



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.**

**SINERGISMO ANTIBACTERIANO ENTRE
COMPUESTOS TERPÉNICOS DE *Cymbopogon citratus* Y
AZUFRADOS DE *Allium cepa***

Por:

Luis Alberto Ortega Ramírez

**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

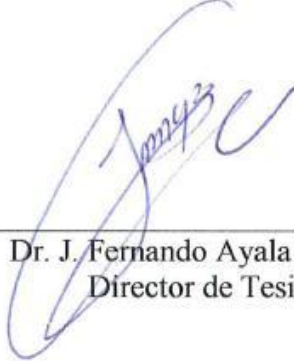
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de I.B. Luis Alberto Ortega Ramírez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



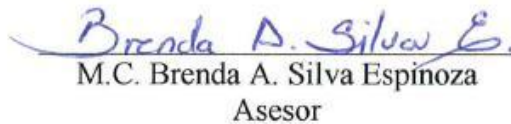
Dr. J. Fernando Ayala Zavala
Director de Tesis



Dr. Gustavo A. González Aguilar
Asesor



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Asesor



M.C. Brenda A. Silva Espinoza
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis confines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.** por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)**, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en esta área, facilitándome sus equipos y mis reiteradas gratificaciones para el personal que labora en esta Coordinación.

Quiero expresar especial gratitud a mi director de tesis el Dr. **Jesús Fernando Ayala Zavala**, no solo por su asesoría en la realización de mi tesis, sino también por el apoyo incondicional y por brindarme su amistad y confianza durante mi estancia en CIAD.

Agradezco a mi comité de tesis integrado por el **Dr. Gustavo A. González Aguilar**. La **Dra. Irasema Vargas Arispuro** y a la **MC Brenda A. Silva Espinoza** por su apoyo y asesoría durante estos dos años. Muchas Gracias.

Al M.C. **Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela** por su apoyo técnico en el laboratorio, por sus consejos para que todo saliera bien, por su gran amistad y sus consejos para la realización de mi trabajo.

DEDICATORIAS

A **Dios** por darme la oportunidad de seguir este camino acompañándome en cada momento de mi vida.

A mis padres **Narciso Ortega** y **Lorena Ramírez**, que son las personas que más amo en esta vida, en primer lugar por darme la vida y en segundo por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios, ya que sin su esfuerzo para sacarme adelante nada de esto hubiera sido posible, además les quiero decir que este logro no es mío, **ES DE USTEDES**, quienes han estado siempre cuando yo los necesité, por estar a mi lado en las buenas y malas, gracias por estar en todo momento preocupándose por mí. *GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS*, los quiero con todo mi corazón.

A mis abuelos, quienes son parte fundamental de mi vida, A mi hermana **Laura** y mi hermano **Bryan**. En general este trabajo se lo dedico a toda mi familia que es lo más importante que tengo en esta vida.

A todos mis compañeros de la maestría, y a mis amigos que seguimos en este camino del posgrado, **Sergio Iván, Juan Manuel, Julio Cesar y Carlos**, por permitirme vivir con ustedes y compartir momentos muy agradables, a mis nuevos amigos que conocí en CIAD; **Isela, Thalía, Rosy, y Pancho** quienes me hacían el día más llevadero en el laboratorio ustedes saben que aquí tienen a un amigo y siempre estaré para apoyarlos en lo que necesiten, *GRACIAS AMIGOS....*

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Necesidad de Antimicrobianos Naturales para Asegurar la Inocuidad Alimentaria	4
Terpenos de Plantas con Actividad Antibacteriana	7
Mecanismo de Acción Antibacteriano de Compuestos Terpénicos	9
<i>Cymbopogon citratus</i> como Fuente Rica en Terpenos con Actividad Antibacteriana	10
Compuestos Azufrados de Plantas con Actividad Antibacteriana	14
<i>Allium cepa</i> como Fuente Rica en Compuestos Azufrados con Actividad Antibacteriana	17
Combinación de Extractos de Plantas para Aumentar la Efectividad Antibacteriana	18
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Obtención de aceites esenciales	24
Identificación de Compuestos Volátiles de los Aceites de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i>	24

Actividad Antibacteriana de los Aceites de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> .	25
Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los Aceites de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> .	25
Interacciones entre la Combinación de los Aceites de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i>	26
Efecto Antibacteriano <i>in vivo</i> de la Combinación de los Aceites Esenciales de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i>	26
Análisis estadístico	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Identificación de Compuestos Volátiles de los aceites de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i>	29
Componentes Mayoritarios en el Aceite de <i>C. citratus</i>	29
Componentes Mayoritarios en el Aceite de <i>A. cepa</i>	31
Actividad Antibacteriana del Aceite de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> .	31
Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los Aceites de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> .	31
Efecto Antibacteriano <i>in vitro</i> de la Combinación de los Aceites	38
Efecto Antibacteriano <i>in vivo</i> de la Combinación de los Aceites	43
CONCLUSIÓN	48
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales terpenos obtenidos de aceites esenciales.	8
Figura 2. Mecanismo antibacteriano propuesto para compuestos terpénicos. La parte lipofílica de estos compuestos les permite interactuar principalmente con la membrana lo que genera apertura de poros o canales, este daño provoca que el material de la célula sea liberado y la muerte de ésta.	11
Figura 3. Principales compuestos extraídos por destilación por arrastre de vapor de <i>C. citratus</i>	13
Figura 4. Compuestos azufrados obtenidos por diferentes métodos de extracción.	15
Figura 5. Mecanismo de acción antibacteriano propuesto para compuestos azufrados. La interacción de compuestos azufrados con proteínas y enzimas de la membrana puede provocar cambios en su estructura e inactivación, lo que puede afectar diferentes procesos metabólicos vitales y la muerte celular bacteriana.	16
Figura 6. Método de checkerboard en microdilución para determinar combinaciones antibacterianas efectivas. El área sombreada indica crecimiento bacteriano.	27
Figura 7. Componentes mayoritarios en el aceite de <i>C. citratus</i> . 1; linalool, 2; citronelal, 3; <i>Cis</i> -vervenol, 4; <i>Cis</i> -carveol, 5; geranial, 6; geraniol, 7; neral, 8; mirceno, 9; cariofileno.	30
Figura 8. Componentes mayoritarios en el aceite de <i>A. cepa</i> . 1; metil propil disulfuro, 2; dipropil disulfuro, 3; dimetil trisulfuro, 4; dipropil trisulfuro.	32
Figura 9. Efecto de las CMI de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias patógenas.	35

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. CMI de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> probados <i>in vitro</i> contra patógenos alimentarios.	33
Cuadro 2. Efecto del aceite de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a bacterias patógenas.....	36
Cuadro 3. ICIF de la combinación de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> contra patógenos alimentarios.	39
Cuadro 4. Efecto del aceite de <i>C. citratus</i> y <i>A. cepa</i> y su combinación sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a bacterias patógenas.	41
Cuadro 5. Logaritmos de reducción antibacteriano de los aceites individuales y en combinación frente a bacterias patógenas inoculadas en espinaca.	44
Cuadro 6. Logaritmos de reducción antibacteriano de los aceites individuales y en combinación frente a bacterias patógenas inoculadas en lechuga.	46

RESUMEN

Gran parte de las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por bacterias, y una de las alternativas para solucionar este problema es el uso de antibacterianos naturales. Los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Allium cepa* son ricos en compuestos terpénicos y azufrados, respectivamente, que han mostrado tener actividad antibacteriana. Una alternativa para aumentar dicha actividad es la combinación de extractos, por lo que se planteó que la combinación entre *C. citratus* y *A. cepa* causa sinergismo antibacteriano contra patógenos alimentarios. Los componentes mayoritarios en *C. citratus* fueron geranial y neral, y en *A. cepa* fueron dipropildisulfuro y dipropil trisulfuro. Ambos aceites (*C. citratus* y *A. cepa*) fueron efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* (CMI=2.210 y 5.13 mg/mL), *Salmonella Choleraesuis* (3.04 y 1.28 mg/mL), *Listeria monocytogenes* (1.33 y 2.56 mg/mL) y *Staphylococcus aureus* (0.44 y 5.26 mg/mL), respectivamente. La combinación de los aceites esenciales causó un efecto sinérgico antibacteriano frente a *E. coli*, *S. Choleraesuis* y *L. monocytogenes* con índices de concentración inhibitoria fraccional (ICIF) de 0.5, 0.25, y 0.375, respectivamente. Se observó un efecto aditivo para *S. aureus* (ICIF=1.0), no se observó ningún efecto antagonista. El aceite de *C. citratus* redujo el crecimiento de las bacterias inoculadas en espinaca y lechuga en los rangos de 0.78-2.04 y 1.73-1.97 log UFC/g, y el aceite de *A. cepa* redujo el crecimiento de 0.48-1.81 y 0.75-1.80 log UFC/g, respectivamente. La combinación de los aceites fue más efectiva para reducir el crecimiento de todas las bacterias inoculadas en espinaca (1.37-2.94 log UFC/g) y lechuga (1.54-3.17 log UFC/g) comparado con los aceites aplicados de manera individual. Por la tanto, la combinación de los aceites esenciales de *C. citratus*, rico en compuestos terpénicos, y *A. cepa*, rico en compuestos azufrados, es una alternativa para potenciar el poder antibacteriano que presentan de manera individual.

Palabras clave: interacción entre aceites, sinergismo antibacteriano, antagonismo, aditivos alimentarios.

ABSTRACT

Most of the foodborne diseases are caused by bacteria, and an alternative to solve this problem is the use of natural additives. *Cymbopogon citratus* and *Allium cepa* essential oils are rich in terpenic and sulfured compounds, respectively, that have shown antibacterial activity. The conjunction of extracts can be an option to increase this activity, for this reason it was stated that the conjunction of *C. citratus* and *A. cepa* cause antibacterial synergy against food pathogens. The major constituents of *C. citratus* were geranial and neral, for *A. cepa* were dipropyldisulfide and dipropyltrisulfide. Both oils (*C. citratus* and *A. cepa*) were effective inhibiting the bacterial growth of *Escherichia coli* (MIC=2.210 and 5.13 mg/mL), *Salmonella Choleraesuis* (3.04 and 1.28 mg/mL), *Listeria monocytogenes* (1.33 and 2.56 mg/mL) and *Staphylococcus aureus* (0.44 and 5.26 mg/mL), respectively. The conjunction of essential oils showed an antibacterial synergistic effect against *E. coli*, *S. Choleraesuis* and *L. monocytogenes* with fractional inhibitory concentration indexes (FICI) of 0.5, 0.25, y 0.35, respectively. An additive effect was observed against *S. aureus* (FICI=1.0), no antagonistic effects were observed. *C. citratus* oil reduced the bacterial growth inoculated on spinach and lettuce in ranges 0.78-2.04 and 1.73-1.97 log CFU/g, and *A. cepa* oil reduced 1.37-2.94 and 1.54-3.17 log CFU/g, respectively. The conjunction of essential oils was more effective to reduce the growth of all inoculated bacteria in spinach (1.37-2.94 log UFC/g) and lettuce (1.54-3.17 log UFC/g), compared with the individual oils. Therefore, the conjunction between essential oils from *C. citratus*, rich in terpenes, and *A. cepa*, rich in sulfured compounds, is an alternative to increase the antibacterial power compared to individual oils.

Keywords: interaction of oils, antibacterial synergism, antagonism, food additives.

INTRODUCCIÓN

La presencia de bacterias en alimentos puede ser causa de enfermedades para el consumidor (FDA, 2011). Se han reportado casos según la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de infecciones bacterianas en humanos debido a brotes de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, en algunos alimentos como espinaca, lechuga, pepino y melón. Para evitar el crecimiento de estos microorganismos en alimentos se han utilizado tradicionalmente aditivos sintéticos, pero estos están siendo rechazados debido a que su consumo pone en riesgo a la salud humana, por lo que se demandan productos más naturales (Dolatabadi y Kashanian, 2010). Es por esto que surge la necesidad de buscar alternativas que permitan asegurar la inocuidad alimentaria (Seneviratne y Kotuwegedara, 2009).

Las plantas contienen ciertos compuestos antibacterianos que se encuentran principalmente en hojas, tallos y bulbos, los cuales en su mayoría son derivados de su metabolismo secundario (Vitulo y col., 2011). Una de las plantas con actividad antibacteriana es la hierba de limón (*Cymbopogon citratus*, DC), cuya actividad ha sido atribuida a los compuestos terpénicos que la componen (Figueirinha y col., 2008). Su aceite esencial es efectivo contra una amplia gama de organismos que comprende bacterias gram positivas y gram negativas, levaduras, y hongos (Hammer y col., 1999; Inouye y col., 2001). De manera específica ha sido eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias como: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, serotipo Typhimurium, *Serratia marcesens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium equii* y *Staphylococcus*, muchas de las cuales pueden comprometer la inocuidad alimentaria (Baratta y col., 1998; Cimanga y col., 2002; Pereira y col., 2004; Bassolé y col., 2011). El modo de acción antibacteriano propuesto para los componentes de *C. citratus*, es atribuido a su carácter lipofílico, el cual les permite interactuar con la membrana

lipídica, provocando la apertura de poros y causando la salida del contenido citoplasmático, principalmente, la liberación de protones lo que causa la muerte de la bacteria (Aiemsard y col., 2011). Este aceite ha sido aplicado en algunos alimentos donde ha mostrado efecto antibacteriano, específicamente contra *Salmonella* Newport, inoculada en vegetales de hoja verde y *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis inoculadas en fresas (Duan y Zhao, 2009; Moore-Neibel y col., 2012). Lo anterior resalta la efectividad del aceite esencial de *C. citratus* como una herramienta para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas en alimentos.

Otra planta con actividad antibacteriana es la cebolla (*Allium cepa* L.), y su actividad es atribuida a los compuestos azufrados presentes, lo cual se ha observado en diferentes variedades (Block y col., 1992) Algunos estudios *in vitro* demuestran que el aceite esencial de *A. cepa* presenta alta actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos y deteriorativos como *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus*, y *Aspergillus terreus* (Benkeblia, 2004).

El modo de acción antibacteriano propuesto para los componentes de *A. cepa* está asociado a la presencia de átomos de azufre que son esenciales para la inhibición del crecimiento bacteriano, reportándose que a mayor número de átomos de azufre mayor actividad (Cavallito y col., 1944). Tales compuestos pueden unirse a la membrana lipídica interactuando con los aminoácidos azufrados de enzimas vitales para las bacterias, afectando su viabilidad (Kim, J. W. y col., 2004). Este aceite ha sido aplicado en algunos alimentos donde presentó actividad antibacteriana, tal es el caso de la aplicación en papa fresca cortada donde redujo las cuentas de mesófilos aerobios (Vazquez-Armenta y col., 2013). Además, este aceite y dipropildisulfuro, uno de sus componentes, inhibieron el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* inoculado en salsa de soya (Kim, J. W. y col., 2004). En este contexto, el aceite de cebolla presenta compuestos con actividad antibacteriana, que han mostrado efectividad en matrices alimentarias.

Una nueva tendencia en la caracterización de las propiedades antimicrobianas de extractos vegetales es el estudio de las interacciones sinérgicas o antagónicas que los diferentes compuestos o extractos pueden presentar (Van Vuuren y Viljoen, 2011). La combinación de *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* a $1/4$ CMI+ $1/4$ CMI y $1/4$ CMI+ $1/2$ CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) son efectivos para reducir el crecimiento bacteriano (de Sousa y col., 2013). De manera práctica la combinación de *Scutellaria*/Forsythia/canela/romero presentó eficacia para reducir el conteo microbiano (1.81 a 2.32 log) en carne de cerdo empacada al vacío (Kong y col., 2007). El concepto de sinergia antibacteriana se basa en el principio de que: en combinación la formulación puede mejorar la eficacia, reducir la toxicidad, disminuir los efectos secundarios adversos, reducir la dosis y la resistencia a los antibacterianos convencionales (Li y col., 1993; Cottarel y Wierzbowski, 2007). Entonces la combinación de extractos de diferentes plantas podría ser una opción para aumentar la actividad antibacteriana.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue utilizar mezclas de aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa* ricos en compuestos activos con estructuras diferentes, para aumentar la actividad antibacteriana.

ANTECEDENTES

Necesidad de Antimicrobianos Naturales para Asegurar la Inocuidad Alimentaria

La inocuidad alimentaria se ha convertido en una preocupación internacional cada vez más importante (FDA, 2011). En los Estados Unidos la CDC estima que hay alrededor de 48 millones de casos anuales de enfermedades transmitidas por los alimentos, estas enfermedades tienen como resultado 128,000 hospitalizaciones y 3,000 muertes. Gran parte de estos problemas se asocia a bacterias como *B. cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum* y *perfringens*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli* O157: H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, y *Staphylococcus aureus* (FDA, 2011). Siendo estas últimas cuatro bacterias, las involucradas más frecuentemente en casos de brotes de enfermedades causados por el consumo de alimentos contaminados de origen vegetal.

La contaminación de alimentos de origen vegetal puede darse en diferentes puntos de la cadena productiva, tanto en pre- como en poscosecha. En precosecha la implementación de buenas prácticas agrícolas es importante para reducir el riesgo de contaminación por patógenos alimentarios, en este periodo los principales vectores que promueven la contaminación son: el agua, animales, y el mismo ser humano (Kirezieva y col., 2013). En poscosecha el control de la contaminación se dicta en la implementación de las buenas prácticas de manufactura y en general la contaminación se da por falta de higiene en diferentes puntos del manejo de los vegetales (Sumathi y col., 2004). Según reportes de la CDC, en el 2012 se han presentado algunos brotes de *E. coli* O157:H7 en espinaca orgánica y en una mezcla de vegetales lo que resultó en 33 personas infectadas y 13 hospitalizaciones. También se han presentado brotes de *E. coli* O26 en trébol crudo que provocaron 29 infecciones y 7 hospitalizaciones relacionados

con este patógeno. Este año se presentaron brotes de *E. coli* O121 en productos congelados lo que provocó 35 personas infectadas y 9 hospitalizaciones (CDC, 2013). Lo anterior permite evidenciar la necesidad de reforzar diferentes barreras que permitan reducir el riesgo de contaminación por bacterias patógenas.

Cuando un alimento es consumido con la presencia de *E. coli* esta bacteria se une a la superficie de la célula epitelial del intestino por medio de los *pili* (The Howard Hughes Medical Institute 2013). (Los *pili* son hebras de largas proteínas filamentosas de la bacteria que se adhieren a las microvellosidades de la superficie de las células intestinales). Cuando la bacteria está en estrecho contacto con las células intestinales, desaparecen las microvellosidades de una zona de la superficie intestinal es ahí cuando comienza la siguiente fase del proceso de infección. La bacteria usa un sistema especializado de inyección de proteínas, como el inyector tipo III, específicamente las EspA (enteropathogenic *Escherichia coli* secreted proteins) que es como un tubo o jeringa e inyecta proteínas bacterianas en la célula intestinal, forzándola a cooperar con su propia infección. Ahora dos proteínas denominadas *EspB* y *EspD* viajan a través del tubo para formar una abertura en la membrana de la célula intestinal, por medio de la cual proteínas bacterianas adicionales se mueven dentro de la célula formando un poro.

Cuando este proceso se completa la bacteria inyecta una proteína denominada *Tir*, la cual en el interior de la célula huésped se inserta en la membrana y se proyecta hacia la superficie celular donde funciona como receptor para interactuar con otra proteína bacteriana denominada intimina y continuar el proceso infectivo (HMMI, The Howard Hughes Medical Institute, 2013). Desde el interior de la célula intestinal otra proteína se adhiere a la porción de la proteína bacteriana *Tir* formando largas hebras de actina. Los filamentos de actina se forman directamente debajo del lugar donde la bacteria se encuentra adherida a la célula intestinal. A medida que los mismos se alargan, empujan a la membrana de la célula intestinal hacia arriba y la bacteria queda suspendida en la cima del pedestal formado. Cuando la bacteria se ha adherido, comienzan los síntomas de infección, principalmente desarrollo de lesiones ultraestructurales y diarrea secretoria (HMMI, The Howard Hughes Medical Institute, 2013).

Otras de las bacterias patógenas más preocupantes en cuestiones de inocuidad alimentaria es *Salmonella*, según reportes de infecciones de la CDC en EUA (CDC, 2013). El 20 de junio del 2013 se reportaron un total de 84 casos de infecciones y 17 hospitalizaciones por consumir pepino contaminado con *Salmonella* Saintpaul, el cual era originario de México. Este mismo año se presentó un brote de *Salmonella* Montevideo y *Salmonella* Mbandaka en pasta de ajonjolí lo que generó 16 casos de infecciones y una persona muerta. En el año 2012 se reportaron brotes de *Salmonella* Braenderup en mango originario de Sinaloa México y su consumo provocó 127 casos de infecciones y 33 hospitalizaciones por el consumo de este producto. Además, el 5 de octubre de 2012 se reportaron 261 personas infectadas por el consumo de melón infectado con *S. Typhimurium* y *S. Newport* (CDC, 2013). Esto destaca la actualidad de la problemática en inocuidad alimentaria que causa este patógeno.

Después de la ingestión del alimento contaminado, *Salmonella* inicia su ciclo de infección intestinal invadiendo al hospedero a través del tejido linfoide. *Salmonella*, utiliza un mecanismo especializado, similar al descrito para *E. coli*, sin embargo en este caso los filamentos de actina forman una vacuola que engloba a la bacteria y la introduce a la célula intestinal (HMMI, 2013). En circunstancias normales entra en acción el mecanismo por el cual la célula destruye a la bacteria, es decir la vacuola se fusiona con lisosomas que contienen enzimas digestivas que degradan al patógeno introducido. Pero en caso de persistir la bacteria usa el sistema inyector para introducir otras proteínas bacterianas en la vacuola que la rodea. De este modo la transforma evitando la fusión con los lisosomas. Una vez a salvo, *Salmonella* comienza a dividirse dentro de la célula y de la vacuola salen filamentos que se adhieren a la membrana celular que la contiene. La formación de esos filamentos esta motorizada por las bacterias y, a medida que se dividen la vacuola crece (HMMI, 2013). Esta infección causa diferentes daños como fiebre tifoidea, enfermedades gastrointestinales como diarrea, y salmonelosis (HMMI, 2013).

L. monocytogenes se considera la tercera causa de muerte por intoxicación alimentaria en EUA (CDC, 2013). En el 2011 se presentó un brote de *Listeria* en melón cantaloupe, provocando 147 personas infectadas. Al año siguiente se presentó un brote

de este patógeno en queso importado desde Italia, lo que resultó en 22 personas infectadas, de las cuales 20 fueron hospitalizadas, y 4 murieron. Estos brotes bacterianos han llevado a la industria alimentaria, al público, y al gobierno a cuestionar la idoneidad de los métodos actuales de aseguramiento de la inocuidad alimentaria (CDC, 2013).

Una de las medidas más utilizadas para el control bacteriano en la producción de alimentos es el uso de aditivos. Sin embargo, la preocupación del consumidor por evitar alimentos que han sido formulados con aditivos sintéticos ha aumentado; ya que algunos de éstos son sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad (Gutiérrez-Larraínzar y col., 2012). Es así como los productores de alimentos han sido forzados a tratar de remover completamente el uso de antimicrobianos sintéticos o adoptar alternativas naturales para el aseguramiento de la inocuidad (Gutiérrez-Larraínzar y col., 2012). Las plantas, hierbas y especias, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias como las patógenas que son de nuestro interés (López-Brea y Domingo, 2003).

Terpenos de Plantas con Actividad Antibacteriana

Los terpenos de plantas con actividad antibacteriana pueden extraerse en forma de aceites esenciales, los cuales son líquidos aromáticos aceitosos obtenidos de diferentes partes de las plantas (flores, semillas, hojas, corteza, brotes, hierbas, frutos y raíces). Gran parte de estos se constituyen de una mezcla variable de estructuras, principalmente monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}) (Figura 1) (Burt, 2004). Se evaluó el efecto antibacteriano de 96 aceites esenciales y 23 de los compuestos terpénicos principales de estos aceites frente a *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, y *Salmonella enterica*, donde los componentes más activos contra las bacterias fueron cinamaldehído, estragol, carvacrol, benzaldehído, citral, timol, eugenol, perilaldehído, carvona R, y geranil (Friedman y col., 2002). Asumiendo que los terpenos son los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

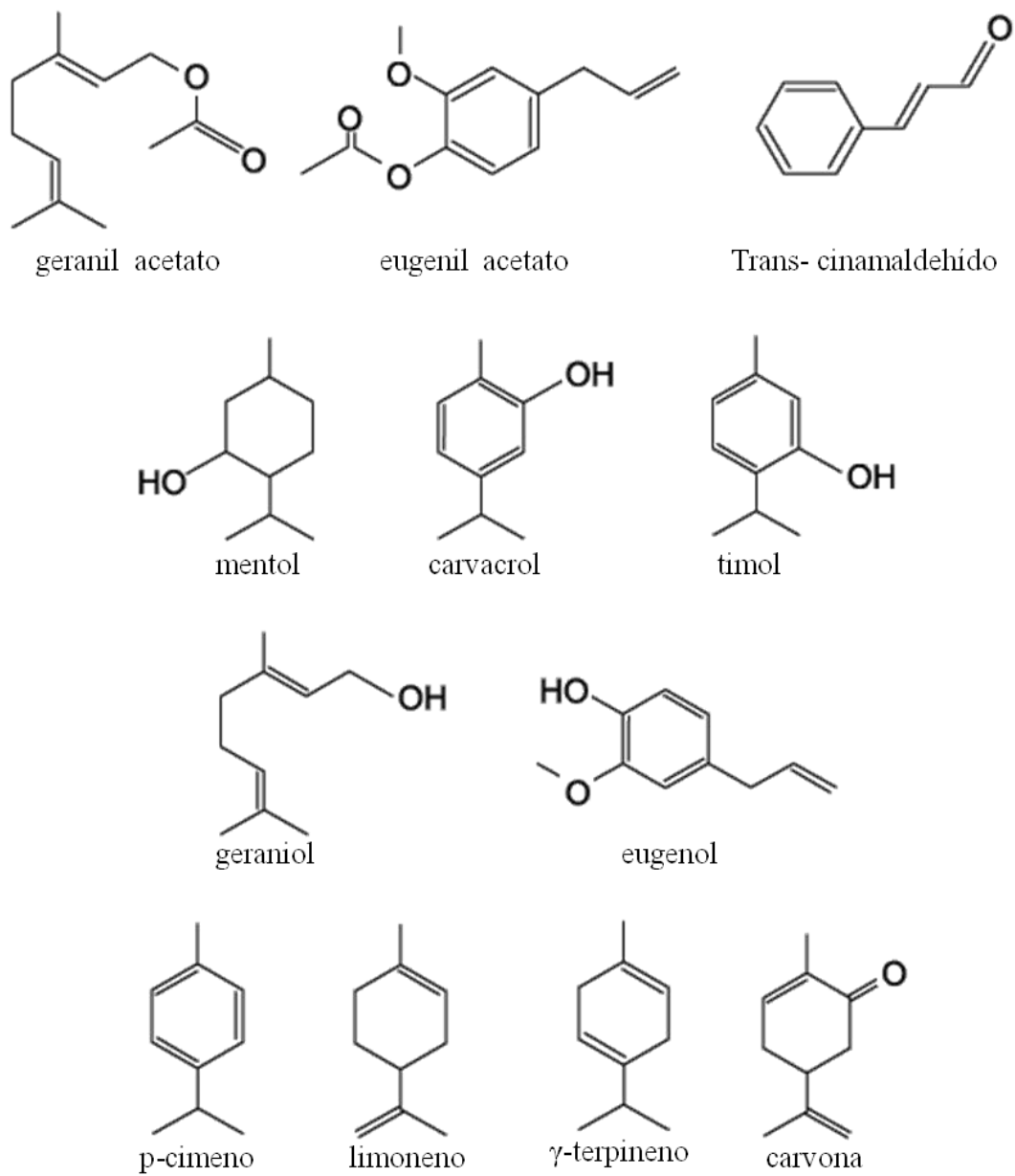


Figura 1. Principales terpenos obtenidos de aceites esenciales.

El uso de compuestos terpénicos ha sido efectivo para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Tal es el caso de la exposición de *E. coli* a 200 $\mu\text{L/mL}$ de citral a pH 4 durante 24 h a 20 °C, lo cual causó la inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos iniciando en un tamaño de inoculo de 10^6 o 10^7 UFC/mL de este patógeno (Somolinos y col., 2010). Por otro lado, se reporta la inactivación de *S. aureus* utilizando carvacrol con una CMI de 3.8 g/L, mientras que timol y carvona fueron efectivos a 7.5 g/L, eugenol y geraniol presentaron menor efectividad con CMI de 33.43 y 222.25 g/L, respectivamente (Gallucci y col., 2009). Adicionalmente, *B. cereus* fue inhibido fuertemente por carvacrol (CMI = 3.8 g/L), timol (CMI = 7.5 g/L), eugenol (CMI = 66.8 g/L) y geraniol (CMI = 222.25 g/L) (Gallucci y col., 2009). Carvacrol (1.3 mM) combinado con temperaturas y pulsos eléctricos redujeron 5 log de *E. coli* O157:H7. Donde la combinación de temperatura y carvacrol, disminuyó el tiempo de inactivación en un 75% en jugo de manzana, mango, y tomate, y en un 85% para el caso de jugo de naranja (Ait-Ouazzou y col., 2013). Una solución de carvacrol de 5-15 mM aplicado en kiwi fresco cortado redujo 4 log UFC/g de la flora bacteriana del producto almacenado durante 21 días a 4 °C. Tratamientos con 1mM de carvacrol o ácido cinámico redujeron las cuentas viables en kiwi en 4 y 1.5 log UFC/g durante 5 días de almacenamiento a 4 °C y 8 °C, respectivamente, además alargó la fase de adaptación bacteriana hasta 3 días comparado con el control (Roller y Seedhar, 2002). Otros terpenos como timol y cinamaldehído (1000 mg/L) redujeron las cuentas de *Salmonella* (>3 log UFC/g) en semillas y germinados de alfalfa inoculados (Weissinger y col., 2001). Como menciona Lang y Buchbauer (2012) los aceites esenciales extraídos de plantas poseen fuerte actividad antibacteriana debido a su composición terpénica.

Mecanismo de Acción Antibacteriano de Compuestos Terpénicos

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición bacteriana de compuestos terpénicos. Se supone que dada la similitud estructural de muchos de los terpenos con actividad su modo de acción es similar, según (de Sousa y col., 2012). Sin embargo, considerando el gran número de diferentes grupos

de compuestos terpénicos y como estos ejercen su actividad antibacteriana, ésta no puede atribuirse a un mecanismo de acción en específico, pero probablemente se deba a diferentes sitios en la célula (Burt, 2004). Nychas (2003), Burt (2004), y Raybaudi-Massilia y col., (2009) mencionan que la acción en la célula bacteriana puede ser atribuida a: degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplasmática y proteínas de ésta, lo anterior causa la liberación del contenido hacia el exterior de la célula, coagulación del citoplasma, y pérdida de la fuerza motriz de protones (Figura 2).

De manera específica el modo de acción reportado para timol y carvacrol ésta relacionado con su carácter anfipático (Knowles y col., 2005). La parte no polar de estas estructuras facilita su paso a través de la membrana de la bacteria; por otro lado, en la parte polar un grupo hidroxilo combinado con un sistema de deslocalización de electrones le confiere un carácter ácido a estas moléculas. Debido a esta característica ácida el timol y carvacrol podrían liberar protones de las células, provocando la acidificación citoplasmática. Ya que el mantenimiento de la homeostasis del pH interno implica la existencia de un gradiente electroquímico de protones generado por una H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, que podría causar una disminución en la concentración de ATP y conducir a la muerte celular (Ultee y col., 2002). Nychas (2003) indica que el modo de acción de los terpenos depende de la concentración, a pesar de esto una gran mayoría de compuestos terpénicos son efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano.

Cymbopogon citratus como Fuente Rica en Terpenos con Actividad Antibacteriana

C. citratus (hierba de limón) ha sido cultivado durante muchos años con fines medicinales en diferentes países en todo el mundo. El uso de la hierba de limón es principalmente utilizada como remedio casero para la tos, los trastornos gastrointestinales, la malaria, la oftalmía, la neumonía y problemas vasculares (Naik y col., 2010). Se ha encontrado que la hierba de limón tiene propiedades antioxidantes, antidepresivas, antisépticas, astringentes, bactericidas, y fungicidas, que son atribuidas a

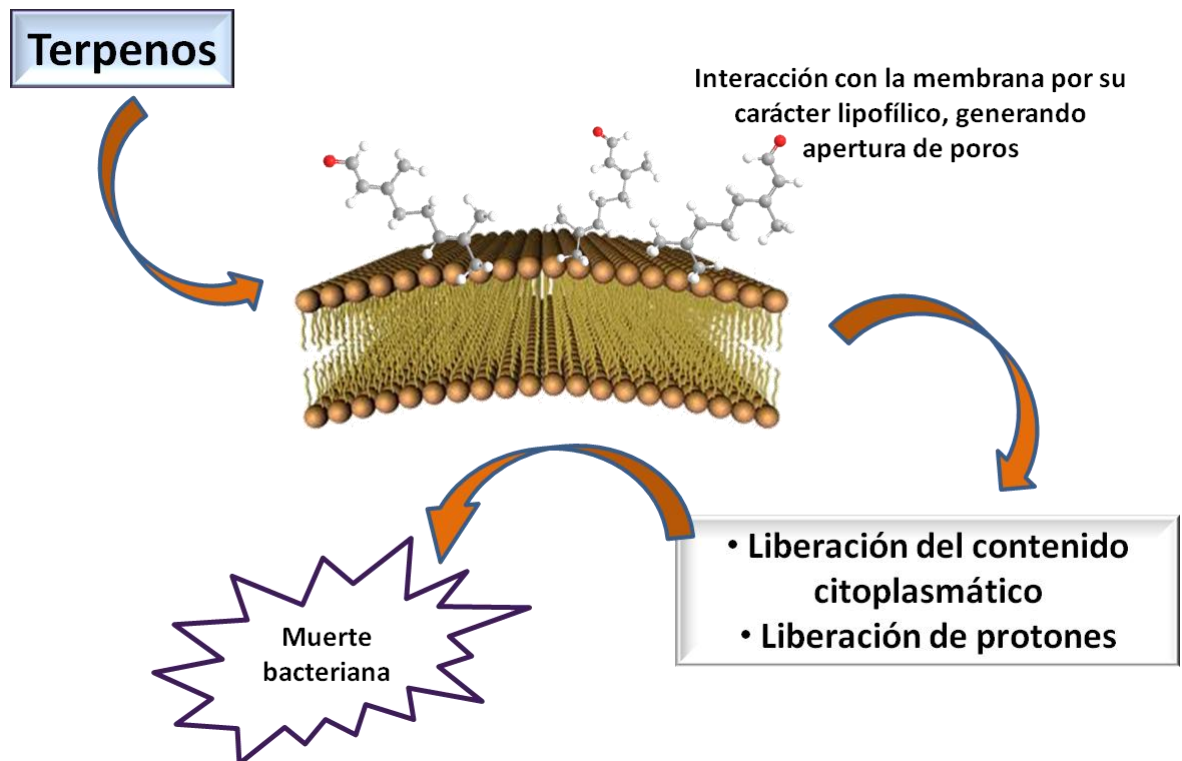


Figura 2. Mecanismo antibacteriano propuesto para compuestos terpénicos. La parte lipofílica de estos compuestos les permite interactuar principalmente con la membrana lo que genera apertura de poros o canales, este daño provoca que el material de la célula sea liberado y la muerte de ésta.

(Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009).

sus principales compuestos terpenos como citral (alrededor de 65-80%, citral es una mezcla de neral y geranial), limoneno, β -mirceno, citronelal y geraniol (Schaneberg y Khan, 2002) (Figura 3). Esta composición permite visualizar el potencial antibacteriano de esta planta.

La hierba de limón es efectiva contra una amplia gama de bacterias patógenas, incluyendo aquellas que presentan mecanismos de adaptación (Hammer y col., 1999; Inouye y col., 2001). El aceite de *C. citratus* ha sido eficaz contra *A. baumannii*, *A. veronii*, *E. faecalis*, *Escherichia*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium*, *S. marcesens*, *P. vulgaris*, *E. aerogenes*, *C. equii* y *S. aureus* (Baratta y col., 1998; Cimanga y col., 2002; Pereira y col., 2004; Bassolé y col., 2011).

Esta última bacteria tiene la habilidad para formar agregados conocidos como biopelículas, lo cual le proporciona protección contra antibióticos, desinfectantes y las defensas naturales del hospedero (Yarwood y col., 2004). Por ejemplo, después de 24 h de exposición a 0.125 % del aceite de *C. citratus*, se observó que la integridad estructural de la biopelícula fue interrumpida, mientras que a 0.5 % el daño fue más evidente, y a 1 % se inhibió la formación de biopelícula (Adukwu y col., 2012). Esto apoya la actividad antibacteriana del aceite de *C. citratus*.

El aceite de *C. citratus* ha sido aplicado en algunos alimentos donde ha mostrado efecto antibacteriano. Éste ha sido utilizado como tratamiento antibacteriano contra *S. Newport* inoculada sobre vegetales de hoja verde, donde la mayor reducción se observó en lechuga iceberg (4.3 log), seguido de espinaca, espinaca madura, y lechuga romana (Moore-Neibel y col., 2012). El aceite de *C. citratus*, entre otros aceites se utilizaron para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis* inoculadas en fresa, donde se observó que el aceite de nuestro interés (1 μ L/mL) redujo 5 log de ambas cepas (Duan y col., 2009). Por otro lado, una mezcla de *C. citratus* (0.25%) y ácido turmérico (0.25%) aplicados en mejillón redujeron las cuentas microbianas comparado con el control. Además el aceite de *C. citratus* fue mejor aceptado sensorialmente que el ácido turmérico (Masniyom y col., 2012). Por lo tanto, el uso de este aceite, además de reducir el deterioro bacteriano puede mantener las características de olor y sabor de los alimentos tratados.

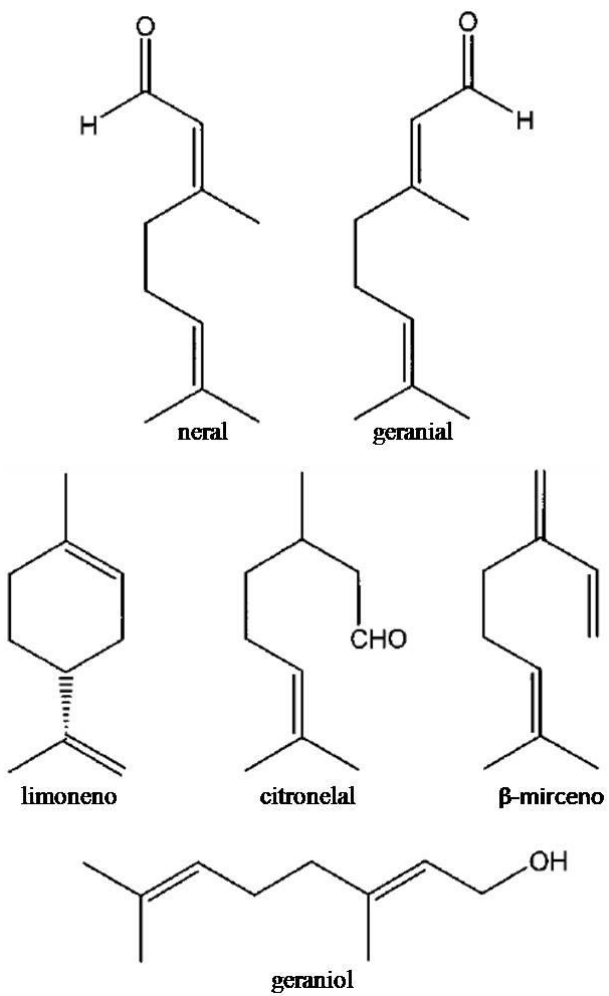


Figura 3. Principales compuestos extraídos por destilación por arrastre de vapor de *C. citratus*.

Compuestos Azufrados de Plantas con Actividad Antibacteriana

Dentro de las plantas del genero *Allium* se encuentran principalmente el ajo, el puerro, el tulipán y la cebolla. Estos son principalmente bulbos ricos en compuestos azufrados sintetizados a partir de alicina o ácido dialiltiosulfónico, estos son volátiles, con olor característico (Block y col., 1992). Los compuestos tiofenos, dimetil, y trimetil sulfuros otorgan sus características de olor y sabor a la cebolla (Lanzotti, 2006). La composición de estas plantas es muy variada y el tipo de compuestos obtenidos dependerá de método de extracción (Figura 4) (Corzo-Martínez y col., 2007). Estos bulbos son comúnmente utilizados como agentes saborizantes y condimentos, y son probablemente el alimento con potencial antibacteriano más consumido.

Se ha reportado la efectividad de extractos de ajo contra bacterias gram positivas y gran negativas: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella* (Whitemore y Naidu, 2000; Kim, J. W. y col., 2004). Además, puede prevenir el crecimiento de *S. aureus* y *B. cereus*; con una eficacia comparada con la ampicilina (Han y col., 1995). En algunas investigaciones también se ha demostrado un efecto inhibitorio de extractos acuosos de ajo sobre diferentes especies de bacterias y hongos (Hsieh y col., 2001; Ward y col., 2002). La actividad antibacteriana de este aceite es debido a compuestos azufrados, principalmente dialil sulfuros (Tsao y Yin, 2001). Varios sulfuros obtenidos de aceites esenciales de ajo (dialil disulfuro, dialil trisulfuro, y dialil tetrasulfuro) y cebolla (dimetil disulfuro, dipropil disulfuro, y dimetil trisulfuro) han mostrado eficacia para inhibir a *S. aureus* (Kim, J. W. y col., 2004).

La actividad antibacteriana de extractos de plantas del genero *Allium*, es atribuida a los compuestos volátiles principalmente metil, propil, propenil, y alil sulfuros (Kyung y Lee, 2001). Esta actividad ha sido explicada como una reacción general entre compuestos azufrados y grupos tiol (-SH) de enzimas celulares esenciales para las bacterias (Figura 5) como xantina oxidasa, succínico deshidrogenasa, y triosa fosfato deshidrogenasa (Kyung y col., 2001). Adicionalmente estos compuestos pueden inhibir la biosíntesis de lípidos y ARN. El número de átomos de azufre disponibles en estos

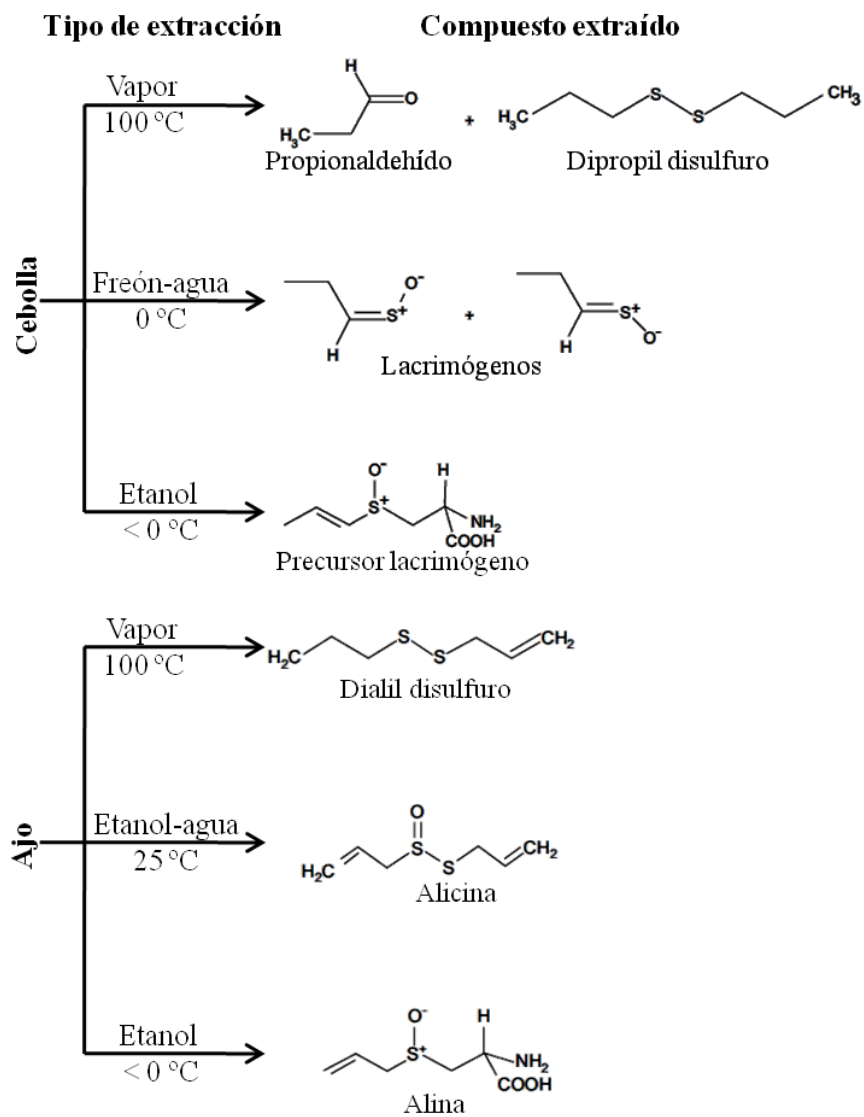


Figura 4. Compuestos azufrados obtenidos por diferentes métodos de extracción.

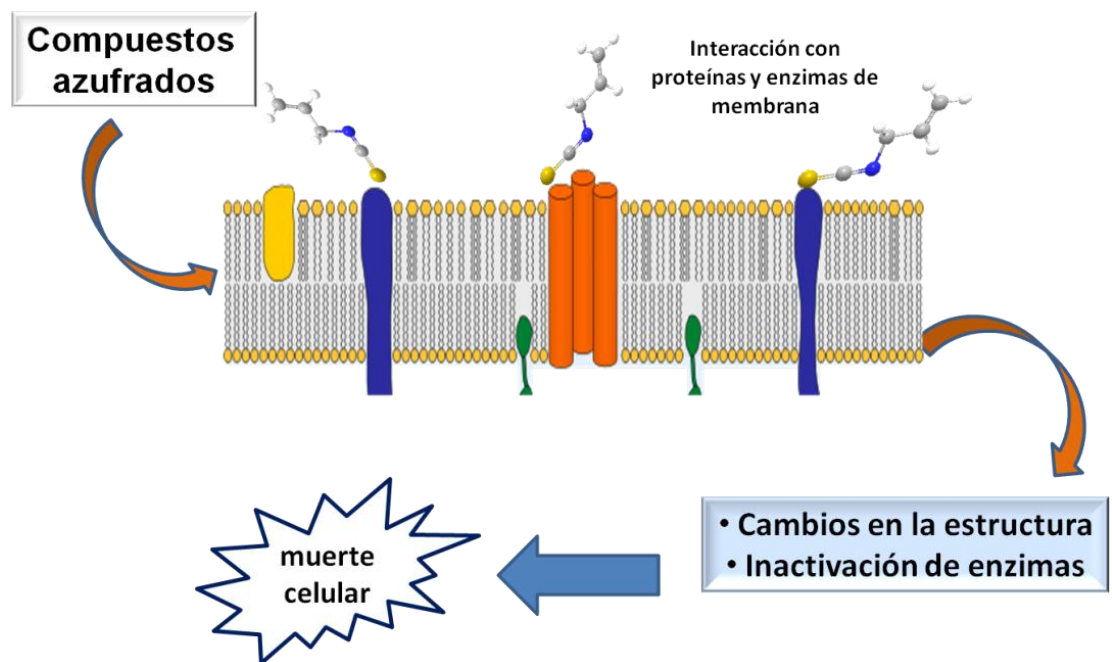


Figura 5. Mecanismo de acción antibacteriano propuesto para compuestos azufrados. La interacción de compuestos azufrados con proteínas y enzimas de la membrana puede provocar cambios en su estructura e inactivación, lo que puede afectar diferentes procesos metabólicos vitales y la muerte celular bacteriana. (Kim, J. W. y col., 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009).

compuestos es importante para conferir potencia antibacteriana, es decir, el agregar un átomo de azufre aumenta dramáticamente la actividad de estos compuestos (Kim, Jay W y col., 2004). Ya que moléculas con un solo átomo de azufre no presentan efectividad antibacteriana comparados con dipropil trisulfuro y dipropil tetrasulfuro (Kim, J. W. y col., 2004). El tratamiento de matrices alimentarias utilizando extractos de plantas ricos en compuestos azufrados ha sido eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, dipropildisulfuro, uno de los componentes de cebolla inhibió el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* inoculado en salsa de soya (Kim, J. W. y col., 2004). Además, carne de res tratada con dialil sulfuro a 10 y 20 μM redujo en 5.5 y 6.01 log UFC/g la cuenta total de mesófilos aerobios a los 8 días de almacenamiento, respectivamente; y para dialil disulfuro redujo 6 log UFC/g a las mismas concentraciones. Estos compuestos organoazufrados también redujeron el crecimiento de *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, y *C. jejuni* inoculadas en carne hasta en 6 log UFC/g comparado con los tratamientos control (Yin y Cheng, 2003). En este contexto, se demuestra el potencial antibacteriano de extractos de plantas ricos en compuestos azufrados aplicados en alimentos.

Allium cepa como Fuente Rica en Compuestos Azufrados con Actividad Antibacteriana

Los principales componentes azufrados de la cebolla son derivados de S-alk(en)il-L-cistein sulfoxidos tales como aliina y γ -glutamilcisteinas (Corzo-Martínez y col., 2007). Los tiosulfinatos se originan a partir de S-alk(en)il-L-cistein sulfoxidos localizados en el citoplasma, a través de una reacción enzimática catalizada por aliinasa, que reacciona con sulóoxidos de cisteína presentes en la vacuola y dan como resultado ácidos sulfénicos, estos son intermediarios altamente reactivos que inmediatamente producen los tiosulfinatos por reacciones de condensación. Los compuestos generados son principalmente tiosulfonatos, tiofenos, mono, di, y trisulfuros (Lanzotti, 2006), los cuales proveen a la cebolla sus características de olor y sabor, así como su actividad antibacteriana. Se han probado diferentes variedades de cebolla (roja, verde y blanca) las

cuales han tenido efecto contra *Salmonella enteritidis* y *S. aureus*, con zonas de inhibición de 8.6 – 9.3 mm a una concentración de 50 mL/L (Benkeblia, 2004). Resultados *in vitro* muestran que el aceite esencial de *A. cepa* presenta alta actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos y deteriorativos como *E. coli* (0.27 mg/mL), *B. subtilis* (0.18 mg/mL), *S. aureus* (0.18 mg/mL), *R. glutinis* (0.36 mg/mL), *S. cerevisiae* (0.36 mg/mL), *C. tropicalis* (0.36 mg/mL), *A. niger* (0.54 mg/mL), *M. purpureus* (0.36 mg/mL), y *A. terreus* (1.80 mg/mL) (Ye y col., 2013). Es probable que la actividad antimicrobiana se deba a la presencia de compuestos organoazufrados, como metil 5-metilfuril sulfuro (18.30%), metil 3,4-dimetil-2-tienil disulfuro (11.75%), y 1-propenil propil disulfuro (9.72%) (Ye y col., 2013).

El aceite de *A. cepa* ha sido aplicado en algunos alimentos donde presentó actividad antibacteriana. Tal es el caso de la aplicación del aceite (2.5 mg/mL) en papa fresca cortada donde disminuyó la población inicial de mesófilos aerobios (1.27 log UFC/g) (Vazquez-Armenta y col., 2013). Por otro lado un extracto de cebolla combinado con jengibre y ajo fue efectivo para reducir la cuenta total de bacterias en 1 log UFC/g en carne de puerco cocinada y almacenada durante 12 días en refrigeración (Cao y col., 2013). Además, este aceite (0.04 mg/mL) inhibió el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* inoculado en salsa de soya (Kim, J. W. y col., 2004). Entonces, la aplicación del aceite de *A. cepa* y sus componentes puede ser contemplado como una alterativa antibacteriana en alimentos.

Combinación de Extractos de Plantas para Aumentar la Efectividad Antibacteriana

La interacción entre compuestos antibacterianos en combinación puede tener diferentes efectos, sinérgico, aditivo, indiferente, o antagónico (Van Vuuren y col., 2011). La sinergia ocurre cuando una mezcla de dos compuestos antibacterianos tiene una actividad mayor que la suma de los componentes individuales. Un efecto aditivo se obtiene cuando la combinación de los compuestos tiene un efecto igual que la suma de los individuales. Es indiferente cuando la combinación no afecta la actividad antibacteriana de los compuestos individuales. Y por último, un efecto antagónico que

ocurre cuando la mezcla de los compuestos antibacterianos tiene un efecto combinado menor que cuando son aplicados de manera individual (Davidson y Parish, 1989; Van Vuuren y col., 2011). El efecto de la combinación es analizado utilizando los resultados de las CMI para calcular el índice de concentración inhibitoria fraccional (ICIF) de acuerdo a las siguientes formulas: $CIF_A = CMI_{A+B} / CMI_A$, $CIF_B = CMI_{B+A} / CMI_B$, $ICIF = CIF_A + CIF_B$. Donde el valor de la CMI_{A+B} es la CMI del compuesto A en la presencia del compuesto B, y viceversa para la CMI_{B+A} . Los valores del ICIF se interpretan como sinérgicos si el $ICIF < 0.5$, aditivo $0.5 < ICIF \leq 1$, indiferente cuando $1 < ICIF < 4$ y antagónico cuando el $ICIF > 4$ (Van Vuuren y col., 2011). De esta manera se puede clasificar el efecto de las combinaciones sobre el poder antibacteriano de una mezcla de compuestos o extractos de plantas.

La combinación de compuestos podría reducir la concentración necesaria para generar el mismo efecto antibacteriano que su aplicación individual, esto puede ser conceptualizado como sinergia antibacteriana. Este efecto se ha observado contra *S. Tiphymurium* expuesta a combinaciones de compuestos terpénicos como cinamaldehído, timol y carvacrol, donde las mezclas de cinamaldehído/timol, cinamaldehído/carvacrol y timol/carvacrol presentaron un efecto sinérgico, reduciéndose hasta tres veces las CMI comparado con los compuestos individuales (Zhou y col., 2007). En otro estudio evaluaron el efecto antibacteriano de eugenol, cinamaldehído, timol, carvacrol y su combinación frente a *E. coli* (Pei y col., 2009), siendo las mezclas de cinamaldehído/eugenol, timol/eugenol, carvacrol/eugenol, y timol/carvacrol las que presentaron efecto sinérgico, reduciéndose hasta tres veces las CMI comparado con la aplicación individual.

Los terpenos (+) limoneno, (-) limoneno y 1,8-cineol fueron efectivos frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* de manera individual en los rangos de 3-27, 2-27, y 23 mg/mL, respectivamente (Vuuren y Viljoen, 2007). Sin embargo, la combinación de 1,8-cineol con (+) limoneno fue efectivo en diferentes proporciones (9:1, 8:2, 7:3, 6:4) para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Además, la combinación de (-)limoneno y 1,8-cineol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) fue efectivo contra *P. aeruginosa* (Vuuren y col., 2007). De manera similar, la combinación de aceites esenciales de albahaca, melisa,

mejorana, orégano, romero, salvia, y tomillo, redujeron la concentración inhibitoria a la mitad frente a bacterias como *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* (Gutierrez y col., 2008). Entonces la combinación de compuestos puede minimizar la concentración de aplicación con los beneficios de reducción de toxicidad y económicos que conlleva tal reducción y un aumento en la eficacia antibacteriana.

Los terpenos timol y cimeno presentaron efecto bactericida contra dos cepas de *B. cereus* a las concentraciones de 0.2–1.0 mM y 0.2–2.0 mM, respectivamente (Delgado y col., 2004). Además, cuando estos compuestos fueron combinados presentaron mayor efecto bactericida que de manera individual (Delgado y col., 2004). De manera similar, Gallucci et al. (2009) observaron que las combinaciones de geraniol/mentol y timol/mentol fueron totalmente sinérgicas frente a *E. coli* y *B. cereus*; mientras que la combinación de eugenol/geraniol mostró sinergismo parcial frente a *B. cereus*. El poder antibacteriano de las combinaciones de extractos se ha demostrado en matrices alimentarias. La combinación de té verde (3%) y romero (1%) en tortas de arroz redujo los niveles de *B. cereus* y *S. aureus*, durante tres días de almacenamiento a temperatura ambiente (Lee et al., 2009). En el mismo sentido, se observó que un extracto de semilla de uva (1%) combinado con un extracto de corteza de pino (1%) redujo más de 1 log UFC/g a *E. coli* O157:H7, *S. Tiphymurium*, y *L. monocytogenes* inoculadas en carne de res (Ahn y col., 2004). Adicionalmente, la Mezcla de 0.125 g/mL *Scutellaria* + 0.5 g/mL *Forsythia* + 0.25 g/mL canela + 0.125 g/mL romero presentaron una reducción de 1.81 a 2.32 log en el conteo microbiano de carne de cerdo empacada al vacío (Kong y col., 2007).

La combinación de los aceites de *C. citratus* y *C. zeylanicum* a 0.1 µL/mL aplicados en fresas inoculadas con *E. coli* redujo 5 log al quinto día de almacenamiento en congelación (Duan y col., 2009). También, mezclas de los compuestos 1,8-cineol y carvacrol en diferentes proporciones (1/8 CMI+1/8 CMI y 1/4 CMI+1/4 CMI) fueron efectivas causando la reducción total de la microflora nativa y de las bacterias inoculadas (*L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *P. fluorescens*) en vegetales frescos cortados (de Sousa y col., 2012). De manera similar, ocurrió con la aplicación combinada de los aceites de *O. vulgare* y *R. officinalis* (1/4 CMI+1/4 CMI o 1/4

CMI+1/2 CMI) que redujo el inóculo inicial (*L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophilla*, y *P. fluorescens*) a 3 log UFC/g después de 5 min de exposición (de Sousa y col., 2013). Es importante mencionar que a la hora de aplicar los aceites esenciales en alimentos, éstos pueden afectar la aceptabilidad sensorial al otorgar olores característicos (Ayala-Zavala y col., 2009), por lo que la reducción de las concentraciones para obtener un efecto antibacteriano inhibitorio podría solucionar esta problemática.

Existen algunos mecanismos generales propuestos cuando la combinación de extractos resulte sinérgica, desde el punto de vista antibacteriano. Estos incluyen la participación individual de cada agente en la inhibición secuencial de una ruta bioquímica, inhibición de enzimas, o efectos combinados en las barreras celulares (Santiesteban-López y col., 2007). Por ejemplo, el efecto sinérgico antibacteriano entre eugenol/carvacrol o eugenol/timol puede deberse a que carvacrol o timol desintegran la membrana, permitiendo que eugenol entre al citoplasma y reaccione con algunas enzimas (Pei y col., 2009). De manera similar, Zhou y col. (2007) proponen que el efecto sinérgico de cinamaldehído/timol o cinamaldehído/carvacrol frente a *S. Typhimurium* puede deberse a dos mecanismos de acción: (i) timol o carvacrol pueden incrementar la permeabilidad de la membrana citoplasmática, permitiendo que cinamaldehído se transporte al interior de la célula interactuando con enzimas; (ii) o que estos tres compuestos interactúen con proteínas de membrana incrementando el número, tamaño y duración de los poros. Como se puede observar los sitios de acción son variados y evidentemente combinaciones con estructuras diferentes pueden afectar diversos puntos celulares, como se planteó en el presente trabajo para la combinación de aceites de *C. citratus*/*A. cepa*.

HIPÓTESIS

La combinación entre compuestos terpénicos de *C. citratus* y azufrados de *A. cepa* causa sinergismo antibacteriano contra patógenos alimentarios.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la combinación de los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa* sobre su capacidad antibacteriana contra patógenos alimentarios.

Objetivos Específicos

- Caracterización de la composición y capacidad antibacteriana de los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa*.
- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* e *in vivo* de la combinación de los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales de *C. citratus* (W523100) y *A. cepa* (W281794) fueron adquiridos mediante la empresa Sigma-Aldrich, estos aceites fueron utilizados en la identificación de sus componentes principales, y para las pruebas de actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo*.

Identificación de Compuestos Volátiles de los Aceites de *C. citratus* y *A. cepa*

La identificación de los constituyentes volátiles de los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa* se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases marca Varian GC-3400 Cx equipado con un detector selectivo de masas Saturn 2100T (Varian, México). Se utilizó una columna capilar DB-5 (30m x 0.25mm) (J&W Scientific, Agilent Technologies, Pensilvania, EUA) con un incremento inicial en la temperatura de 55 a 65 °C a una tasa de 1 °C/min, mantenida 3 min, después la temperatura se aumentó de 65 a 290 °C a una tasa de 10 °C/min y la temperatura final se mantuvo durante 10 min. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min. Para la detección se utilizó un sistema de ionización de electrones con una energía de ionización de 70 eV. Las temperaturas del inyector y el detector fueron 100 y 290 °C, respectivamente. Se inyectó manualmente en el modo de split-less 1µL del aceite diluido en hexano a una concentración de 500 µL/mL. La identificación de los constituyentes se basó en la comparación de éstos, contra los encontrados en la base de datos del sistema CG-MS NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los Aceites de *C. citratus* y *A. cepa*.

Se determinó la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa* contra las bacterias *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC 7001, *L. monocytogenes* ATCC 7644, y *S. aureus* ATCC 6538. Para la preparación de los inóculos, se tomó una azada de cada bacteria y se inoculó en caldo Mueller Hinton, incubándose durante 19 h a 37 °C. Posteriormente, la densidad óptica fue comparada con un tubo de 0.5 sobre la escala de McFarland (10^8 UFC/mL) para cada bacteria. La efectividad antibacteriana de los aceites se determinó empleando la técnica de microdilución en caldo. Se prepararon diferentes concentraciones de los aceites en caldo Mueller Hinton en el rango de 1-10 mg/mL. Se tomaron 5 μ L del inóculo y 295 μ L de las diluciones de aceite y se dejó incubando durante 24 h a 37 °C. La concentración más baja de cada uno de los aceites que evitó el desarrollo del inóculo se tomó como la concentración mínima inhibitoria. Una vez encontradas las CMI de cada aceite para cada bacteria, se realizaron curvas de sensibilidad para conocer el efecto de los aceites sobre los parámetros de crecimiento bacteriano. El crecimiento bacteriano fue expresado como un aumento en la densidad óptica (DO) a 600 nm, estos datos fueron procesados utilizando la función de Baranyi (Baranyi y col., 1993), calculando el tiempo de la fase Lag (h), tasa de crecimiento (μ_{\max} , h^{-1}), y el crecimiento máximo en la fase estacionaria (Y_{\max} , DO).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{l}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^{(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

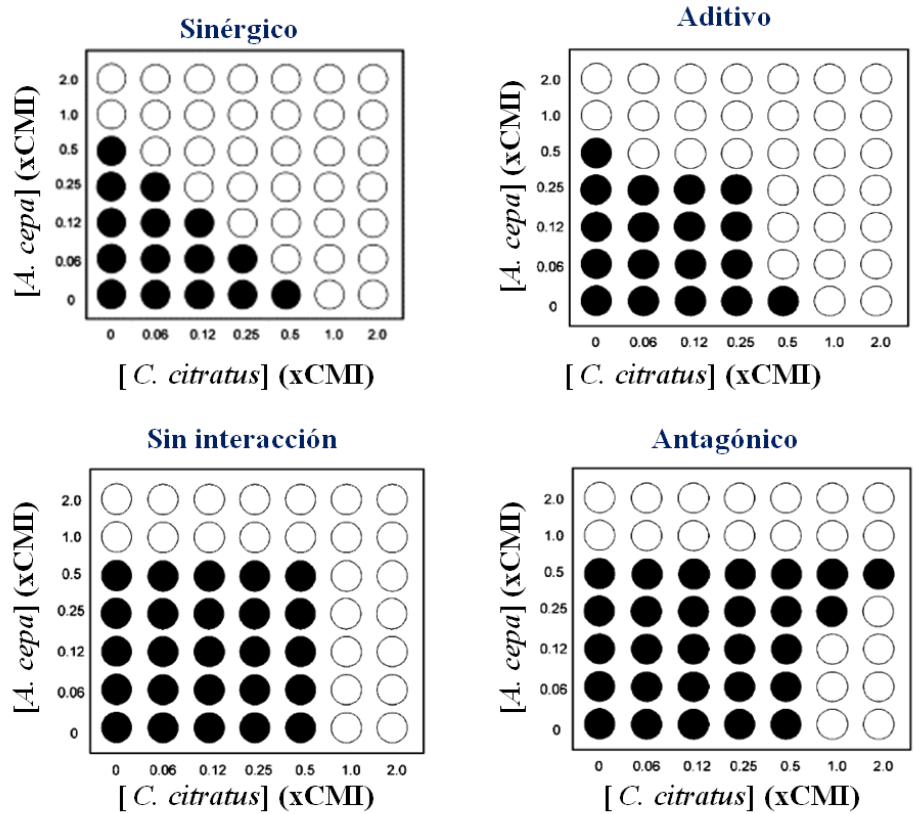
Función de Baranyi del crecimiento bacteriano a un tiempo dado [y (t)], donde: y_0 = densidad óptica al tiempo cero, μ_{\max} =tasa máxima de crecimiento, m = tiempo de la curvatura al final de la fase lag, Y_{\max} =la máxima absorbancia en la fase estacionaria.

Interacciones entre la Combinación de los Aceites de *C. citratus* y *A. cepa*

La actividad antibacteriana de combinaciones de aceites de *C. citratus* y *A. cepa* se realizó utilizando el método de checkerboard (Berenbaum, 1978). Considerando las CMI obtenidas en el ensayo anterior para cada aceite sobre cada bacteria, se hicieron combinaciones de éstos a 0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, y 2.0 veces la CMI, respectivamente. Estas preparaciones fueron inoculadas, incubadas y analizadas como se describió anteriormente para el cálculo de las CMI. Los resultados de esta prueba se expresaron como ICIF, utilizando el patrón descrito en la Figura 6, y expresándose según el caso como sinérgicos ($ICIF < 0.5$), aditivo ($0.5 < ICIF \leq 1$), indiferente ($1 < ICIF < 4$) y antagónico ($ICIF > 4$).

Efecto Antibacteriano *in vivo* de la Combinación de los Aceites Esenciales de *C. citratus* y *A. cepa*

Para evaluar el efecto antibacteriano *in vivo* se utilizaron dos vegetales de hoja verde (espinaca y lechuga romana). Estas fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio a 250 ppm y pesadas en muestras de 10 g. Después del lavado, las muestras fueron irradiadas bajo luz ultravioleta durante 30 min para reducir la microflora nativa. Las muestras se inocularon por inmersión durante 2 min en las diferentes soluciones bacterianas (*E. coli*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*; 1×10^6 UFC/mL) y secadas durante 30 min en una cabina de bioseguridad con flujo laminar, (Esco, Airstream) para fijar los inóculos. Las muestras testigo de cada bacteria se tomaron después del tiempo de secado, con el fin de poder comparar con el efecto de los tratamientos y poder determinar el nivel de reducción. Cada vegetal inoculado fue sumergido en 200 mL (2 min) de cada uno de los tratamientos, *C. citratus*, *A. cepa*, *C. citratus* + *A. cepa* (se utilizaron las CMI y las concentraciones de la combinación más efectiva de los aceites para inhibir a cada bacteria), una vez tratadas las muestras se dejaron secar durante 30 min. Las muestras testigo al igual que los tratamientos, se colocaron en bolsas individuales con 90 mL de agua peptonada para su posterior siembra



$$\text{Índice de CIF} = \frac{(\text{CMI de } C. \text{ citratus en combinación}) + (\text{CMI } A. \text{ cepa en combinación})}{\text{CMI } C. \text{ citratus individual} + \text{CMI } A. \text{ cepa individual}}$$

Figura 6. Método de checkerboard en microdilución para determinar combinaciones antibacterianas efectivas. El área sombreada indica crecimiento bacteriano.

en placas con agar cuenta estándar, realizando diluciones seriadas por triplicado. Las colonias fueron contadas después de 24 h de incubación a 37 °C. Los resultados obtenidos se expresaron como log de UFC/g, que posteriormente fueron convertidos a $\Delta \log \text{UFC} = \log N_0$ (log de inóculo testigo) - N (log de los tratamientos).

Análisis estadístico

Para el total de los ensayos ejecutados se realizó un diseño experimental completamente al azar. Para cumplir con el primer objetivo se evaluó el efecto del tipo de aceite sobre las CMI (*E. coli*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*) y los parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano (fase lag, μ_{\max} , y Y_{\max}). Mientras que para el segundo objetivo se evaluó el efecto de la combinación de aceites el $\Delta \log$ de las bacterias inoculadas (*E. coli*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*) en los vegetales de estudio (espinaca y lechuga romana). Se realizó un ANOVA ($p \leq 0.05$) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Se utilizó el software estadístico NCSS (2007) para el análisis de resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de Compuestos Volátiles de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa*

Componentes Mayoritarios en el Aceite de *C. citratus*

El perfil de volátiles del aceite de *C. citratus* (Figura 7) estuvo formado principalmente por: linalool, citronelal, *Cis*-vervenol, *Cis*-carveol, geranial, geraniol, neral, mirceno, y cariofileno. Neral fue el compuesto que se encontró en mayor proporción (50%), seguido de geranial (35%), cariofileno (1.7%), geraniol (1.5%), *Cis*-verbenol (1%), *Cis*-carveol (1%), mirceno (0.5%), linalool (0.4%), y citronelal (0.16%). Dicha composición en el aceite de *C. citratus* es similar a la presentada en otros estudios, como lo muestra Bassolé y col. (2011) que identificaron compuestos como geranial (48.1%), neral (34.6%), mirceno (11.0%) geraniol (1.9%), y linalool (0.7%), como los componentes principales en los aceites de *C. citratus* y *C. giganteus*. Algunos estudios han reportado la presencia de estos compuestos volátiles en *C. citratus*, donde neral y geranial son los más abundantes y la mezcla de estos dos isómeros es conocida como citral, formando alrededor del 65-80% del aceite (Schaneberg y col., 2002; Bassolé y col., 2011). Sin embargo, es importante mencionar que la variación en la composición de los aceites puede deberse a la especie de planta, la época del año y la región geográfica donde se cultive (Jordán y col., 2006).

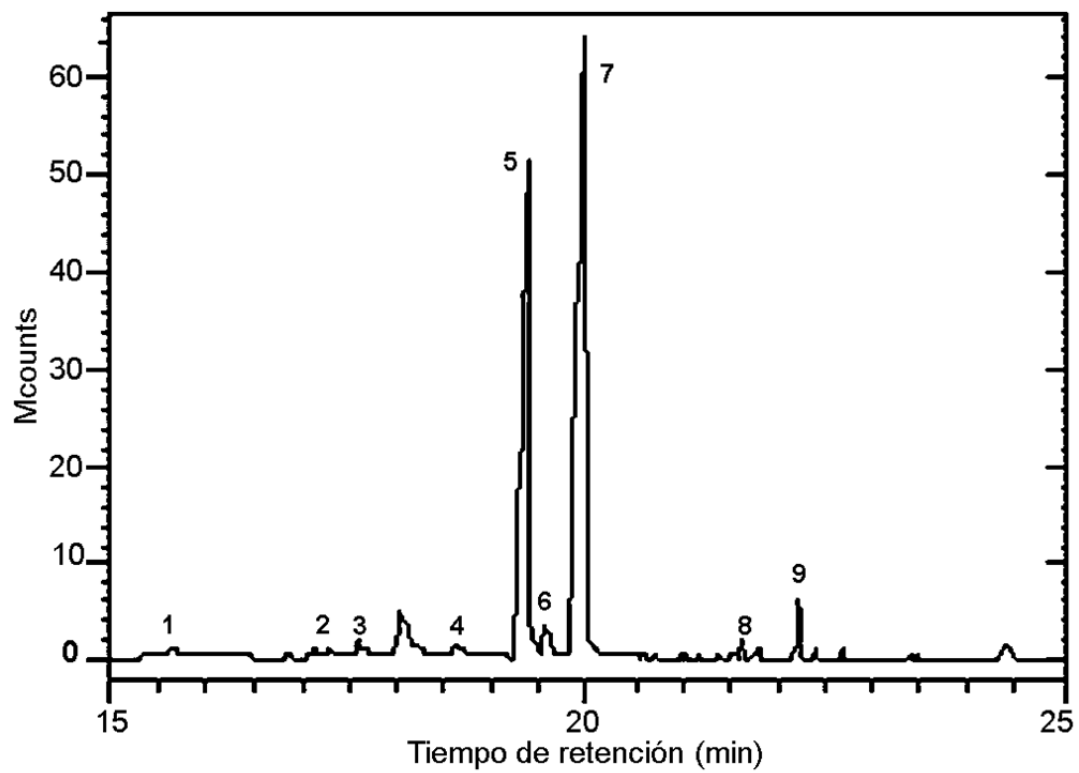


Figura 7. Componentes mayoritarios en el aceite de *C. citratus*. 1; linalool, 2; citronelal, 3; *Cis-vervenol*, 4; *Cis-carveol*, 5; geranial, 6; geraniol, 7; neral, 8; mirceno, 9; cariofileno.

Componentes Mayoritarios en el Aceite de *A. cepa*

El perfil de volátiles del aceite de *A. cepa* estuvo formado principalmente por: metil propil disulfuro, dipropil disulfuro, dimetil trisulfuro, y dipropil trisulfuro (Figura 8). El compuesto que se encontró en mayor proporción fue dipropil trisulfuro (30.52%), seguido de dipropil disulfuro (25.96%), metil propil disulfuro (4.73%), y dimetil trisulfuro (2.3%). Los compuestos azufrados se sintetizan durante la degradación de alk(en)il-cistein sulfoxidos por la enzima aliinasa, además durante la extracción por arrastre de vapor los compuestos extraídos son principalmente alquil sulfuros (Corzo-Martínez y col., 2007; Lokke y col., 2012). Estudios previos indican que algunos de estos componentes como el metil propil trisulfuro, dipropil trisulfuro, y dipropil tetrasulfuro se han identificado en aceites de cebolla, estos compuestos son los responsables del olor, sabor, y capacidad antibacteriana de este aceite (Sinha y col., 1992; Lokke y col., 2012).

Actividad Antibacteriana del Aceite de *C. citratus* y *A. cepa*.

Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los Aceites de *C. citratus* y *A. cepa*.

En el Cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa*. Ambos aceites presentaron efectividad para todas las bacterias, pero el aceite de *C. citratus* fue más efectivo, siendo capaz de inhibir a *S. aureus* con una CMI de 0.44 mg/mL, seguido de *L. monocytogenes* (1.33 mg/mL), *E. coli* (2.21 mg/mL), y presentando una mayor resistencia *S. Choleraesuis* con una CMI de 3.0 mg/mL. Por otro lado, el aceite de *A. cepa* fue efectivo contra *S. Choleraesuis* (1.28 mg/mL), seguido de *L. monocytogenes* (2.56 mg/mL), *S. aureus* (2.56 mg/mL), y fue necesario un aumento hasta 5.13 mg/mL

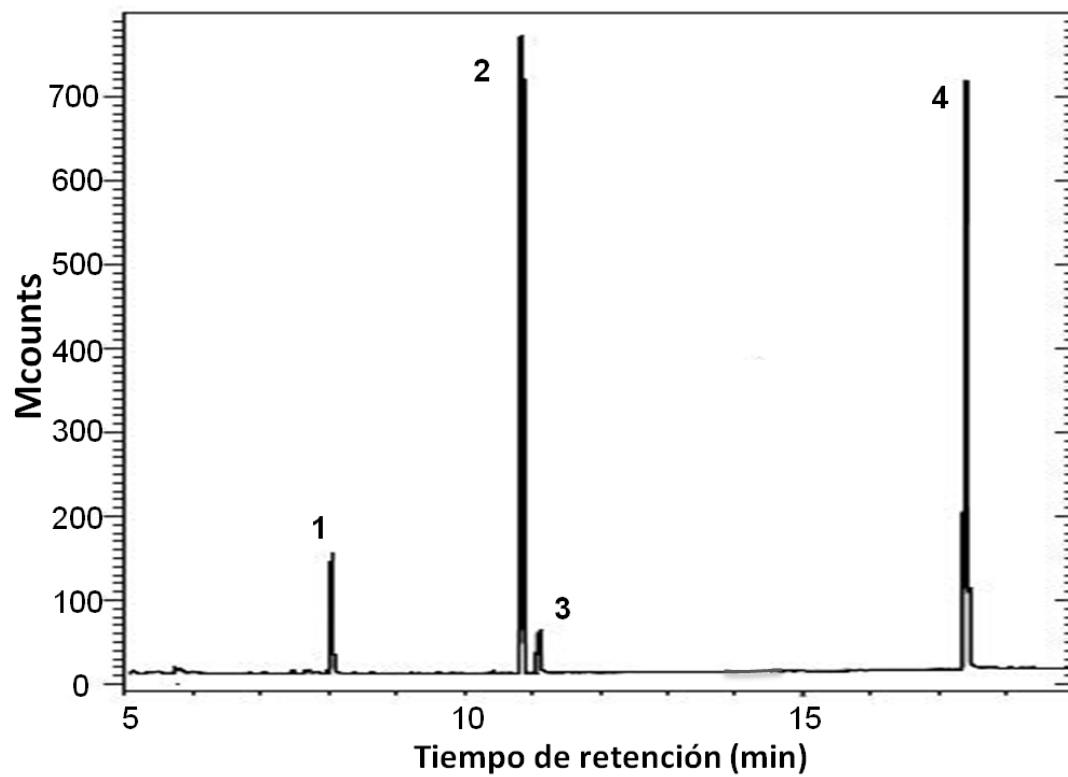


Figura 8. Componentes mayoritarios en el aceite de *A. cepa*. 1; metil propil disulfuro, 2; dipropil disulfuro, 3; dimetil trisulfuro, 4; dipropil trisulfuro.

Cuadro 1. CMI de *C. citratus* y *A. cepa* probados *in vitro* contra patógenos alimentarios.

Aceite esencial	CMI (mg/mL)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>C. citratus</i>	2.2 ^a	3.0 ^b	1.33 ^a	0.44 ^a
<i>A. cepa</i>	5.13 ^b	1.28 ^a	2.56 ^b	2.56 ^b

Literales diferentes indican diferencias entre aceite

para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Estos datos nos muestran al mayor poder antibacteriano del aceite de *C. citratus* comparado con el de *A. cepa*.

Los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa* a las CMI afectaron las diferentes fases de crecimiento bacteriano (Figura 9). Se pudo observar una extensión de la fase lag para todas las bacterias expuestas a los aceites, una disminución en la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), así también una disminución en el crecimiento máximo. De manera puntual el Cuadro 2 muestra el efecto de las CMI de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* sobre los parámetros cinéticos de crecimiento como la fase lag (h), la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{max} h^{-1}$), así como el crecimiento máximo (Y_{max} , DO). El aceite de *C. citratus* fue más efectivo que *A. cepa* contra *E. coli* ($p < 0.05$), extendiendo más la fase lag (14.5 vs 12.7 h), disminuyendo la μ_{max} (0.04 vs 0.11 h^{-1}), y Y_{max} (0.37 vs 0.80), respectivamente. Ambos aceites fueron efectivos contra *S. Choleraesuis* alargando la fase durante 24 horas ($p > 0.05$), y por este motivo no se observaron cambios en μ_{max} y Y_{max} . El aceite de *C. citratus* fue más efectivo que *A. cepa* para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* ($p < 0.05$); extendiendo más la fase lag (9.2 vs 4.4 h), disminuyendo la μ_{max} (0.04 vs 0.07 h^{-1}), y Y_{max} (0.19 vs 0.4), respectivamente. Para el caso de *S. aureus* el aceite de *A. cepa* causó una mayor fase lag (14 h) que *C. citratus* (11.2 h), pero fue el aceite de *C. citratus* el que tuvo la menor μ_{max} (0.3 h^{-1}) y Y_{max} (0.19), comparado con *A. cepa* ($\mu_{max}=0.22 h^{-1}$ y $Y_{max}=0.37$), lo que indica que *C. citratus* fue más efectivo ya que redujo en mayor medida el crecimiento bacteriano. Lo anterior demuestra que la efectividad de los aceites afecta las diferentes fases de crecimiento bacteriano.

Se encontró que en nuestro estudio el aceite de *C. citratus* presentó CMI menores para inhibir a las cuatro bacterias comparadas con las CMI obtenidas por Basolle y col. (2011), las cuales fueron de 10, 2.5, 8.3, y 2.5 mg/mL para inhibir a *E. coli*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*, respectivamente, también fue más efectivo que otra variedad como *Cymbopogon giganteus*. de Oliveira y col. (2013) encontraron una CMI=3.4 mg/mL para *E. coli*, la cual es mayor comparado con nuestro estudio para esta misma bacteria. Caso contrario a las CMI del aceite de *C. citratus* obtenidas por

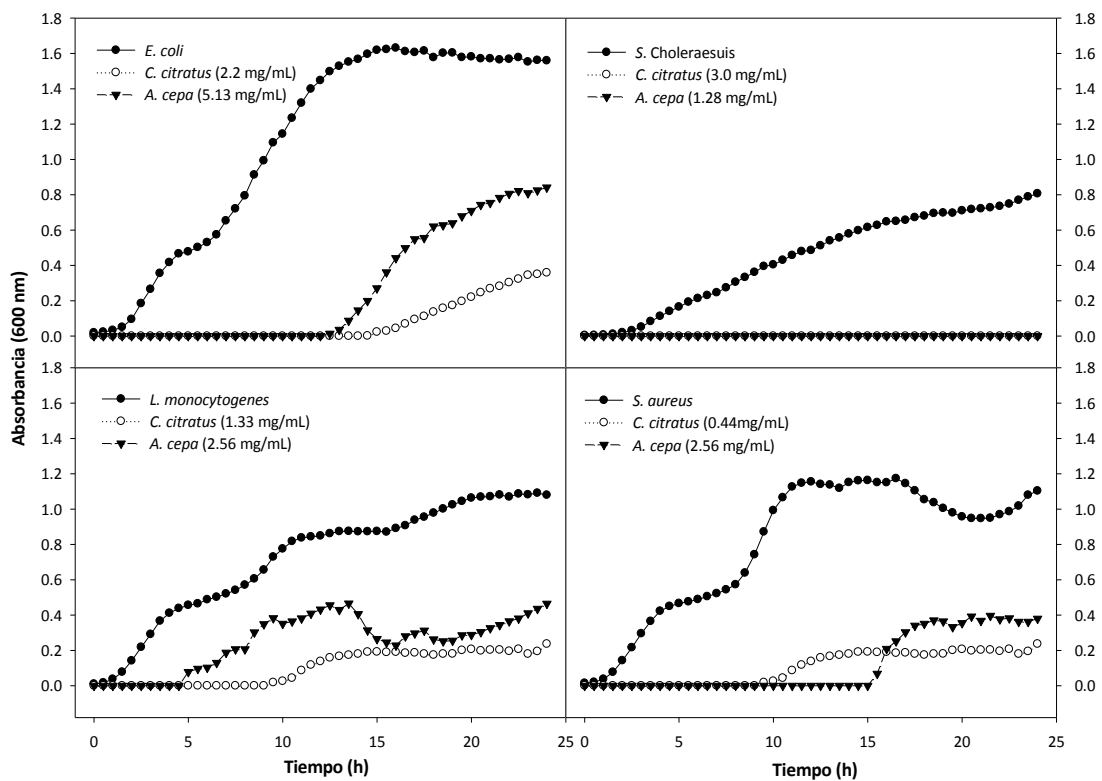


Figura 9. Efecto de las CMI de *C. citratus* y *A. cepa* sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias patógenas.

Cuadro 2. Efecto del aceite de *C. citratus* y *A. cepa* sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a bacterias patógenas.

Bacteria	Tratamiento	Lag (h)	μ_{max} (h^{-1})	Ymax (DO)
<i>E. coli</i>	Testigo	2.7 ^c	0.15 ^c	1.59 ^c
	<i>C. citratus</i>	14.5 ^a	0.04 ^a	0.37 ^a
	<i>A. cepa</i>	12.7 ^b	0.11 ^b	0.80 ^b
<i>S. Choleraesuis</i>	Testigo	0 ^b	0.04 ^b	0.75 ^b
	<i>C. citratus</i>	24 ^a	0 ^a	0 ^a
	<i>A. cepa</i>	24 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	Testigo	0 ^c	0.06 ^a	1.06 ^c
	<i>C. citratus</i>	9.2 ^a	0.04 ^{ab}	0.19 ^a
	<i>A. cepa</i>	4.4 ^b	0.07 ^a	0.40 ^b
<i>S. aureus</i>	Testigo	0 ^c	0.09 ^b	1.13 ^c
	<i>C. citratus</i>	11.2 ^b	0.03 ^a	0.19 ^a
	<i>A. cepa</i>	15.0 ^a	0.22 ^c	0.37 ^b

Literales diferentes indican diferencias entre tratamiento por bacteria

Hammer y col. (1999) para *E. coli* (0.6 mg/mL), *Salmonella* (2.6 mg/mL), y *S. aureus* (0.6 mg/mL), las cuales fueron mucho menores comparado con el aceite de *C. citratus* de nuestro estudio. Las variaciones existentes respecto a la actividad antibacteriana puede deberse al tipo de planta, al método de extracción del aceite, la región geográfica y las condiciones climáticas del cultivo.

Comparando la actividad antibacteriana del aceite de *A. cepa* de nuestro estudio, se encontró que existen variaciones para las diferentes bacterias probadas. Tal como lo muestra Teixeira y col. (2013) quienes encontraron CMI de 2.4 y 1.9 mg/mL para *L. monocytogenes* y *Listeria innocua*, respectivamente, estas CMI fueron menores con respecto a nuestro estudio. Además, en otro estudio (Ye y col., 2013) se encontraron CMI que las de nuestro estudio para *E. coli* (0.27 mg/mL) y *S. aureus* (0.18 mg/mL) con el aceite de *A. cepa*, extraído en condiciones supercríticas. Éstas diferencias observadas puede deberse a la especie de bacteria evaluada, como fue para el caso de *L. innocua*, además, estas diferencias para el caso de *E. coli* y *S. aureus* puede asociarse al tipo de extracción del aceite de *A. cepa*, ya que los aceites obtenidos por extracción supercrítica presentan una mayor diversidad de compuestos. A pesar de esto podemos ver que las CMI se encuentran dentro de los rangos observados en estudios previos para otros aceites esenciales clasificados como antibacterianos efectivos (Gañán y Brignole, 2013).

Relacionando el estatus gram de las bacterias con la efectividad de los aceites, se observó lo siguiente: que al aplicar *C. citratus* sobre *L. monocytogenes* y *S. aureus* (gram positivas) se utilizaron concentraciones menores comparadas con las necesarias para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. Choleraesuis* (gram negativas). Esta sensibilidad puede ser atribuida a que las bacterias gram positivas presentan en su estructura una membrana citoplasmática cubierta por la pared celular, mientras que las bacterias gram negativas presentan además otra membrana lipídica externa que cubre toda la célula. Esta característica de doble membrana, es un factor importante en la resistencia de bacterias gram negativas a la presencia de agentes antibacterianos (Poole, 2001). Recordando el mecanismo de acción de los terpenos de *C. citratus* sobre las membranas bacterianas podemos inferir que al existir una doble membrana existe una doble barrera para atrapar a estos compuestos y presentar resistencia. De manera similar, se observó que la

sensibilidad mostrada frente al aceite de *A. cepa* presentó una relación con el estatus gram para *E. coli* (gram negativa), *L. monocytogenes* (gram positivas) y *S. aureus* (gram positivas); sin embargo, no se observó este efecto para *S. Choleraesuis* (gram negativa) que fue más susceptible que las bacterias gram positivas, por lo que sería muy interesante conocer los mecanismos que hace más sensible a esta bacteria frente al ataque de compuestos azufrados.

Se observaron cambios en los parámetros de crecimiento por la adición de los aceites, estos cambios pueden deberse a que afectaron las fases de crecimiento. Como puede ser la fase lag que es la etapa de adaptación de las bacterias al nuevo medio en el cual las bacterias no presentan crecimiento, por ello, durante esta etapa la tasa de crecimiento es baja. Esto podría facilitar la inactivación o inhibición, como se pudo observar en los tratamientos con los aceites de *C. citratus* y *A. cepa*, en los que se logró retardar la fase lag tomando en cuenta el testigo sin aceite. Esto indica que la adición de los aceites a las distintas CMI afectan la capacidad de adaptación de la bacteria al medio, el cual podría estar afectando a la membrana ya sea inhibiendo la absorción de los nutrientes o afectando a algunas enzimas o proteínas de membrana indispensables para su multiplicación celular o mediante mecanismos de difusión al interior de la célula. Por este motivo, es necesario realizar estudios que nos permitan conocer el mecanismo por el cual los compuestos de estos aceites ejercen su efecto antibacteriano. Debido al potencial antibacteriano presentado por los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa*, que son capaces de retardar el crecimiento bacteriano, disminuir la tasa de crecimiento, además, de reducir el conteo final de bacterias. Estos aceites podrían ser aplicados en combinación alimentos para retardar o reducir el crecimiento bacteriano.

Efecto Antibacteriano *in vitro* de la Combinación de los Aceites

El efecto cuantitativo de la combinación de *C. citratus* y *A. cepa* se describe en términos de ICIF (Cuadro 3). El ICIF se encuentra en el rango de 0.25-1.0 lo que indica que hubo efectos sinérgicos y aditivos. La combinación de los dos aceites esenciales presentó un efecto sinérgico antibacteriano en contra de *E. coli* (0.5), *S. Choleraesuis* (0.25) y

Cuadro 3. ICIF de la combinación de *C. citratus* y *A. cepa* contra patógenos alimentarios.

	CIF	Interacción
<i>E. coli</i>	0.5	Sinérgico
<i>S. Choleraesuis</i>	0.25	Sinérgico
<i>L. monocytogenes</i>	0.375	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	1.0	Aditivo

L. monocytogenes (0.375). Se observó un efecto aditivo solo para *S. aureus* (1.0), no se observó ningún efecto antagonista. Con respecto al efecto de los aceites de manera individual y en combinación sobre crecimiento bacteriano (Cuadro 4), donde, se observó un efecto de los tratamientos sobre los parámetros cinéticos de crecimiento ($p < 0.05$). El aceite de *C. citratus* presentó la fase lag más larga (14.5 h) para *E. coli*, sin encontrar diferencias entre *A. cepa* (12.7 h) y la combinación (12.3 h), pero con respecto a la reducción de μ_{max} y Y_{max} , la combinación de los aceites obtuvo los valores menores ($\mu_{max}=0.03$ y $Y_{max}=0.24$), comparado con *C. citratus* ($\mu_{max}=0.04$ y $Y_{max}=0.37$) y *A. cepa* ($\mu_{max}=0.11$ y $Y_{max}=0.80$) de manera individual ($p < 0.05$). Para el caso de *S. Choleraesuis* ambos aceites de manera individual inhibieron completamente el crecimiento (lag= 24, $\mu_{max}=0$, y $Y_{max}=0$), la combinación de los aceites contra *Salmonella* fue capaz de extender la fase lag durante 6.3 h, así como reducir la μ_{max} (0.01) y Y_{max} (0.21). El efecto observado para *Salmonella* podría indicar que las concentraciones utilizadas de los aceites esenciales de manera individual fueron bactericidas y la combinación efecto inhibitorio. Esta información da pie a buscar las concentraciones mínimas bactericidas de los aceites esenciales para las demás bacterias.

De acuerdo a los parámetros de crecimiento observados para *L. monocytogenes*, la combinación fue más efectiva alargando la fase lag (10.9 h) que los aceites de *C. citratus* (9.2 h) y *A. cepa* (4.4 h) de manera individual, *C. citratus* presentó la menor $\mu_{max}=0.04$ y $Y_{max}=0.19$, sin encontrar diferencias entre *A. cepa* ($\mu_{max}=0.07$ y $Y_{max}=0.40$) y la combinación ($\mu_{max}=0.08$ y $Y_{max}=0.42$) en *Listeria*. Respecto a *S. aureus*, la combinación fue más efectiva mostrando una fase lag de 21 h, comparado con *C. citratus* y *A. cepa* (11.2 y 13 h⁻¹). Además, la combinación y *C. citratus* mostraron las menores μ_{max} (0.07 y 0.03 h⁻¹, respectivamente) y Y_{max} (0.19 y 0.21, respectivamente). Comparado con *A. cepa* que presentó valores más altos.

Se ha probado la combinación de aceites donde se han observado diferentes efectos al combinarse de acuerdo a los ICIF, tal es el caso entre los aceites de *C. citratus* y *C. giganteus* que ejercen un efecto sinérgico contra *S. aureus* (0.4), *L. monocytogenes* (0.1), *S. Typhimurium* (0.2), y *E. aerogenes* (0.1); aditivo contra *E. coli* (0.5) y *Shigella*

Cuadro 4. Efecto del aceite de *C. citratus* y *A. cepa* y su combinación sobre los parámetros de crecimiento evaluados frente a bacterias patógenas.

Bacteria	Tratamiento	Lag (h)	μ_{max} (h^{-1})	Y_{max}
<i>E. coli</i>	Testigo	2.7 ^c	0.15 ^c	1.59 ^d
	<i>C. citratus</i>	14.5 ^a	0.04 ^a	0.37 ^b
	<i>A. cepa</i>	12.7 ^b	0.11 ^b	0.80 ^c
	Combinación	12.3 ^b	0.03 ^a	0.24 ^a
<i>S. Choleraesuis</i>	Testigo	0 ^c	0.04 ^c	0.75 ^c
	<i>C. citratus</i>	24 ^a	0 ^a	0 ^a
	<i>A. cepa</i>	24 ^a	0 ^a	0 ^a
	Combinación	6.3 ^b	0.01 ^b	0.21 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	Testigo	0 ^d	0.06 ^b	1.06 ^c
	<i>C. citratus</i>	9.2 ^b	0.04 ^a	0.19 ^a
	<i>A. cepa</i>	4.4 ^c	0.07 ^b	0.40 ^b
	Combinación	10.9 ^a	0.08 ^{bc}	0.42 ^b
<i>S. aureus</i>	Testigo	0 ^d	0.09 ^c	1.13 ^c
	<i>C. citratus</i>	11.2 ^c	0.03 ^a	0.19 ^a
	<i>A. cepa</i>	15.0 ^b	0.22 ^d	0.37 ^b
	Combinación	21 ^a	0.07 ^b	0.21 ^a

Literales diferentes indican diferencias entre tratamiento por bacteria

dysenteriae (0.8); e indiferente contra *E. faecalis* (1.6) y *S. enterica* (1.1) (Bassolé y col., 2011). Los ICIF son similares a los obtenidos en nuestro estudio donde se encontraron ICIF en el rango de 0.25-1.0. Lo que indica que el aceite de *C. citratus* al ser combinados con el aceite de *A. cepa* hace que aumente su actividad antibacteriana. Son pocos los estudios que han utilizado cálculos de ICIF para evaluar la ocurrencia de sinergia resultante de la mezcla de aceites esenciales. De acuerdo a santiesteban-lopez y col (2007), las combinaciones sinérgicas tienen ventajas en la reducción de la cantidad de antibacterianos necesarios para inhibir el crecimiento y supervivencia bacteriana, disminuyendo así las preocupaciones de los consumidores por el uso de antibacterianos sintéticos.

Timol y cimeno a 0.2 mMol/L no fueron efectivos frente a *B. cereus* INRA-AVTZ415 y INRA-AVZ421, pero al combinarlos a esa misma concentración redujeron la cuenta bacteriana (Delgado y col., 2004). Los terpenos eugenol, cinamaldehído, timol, y carvacrol en combinación presentaron efectos sinérgicos inhibiendo el crecimiento de *E. coli* disminuyendo las concentraciones de los compuestos evaluados utilizando 1/4 de la CMI (Pei y col., 2009). Algo similar ocurre al realizar diferentes combinaciones de compuestos como cinamaldehído, timol y carvacrol que presentan un efecto sinérgico, disminuyendo las concentraciones utilizadas hasta 1/4 de la CM para todos los compuestos (Zhou y col., 2007). En nuestro estudio, combinando los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* se obtuvieron concentraciones menores, inhibiendo a *E. coli*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* con concentraciones de 0.55 y 1.28 mg/mL, 0.38 y 0.32 mg/mL, 0.16 y 0.64 mg/mL, 0.22 y 1.28 mg/mL, con el aceite de *C. citratus* y *A. cepa*, respectivamente. Esto indica que para el efecto sinérgico antibacteriano se obtuvo reduciendo hasta 1/8 la CMI de los aceites.

Como se pudo observar, esta máxima reducción (1/8 de CMI) entre los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* puede deberse a la diferente composición y estructura de éstos. Como lo menciona de Sousa y col. (2012), donde el incremento en la actividad antibacteriana entre carvacrol y 1, 8-cineol puede ser explicada considerando la diferente estructura, y de ahí la posibilidad de diferentes mecanismos de acción de cada compuesto. Como el mecanismo de acción antibacteriano encontrado entre la mezcla de cimeno/timol, que

pueden atacar preferentemente a nivel de membrana celular y la acción de un compuesto puede facilitar la absorción del otro en la bicapa lipídica de la membrana (Delgado y col., 2004). Similar al efecto sinérgico entre carvacrol/timol/ que pueden desintegrar la membrana externa de la célula haciendo más fácil que el eugenol o cinamaldehído puedan entrar al citoplasma y combinarse con proteínas o enzimas (Pei y col., 2009).

Entonces de acuerdo a los mecanismo de acción sinérgico antes mencionados, podría ser posible que los compuestos de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* actúen juntos para contribuir a la actividad antibacteriana generando así el efecto sinérgico observado. Debido a las propiedades lipofílicas se cree que los componentes del aceite de *C. citratus* pueden penetrar en la capa lipídica de la membrana celular bacteriana causando la pérdida de la organización estructural o su integridad. Además, la presencia de compuestos azufrados en el aceite de *A. cepa* es esencial para la inhibición de crecimiento microbiano, que pueden unirse en la pared celular y el citoplasma inhibiendo algunas enzimas con un grupo tiol. Entonces la acción simultánea de estos dos mecanismos podría ser los responsables del efecto antibacteriano sinérgico observado.

Efecto Antibacteriano *in vivo* de la Combinación de los Aceites

El efecto antibacteriano de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* probados de manera individual y en combinación fue significativo ($p < 0.05$). Solo se pudo observar efecto del aceite adicionado así como de la combinación de ambos aceites. El aceite de *C. citratus* de manera individual fue efectivo contra las diferentes bacterias inoculadas en espinaca (Cuadro 5) presentando una reducción en log UFC/g para *E. coli* de 1.09, 0.78 para *S. almonella*, 1.28 de *L. monocytogenes*, y 2.04 log de UFC para *S. aureus*. El aceite de *A. cepa* obtuvo los valores más bajos de log de reducción, *E. coli* (0.48 log UFC/g), *Salmonella* (0.60 log UFC/g), *L. monocytogenes* (0.69 log UFC/g), y *S. aureus* (1.81 log UFC/g). Los resultados muestran que la combinación de los aceites aplicados en espinaca (Cuadro 5) redujeron en un rango mayor las cuentas bacterianas de *E. coli* (2.34 log UFC/g), *Salmonella* (2.94 log UFC/g), *L. monocytogenes* (2.06 log UFC/g), y *S. aureus* (1.37 log UFC/g). Esto nos muestra que la ventaja de la combinación de aceites es reducir

Cuadro 5. Logaritmos de reducción antibacteriano de los aceites individuales y en combinación frente a bacterias patógenas inoculadas en espinaca.

Bacteria	Tratamiento	Dosis (mg/mL)	Reducción (Log)
<i>E. coli</i>	<i>C. citratus</i>	2.2	1.092 ^b
	<i>A. cepa</i>	5.13	0.485 ^c
	Combinación	0.55+1.28	2.340 ^a
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>C. citratus</i>	3.04	0.789 ^b
	<i>A. cepa</i>	1.28	0.605 ^c
	Combinación	0.35+0.32	2.941 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. citratus</i>	1.33	1.281 ^b
	<i>A. cepa</i>	2.56	0.697 ^c
	Combinación	0.16+0.64	2.060 ^a
<i>S. aureus</i>	<i>C. citratus</i>	0.44	2.042 ^a
	<i>A. cepa</i>	2.56	1.817 ^b
	Combinación	0.22+1.28	1.377 ^c

Literales diferentes indican diferencias entre tratamiento por bacteria

la dosis de los aceites y obtener el mismo efecto antibacteriano o mayor que cuando son utilizados de manera individual.

Se observó el mismo efecto en la aplicación de los aceites individuales y en combinación sobre lechuga romana (Cuadro 6), que el observado en espinaca. El aceite de *C. citratus* redujo 1.73, 1.02, 1.80, y 1.97 log UFC/g, el aceite de *A. cepa* redujo el crecimiento en 0.75, 0.92, 1.08, y 1.80 log UFC/g y la combinación de estos redujo 2.45, 3.17, 2.17, y 1.54 log UFC/g para las bacterias de *E. coli*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, y *S. aureus*, respectivamente. Se observa entonces que la combinación de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* presentaron mejor efecto en la reducción del crecimiento bacteriano que el observado para los aceites de manera individual. El efecto observado con la combinación de los aceites sugiere un posible efecto sinérgico, ya que el efecto fue mayor que la suma de los efectos observados para los aceites de manera individual.

Se ha evaluado la efectividad antibacteriana de *C. citratus* sobre vegetales de hoja verde inoculados con *Salmonella* Newport. La actividad antibacteriana se incrementó con el tiempo de exposición ($p < 0.05$), donde las muestras tratadas durante 2 min mostraron mayor reducción (1 log UFC/g) que las tratadas durante 1 min (Moore-Neibel y col., 2012). Por otro lado se ha encontrado que la adición de aceite de *A. cepa* y DPDS a salsa evitó la formación de biopelícula de *Zygosaccharomyces rouxii* durante 30 días (Kim, Jay W y col., 2004). Estos estudios demuestran que los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* presentan efectividad antibacteriana *in vivo*, ambos aceites tienen la oportunidad para utilizarlos en la industria de alimentos como conservadores naturales.

Algunos estudios evalúan el efecto de la combinación de diferentes compuestos sobre algunos vegetales para ver si esta combinación aumenta la efectividad de los compuestos. La mezcla de compuestos carvacrol y 1, 8-cineol (1/8 CMI+1/8 CMI y 1/4 CMI+1/4 CMI) disminuyó el inóculo inicial para todas las bacterias probadas en un rango de 2.9-7.3 log UFC/g después de los 5 min de exposición. En otro estudio, la combinación de los aceites de *C. citratus* y *C. zeylanicum* resultó en 5 log UFC/g de reducción de *E. coli* inoculada en jugo de fresa durante cinco días de almacenamiento (Duan y col., 2009). En nuestro estudio la combinación entre los aceites de *C. citratus* y

Cuadro 6. Logaritmos de reducción antibacteriano de los aceites individuales y en combinación frente a bacterias patógenas inoculadas en lechuga.

Bacteria	Tratamiento	Dosis (mg/mL)	Reducción (Log)
<i>E. coli</i>	<i>C. citratus</i>	2.2	1.736 ^b
	<i>A. cepa</i>	5.13	0.755 ^c
	Combinación	0.55+1.28	2.450 ^a
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>C. citratus</i>	3.04	1.029 ^b
	<i>A. cepa</i>	1.28	0.920 ^c
	Combinación	0.35+0.32	3.177 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. citratus</i>	1.33	1.809 ^b
	<i>A. cepa</i>	2.56	1.086 ^c
	Combinación	0.16+0.64	2.174 ^a
<i>S. aureus</i>	<i>C. citratus</i>	0.44	1.974 ^b
	<i>A. cepa</i>	2.56	1.800 ^c
	Combinación	0.22+1.28	1.542 ^a

Literales diferentes indican diferencias entre tratamiento por bacteria

A. cepa pudo reducir el crecimiento para las 4 bacterias inoculadas en un rango de 1.3 a 3.7 log UFC/g de reducción durante 2 min de exposición. En estos estudios se obtuvieron valores más altos en la reducción bacteriana comparada con el nuestro, pero esta mayor reducción puede deberse a que fueron evaluados a un tiempo de exposición más largo, comparado con nuestro estudio donde el tiempo de exposición de los vegetales a los aceites fue durante 2 min. Esto da pie a evaluar el efecto de la combinación de los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* durante un tiempo mayor de exposición y conocer su efectividad contra las diferentes bacterias patógenas.

CONCLUSIÓN

El aceite esencial de *C. citratus* presentó un mayor número y diversidad de compuestos donde geranial y neral fueron los compuestos más abundantes, y en *A. cepa* fueron dipropil disulfuro, dipropil trisulfuro y dimetil tetrasulfuro. El aceite esencial de *C. citratus* fue más efectivo que el aceite de *A. cepa* para inhibir el crecimiento bacteriano tanto *in vitro* como *in vivo*. La combinación de los aceites esenciales de *C. citratus* y *A. cepa*, ejerce un efecto antibacteriano sinérgico tanto *in vitro*, como *in vivo* al ser aplicado sobre espinaca y lechuga romana. Esta actividad antibacteriana sinérgica observada en la combinación, puede asociarse a la diferente composición de los aceites. Entonces la combinación de los aceites esenciales de *C. citratus*, rico en compuesto terpénicos, y *A. cepa*, rico en compuestos azufrados, es una alternativa para potenciar el poder antibacteriano que presentan de manera individual.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio donde los aceites de *C. citratus* y *A. cepa* en combinación ejercieron un efecto sinérgico contra diferentes bacterias evaluadas; será importante evaluar el mecanismo por el cual la combinación ejerce su efecto sinérgico aprovechando su composición diferente para evaluar su potencial antimicrobiano sobre diferentes procesos celulares. Como evaluar su efecto en mecanismos específicos intracelulares, inactivación de proteínas de membrana, enzimas clave del metabolismo microbiano, daño al material genético, entre otros. Sin dejar de lado los procesos de comunicación intercelulares, es decir, la inhibición de la formación de biopelículas que les permiten sobrevivir y la inhibición de la comunicación celular (Quorum Sensing).

REFERENCIAS

- Adukwu, E. C., Allen, S. C. H. y Phillips, C. A. (2012). "The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*." Journal of applied microbiology **113**(5): 1217-1227.
- Ahn, J. H., Grun, I. U. y Mustapha, A. (2004). "Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts *in vitro* and in ground beef." Journal of Food Protection **67**(1): 148-155.
- Aiemsraad, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S. y Khunkitti, W. (2011). "The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745." Research in Veterinary Science **91**(3): e31-e37.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., García-Gonzalo, D. y Pagán, R. (2013). "Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices." Food Control **32**(1): 159-167.
- Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A. y Del Toro-Sánchez, L. (2009). "Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils." J. Food Sci. **74**: 84-91.
- Baranyi, J., Roberts, T. A. y McClure, P. (1993). "A non-autonomous differential equation to model bacterial growth." Food Microbiology **10**(1): 43-59.
- Baratta, M. T., Dorman, H., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. y Ruberto, G. (1998). "Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils." Flavour and fragrance journal **13**(4): 235-244.
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L. C., Ilboudo, A. J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C. y Dicko, M. H. (2011). "Chemical composition and

- antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination." Phytomedicine **18**(12): 1070-1074.
- Benkeblia, N. (2004). "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)." LWT - Food Science and Technology **37**(2): 263-268.
- Berenbaum, M. (1978). "A method for testing for synergy with any number of agents." Journal of Infectious Diseases **137**(2): 122-130.
- Block, E., Naganathan, S., Putman, D. y Zhao, S. H. (1992). "*Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(12): 2418-2430.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." International Journal of Food Microbiology **94**(3): 223-253.
- Cao, Y., Gu, W., Zhang, J., Chu, Y., Ye, X., Hu, Y. y Chen, J. (2013). "Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage." Food Chemistry **141**(3): 1655-1660.
- Cavallito, C. J., Buck, J. S. y Suter, C. M. (1944). "Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. determination of the chemical structure." Journal of the American Chemical Society **66**(11): 1952-1954.
- CDC. (2013). "Reports of Outbreak Investigations of *Listeria*, by Year." Retrieved 6 de julio, 2013.
- CDC. (2013). "Reports of Outbreak Investigations of *Salmonella*, by Year." Retrieved 6 de julio, 2013.
- CDC. (2013). "Reports of Outbreak Investigations of *E. coli*, by Year." Retrieved 6 de julio, 2013.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L. y Vlietinck, A. (2002). "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo." Journal of Ethnopharmacology **79**(2): 213-220.

- Corzo-Martínez, M., Corzo, N. y Villamiel, M. (2007). "Biological properties of onions and garlic." Trends in Food Science & Technology **18**(12): 609-625.
- Cottarel, G. y Wierzbowski, J. (2007). "Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy." Trends in Biotechnology **25**(12): 547-555.
- Davidson, P. y Parish, M. (1989). "Methods for testing the efficacy of food antimicrobials." Food Technology **43**.
- de Sousa, J. P., de Azerêdo, G. A., de Araújo Torres, R., da Silva Vasconcelos, M. A., da Conceição, M. L. y 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.
- de Sousa, L. L., de Andrade, S. C. A., Athayde, A. J. A. A., de Oliveira, C. E. V., de Sales, C. V., Madruga, M. S. y de Souza, E. L. (2013). "Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes)." International Journal of Food Microbiology **165**(3): 312-318.
- Delgado, B., Fernández, P. S., Palop, A. y Periago, P. M. (2004). "Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions." Food Microbiology **21**(3): 327-334.
- Dolatabadi, J. E. N. y Kashanian, S. (2010). "A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives." Food Research International **43**(5): 1223-1230.
- Duan, J. y Zhao, Y. (2009). "Antimicrobial Efficiency of Essential Oil and Freeze–Thaw Treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in Strawberry Juice." Journal of Food Science **74**(3): M131-M137.
- FDA. (2011). "Organismos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos en los EE.UU." Retrieved 27 de Abril, 2012.
- Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C. y Batista, M. T. (2008). "*Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols." Food Chemistry **110**(3): 718-728.

- Friedman, M., Henika, P. R. y Mandrell, R. E. (2002). "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*." Journal of Food Protection **65**(10): 1545-1560.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J. y 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.
- Gañán, N. y Brignole, E. A. (2013). "Supercritical carbon dioxide fractionation of *T. minuta* and *S. officinalis* essential oils: Experiments and process analysis." The Journal of Supercritical Fluids **78**(0): 12-20.
- Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R. y del Valle, P. (2012). "Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria." Food Control **26**(2): 555-563.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. y 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.
- Hammer, K. A., Carson, C. y Riley, T. (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." Journal of applied microbiology **86**(6): 985-990.
- Han, J., Lawson, L., Han, G. y Han, P. (1995). "Spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates." Analytical Biochemistry **225**(1): 157-160.
- HMMI. (2013). "Intracellular infection by *Salmonella*." Retrieved 8 julio, 2013, from <http://www.hhmi.org/biointeractive/intracellular-infection-salmonella>.
- HMMI, T. H. H. M. I. (2013). "Intracellular infection by *E. coli*." Retrieved 10 de julio, 2013, from <http://www.hhmi.org/biointeractive/e-coli-infection-strategy>.
- Hsieh, P. C., Mau, J. L. y Huang, S. H. (2001). "Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts." Food Microbiology **18**(1): 35-43.

- Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **47**(5): 565-573.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A. y Sotomayor, J. A. (2006). "Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition." Industrial Crops and Products **24**(3): 253-263.
- Kim, J. W., Kim, Y. S. y Kyung, K. H. (2004). "Inhibitory Activity of Essential Oils of Garlic and Onion against Bacteria and Yeasts." Journal of Food Protection **67**(3): 499-504.
- Kim, J. W., Kim, Y. S. y Kyung, K. H. (2004). "Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts." Journal of Food Protection® **67**(3): 499-504.
- Kim, J. W., Huh, J. E., Kyung, S. H. y Kyung, K. H. (2004). "Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion." Food Science and Biotechnology **13**(2): 235-239.
- Kirezieva, K., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Van Boekel, M. A. J. S. y Luning, P. A. (2013). "Assessment of Food Safety Management Systems in the global fresh produce chain." Food Research International **52**(1): 230-242.
- Knowles, J., Roller, S., Murray, D. y Naidu, A. (2005). "Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Applied and environmental microbiology **71**(2): 797-803.
- Kong, B., Wang, J. y Xiong, Y. L. (2007). "Antimicrobial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum-packaged pork." Journal of Food Protection **70**(3): 641-647.
- Kyung, K. y Lee, Y. (2001). "Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-alk (en) yl-L-cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica*." Food Reviews International **17**(2): 183-198.

- Lang, G. y Buchbauer, G. (2012). "A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review." Flavour and fragrance journal **27**(1): 13-39.
- Lanzotti, V. (2006). "The analysis of onion and garlic." Journal of Chromatography A **1112**(1–2): 3-22.
- Li, R., Schentag, J. y Nix, D. (1993). "The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **37**(3): 523-531.
- Lokke, M. M., Edelenbos, M., Larsen, E. y Feilberg, A. (2012). "Investigation of volatiles emitted from freshly cut onions (*Allium cepa* L.) by real time proton-transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS)." Sensors **12**(12): 16060-16076.
- López-Brea, M. y Domingo, D. (2003). "Plantas con acción antimicrobiana." Revista Española de Quimioterapia **16**(4): 385-393.
- Masniyom, P., Benjama, O. y Maneesri, J. (2012). "Effect of turmeric and lemongrass essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*)." International Journal of Food Science & Technology **47**(5): 1079-1085.
- Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M. y Ravishankar, S. (2012). "Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens." Journal of applied microbiology **112**(3): 485-492.
- Naik, M. I., Fomda, B. A., Jaykumar, E. y Bhat, J. A. (2010). "Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria." Asian Pacific Journal of Tropical Medicine **3**(7): 535-538.
- Onawunmi, G. O. (1989). "Evaluation of the antimicrobial activity of citral." Letters in Applied Microbiology **9**(3): 105-108.
- Pei, R.-S., Zhou, F., Ji, B.-P. y 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): M379-M383.

- Pereira, R. S., Sumita, T. C., Furlan, M. R., Jorge, A. O. C. y Ueno, M. (2004). "Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection." Revista de Saúde Pública **38**(2): 326-328.
- Poole, K. (2001). "Multidrug resistance in Gram-negative bacteria." Current Opinion in Microbiology **4**(5): 500-508.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2009). "Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials." Comprehensive reviews in food science and food safety **8**(3): 157-180.
- Roller, S. y Seedhar, P. (2002). "Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C." Letters in Applied Microbiology **35**(5): 390-394.
- Santiesteban-López, A., Palou, E. y López-Malo, A. (2007). "Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH." Journal of applied microbiology **102**(2): 486-497.
- Schaneberg, B. T. y Khan, I. A. (2002). "Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemongrass by GC." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(6): 1345-1349.
- Seneviratne, K. y Kotuwagedara, R. (2009). "Antioxidant activities of the phenolic extracts of seed oils and seed hulls of five plant species." Food Science and Technology International **15**(5): 419-425.
- Sinha, N. K., Guyer, D. E., Gage, D. A. y Lira, C. T. (1992). "Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(5): 842-845.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B. y Pagán, R. (2010). "Inactivation of *Escherichia coli* by citral." Journal of applied microbiology **108**(6): 1928-1939.
- Sumathi, S., Cindy, R. F., Linda, C. y Robert, V. T. (2004). "Fresh Produce: A Growing Cause of Outbreaks of Foodborne Illness in the United States, 1973 through 1997." Journal of Food Protection **67**(10): 2342-2353.

- Tsao, S. y Yin, M. (2001). "In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **47**(5): 665-670.
- Ultee, A., Bennik, M. y Moezelaar, R. (2002). "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*." Applied and environmental microbiology **68**(4): 1561-1568.
- Van Vuuren, S. y Viljoen, A. (2011). "Plant-based antimicrobial studies - methods and approaches to study the interaction between natural products." Planta Medica **77**(11): 1168-1182.
- Vazquez-Armenta, F. J., Olivas, G. I., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F. y Silva-Espinoza, B. A. (2013). "Antibrowning and antimicrobial effects of onion essential oil to preserve the quality of cut potatoes." Acta Alimentaria **En prensa**.
- Vitullo, M., Ripabelli, G., Fanelli, I., Tamburro, M., Delfine, S. y Sammarco, M. L. (2011). "Microbiological and toxicological quality of dried herbs." Letters in Applied Microbiology **52**(6): 573-580.
- Vuuren, S. F. v. y 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.
- Ward, P. M. L., Fasitsas, S. y Katz, S. E. (2002). "Inhibition, resistance development, and increased antibiotic and antimicrobial resistance caused by nutraceuticals." Journal of Food Protection **65**(3): 528-533.
- Weissinger, W. R., McWatters, K. H. y Beuchat, L. R. (2001). "Evaluation of Volatile Chemical Treatments for Lethality to *Salmonella* on Alfalfa Seeds and Sprouts." Journal of Food Protection **64**(4): 442-450.
- Whitemore, B. y Naidu, A. (2000). "Thiosulfinates." Natural food antimicrobial systems: 265-380.
- Xiong, L., Peng, C., Zhou, Q.-M., Wan, F., Xie, X.-F., Guo, L., Li, X.-H., He, C.-J. y Dai, O. (2013). "Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Leonurus japonicus* Houtt." Molecules **18**(1): 963-973.

- Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M. y Greenberg, E. P. (2004). "Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms." Journal of bacteriology **186**(6): 1838-1850.
- Ye, C.-L., Dai, D.-H. y Hu, W.-L. (2013). "Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.)." Food Control **30**(1): 48-53.
- Yin, M.-c. y Cheng, W.-s. (2003). "Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef." Meat Science **63**(1): 23-28.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H. U. I., Yang, Z., Li, J., Li, J. y Yan, W. (2007). "The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella thyphymurium*." Journal of Food Safety **27**(2): 124-133.