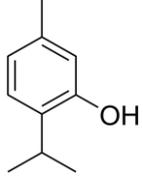
Figura 8. Isoblograma teórico representando los 3 posibles resultados a la hora de combinar dos compuestos antimicrobianos en función de su Índice de concentración fraccional inhibitoria (Ind. CFI).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CMI de los compuestos activos

El ensayo MTT permitió determinar de forma rápida y sencilla la CMI de cada uno de los compuestos estudiados, siendo esta la correspondiente al primer pocillo amarillo antes de observar el cambio de coloración a púrpura, ya que los pocillos amarillos representan concentraciones de activo a las cuales no hay células viables capaces de transformar el reactivo MTT en formazan de color púrpura. Todos los compuestos activos estudiados mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. innocua* y *E. coli*, con valores de CMI que oscilan entre 0,5-1,75 mg/mL (Tabla 5). El cinamaldehído fue el compuesto antimicrobiano más efectivo frente a ambas bacterias, con una CMI de 0,5 mg/mL en ambos casos. Valores similares han sido reportados para este compuesto frente a *E. coli* (0,31 mg/mL; Ye et al., 2013) y *L. innocua* (0,5 mg/mL; Hill et al., 2013). Por el contrario, el eucaliptol fue el compuesto menos efectivo, con valores de CMI un orden de magnitud mayor, siendo *E. coli* más resistente. Estudios similares reportan también una actividad antimicrobiana significativamente menor para este compuesto, en comparación con el resto de activos estudiados, aunque con valores de CMI significativamente superiores a los obtenidos en este trabajo. Así de Sousa et al. (2012) reporta una CMI de 18 mg/mL frente a *L. monocytogenes*, mientras que Van Vuuren & Viljoen (2007) reportan una CMI de 8 mg/mL frente a *E. coli*. Análogamente a lo observado por Pei et al. (2009) y Hill et al. (2013) para *E. coli* y *L. innocua* respectivamente, el eugenol tuvo un menor efecto antimicrobiano en comparación con el resto de activos, siendo más efectivo frente a *L. innocua*. Por último, el carvacrol y el timol mostraron valores de CMI similares entre ellos frente a ambas bacterias, dada la similitud en su estructura molecular. Aunque los valores obtenidos en este trabajo para estos dos compuestos son ligeramente superiores a los reportados en bibliografía, se observa que *E. coli* es más sensible que *L. innocua* tanto al timol como al carvacrol, tal y como reportan Guarda et al. (2011) y Du et al. (2015). Las discrepancias observadas respecto a los valores de CMI reportados en la bibliografía puede deberse al hecho de que en muchos casos se han utilizado diferentes metodologías para estudiar la actividad antimicrobiana. Además, algunos factores tales como el medio de cultivo, el volumen de inóculo, el pH, el tiempo de incubación y la temperatura pueden afectar también a los valores de CMI obtenidos en los experimentos (Pei et al., 2009).

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes compuestos activos estudiados frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*

Compuesto activo	MIC (mg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	
Carvacrol		0.70	0.75
Eugenol		1.35	1.05
Cinamaldehído		0.50	0.50
Timol		0.65	0.70
Eucaliptol		1.75	1.25

#### 4.2. Interacciones entre los compuestos activos en mezclas binarias

Análogamente a lo reportado para la determinación de las CMI, el ensayo MTT permitió determinar de forma rápida y sencilla las interacciones entre los compuestos activos estudiados en combinaciones binarias, en aras a identificar cuáles de ellas presentan efectos sinérgicos (Figura 9). Para ello, se calcularon las CFI de cada compuesto en cada una de las mezclas, obteniendo así sus correspondientes isoblogramas frente a *L. innocua* (Figura 10) y *E. coli* (Figura 11). Además, para cada mezcla binaria se muestran las concentraciones de activos que dieron lugar al mejor Índice CFI (Tabla 6).

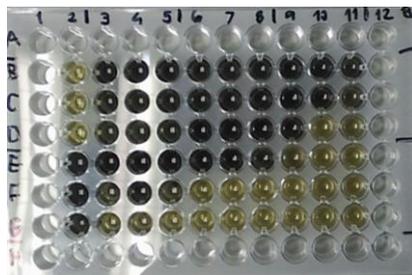


Figura 9. Aspecto visual del resultado de un ensayo MTT para estudiar la interacción entre dos compuestos A y B en una mezcla binaria, donde los pocillos amarillos representan diferentes concentraciones de ambos activos a las cuales no hay células viables capaces de transformar el reactivo MTT en formazán de color púrpura.

Se consideraron combinaciones sinérgicas aquellas cuyo Índice CFI fue inferior a 1, antagónicas cuando dicho índice fue superior a 1 y aditivas cuando el Índice CFI fue igual a 1. Así, las mezclas carvacrol/cinamaldehído mostraron efectos sinérgicos frente a *E. coli* para la mayoría de las proporciones estudiadas, mientras que frente a *L. innocua* dicho efecto solo se observó cuando el cinamaldehído fue el compuesto mayoritario en la mezcla. En línea con estos resultados, Ye et al. (2013) reportan una sinergia muy significativa para diferentes ratios de mezclas carvacrol/cinamaldehído frente a 7 bacterias diferentes incluyendo *E. coli*. La mayoría de las proporciones eugenol/cinamaldehído exhibieron efectos antagónicos frente a ambas bacterias. Por el contrario, Pei et al. (2009) encontró acción sinérgica entre eugenol y cinamaldehído frente a *E. coli* y solo un efecto aditivo entre carvacrol y cinamaldehído para la misma bacteria.

La combinación eugenol/carvacrol mostró efectos antagónicos a la mayoría de ratios estudiados frente a *L. innocua*, mientras que frente a *E. coli* se observaron tanto efectos sinérgicos como aditivos dependiendo del ratio de ambos compuestos. Análogamente, García-García et al. (2011) tampoco reportaron efectos sinérgicos para las combinaciones eugenol/carvacrol frente a *L. innocua*. Aunque algunos estudios han demostrado la actividad sinergia entre carvacrol y timol frente a *E. coli* (Pei et al., 2009), los resultados de este trabajo no revelan dicha interacción entre ambos, tal y como reportan Gallucci et al. (2009) y Rivas et al. (2010), sugiriendo un mecanismo de acción similar dada la similitud de su estructura molecular. A pesar de la diferente estructura del carvacrol y el eucaliptol, y por tanto el posible diferente mecanismo de acción, no se observaron efectos sinérgicos en las mezclas carvacrol/eucaliptol, a diferencia de lo reportado por de Sousa et al. (2012) y de Oliveira et al. (2015). De hecho, las combinaciones de los diferentes compuestos activos con eucaliptol fueron las menos efectivas en la mayoría de los casos, posiblemente debido su menor poder antibacteriano.

En general, la estrategia de combinar los compuestos activos en mezclas binarias dio lugar a una actividad antibacteriana mayor que la obtenida con los compuestos puros solos, por lo que son necesarias menores cantidades totales de activos. El espectro sinérgico fue mucho más amplio frente a *L. innocua* que frente a *E. coli*, lo cual puede estar relacionado con sus diferencias a nivel de la pared celular bacteriana. Las bacterias Gram positivas, rodeadas por capas de peptidoglicano mucho más gruesas que las de *E. coli*, podrían ser más sensibles a la acción combinada de diferentes compuestos que pueden interactuar con los distintos componentes de la pared celular bacteriana en diferente medida. La combinación de compuestos que mejor controló el crecimiento de *E. coli* fue carvacrol/cinamaldehído (relación 1: 0.1), cuyo valor de MIC fue de 0,55 mg/ml. Esta combinación también fue la más efectiva contra *L. innocua* (valor MIC 0,45 mg/ml), pero cuando se usó en una relación carvacrol/cinamaldehído de 0,5: 4.

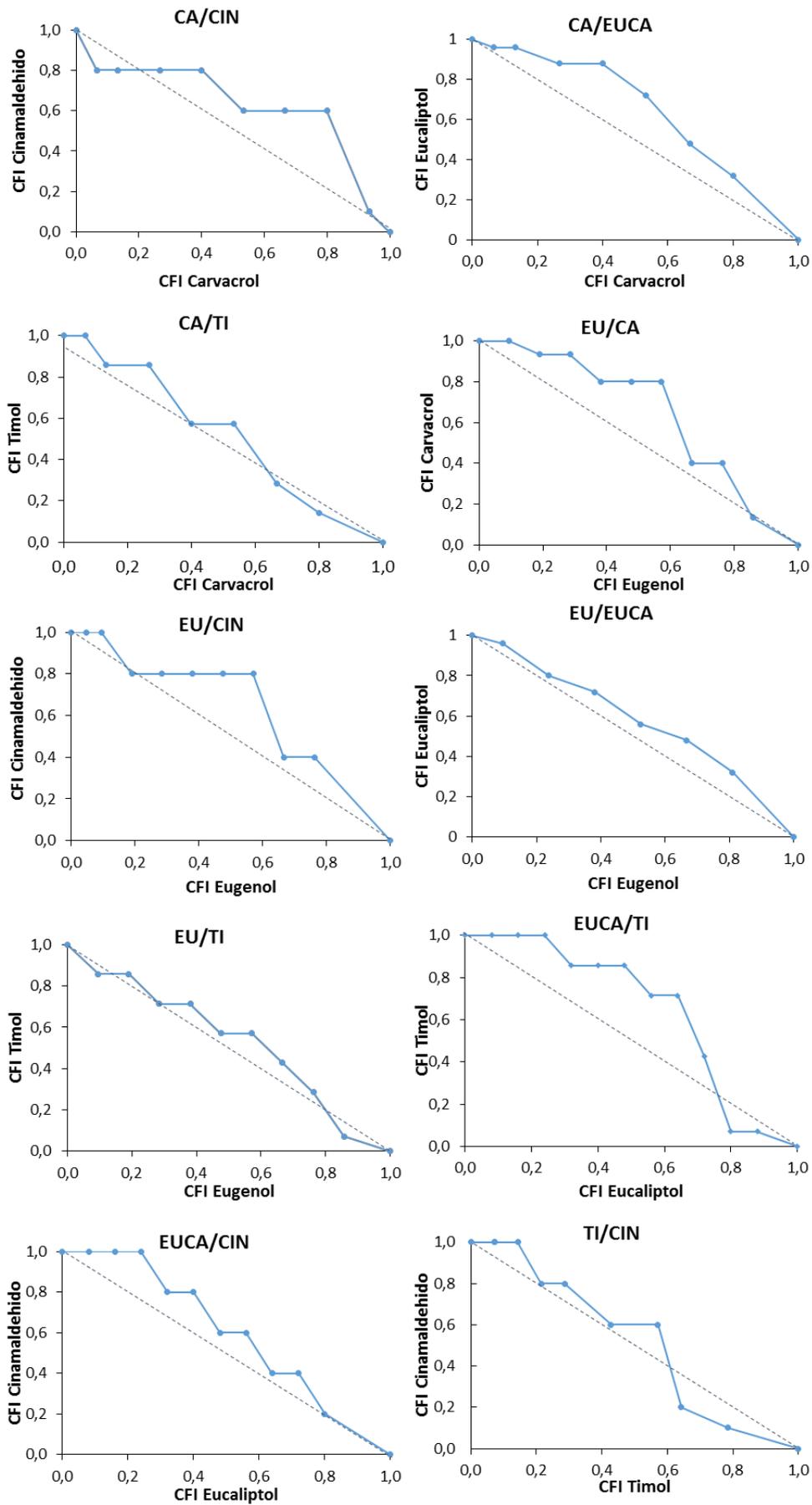


Figura 10. Isobogramas CFI para las diferentes mezclas binarias de activos estudiadas frente a *Listeria innocua*.

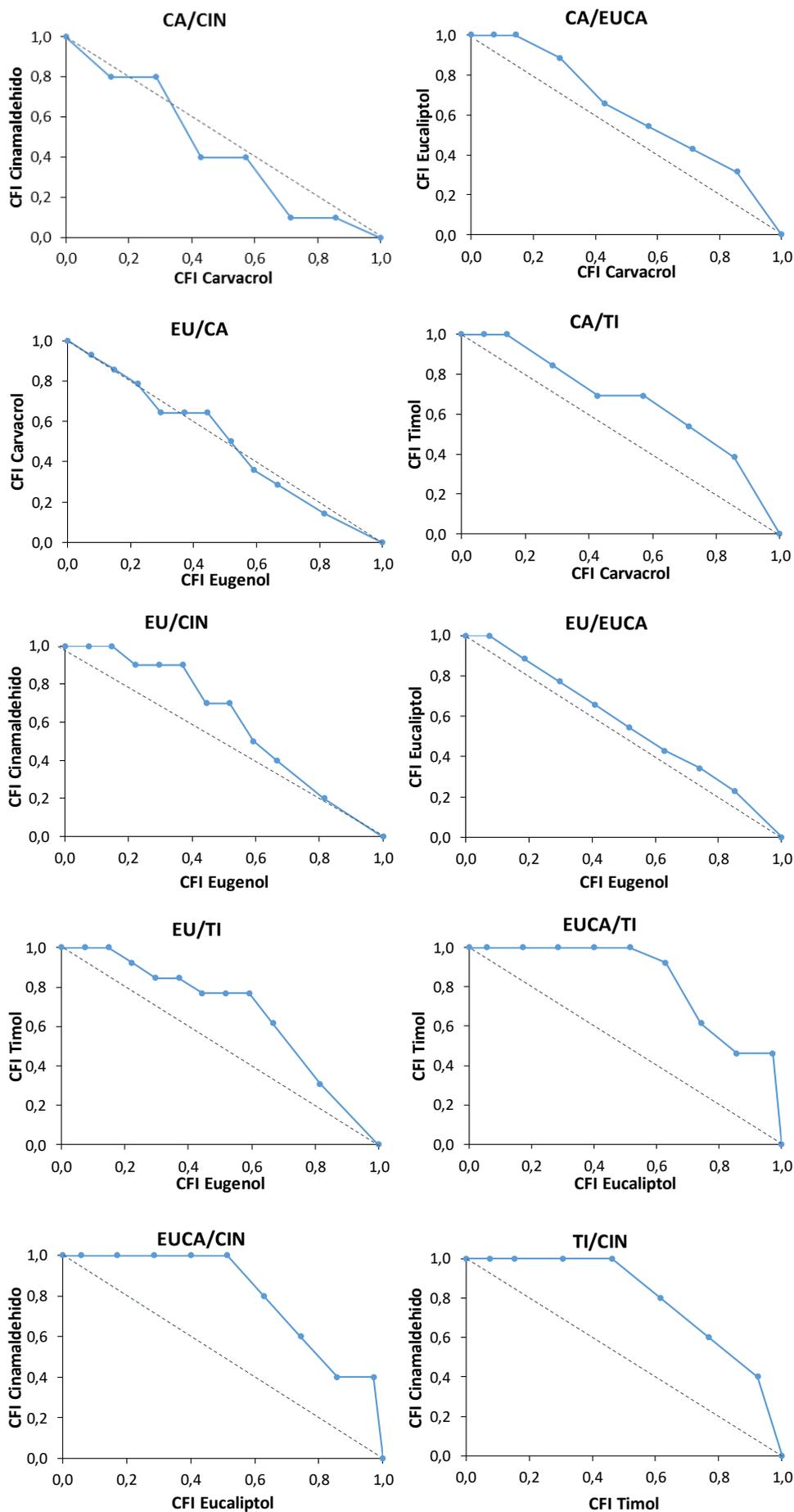


Figura 11. Isobogramas CFI para las diferentes mezclas binarias de activos estudiadas frente a *Escherichia coli*.

Tabla 6. Combinaciones binarias con mayor efecto sinérgico (menor índice CFI) frente a *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Combinación sinérgica (A/B)	<i>E. coli</i>		<i>L. innocua</i>	
	A (mg/mL)	B (mg/mL)	A (mg/mL)	B (mg/mL)
Carvacrol/Cinamaldehído	0,50	0,05	0,05	0,40
Carvacrol/Timol	-	-	0,60	0,10
Eugenol/Carvacrol	0,40	0,45	0,90	0,10
Eugenol/Cinamaldehído	0,80	0,10	0,20	0,40
Eugenol/Timol	-	-	0,90	0,05
Eucaliptol/Timol	-	-	1,00	0,05
Eucaliptol/Cinamaldehído	-	-	1,00	0,10
Timol/Cinamaldehído	-	-	0,45	0,10

## 5. CONCLUSIÓN

El método MTT fue eficaz para evaluar el potencial efecto antibacteriano sinérgico de manera simple y rápida a través de la evaluación del índice CFI de mezclas de componentes activos de AE, que pueden estandarizarse fácilmente. Este método proporcionó valores CMI confiables de los compuestos activos, así como el valor del índice CFI de sus combinaciones binarias en un amplio rango de concentración por debajo de las respectivas CMI. El efecto sinérgico más notable se observó para las mezclas de carvacrol/cinamaldehído tanto para *E. coli* como para *L. innocua*, pero usando diferentes proporciones de compuestos (1: 0.1 y 0.5: 4 respectivamente para cada bacteria). En general, los resultados obtenidos sobre los efectos sinérgicos de los componentes AE concuerdan con los reportados por otros autores, aunque se obtuvieron algunas discrepancias atribuibles a diferentes factores del ensayo antimicrobiano que afectan el crecimiento bacteriano (temperatura, medio de cultivo, pH, cepa bacteriana). Asimismo, el método MTT permite probar una amplia gama de concentraciones, lo que permite una mejor estimación de la relación óptima de compuestos activos con los que obtener la máxima sinergia. El efecto sinérgico fue más notable en las bacterias Gram-positivas que en las Gram-negativas, lo que podría atribuirse a su diferente envoltura bacteriana. Los resultados obtenidos permitieron optimizar la dosis de compuestos activos utilizados para la aplicación en alimentos, minimizando así su impacto sensorial.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, I., LIN, H., ZOU, L., BRODY, A. L., LI, Z., QAZI, I. M., & LV, L. (2017). A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food control*, 82, 163-178.
- AKINYEMI, K. O., OLUWA, O. K., & OMOMGIBHEIN, E. O. (2006). Antimicrobial activity of crude extracts of three medicinal plants used in south-west Nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 3(4), 13-22.
- ALI, S. M., KHAN, A. A., AHMED, I., MUSADDIQ, M., Ahmed, K. S., POLASA, H., & AHMED, N. (2005). Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 4(1), 20.
- BIALONSKA, D., RAMMANO, P., KASIMSETTY, S. G., MUNTHA, K. R., GIBSON, G. R., & FERREIRA, D. (2010). The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), 175-182.
- BRODY, A. L., BUGUSU, B., HAN, J. H., SAND, C. K., & MCHUGH, T. H. (2008). Innovative Food Packaging Solutions. *Journal of food science*, 73(8).
- BOURTOOM, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.
- BUENO, J. (2015). Models of evaluation of antimicrobial activity of essential oils in vapour phase: a promising use in healthcare decontamination. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 2(2).
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- BURT, S. A., FLEDDERMAN, M. J., HAAGSMAN, H. P., VAN KNAPEN, F., & VELDHIJZEN, E. J. (2007). Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 346-350.
- CLARK, F. E. (1965). Agar-Plate Method for Total Microbial Count 1. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 1460-1466.
- DE OLIVEIRA, K. Á. R., DE SOUSA, J. P., DA COSTA MEDEIROS, J. A., de FIGUEREIREDO, R. C. B. Q., Magnani, M., de Siqueira Júnior, J. P., & de Souza, E. L. (2015). Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1, 8-cineole. *Food Control*, 47, 334-339.
- DE SOUSA, J. P., DE AZEREDO, G. A., DE ARAÚJO TORRES, R., DA SILVA VASCONCELOS, M. A., da CONCEIÇÃO, M. L., & DE SOUZA, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International journal of food microbiology*, 154(3), 145-151.
- DECKER, E. A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in food science & technology*, 9(6), 241-248.

- DEL NOBILE, M. A., CONTE, A., INCORANTO, A. L., & PANZA, O. (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 57-63.
- DU, E., GAN, L., LI, Z., WANG, W., LIU, D., & GUO, Y. (2015). In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 58
- FANG, Z., ZHAO, Y., WARNER, R. D., & JOHNSON, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in food science & technology*, 61, 60-71.
- GALUCCI, M. N., OLIVA, M., CASERO, C., DAMBOLENA, J., LUNA, A., ZYGADLO, J., & DEMO, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(6), 348-354.
- GARCÍA-GARCÍA, R., LÓPEZ-MALO, A., & PALOU, E. (2011). Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of food science*, 76(2).
- GHABRAIE, M., VU, K. D., TATA, L., SALMIERI, S., & LACROIX, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 332-339.
- GÓMEZ-ESTACA, J., LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., CATALÁ, R., & GAVARA, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51
- GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J. B., CHRISTENSEN, A. B., & GIVSKOV, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79-97.
- GUARDA, A., RUBILAR, J. F., MILTZ, J., & GALOTTO, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International journal of food microbiology*, 146(2), 144-150.
- GUERREIRO, A. C., GAGO, C. M., MIGUEL, M. G., FALEIRO, M. L., & ANTUNES, M. D. (2016). The influence of edible coatings enriched with citral and eugenol on the raspberry storage ability, nutritional and sensory quality. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 20-28.
- GUILBERT, S., GONTARD, N., & CUQ, B. (1995). Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*, 8(6), 339-346.
- GUNASEKERA, T. S., ATTFIELD, P. V., & VEAL, D. A. (2000). A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1228-1232.

- GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*, 124(1), 91-97.
- HIGUERAS, L., LÓPEZ-CARBALLO, G., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., CATALÁ, R., & GAVARA, R. (2014). Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. *International journal of food microbiology*, 188, 53-59.
- HILL, L. E., GOMES, C., & TAYLOR, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 86-93.
- HOSSEINNEJAD, M., & JAFARI, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 85, 467-475.
- HOUDKOVA, M., RONDEVALDOVA, J., DOSKOCIL, I., & KOSKOSA, L. (2017). Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*, 118, 56-62
- HUANG, T. H., CHEN, C. L., HUNG, C. J., & KAO, C. T. (2012). Comparison of antibacterial activities of root-end filling materials by an agar diffusion assay and Alamar blue assay. *Journal of Dental Sciences*, 7(4), 336-341.
- JAISWAL, A. K., & JAISWAL, S. (2014). Modelling the effects of natural antimicrobials as food preservatives. *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*, 259-284.
- JOERGER, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry science*, 82(4), 640-647.
- JOKAR, M., RAHMAN, R. A., IBRAHIM, N. A., ABDULLAH, L. C., & TAN, C. P. (2012). Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food and bioprocess technology*, 5(2), 719-728.
- KERRY, J. P., O'GRADY, M. N., & HOGAN, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat science*, 74(1), 113-130
- KREPKER, M., SHEMESH, R., POLEG, Y. D., KASHI, Y., VAXMAN, A., & SEGAL, E. (2017). Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control*, 76, 117-126.
- LAMBERT, R. J. W., & LAMBERT, R. (2003). A model for the efficacy of combined inhibitors. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 734e743.
- LAMBERT, R., & PEARSON, J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784-790.

- LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., CATALÁ, R., GAVARA, R., & HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. (2011). Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering*, 104(3), 380-386.
- MAJID, I., NAYIK, G. A., Dar, S. M., & Nanda, V. (2016). Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- MAKWANA, S., CHOUDHARY, R., DOGRA, N., KOHLI, P., & HADDOCK, J. (2014). Nanoencapsulation and immobilization of cinnamaldehyde for developing antimicrobial food packaging material. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 470-476.
- MOLEYAR, V., & NARASIMHAM, P. (1992). Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16(4), 337-342.
- MOSTAFA, A. A., AL-ASKARKAR, A. A., ALMAARY, K. S., DAWOUD, T. M., SHOLKAMY, E. N., & BAKRI, M. M. (2017). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- MOON, H., & RHEE, M. S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International journal of food microbiology*, 217, 35-41.
- MULLER, J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., & CHIRALT, A. (2017). Poly (lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. *European Polymer Journal*, 95, 56-70.
- NCUBE, N. S., AFOLOYAN, A. J., & OKOH, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).
- NITHYA, V., MURTHY, P. S. K., & HALAMI, P. M. (2013). Development and application of active films for food packaging using antibacterial peptide of *Bacillus licheniformis* Me1. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 475-483.
- NOSHAD, M., HOJIATI, M., & BEHBAHANI, B. A. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial pathogenesis*, 116, 153-157.
- NOSTRO, A., GERMANO, M. P., D'ANGELO, V., MARINO, A., & CANNATELLI, M. A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in applied microbiology*, 30(5), 379-384.
- NOVY, P., KLOUCEK, P., RONDEVALDOVA, J., HAVLIK, J., KOURIMSKA, L., & KOKOSKA, L. (2014). Thymoquinone vapor significantly affects the results of *Staphylococcus aureus* sensitivity tests using the standard broth microdilution method. *Fitoterapia*, 94, 102-107.
- OLIVAS, G. I., & BARBOSA-CÁNOVAS, G. (2009). Edible films and coatings for fruits and vegetables. In *Edible films and coatings for food applications* (pp. 211-244). Springer New York.

- OZDEMIR, M., & FLOROS, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(3), 185-193.
- PEI, R. S., ZHOU, F., JI, B. P., & XU, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of food science*, 74(7).
- QIN, Y., LIU, D., WU, Y., YUAN, M., LI, L., & YANG, J. (2015). Effect of PLA/PCL/cinnamaldehyde antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Postharvest biology and technology*, 99, 73-79.
- RAVISHANKAR, S., ZHU, L., OLSEM, C. W., MCHUGH, T. H., & FRIEDMAN, M. (2009). Edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat and poultry products. *Journal of food science*, 74(8).
- REQUENA, R., JIMENEZ, A., VARGAS, M., & CHIRALT, A. (2016). Poly [(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] active bilayer films obtained by compression moulding and applying essential oils at the interface. *Polymer International*, 65(8), 883-891.
- REQUENA, R., VARGAS, M., ATARÉS, L., & CHIRALT, A. (2017). Biopolymers Carrying Essential Oils, or their Compounds, for Food Antimicrobial Packaging. *Current Organic Chemistry*, 2017, 21, 1-16 1
- RESTUCCIA, D., SPIZZIRRI, U. G., PARISI, O. I., CIRILLO, G., CURCIO, M., LEMMA, F., & PICCI, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425-1435.
- RIVAS, L., MCDONNELL, M. J., BURGESS, C. M., O'BRIEN, M., NAVARRO-VILLA, A., FANNING, S., & DUFFY, G. (2010). Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 70-78.
- RONDEVALDOVA, J., NOVY, P., URBAN, J., & KOKOSKA, L. (2017). Determination of anti-staphylococcal activity of thymoquinone in combinations with antibiotics by checkerboard method using EVA capmat™ as a vapor barrier. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(4), 566-572.
- SARKAR, P., BHUNIA, A. K., & YAO, Y. (2017). Impact of starch-based emulsions on the antibacterial efficacies of nisin and thymol in cantaloupe juice. *Food chemistry*, 217, 155-162.
- STRATAKOS, A. C., SIMA, F., WARD, P., LINTON, M., KELLY, C., PINKERTON, L., STEF, L., PET, I. & CORCIONIVOSCHI, N. (2018). The in vitro effect of carvacrol, a food additive, on the pathogenicity of O157 and non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Food Control*, 84, 290-296.
- VALENCIA, G. A. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: Una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria*, 2.
- VALENCIA-SULLCA, C., Jiménez, M., JIMÉNEZ, A., ATARÉS, L., VARGAS, M., & CHIRALT, A. (2016). Influence of liposome encapsulated essential oils on properties of chitosan films. *Polymer International*, 65(8), 979-987.

VAN VUUREN, S. F., & VILJOEN, A. M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 540-544.

VANGALAPATI, M., SATYA, S. N., PRAKASH, S. D. V., & AVANIGADDA, S. (2012). A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species. *Research Journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 3(1), 653-663.

XUE, J., DAVIDSON, P. M., & ZHONG, Q. (2017). Inhibition of Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes growth in milk and cantaloupe juice by thymol nanoemulsions prepared with gelatin and lecithin. *Food Control*, 73, 1499-1506.

YE, H., SHEN, S., XU, J., LIN, S., YUAN, Y., & JONES, G. S. (2013). Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, 34(2), 619-623.