



EVALUACIÓN DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES ACTIVAS DE PLA INCORPORADA DE ACEITES ESENCIALES PARA INHIBIR ADHESIÓN MICROBIANA

EVALUATION OF PLA ACTIVE BIODEGRADABLE FILMS INCORPORATED OF ESSENTIAL OILS TO INHIBIT MICROBIAL ADHESION

Anderson Pazmiño*¹, Ana Campuzano², Karina Marín³, Jonathan
Coronel³, y Rómulo Salazar³

¹Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Técnica de Manabí. Código Postal 130105, Portoviejo, Ecuador.

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Agraria del Ecuador, Código Postal 090104, Guayaquil, Ecuador.

³Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

*Autor para correspondencia: anderson.pazmino@utm.edu.ec

Manuscrito recibido el 30 de octubre de 2020. Aceptado, tras revisión, el 21 de enero de 2022. Publicado el 1 de septiembre de 2022.

Resumen

La evaluación de películas biodegradables activas de ácido poliláctico (PLA) incorporado de aceites esenciales para inhibir la adhesión microbiana se realizó mediante un diseño exploratorio fraccionario 2_{V-1}^{5-1} , combinando los factores, cantidad de plastificante PEG 400 (10 y 20%), cantidad de aceite esencial de canela (0,5 y 1%), cantidad de aceite esencial de orégano (0,5 y 1%), concentración en unidades formadoras de colonias (UFC) de *Salmonella* spp. (10^3 y 10^4 UFC mL^{-1}) y concentración de *Staphylococcus aureus* (10^3 y 10^4 UFC mL^{-1}). Los resultados del ensayo de inhibición a la adhesión microbiana mostraron que el porcentaje máximo de inhibición alcanzó el $73,82 \pm 0,35\%$, correspondiente al experimento 7 (bce), el cual contiene 10% PEG 400, 1% aceite esencial de canela, 1% aceite esencial de orégano, 10^3 UFC mL^{-1} de concentración de *Salmonella* spp. y 10^4 UFC mL^{-1} de concentración de *Staphylococcus aureus*. El análisis estadístico determinó que existe evidencia significativa (valor $p = 0,0283$) que indica que la concentración de *Staphylococcus aureus* influye en el porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana; así como también, que la interacción del aceite esencial de canela-*Salmonella* spp. tiene poca evidencia significativa (valor $p = 0,0711$) que influye en el porcentaje de inhibición. Los resultados de inhibición están en función del tipo de bacteria, siendo mayor para las Gram positivas. Los resultados de inhibición superiores al 60% tienen como factor común la concentración más alta de *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, las películas biodegradables activas de PLA con mayor porcentaje de inhibición pueden usarse potencialmente en la industria alimentaria como mecanismo de barrera para evitar contaminación bacteriana.

Palabras clave: Biopolímero, alimento, barrera, patógenos.

Abstract

An evaluation of incorporated polylactic acid (PLA) active biodegradable films of essential oils to inhibit microbial adhesion was performed using a 2^{5-1} fractional exploratory design, combining the factors, amount of PEG 400 plasticizer (10 and 20%), amount of cinnamon essential oil (0.5% and 1%), amount of oregano essential oil (0.5% and 1%), *Salmonella* spp. concentration (10^3 CFU mL^{-1} and 10^4 CFU mL^{-1}) and *Staphylococcus aureus* concentration (10^3 CFU mL^{-1} and 10^4 CFU mL^{-1}). The results of microbial adhesion inhibition test showed that the maximum inhibition percentage reached $73.82 \pm 0.35\%$ corresponding to experiment 7 (bce), which contains 10% of PEG 400, 1% of cinnamon essential oil, 1% of oregano essential oil, 10^3 CFU mL^{-1} of *Salmonella* spp. concentration, 10^4 CFU mL^{-1} of *Staphylococcus aureus* concentration. Statistical analysis determined that there is strong significant evidence (p - value = 0.0283) that *Staphylococcus aureus* concentration influences the inhibition percentage to microbial adhesion; as well as that the cinnamon essential oil- *Salmonella* spp. interaction has little significant evidence (p - value = 0.0711) that influences the inhibition percentage. Inhibition results greater than 60% have the highest concentration of *Staphylococcus aureus* as a common factor. PLA active biodegradable films with a higher inhibition percentage can potentially be used in the food industry as a barrier mechanism to avoid bacterial contamination.

Keywords: Biopolymer, food, barrier, infectious agent.

Forma sugerida de citar: Pazmiño, A., Campuzano, A., Marín, K., Coronel, J. y Salazar, R. (2022). Evaluación de películas biodegradables activas de PLA incorporada de aceites esenciales para inhibir adhesión microbiana. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 36(2):18-31. <http://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.02>

IDs Orcid:

Anderson Pazmiño: <http://orcid.org/0000-0001-5333-3819>

Ana Campuzano: <http://orcid.org/0000-0003-0010-4267>

Karina Marín: <http://orcid.org/0000-0002-0706-7692>

Jonathan Coronel: <http://orcid.org/0000-0001-6535-0261>

Rómulo Salazar: <http://orcid.org/0000-0002-0172-839X>

1 Introducción

La extensión en el uso de envases biodegradables para reemplazar las poliolefinas de baja tasa de degradabilidad es uno de los desafíos centrales de la industria de alimentos, al igual que los esfuerzos orientados a reducir el número de personas afectadas por enfermedades transmitidas por alimentos, mediante el incentivo en la aplicación de biocontroles y demás mecanismos de barrera que garanticen seguridad alimentaria a los consumidores (Tauxe y col., 2010; Jahid y Ha, 2012), en especial en alimentos mínimamente procesados o frescos, tomando en cuenta que, por ejemplo, en los últimos años los brotes de enfermedades producidas por *Salmonella* spp. han sido vinculados a la contaminación de pepinos, papaya frescas, melón y piña cortados, pollo, huevos, atún crudo, carne de res molida, carne de pavo molida, y muchos otros alimentos (Centers for Disease Control and Prevention, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que las enfermedades de transmisión alimentaria afectan a una de cada diez personas a nivel mundial, y ocasionan 420 000 muertes al año, siendo los principales agentes etiológicos, Norovirus, *E. coli*, *Campylobacter* spp., y *Salmonella* no tifoidea (WHO, 2016). Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades estiman que cada año, solamente en Estados Unidos, 48 millones de personas son afectadas por enfermedades transmitidas por alimentos, de las cuales 128.000 son hospitalizadas y 3.000 mueren (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Del total de afectados, 9,4 millones personas (20%) se enferman a causa de 31 patógenos conocidos transmitidos por los alimentos, y 38,4 millones (80%) son afectados por agentes no especificados que están en los alimentos y cuya sintomatología comienza con gastroenteritis aguda. Las cifras estimadas indican que las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por virus (59%), bacterias (39%) y parásitos (2%). Los patógenos que causan la mayoría de las enfermedades son el Norovirus (58%), *Salmonella* spp. (11%), *Clostridium perfringens* (10%), *Campylobacter* spp. (9%), y *Staphylococcus aureus* (3%). Del total de hospitalizaciones estimadas, el 64% son causadas por bacterias, siendo el 35% debido a *Salmonella* spp. y 15% a *Campylobacter* spp. Del total de muertes estimada, el 64% es causado por bacterias, de las cuales el 28% corresponde a *Salmonella* spp., 19% *Listeria mo-*

nocytogenes, y 6% *Campylobacter* spp. (Scallan y col., 2011).

El uso de aceites esenciales es una opción para mejorar las propiedades de las películas o envases biodegradables, otorgando propiedades antibacterianas contra patógenos que producen enfermedades alimentarias (Calo y col., 2015). Entre estos aceites esenciales están el aceite de orégano (*Origanum vulgare*) y el aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), ambos categorizados GRAS (Generalmente reconocido como seguro) por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) (FDA, 2020)

El aceite esencial de canela es considerado útil para la preservación de los alimentos por sus propiedades antioxidantes, antifúngicas y antibacterianas. Estas propiedades son consecuencia de su contenido de Cinamaldehído (94,65% - 65%), D-Limoneno (3,55%) y Eugenol (1,8%) (Burt, 2004; Cardoso-Ugarte, López-Malo y Sosa-Morales, 2016; Echegoyen y Nerín, 2015). Estudios sobre el mecanismo de acción y concentraciones mínimas inhibitorias contra *Yersinia enterocolitica* (0,075 mg mL⁻¹), *Listeria monocytogenes* (2,5 mg mL⁻¹), *Bacillus cereus* (2,5 mg mL⁻¹), *Escherichia coli* (5 mg mL⁻¹), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (5 mg mL⁻¹) y *Staphylococcus aureus* (5 mg mL⁻¹), han determinado que la liberación de iones de potasio intracelular, la reducción de la actividad metabólica y de replicación fueron secuelas de la acción del aceite esencial (Duan y Zhao, 2009; Silveira y col., 2012).

El aceite esencial de orégano posee un alto poder antioxidante y antimicrobiano que favorece la preservación de la calidad química, sensorial, nutricional y microbiológica de los alimentos, debido al efecto de sus principales componentes, Carvacrol (0,5-88,7%), Timol (3,1-82%), 1,8-Cineol (0,1-14%), p-Cimeno (2,7-28,0%) (Franz y Novak, 2009; Ventura y col., 2011; Teixeira y col., 2013; Rostro-Alanis y col., 2019). Las bacterias Gram-negativas, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, y las bacterias Gram-positivas, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* y *B. cereus*, han sido utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano y sus principios activos, y de ellas sólo *Pseudomonas aeruginosa* ha mostrado una alta resistencia (Albado Plaus, Saez Flores y Grabiell Ataucusi, 2001; Oussalah y col., 2007; Emiroğlu y col.,

2010; Sung y col., 2013; Calo y col., 2015). Este accionar bactericida se debe a sus principios activos que aumentan la permeabilidad de la membrana citoplasmática de los microorganismos, causando la muerte celular (Lambert y col., 2001; Rhayour y col., 2003; Sung y col., 2013; Calo y col., 2015).

Ye y col. (2013) demostró un buen efecto antibacteriano sinérgico de Cinamaldehído y Carvacrol, especialmente contra *E. coli* y *S. aureus*; de esta manera, el uso de aceites esenciales que contengan estos compuestos puede originar el desarrollo de biopolímeros de gran actividad bactericida para la preservación de alimentos.

El cuanto al desarrollo de películas biodegradables, el biopolímero semicristalino ácido poliláctico (PLA), por sus características de transparencia, inocuidad, biodegradabilidad y facilidad de procesamiento se presenta como un polímero idóneo para el envasado alimentario (Jamshidian y col., 2010; Lallanne y col., 2011; Burgos, Martino y Jiménez, 2013; Blanot, 2017; Salazar, Domenek y Ducruet, 2014; Ruellan y col., 2015).

Biopelículas de PLA con aceites esenciales (bergamota, limoncillo, romero, clavo, mirto, tomillo, canela, ajo, y orégano) han sido elaboradas con resultados positivos tanto en el aspecto reológico, térmico, antioxidante y antibacterial (Ahmed, Hiremath y Jacob, 2016; Qin y col., 2017; Yahyaoui y col., 2016; Anuar y col., 2017; Scaffaro y col., 2018; Zeid y col., 2019), logrando biopelículas con adecuada transparencia, menos rígidas y flexibles, menos permeables al vapor de agua y oxígeno, sin afectar significativamente el perfil de degradación térmica del PLA, y con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Sin embargo, la evaluación de la incorporación de estos aceites esenciales ha sido en forma independiente, por lo que es necesario establecer posibles combinaciones de aceites esenciales en biopolímeros para obtener mejores efectos de barrera y de control contra microorganismos patógenos que desarrollan biopelículas sobre diferentes superficies y que provocan enfermedades alimentarias, considerando posibles efectos positivos en la sinergia de los aceites esenciales empleados y las interacciones entre éstos y los demás componentes del polímero (Calo y col., 2015).

Ante la necesidad mundial de producir envases biodegradables y debido a que los microorganismos patógenos usan a los alimentos y empaques como transporte para afectar a la salud de los consumidores, este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de películas biodegradables activas de PLA incorporadas con aceites esenciales de orégano y canela.

2 Materiales y Métodos

El ácido poliláctico (PLA-IngeoTM Biopolymer 2003D) fue adquirido en Nature Works®Co. LLC (Estados Unidos). El plastificante polietilenglicol (PEG 400) y el solvente cloroformo fueron adquiridos en Loba Chemie Pvt. Ltd (India). El etanol absoluto fue obtenido en Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

Los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) fueron adquiridos en Nowfoods (Bloomingdale, IL, Estados Unidos), fueron 100% puros, y se obtuvieron por el método de destilación por vapor. De acuerdo a las especificaciones técnicas, el aceite esencial de orégano (gravedad específica: 0,937-0,955 g mL⁻¹ a 20°C; índice de refracción: 1,498-1,521 nD; 75% Carvacrol) fue extraído de hierba de flores secas, y el aceite esencial de canela (gravedad específica: 1,010-1,030 g mL⁻¹ a 20°C; índice de refracción: 1,573-1,591 nD; 60% Cinamaldehído) fue extraído de la corteza interior seca de la planta.

Los medios de cultivos y reactivos para las pruebas microbiológicas fueron adquiridos en Difco (Estados Unidos). Las bacterias patógenas utilizadas en esta investigación, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Samonella* spp. (ATCC 14028) fueron obtenidas del banco de cepas del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE, Ecuador).

2.1 Determinación de solubilidad de los componentes con PLA

La solubilidad del PLA con el cloroformo, PEG 400, Carvacrol (componente principal del aceite esencial de orégano) y Cinamaldehído (componente principal del aceite esencial de canela) fue determinada de acuerdo a lo descrito por Ruellan y col. (2015). La Ecuación 1 y Ecuación 2 son usadas para determi-

nar la distancia $\Delta\delta$ del compuesto con PLA y el diferencial de energía relativa (RED), respectivamente. Los parámetros de solubilidad de Hansen necesarios para aplicar las ecuaciones fueron consultados en el manual de usuario descrito por Hansen (2007). Donde, δ_d , δ_p y δ_h son los componentes de los parámetros de solubilidad.

$$\text{Distancia}(\Delta\delta) = ((\delta_{d \text{ comp}} - \delta_{d \text{ PLA}})^2 + (\delta_{p \text{ comp}} - \delta_{p \text{ PLA}})^2 + (\delta_{h \text{ comp}} - \delta_{h \text{ PLA}})^2)^{0,5} \quad (1)$$

$$\text{RED} = \frac{\text{Distancia}}{\text{Radio}} \quad (2)$$

2.2 Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada aceite esencial fue determinada por la metodología descrita por Pazmiño, Campuzano y Marín (2020), en donde se determinó la CMI mediante ensayo de microdilución en caldo nutritivo y suplementado con agar nutritivo de concentración 0,15% (p/v); la cantidad de 50 de este caldo fue distribuida desde el segundo al doceavo pocillo en cada fila de una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos (HDM Cia. Ltda, Ecuador).

Se preparó una dilución al 4% de cada aceite esencial con agar bacteriológico y caldo nutritivo.

En forma independiente, de cada dilución preparada se vertieron 100 al primer pocillo de cada fila de la placa de microtitulación; y luego se transfirieron 50 en dilución escalar desde el segundo al onceavo pocillo, obteniendo así una cantidad de aceite esencial entre 2% (v/v) y 0,0019% (v/v) desde el primer pocillo hasta el onceavo pocillo. Al doceavo pocillo no se le agregó el aceite esencial y se consideró como control de crecimiento. Luego, se adicionados 50 de suspensión de *Salmonella* spp. de concentración 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC mL^{-1}) en cada pocillo, excepto al onceavo pocillo, que fue considerado como blanco. El ensayo se hizo por triplicado, y el mismo procedimiento fue realizado con *S. aureus* (10^6 - 10^7 UFC mL^{-1}). La placa se incubó a $37^\circ C$ durante 18 h.

2.3 Diseño del experimento

Para evaluar la inhibición a la adhesión microbiana en la película plástica fueron considerados los factores: cantidad de PEG 400 (A), cantidad de aceite esencial de canela (B), cantidad de aceite esencial de orégano (C), concentración de *Salmonella* spp. (D) y concentración de *S. aureus* (E), y cada factor se evaluó en dos niveles (Tabla 1). Para el efecto, un diseño exploratorio fraccionario 2^{5-1} con una relación generadora E = ABCD y en dos bloques (AB=CDE) (Tabla 2) fue programado y analizado en RStudio Versión 0.99.486. Dieciséis experimentos fueron realizados, cada uno con su réplica.

Tabla 1. Niveles de cada factor a evaluar en el diseño experimental.

Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (1)
Cantidad de PEG 400 (%)	10	20
Cantidad de aceite esencial de canela (%)	0,5	1
Cantidad de aceite esencial de orégano (%)	0,5	1
Concentración de <i>Salmonella</i> spp. (UFC mL^{-1})	10^3	10^4
Concentración de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC mL^{-1})	10^3	10^4

2.4 Elaboración de películas biodegradables activas a base de PLA y aceites esenciales

Los pellets de PLA se secaron a $40^\circ C$ por 48 horas, de tal forma que la humedad antes del procesamiento fue de 0,29% medido en una termobalanza (KERN, Alemania, Mod MLB50-3). El método

de vaciado en placa fue ejecutado con la metodología descrita por Pazmiño, Campuzano y Marín (2020). La cantidad de 0,45 g de PLA y PEG 400 (10 o 20% con respecto al PLA) se disolvieron en 10 mL de cloroformo. Después de disolver a temperatura ambiente la resina en la solución, se añadieron los aceites esenciales en la cantidad correspondiente (0,5% o 1% con respecto al PLA) agitando por

pocos minutos hasta disolverlos. A continuación, la solución se vertió en cajas Petri, agregando $5 \pm 0,5$ g de solución en cada una de ellas, y finalmente se dejó por 24 h a temperatura ambiente dentro de la cámara de extracción para que el solvente se evapore. También se elaboraron películas sin adición de aceites esenciales (películas control). Las películas obtenidas tuvieron espesor entre 27 a 30 μm , medido por un micrómetro (Qualitest, Estados Unidos, Mod MRG-25).

2.5 Porcentaje de inhibición a la adhesión de microorganismos en las películas biodegradables activas

El porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana fue realizado modificando el método aplicado por Coronel-León y col. (2016). Conforme al diseño experimental, 1 mL de cada concentración de microorganismo (10^3 o 10^4 UFC mL^{-1}) fue inoculado en la película plástica, con una incubación a 37°C por 24 horas. Culminado el período de incubación, cada película fue lavada con 1 mL de agua destilada dos veces para eliminar los residuos. Se añadió 1 mL de etanol absoluto, colocando las placas en la

cámara de extracción por 24 horas para evaporar el alcohol. La película se cortó en un rectángulo ($8,75 \text{ cm}^2$), para colocarlo en un portaobjeto en donde se agregó el reactivo cristal violeta (500) dejándolo por un minuto. Luego, se enjuagó con agua destilada para eliminar el exceso del reactivo. Una vez secado con papel toalla, se cortó en 8 pedazos para introducirlos en un tubo de ensayo, añadiéndole 2 mL de etanol absoluto. Posteriormente, se depositaron 200 de cada solución en los pocillos del microplato de 96 pocillos para medir la concentración del reactivo por el espectro de absorción UV-Vis en el equipo Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, Estados Unidos) con una absorbancia de 595 nm a $24,8^\circ\text{C}$.

El porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana (%) se calculó con la Ecuación 3. Donde, A_c representa la absorbancia de la solución en el pocillo correspondiente a la película plástica conforme al diseño experimental, y A_0 representa la absorbancia de la solución de la película control (ausencia de aceite esencial). El experimento se realizó por triplicado, y los resultados se presentan como un promedio.

$$\% = [1 - (A_c/A_0)] \times 100 \quad (3)$$

Tabla 2. Diseño exploratorio fraccionario 2_5^{-1} con una relación generadora $E = ABCD$ en dos bloques ($AB = CDE$).

Experimento	Factores					AB	Totales	Bloques
	A	B	C	D	E			
1	-1	-1	-1	-1	1	1	e	1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	a	2
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	b	2
4	1	1	-1	-1	1	1	abe	1
5	-1	-1	1	-1	-1	1	c	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	ace	2
7	-1	1	1	-1	1	-1	bce	2
8	1	1	1	-1	-1	1	abc	1
9	-1	-1	-1	1	-1	1	d	1
10	1	-1	-1	1	1	-1	ade	2
11	-1	1	-1	1	1	-1	bde	2
12	1	1	-1	1	-1	1	abd	1
13	-1	-1	1	1	1	1	cde	1
14	1	-1	1	1	-1	-1	acd	2
15	-1	1	1	1	-1	-1	bcd	2
16	1	1	1	1	1	1	abcde	1

3 Resultados y Discusión

3.1 Solubilidad de los componentes con el PLA

Los valores obtenidos con las ecuaciones 1 y 2 se encuentran en la Tabla 3. Bajo el criterio que distancias menores a 5 ($J\ cm^{-3}$)^{0,5} indican una mejor solubilidad del compuesto con el polímero, se pue-

de establecer que los compuestos tienen una buena solubilidad con el PLA, especialmente el Cinamaldehído del aceite esencial de canela. El valor RED cercano a cero indica una mejor compatibilidad de los compuestos con el polímero, y un valor mayor a 1 indica una no miscibilidad del compuesto con el polímero; de acuerdo a los resultados, todos los compuestos son completamente miscibles.

Tabla 3. Resultados de distancia y valor RED del Carvacrol, Cinamaldehído, PEG 400 y cloroformo, con relación al PLA.

Compuesto	Parámetros de solubilidad de Hansen ($J\ cm^{-3}$) ^{0,5}			Distancia $\Delta\delta$	RED*
	δd	Δp	Δh		
PLA ^a	18,60	9,90	6,00	—	—
PEG400 ^a	17,90	4,20	14,20	10,01	0,94
Carvacrol ^b	19,00	4,50	10,80	7,24	0,68
Cloroformo ^b	17,80	3,10	5,70	6,85	0,64
Cinamaldehído ^b	19,40	12,40	6,20	2,63	0,25

*Radio de PLA = 10,7 (Ruellan y col., 2015).

a: (Ruellan y col., 2015); b: (Hansen, 2007), valores del carvacrol como isómero del timol.

3.2 Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial

Los resultados muestran que ambos aceites esenciales inhiben a las bacterias Gram positiva *S. aureus* y Gram negativa *Salmonella* spp. (Tabla 4). La CMI 0,016% (v/v) del aceite esencial de orégano para *Salmonella* spp. es más baja que la CMI del aceite esencial de canela para esta misma bacteria; mientras que la CMI de ambos aceites esenciales contra *S. aureus* es igual, siendo ésta 0,031% (v/v).

La CMI de aceite esencial de orégano para *Salmonella* spp. es más baja en comparación con los resultados de Oussalah y col. (2007), donde la CMI para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* fue de 0,05% (v/v), y también comparada con los resultados de Pesavento y col. (2015), donde las CMI encontradas para *Salmonella enteritidis* y *S. enterica serovar Typhimurium* fue de 0,125% (v/v). Los resultados de la CMI de aceite esencial de orégano para *S. aureus* se encuentran dentro del rango de valores reportados por Nostro (2007), donde la CMI del

aceite esencial de orégano sobre varias cepas de este microorganismo estuvieron entre 0,015-0,062% (v/v) y en ciertas cepas hasta 0,125% (v/v).

La CMI de aceite esencial de canela para *Salmonella* spp. y *S. aureus* es más alta a la encontrada por Sheng y Zhu (2014), donde la CMI del aceite esencial de canela extraído de la variedad *Cinnamomum cassia* fue 0,025% (v/v) tanto para *S. enterica serovar Typhimurium* como *S. aureus*. Los resultados de CMI del aceite esencial de orégano y del aceite esencial de canela, expresados en $mg\ mL^{-1}$ en la Tabla 4 y que fueron obtenidos en este trabajo de investigación son más elevados en comparación con los resultados encontrados en otras investigaciones, en donde la CMI del aceite esencial de orégano oscilan entre 0,16-0,2 $mg\ mL^{-1}$ para *Salmonella* spp. y 0,4-0,9 $mg\ mL^{-1}$ para *S. aureus*, y la CMI del aceite esencial de canela oscila entre 0,2-0,5 $mg\ mL^{-1}$ tanto para *Salmonella* spp. como para *S. aureus* (Chang, Chen y Chang, 2001; Becerril, Nerín y Gómez-Lus, 2012; Boskovic y col., 2015; Martucci y col., 2015; Cui y col., 2019).

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales de canela y orégano para *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*.

Aceite esencial	Principio activo	CMI <i>Salmonella</i> spp.		CMI <i>Staphylococcus aureus</i>	
		(%) (v/v)	mg mL ⁻¹	(%) (v/v)	mg mL ⁻¹
Canela	Cinamaldehído	63	64,26	31	31,62
Orégano	Carvacrol	16	15,14	31	29,33

Los datos descritos anteriormente demuestran la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y canela. El Carvacrol del aceite esencial de orégano daña la pared y membrana celular, y aumenta la permeabilidad, provocando la lisis celular (Lambert y col., 2001; Rhayour y col., 2003; Lv y col., 2011; Cui y col., 2019). El Cinamaldehído del aceite esencial de canela presenta diferentes mecanismos de acción por sí solo o en sinergia con el Carvacrol, con la capacidad de colapsar la estructura de la envoltura bacteriana, así como interrumpir procesos metabólicos como la generación de la energía celular, formación material citoplasmático y división celular (Kwon, Yu y Park, 2003; Burt, 2004; Becerril y col., 2007; Bouhdid y col., 2009; Ye y col., 2013; Calo y col., 2015).

3.3 Porcentaje de inhibición a la adhesión de microorganismos en las películas biodegradables activas

Los resultados de los porcentajes de inhibición a la adhesión microbiana en las películas biodegradables activas se detallan en la Tabla 5. Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje máximo de inhibición alcanzó el $73,82 \pm 0,35\%$ correspondiente al experimento 7 (bce) del diseño experimental, y existe una diferencia significativa con los demás resultados, excepto con 13 (cde). El experimento 7(bce) comprendió 10% de cantidad de PEG 400, 1% de aceite esencial de canela, 1% de aceite esencial de orégano, 10^3 UFC mL⁻¹ de concentración de *Salmonella* spp., 10^4 UFC mL⁻¹ de concentración de *S. aureus*. Este porcentaje de inhibición a la adhesión es superior al reportado en estudios realizados con Lichenysin (4000 mL⁻¹) en *S. aureus* (68,73%) (Coronel-León y col., 2016), y con Rhamnolípidos (1%) en *S. aureus* (67,7%), y no fue significativa en *Salmonella enteritidis* (Do Valle Gomes y Nitschke, 2012).

El porcentaje de inhibición logrado en el experimento 7 (ecb), revela la gran afinidad entre los radicales de los principios activos de los aceites esenciales, especialmente del aceite esencial de orégano, y las membranas celulares de bacterias Gram-positivas, provocando alteraciones estructurales y pérdida de viabilidad celular (Bouhdid y col., 2009; Lv y col., 2011). De esta forma, cuanto mayor sea la concentración de este tipo de microorganismos en una superficie, mayor será el porcentaje de inhibición.

Estudios de evaluaciones *in vitro* o sobre matrices alimentarias (especialmente productos cárnicos) de PLA y otros biopolímeros (alginato, proteína de soya) con aceite esencial de orégano y aceite esencial de canela, ambos empleados al 1% en forma independiente, demostraron buenos resultados en el control microbiológico de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Oussalah y col., 2006; Emiroğlu y col., 2010; Anuar y col., 2017); sin embargo, en estos estudios no se especifica el porcentaje de inhibición para establecer comparaciones más precisas, porque en ellos se empleó medidas de halos de inhibición.

Los resultados también señalan que los experimentos 4 (abe), 10 (ade), 12 (abd), y 13 (cde), muestran inhibiciones a la adhesión microbiana de $60,73 \pm 0,39\%$, $66,11 \pm 1,55\%$, $66,34 \pm 0,53\%$, y $67,73 \pm 0,66\%$, respectivamente; mostrando además que el factor común entre ellos y el experimento 7(bce) es la concentración de *S. aureus* (10^4 UFC mL⁻¹), excepto en el experimento 12 (abd). Entre 7 (bce) y 13 (cde) no hay diferencias significativas, y entre los componentes difieren en la cantidad de aceite esencial de canela y la concentración de *Salmonella* spp., teniendo 13 (cde) la cantidad de aceite esencial de canela más baja y la concentración de *Salmonella* spp. más alta que en 7(bce). Sin embargo, como se expone más adelante, cuando la cantidad de aceite esencial de canela es baja y la concentración de *Salmonella* spp. es más alta, los resultados del porcentaje de inhibición a la adhesión micro-

biana son tan elevados como cuando se usa aceite esencial de canela al 1%. Esta situación contribuye a que no haya diferencia significativa entre 7(bce) y 13 (cde).

Tabla 5. Porcentajes de inhibición a la adhesión microbiana de las películas biodegradables activas.

Experimento	PEG 400 (%)	Aceite esencial de canela (%)	Aceite esencial de orégano (%)	<i>Salmonella</i> spp. (UFC mL ⁻¹)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC mL ⁻¹)	Inhibición a la adhesión microbiana (%)
1 (e)	10	0,5	0,5	10 ³	10 ⁴	55,04 ± 1,52 ^{c,d}
2 (a)	20	0,5	0,5	10 ³	10 ³	31,46 ± 2,96 ^e
3 (b)	10	1	0,5	10 ³	10 ³	54,71 ± 0,55 ^{c,d}
4 (abe)	20	1	0,5	10 ³	10 ⁴	60,73 ± 0,39 ^{b,c}
5 (c)	10	0,5	1	10 ³	10 ³	43,49 ± 0,83 ^d
6 (ace)	20	0,5	1	10 ³	10 ⁴	48,04 ± 1,96 ^d
7 (bce)	10	1	1	10 ³	10 ⁴	73,82 ± 0,35 ^a
8 (abc)	20	1	1	10 ³	10 ³	47,24 ± 2,40 ^d
9 (d)	10	0,5	0,5	10 ⁴	10 ³	58,21 ± 1,34 ^c
10 (ade)	20	0,5	0,5	10 ⁴	10 ⁴	66,11 ± 1,55 ^b
11 (bde)	10	1	0,5	10 ⁴	10 ⁴	59,83 ± 1,56 ^{b,c}
12 (abd)	20	1	0,5	10 ⁴	10 ³	66,34 ± 0,53 ^b
13 (cde)	10	0,5	1	10 ⁴	10 ⁴	67,73 ± 0,66 ^{a,b}
14 (acd)	20	0,5	1	10 ⁴	10 ³	42,93 ± 0,49 ^d
15 (bcd)	10	1	1	10 ⁴	10 ³	51,46 ± 1,95 ^{c,d}
16 (abcde)	20	1	1	10 ⁴	10 ⁴	49,60 ± 2,07 ^d

Los valores de porcentaje de inhibición de la adhesión microbiana son medias ± DE.
Los valores seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Con los datos del experimento correspondiente al diseño 2^{5-1} , con dos bloques de ocho observaciones, y de acuerdo a lo especificado por la resolución V, se realizó un modelo que incluía los efectos principales y las interacciones de dos vías, excepto la interacción PEG 400 -aceite esencial de canela (AB), por estar confundida con los bloques. De acuerdo con los resultados obtenidos de este modelo inicial, se eliminó la interacción PEG 400 -*S. aureus* (valor $p > 0,1$). De esta misma manera se procedió con los modelos siguientes, en donde paulatinamente fueron eliminándose las interacciones PEG 400 -aceite esencial de orégano, PEG 400 -*Salmonella* spp., aceite esencial de canela-aceite esencial de orégano, aceite esencial de canela -*S. aureus*, *Salmonella* spp. -*S. aureus*, aceite esencial de orégano -*S. aureus*, y aceite esencial de orégano -*Salmonella* spp., porque estas interacciones tampoco fueron estadísticamente significativas. Después de la supresión de las interacciones antes mencionadas, los resultados del modelo aplicado se muestran en la Tabla 6.

Existe evidencia significativa (valor $p = 0,0283$) de que el factor de concentración de *S. aureus* in-

fluye en el porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana (Figura 1) con un valor de efecto de 10,63% entre la media del porcentaje de inhibición, cuando la concentración de *S. aureus* es baja (49,48%), y la media del porcentaje de inhibición cuando la concentración de *S. aureus* es alta (60,11%). De allí que los porcentajes de inhibición a la adhesión microbiana mayores al 60% tienen como factor común la mayor concentración de *S. aureus*.

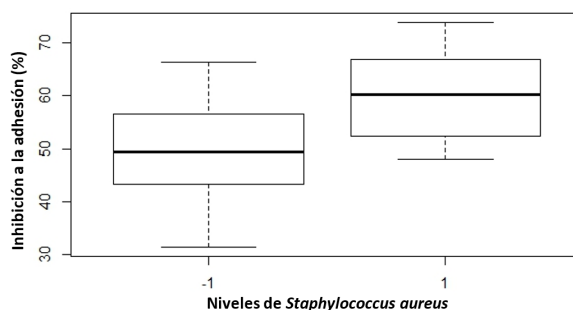


Figura 1. Porcentaje de inhibición a la adhesión a diferentes concentraciones de *Staphylococcus aureus*.

La interacción de aceite esencial de canela - *Salmonella* spp. tiene poca evidencia significativa (valor $p = 0,0711$) que influye en el porcentaje de inhibición. En los otros factores e interacciones no hay evidencia estadística significativa de su influencia en los resultados de inhibición.

Tabla 6. Efectos principales e interacciones de dos vías con su correspondiente valor de efecto y valor p.

Factor o interacción	Efecto	Valor p
PEG 400	-6,48	0,1422
Aceite esencial de canela	6,34	0,1498
Aceite esencial de orégano	-3,51	0,4029
<i>Salmonella</i> spp.	5,96	0,1727
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,63	0,0283
Aceite esencial de canela- <i>Salmonella</i> spp.	-8,28	0,0711

En el gráfico de interacción del aceite esencial de canela -*Salmonella* spp. (Figura 2), cuando la cantidad de aceite esencial de canela es menor y la concentración de *Salmonella* spp. es menor, la media del porcentaje de inhibición a la adhesión es 44,51%; y cuando la cantidad del aceite esencial de canela es mayor y la concentración de *Salmonella* spp. sigue siendo menor, la media del porcentaje de inhibición es 59,12%; cuando la cantidad de aceite esencial de canela es la más baja y la concentración de *Salmonella* spp. es la más alta, la media del porcentaje de inhibición a la adhesión es de 58,74%; y cuando la cantidad del aceite esencial de canela es la mayor y la concentración de *Salmonella* spp. sigue siendo alta, la media del porcentaje de inhibición es de 56,81%.

De esta forma, el mayor efecto se observa en la cantidad de aceite esencial de canela de 0,5% con un aumento del porcentaje de inhibición de 14,24%, cuando la concentración de *Salmonella* spp. pasa de nivel bajo (10^3 UFC mL^{-1}) a nivel alto (10^4 UFC mL^{-1}); mientras que existe una reducción del porcentaje de inhibición 2,32% en la concentración de aceite de canela de 1% y cuando cambia la concentración de *Salmonella* spp. Cuando la concentración de aceite esencial de canela pasa de 0,5% a 1%, siendo la concentración de *Salmonella* spp. baja, el porcentaje de inhibición aumenta en 14,62%, mientras que con una concentración de *Salmonella* spp. alta, el porcentaje de inhibición se reduce en 1,94%, lo que podría manifestar una tendencia a la disminución en el porcentaje de inhibición a concentraciones mayores de *Salmonella* spp.

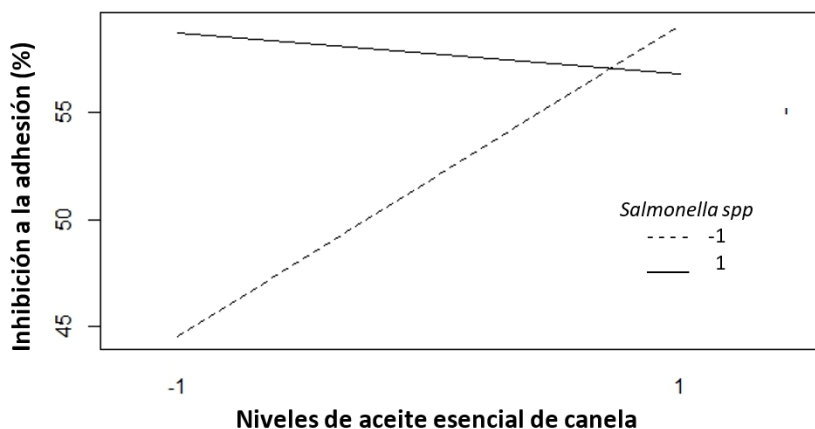


Figura 2. Interacción aceite esencial de canela -*Salmonella* spp.

También se puede evidenciar que el mayor porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana 59,12% se produce cuando el aceite esencial de canela está al 1% y la concentración de *Salmonella* es 10^3 UFC mL^{-1} ; y el menor porcentaje de inhibición 44,51% ocurre cuando el aceite esencial de canela está al 0,5% a la misma concentración de *Salmonella* spp. Entonces, la Figura 2 indica que el aceite esencial de canela al 1% tiene mayor efectividad en la inhibición para las distintas concentraciones de *Salmonella* spp., tipo de microorganismo que en este estudio representa a las bacteria Gram-negativas.

Los resultados de la interacción aceite esencial de canela -*Salmonella* spp. demuestran que el aceite esencial de orégano es menos efectivo contra bacterias Gram-negativas porque tiene una menor afinidad con la membrana celular de una fina capa de peptidoglicano, abriendo la acción del aceite esencial de canela y su principio activo sobre este tipo de bacterias (Becerril y col., 2007), los mismos que metabólicamente son más difíciles de combatir por la envoltura externa que desarrollan como mecanismo de protección (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

4 Conclusiones

Se obtuvieron películas activas biodegradables de PLA con incorporación de aceites esenciales de orégano y canela, y se pudo verificar una buena solubilidad entre los componentes. El porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana sobre las películas biodegradables activas está en función del modelo representativo de bacteria Gram-positiva para este trabajo de investigación. El análisis estadístico determinó que existe evidencia significativa que indica que la concentración de *S. aureus* influye en el porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana. De esta forma, las inhibiciones superiores al 60% tienen como factor común la mayor concentración de *S. aureus*.

Además, la cantidad de aceite esencial de canela al 1% tiene mayor efectividad en la inhibición para las distintas concentraciones de *Salmonella* spp., a pesar de registrar una leve disminución en la inhibición al pasar de la menor a la mayor concentración de *Salmonella* spp.

Las películas biodegradables activas de PLA con

mayor porcentaje de inhibición a la adhesión microbiana potencialmente pueden ser utilizadas en la industria de alimentos, como una alternativa ecológica para aumentar mecanismos de barrera adicionales para evitar la contaminación con *Salmonella* spp. y *S. aureus*, y reducir el número de personas infectadas por estos microorganismos.

Referencias

- Ahmed, J., N. Hiremath y H. Jacob (2016). «Antimicrobial, rheological, and thermal properties of plasticized polylactide films incorporated with essential oils to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*». En: *Journal of Food Science* 81.2, E419-E429. Online: <https://bit.ly/3jpA4wS>.
- Albado Plaus, E., G. Saez Flores y S. Grabiell Ataucusi (2001). «Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)». En: *Revista Medica Herediana* 12.1, 16-19. Online: <https://n9.cl/tawci>.
- Anuar, H. y col. (2017). «Impregnation of cinnamon essential oil into plasticised polylactic acid biocomposite film for active food packaging». En: *Journal of Packaging Technology and Research* 1.3, 149-156. Online: <https://bit.ly/3737hff>.
- Becerril, R., C. Nerín y R. Gómez-Lus (2012). «Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils». En: *Foodborne pathogens and disease* 9.8, 699-705. Online: <https://bit.ly/3urAx7F>.
- Becerril, R. y col. (2007). «Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*». En: *Analytical and bioanalytical chemistry* 388.5, 1003-1011. Online: <https://bit.ly/37bjkHh>.
- Blanot, V. (2017). «Desarrollo de formulaciones envase poli (ácido láctico)(pla) con actividad antimicrobiana para el uso en envasado activo con aplicaciones alimentarias». Tesis de mtría. Universitat Politècnica de València.
- Boskovic, M. y col. (2015). «Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some foodborne microorganisms». En: *Procedia Food Science* 5, 18-21. Online: <https://n9.cl/s9w2m>.

- Bouhdid, S. y col. (2009). «Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil». En: *Journal of applied microbiology* 106.5, 1558–1568. Online:https://bit.ly/3yL2mLe.
- Burgos, N., V. Martino y A. Jiménez (2013). «Characterization and ageing study of poly (lactic acid) films plasticized with oligomeric lactic acid». En: *Polymer degradation and stability* 98.2, 651-658. Online:https://bit.ly/3uuoqY0.
- Burt, S. (2004). «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review». En: *International journal of food microbiology* 94.3, 223–253. Online:https://bit.ly/3ySx4C7.
- Cabrera, C., R. Gómez y A. Zúñiga (2007). «La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación». En: *Colombia médica* 38.2, 149-158. Online:https://bit.ly/3LRBvAm.
- Calo, J. y col. (2015). «Essential oils as antimicrobials in food systems-A review». En: *Food control* 54, 111-19. Online:https://bit.ly/3xDrGIA.
- Cardoso-Ugarte, G., A. López-Malo y M. Sosa-Morales (2016). «Essential oils in food preservation, flavor and safety». En: Academic Press. Cap. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils, págs. 339-347.
- Centers for Disease Control and Prevention (2019). *Burden of Foodborne Illness: Findings - Estimates of Foodborne Illness*.
- (2020). *Outbreaks Involving Salmonella*.
- Chang, S., P. Chen y S. Chang (2001). «Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*». En: *Journal of ethnopharmacology* 77.1, 123-127. Online:https://bit.ly/3rAG1vs.
- Coronel-León, J. y col. (2016). «Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control». En: *Journal of applied microbiology* 120.1, 99-111. Online:https://bit.ly/3MbHZub.
- Cui, H. y col. (2019). «Antibacterial mechanism of oregano essential oil». En: *Industrial Crops and Products* 139, 111498. Online:https://bit.ly/37moznK.
- Do Valle Gomes, M.Z. y M. Nitschke (2012). «Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria». En: *Food control* 25.2, 441-447. Online:https://bit.ly/3vz8fl6.
- Duan, J. e Y. Zhao (2009). «Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in strawberry juice». En: *Journal of food science* 74.3, M131-M137. Online:https://bit.ly/3K1oJ16.
- Echegoyen, Y. y C. Nerín (2015). «Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality». En: *Food Chemistry* 170, 30-36. Online:https://bit.ly/3uT552V.
- Emiroğlu, Z. y col. (2010). «Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties». En: *Meat science* 86.2, 283-288. Online:https://bit.ly/3vrSUJx.
- FDA (2020). *Code of Federal Regulations*.
- Franz, C. y J. Novak (2009). «Handbook of Essential Oils: Science». En: Technology, y Applications. Cap. Sources of essential oils, 217–220.
- Hansen, C. (2007). *Hansen Solubility Parameters*. CRC Press.
- Jahid, I. y S. Ha (2012). «A review of microbial biofilms of produce: Future challenge to food safety». En: *Food Science and Biotechnology* 21.2, 299-316. Online:https://bit.ly/38OosRZ.
- Jamshidian, M. y col. (2010). «Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies». En: *Comprehensive reviews in food science and food safety* 9.5, 552-571. Online:https://bit.ly/3JS8KC7.
- Kwon, J., C. Yu y H. Park (2003). «Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*». En: *Letters in applied microbiology* 37.1, 61-65. Online:https://bit.ly/3xAn2oF.
- Lalanne, A. y col. (2011). «Identification of potential migrants in Poly (lactic acid) packagings». En: *Italian Journal of Food Science* 23, 63-67. Online:https://bit.ly/36tGQyN.
- Lambert, R. y col. (2001). «A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol». En: *Journal of applied microbiology* 91.3, 453-462. Online:https://bit.ly/3Orrw6T.
- Lv, F. y col. (2011). «In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms». En: *Food Research Internatio-*

- nal 44.9, 3057-3064. Online: <https://bit.ly/36uDsDN>.
- Martucci, J. y col. (2015). «Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films». En: *Industrial Crops and Products* 71, 205-213. Online: <https://bit.ly/3L3gT8h>.
- Nostro, A. (2007). «Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms». En: *Journal of Medical Microbiology* 56.4, 519-23. Online: <https://bit.ly/3xEXW84>.
- Oussalah, M. y col. (2006). «Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle». En: *Journal of Food Protection* 69.10, 2364-2369. Online: <https://bit.ly/3jYzCWA>.
- Oussalah, M. y col. (2007). «Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes». En: *Food control* 18.5, 414-420. Online: <https://bit.ly/3jUcVmH>.
- Pazmiño, A., A. Campuzano y K. Marín (2020). «Efecto de inhibición del aceite esencial de orégano en una película biodegradable activa de ácido poliláctico». En: *Revista Bases de la Ciencia. e-ISSN 2588-0764* 5.1, 41-50. Online: <https://bit.ly/3JXWOyL>.
- Pesavento, G. y col. (2015). «Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in beef meatballs». En: *Food Control* 54, 188-199. Online: <https://bit.ly/3jTAN3i>.
- Qin, Y. y col. (2017). «Development of active packaging film made from poly (lactic acid) incorporated essential oil». En: *Progress in Organic Coatings* 103, 76-82. Online: <https://bit.ly/3EL62xH>.
- Rhayour, K. y col. (2003). «The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on Escherichia coli and Bacillus subtilis». En: *Journal of essential oil research* 15.5, 356-362. Online: <https://bit.ly/3xH8O5e>.
- Rostro-Alanis, Ma. y col. (2019). «Chemical composition and biological activities of oregano essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation». En: *Molecules* 24.10, 1904. Online: <https://bit.ly/3Onc63D>.
- Ruellan, A. y col. (2015). «Solubility factors as screening tools of biodegradable toughening agents of polylactide». En: *Journal of Applied Polymer Science* 132.48, 42476. Online: <https://bit.ly/3rEatVF>.
- Salazar, R., S. Domenech y V. Ducruet (2014). «Interactions of flavoured oil in-water emulsions with polylactide». En: *Food chemistry* 148, 138-146. Online: <https://bit.ly/3EzzZkc>.
- Scaffaro, R. y col. (2018). «Antimicrobial additives for poly (lactic acid) materials and their applications: Current state and perspectives». En: *Applied microbiology and biotechnology* 102.18, 7739-7756. Online: <https://bit.ly/3rIj9Kv>.
- Scallan, E. y col. (2011). «Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens». En: *Emerging infectious diseases* 17.1, 7-15. Online: <https://bit.ly/3t9QnU3>.
- Sheng, L. y M. Zhu (2014). «Inhibitory effect of Cinnamomum cassia oil on non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli». En: *Food Control* 46, 374-381. Online: <https://bit.ly/3vQgUX1>.
- Silveira, S. y col. (2012). «Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens». En: *Ciência Rural* 42.7, 1300-1306. Online: <https://bit.ly/3Etqgf7>.
- Sung, S. y col. (2013). «Antimicrobial agents for food packaging applications». En: *Trends in Food Science y Technology* 33.2, 110-123. Online: <https://bit.ly/3rEbvRu>.
- Tauxe, R. y col. (2010). «Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections». En: *International journal of food microbiology* 139, S16-S28. Online: <https://bit.ly/3vx377p>.
- Teixeira, B. y col. (2013). «Chemical composition and bioactivity of different oregano (Origanum vulgare) extracts and essential oil». En: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93.11, 2707-2714. Online: <https://bit.ly/3JZ33m7>.
- Ventura, M. y col. (2011). «Evaluación del rendimiento y la acción conservante en carne de cerdo del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare L.) cultivado en seis zonas altoandinas de Amazonas». En: *Aporte Santiaguino* 4.2, 185-194. Online: <https://bit.ly/3uXfD0Y>.
- WHO (2016). *Datos y cifras sobre las enfermedades de transmisión alimentaria*.
- Yahyaoui, M. y col. (2016). «Development of novel antimicrobial films based on poly (lactic acid) and essential oils». En: *Reactive and Functional*

- Polymers* 109, 1-8. Online:<https://bit.ly/3JYoZxO>.
- Ye, H. y col. (2013). «Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria». En: *Food Control* 34.2, 619-623. Online:<https://bit.ly/3vx9kAb>.
- Zeid, A. y col. (2019). «Preparation and evaluation of antioxidant packaging films made of polylactic acid containing thyme, rosemary, and oregano essential oils». En: *Journal of Food Processing and Preservation* 43.10, e14102. Online:<https://bit.ly/3rFiolw>.