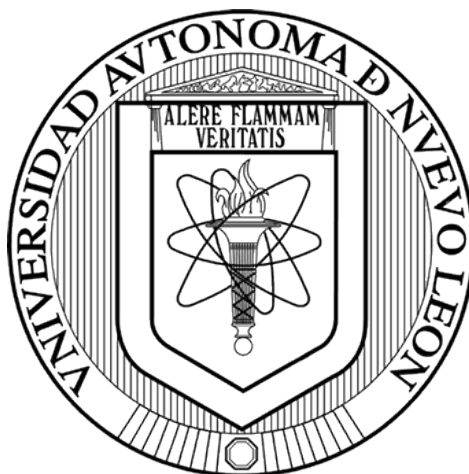


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN *in vitro* E *in silico* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO
DE ACEITES ESENCIALES DE *Lippia graveolens* Y *Thymus vulgaris*
L COENCAPSULADOS EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

POR

ÁNGEL VALENTÍN MORENO TREVIÑO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE
RECURSOS BIÓTICOS**

2025



Evaluación *in vitro* e *in silico* del efecto antimicrobiano de aceites
esenciales de *Lippia graveolens* y *Thymus vulgaris* L
coencapsulados en nanopartículas poliméricas



COMITÉ DE TESIS

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

PRESIDENTE

Dr. Francisco Javier Sánchez Velázquez

SECRETARIO

Dra. Claudia Tomasa Gallardo Rivera

VOCAL

Dr. Catalina Rivas Morales

VOCAL

Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

VOCAL

Dra. Katiushka Arevalo Nino

SUBDIRECTORA DE POSGRADO



COORDINACIÓN
DE POSGRADO



Evaluación *in vitro* e *in silico* del efecto antimicrobiano de aceites
esenciales de *Lippia graveolens* y *Thymus vulgaris* L
coencapsulados en nanopartículas poliméricas



DIRECCIÓN DE TESIS

DR. SERGIO ARTURO GALINDO RODRÍGUEZ
DIRECTOR

DRA. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN
DIRECTORA EXTERNA

OCTUBRE 2025

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Biológicas y su subdirección de posgrado por brindarme todas las facilidades necesarias durante mi formación en la Maestría en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos.



Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por proporcionarme la beca con CVU 1235061 para concluir mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

A mis amados padres, por todo el amor con el que me han educado a lo largo de mi vida y me ha convertido en quien soy.

A los doctores Sergio Galindo y Rocío Alvarez, por guiarme durante mi vida académica y por abrirme las puertas al campo de estudio y laboral que hoy ejerzo con enorme satisfacción.

A mi amada Valeria, por entrar a mi vida y llenarla de felicidad, por ser mi complemento y ser mi motivación para ser mejor.

A mis compañeros de laboratorio, Nancy, Anahí, Romario y Rubí, por acompañarme a lo largo de mi formación académica, por todas sus enseñanzas, por ayudarme a desarrollar las habilidades que hoy poseo y por aguantarme.

A mis muchachos, David, Lalo, Geo, Rigo, Mau y Chof, por su incondicional amistad y llenar mi vida de momentos memorables y alegría.

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

Contenido

RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Contaminación de alimentos por bacterias patógenas	3
2.2 <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Typhimurium	5
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.4 Aditivos sintéticos.....	8
2.5 Aceites esenciales como agentes conservadores naturales.....	8
2.5.1 Aceite esencial de tomillo.....	10
2.5.2 Aceite esencial de orégano	11
2.5.3 Actividad antimicrobiana sinergista entre aceites esenciales	12
2.6 Ensayos <i>in silico</i> para evaluar actividad antimicrobiana de productos naturales.....	15
2.7 Encapsulación de aceites esenciales	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1 Ensayos para la verificación de la integridad de los aceites esenciales	21
6.1.1 Índice de refracción	21
6.1.2 Densidad relativa.....	21

6.1.3 Caracterización química.....	21
6.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales....	22
6.2.1 Ensayo de difusión en pozo	22
6.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida de aceites esenciales libres y coencapsulados	23
6.2.3 Evaluación del sinergismo entre el AEO y el AET mediante la técnica de <i>checkerboard</i>	23
6.3 Obtención y caracterización fisicoquímica de nanopartículas.....	24
6.3.1 Obtención de nanopartículas con aceites esenciales	24
6.3.2 Caracterización fisicoquímica de las Nanopartículas	25
<i>Tamaño e índice de polidispersidad</i>	25
<i>Potencial Zeta (ζ)</i>	25
6.3.3 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) .	25
6.3.4 Contenido de AE en las nanopartículas	26
6.5 Evaluación del desempeño del método con HS-SPME por CG-FID para cuantificar los componentes de seguimiento de los AE en la nanoformulación.....	26
6.5.1 Validación del sistema	26
<i>Linealidad</i>	27
<i>Límite de detección (LD)</i>	27
<i>Límite de cuantificación (LQ)</i>	28
<i>Precisión</i>	28
6.5.2 Validación del método: confirmación del desempeño	28
<i>Selectividad</i>	28
<i>Precisión intradía (repetibilidad)</i>	29
<i>Precisión interdía</i>	29

6.6 Actividad antimicrobiana <i>in silico</i> de la nanoformulación	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 Obtención y caracterización de los aceites esenciales	31
7.2 Análisis cualitativo y cuantitativo de los AE mediante técnicas cromatográficas	33
7.3 Actividad antimicrobiana	38
7.3.1 Ensayo de difusión en pozo	38
7.3.2 Ensayo de microdilución en placa de 96 pocillos	39
7.3.3 Evaluación antimicrobiana de combinaciones de AEO y AET mediante la técnica de <i>checkerboard</i>	40
7.4 Obtención y caracterización fisicoquímica de nanoformulación de los AE coencapsulados	43
7.4.1 Caracterización química de la nanoformulación	44
7.5 Cuantificación de la incorporación del AETO en la nanoformulación.....	47
7.6 Evaluación de desempeño de un método analítico por cromatografía de gases para cuantificar el AE incorporado	48
7.7 Actividad antimicrobiana de la nanoformulación de AE coencapsulados	50
7.7.1 Concentración mínima inhibitoria	50
7.7.2 Actividad antimicrobiana <i>in silico</i> de la nanoformulación	54
8. CONCLUSIÓN.....	57
9. BIBLIOGRAFÍA.....	58
10. PERSPECTIVAS	79
11. ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
I	Uso de los aceites esenciales de orégano y tomillo como agentes antimicrobianos.	13
II	Parámetros fisicoquímicos del anetol (control) y los AE de orégano y tomillo ($\bar{X} \pm DS$, n=3).	32
III	Composición molecular de los aceites esenciales de orégano y tomillo individuales y en una mezcla 1:1 determinadas por CG-FID.	37
IV	Evaluación de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y tomillo mediante la técnica de difusión en pozo ($\bar{X} \pm DS$, n=3, p<0.05).	38
V	Concentración mínima requerida de cada AE para inhibir el crecimiento microbiano.	39
VI	Efecto de la combinación de los aceites esenciales de orégano y tomillo sobre el crecimiento microbiano de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i> (n=3).	42
VII	Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas con los aceites esenciales de orégano y tomillo coencapsulados con el polímero Eudragit RL100 ($\bar{X} \pm DS$, n=3, p<0.05).	44
VIII	Incorporación del carvacrol en las NP de Eudragit RL100 a partir del AETO ($\bar{X} \pm DS$, n=3).	48
IX	Parámetros de validación del sistema y método para cuantificar el carvacrol con <i>HS</i> -SPME por CG-FID.	50
X	Afinidad de los componentes encapsulados por las proteínas seleccionadas utilizando el programa PYRX.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Comparación de los espectros de infrarrojo del AET registrados en 2017 (negro) y el utilizado en 2023 (rojo).	32
2	Comparación de los espectros de infrarrojo del AEO registrado en 2016 (azul) y el utilizado en 2023 (amarillo).	33
3	Cromatograma del aceite esencial de orégano obtenido mediante CG-FID.	34
4	Cromatograma del aceite esencial de tomillo obtenido mediante CG-FID	35
5	Cromatograma de la mezcla de ambos aceites esenciales obtenido mediante CG-FID	36
6	Patrones de inhibición al evaluar combinaciones fraccionadas del CMI de los AE de orégano y tomillo contra <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i> (n=3).	41
7	Espectros de FT-IR de a) Eudragit RL100, b) NP sin AETO, c) AETO y d) NP-AETO.	46
8	Componentes de la mezcla de los aceites esenciales de orégano y tomillo coencapsulados en la formulación de NP de Eudragit RL100.	47
9	Cromatogramas de la curva de calibración del estándar de carvacrol a cinco niveles de concentración (10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL) con HS-SPME por CG-FID.	49
10	Concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas con los aceites esenciales coencapsulados (NP-RL100-AETO) y nanopartículas blanco (NP-RL100) frente a <i>S. Typhimurium</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	52
11	Fórmula desarrollada del monómero que conforma al polímero Eudragit RL100 (Gupta, P. <i>et al</i> 2015)	53
12	Interacciones entre los fitoquímicos encapsulados y las proteínas evaluadas	56

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son aquellos padecimientos ocasionados por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o por sus toxinas. Entre los patógenos comúnmente encontrados, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (ST) y *Listeria monocytogenes* (LM) tienen un interés especial, ya que, ST es el patógeno de mayor prevalencia a nivel mundial en brotes de alimentos con 95 millones de casos anuales. Por otro lado, los brotes de LM son esporádicos, sin embargo, sus afecciones a la salud son de mayor severidad, ya que, el 92 % de los casos requieren de hospitalización, de los cuales, el 20 % se convierten en defunciones. Debido a la preferencia de los consumidores por alimentos libres de los aditivos sintéticos tradicionalmente utilizados, se ha propuesto el uso de los aceites esenciales (AE) de *Lippia graveolens* (AEO) y *Thymus vulgaris* (AET), debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos. No obstante, la aplicación de los AE se ve limitada por sus propiedades fisicoquímicas. Por ello, se planteó la encapsulación de los AE en nanopartículas poliméricas (NP) como una vía de aplicación capaz de protegerlos de factores ambientales. En el ensayo de difusión en pozo, se observaron halos de inhibición del AEO contra ST y LM de 37 ± 2.64 y 27 ± 1.15 mm, respectivamente, mientras tanto, el AET mostró halos de inhibición de 31.3 ± 1.52 mm contra ST y 27 ± 1.5 mm contra LM. Por medio del ensayo de microdilución en placa, se determinó para el AEO una CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$ contra ST y 1,000 $\mu\text{g/mL}$ contra LM, mientras que, el AET tuvo una CMI de 1,000 $\mu\text{g/mL}$ contra ST y 2,000 $\mu\text{g/mL}$ contra LM. A través del ensayo de *Checkerboard* se observó una actividad sinérgica contra ST al obtener un FICI de 0.5, mientras que, contra LM se observó un efecto aditivo al determinar un FICI de 0.75. Mediante la técnica de nanoprecipitación se co-encapsularon los AE en NP de Eudragit RL100 con tamaño de 124.16 ± 4.07 nm, IPD de 0.14 ± 0.005 y potencial Z de 37.7 ± 3.74 mV con un % E de 3.78 y un %EE de 62.89. La actividad antimicrobiana de la formulación se determinó mediante microdilución en placa, obteniendo una CMI de 98.16 $\mu\text{g/mL}$ contra ST y 49.08 $\mu\text{g/mL}$ contra LM. La combinación de los AEO y AET mostró un efecto antimicrobiano sinérgico que incrementa su actividad biológica, a su vez, la co-encapsulación de los AE en NP ofrece una vía de administración que potencializa su actividad biológica.

ABSTRACT

Foodborne diseases are those illnesses caused by the ingestion of food contaminated with pathogenic microorganisms or their toxins. Among the pathogens commonly found, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (ST) and *Listeria monocytogenes* (LM) are of special interest because ST is the most prevalent pathogen worldwide in food outbreaks with 95 million cases per year. On the other hand, LM outbreaks are sporadic, however, their health affections are of greater severity, since 92 % of the cases require hospitalization, of which 20 % become deaths. Due to the preference of consumers for foods traditionally free of synthetic additives, the use of essential oils (EO) of *Lippia graveolens* HKB (AEO) and *Thymus vulgaris* L (AET) are proposed, due to their capacity to inhibit different microorganisms. However, the application of EO is limited by their physicochemical properties. Therefore, the encapsulation of EO in polymeric nanoparticles (NP) was proposed as an application route capable of protecting them from environmental factors. In the well diffusion assay, it was observed inhibition halos of AEO against ST and LM of 37 ± 2.64 and 27 ± 1.15 mm, respectively, while AET showed inhibition halos of 31.3 ± 1.52 mm against ST and 27 ± 1.5 mm against LM. By means of the microdilution plate assay, a MIC of 500 $\mu\text{g/mL}$ against ST and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ against LM was determined for AEO, while AET had a MIC of 1,000 $\mu\text{g/mL}$ against ST and 2,000 $\mu\text{g/mL}$ against LM. Through the Checkerboard assay, a synergistic activity was observed against ST by obtaining a FICI of 0.5, while, against LM an additive effect was observed by determining a FICI of 0.75. Using the nanoprecipitation technique, the EO were co-encapsulated in Eudragit RL100 NP with a size of 124.16 ± 4.07 nm, IPD of 0.14 ± 0.005 and Z potential of 37.7 ± 3.74 mV with a % E of 3.78 and a %EE of 62.89. The antimicrobial activity of the formulation was determined by plate microdilution, obtaining a MIC of 98.16 $\mu\text{g/mL}$ against ST and 49.08 $\mu\text{g/mL}$ against LM. The combination of the AEO and AET showed a synergistic antimicrobial effect that increases their biological activity; likewise, the co-encapsulation of the AEO in NPs offers a route of administration that potentiates their biological activity.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) ocurren por la ingestión de alimento contaminado con bacterias patógenas o, en su defecto, al ingerir sus toxinas. Existen más de 200 ETA conocidas, provocando en el consumidor malestares gastrointestinales comunes como diarrea y vómito, o en casos más severos, choque séptico o hipertermia (Flores y Rojas 2005).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el 30 % de las personas que residen en países en vías de desarrollo han padecido de alguna enfermedad relacionada con el consumo de alimentos y se cuenta con un registro de 2 millones de defunciones por esta causa. Esto las convierte en un área de interés dentro del sector salud por ser una fuente de comorbilidad y mortalidad (World Health Organization 2002). Además, se estima que solo del género *Salmonella* existen 95 millones de casos anualmente, siendo así uno de los géneros bacterianos de mayor interés sanitario (Stanaway *et al.* 2019; Shannon *et al.* 2010).

Los patógenos llegan a los alimentos por mecanismos que dependen de diferentes factores, sin embargo, la contaminación generalmente es debida al agua de riego empleada, materia fecal utilizada como composta para el enriquecimiento de los suelos para siembra y durante el proceso de su comercialización (Contreras-Soto *et al.* 2019).

El alto grado de globalización comercial en la sociedad actual propicia la aparición de brotes por patógenos endémicos de ciertas regiones en lugares donde comúnmente no se encontrarían (Aljamali 2021). Aunado a esta problemática, se encuentra ampliamente reportado que estas bacterias cuentan con mecanismos de resistencia a los antibióticos con los que tradicionalmente eran tratadas, como la penicilina, cefalosporina y carbapenémicos, pertenecientes a la familia de los betalactámicos (Iwu y Okoh 2019), lo cual complica el tratamiento de los padecimientos, extendiendo el interés global por el control de estos microorganismos.

Habitualmente, aditivos sintéticos son agregados a los alimentos para evitar la proliferación de la microbiota nativa o la contaminación por patógenos externos, no obstante, sus afectaciones a la salud han propiciado el rechazo de los alimentos que los

contienen, generando una preferencia por alimentos libres de estos conservadores (Lalani *et al.* 2024). Ante esta situación, los aceites esenciales (AE) han sido propuestos como una alternativa para la inhibición de microorganismos patógenos, ya que, dentro de la producción de metabolitos secundarios necesarios para la supervivencia de los organismos vegetales, se sintetizan una amplia cantidad de moléculas con actividad antimicrobiana y antioxidante (São Pedro *et al.* 2013; Saeed *et al.* 2022).

No obstante, la aplicación de AE se ha limitado debido a sus características fisicoquímicas, como su tendencia a oxidarse ante la presencia de luz, alta volatilidad y baja solubilidad en sistemas acuosos, singularidades que dificultan su empleo (Sundar y Parikh 2023). Actualmente, las nanopartículas poliméricas (NP) son definidas como sólidos en suspensión coloidal que brindan un espacio en su interior para contener, proteger y transportar moléculas con actividad biológica y han sido estudiadas como acarreadores de los AE para solventar las limitantes antes mencionadas (São Pedro *et al.* 2013; Armendáriz-Barragán 2018).

La encapsulación de AE en NP, además de las ventajas ya descritas, funciona como un sistema para la liberación gradual de las moléculas biológicamente activas que permite aumentar su biodisponibilidad. Por otra parte, las características intrínsecas de las NP, como su tamaño nanométrico y densidad de carga superficial, favorecen su internalización en sistemas biológicos celulares e incrementa los puntos de interacción con los mismos (Olea-Flores 2018).

En este contexto, considerando sus propiedades antimicrobianas, se propone el uso de los AE de tomillo (*Thymus vulgris* L) y orégano (*Lippia graveolens* HKB) coencapsulados en NP para potenciar su actividad biológica en el control de bacterias transmitidas por alimentos, tales como *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación de alimentos por bacterias patógenas

Los patógenos transmitidos por alimentos son aquellos virus, bacterias o parásitos capaces de provocar malestares en el individuo cuando se ingiere un alimento que los contenga o, en su defecto, por la ingesta de sus metabolitos secundarios como exotoxinas; particularmente, las condiciones anteriores se distinguen como infecciones o intoxicaciones, respectivamente. La principal fuente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son las bacterias, siendo las más comunes *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Shigella* spp. En particular, *Salmonella* spp toma un lugar sobresaliente por su perseverancia ambiental y su alta incidencia en una gama amplia y diversa de alimentos (Bintsis 2017; Contreras-Soto *et al.* 2019).

Las afectaciones a la salud debido a la presencia de estos patógenos o toxinas se manifiestan con padecimientos que abarcan desde gastroenteritis y deshidratación, hasta diarrea y/o vómito continuo, daño hepático, renal y, en casos extremos, septicemia o enfermedades neurológicas como meningitis o encefalitis. Cabe señalar que el estado del sistema inmunológico de la persona es uno de los principales factores para el establecimiento de la enfermedad (Bari y Yeasmin 2018).

Además del problema en la salud que representan las bacterias patógenas en los alimentos, también mantienen un interés desde una perspectiva socioeconómica, ya que, en 2018 el Banco Mundial informó que en países de bajos y medianos ingresos, las pérdidas monetarias relacionadas a la contaminación de alimentos fueron de 95 mil millones anuales y 15 mil millones gastados para el tratamiento de la enfermedad (Chen *et al.* 2022), estimaciones que coinciden con las obtenidas por Simpson *et al.* 2022 en un periodo de 11 años, en el cual se registraron 9,407 brotes. Además, se espera que el costo relacionado a las muertes por la resistencia a antibióticos de estos microorganismos ascienda de 700,000 a 10 millones dólares anuales (Olaimat *et al.* 2018), siendo una de las problemáticas actuales con una importante proyección a futuro de consideración.

Los microorganismos patógenos causantes de estas enfermedades y pérdidas económicas llegan a contaminar los alimentos a través de diferentes vías, por ejemplo, el agua utilizada para el consumo de los animales y para el riego de los campos de cultivo; otras vías incluyen el equipo usado para su procesamiento y/o la manipulación durante su comercio y preparación (Contreras-Soto *et al.* 2019; Barberies *et al.* 2018; Rosas M 2007).

Entre las alternativas para evitar las infecciones transmitidas por bacterias patógenas, existen métodos como el tratamiento térmico o la adición de conservadores, no obstante, estos procedimientos modifican las características organolépticas de los alimentos, lo cual, podría ser indeseable para algunos consumidores; además, algunos patógenos son capaces de producir toxinas termorresistentes (Regenthal *et al.* 2017).

La presencia de estos microorganismos toma mayor relevancia en los alimentos listos para su consumo, debido a que no requieren de un proceso térmico para su cocción, en el que los patógenos son eliminados. En consecuencia, requieren de procesos más estrictos para evitar su contaminación (Rodríguez *et al.* 2010). Por ejemplo, los alimentos clasificados como “listos para consumir” han tomado popularidad, ya que, evitan la preparación de los alimentos e incluyen embutidos, derivados de la leche y mariscos. Sin embargo, al no requerir de un proceso térmico de cocción que elimine los microorganismos que pudieran encontrarse presentes, el riesgo por el consumo de alimentos contaminados es mayor (Ali A *et al.* 2020).

Actualmente, para prevenir la contaminación por microorganismos, en la industria alimentaria se ha optado por el uso de ingredientes que prolonguen la vida de anaquel de los alimentos como los nitritos, no obstante, este aditivo es poco benéfico para la salud debido a que se le han atribuido propiedades carcinogénicas, ya que es un precursor para la formación de nitrosaminas (Šojić *et al.* 2019). Así mismo, actualmente se ha incrementado el interés por desarrollar una alternativa a los aditivos sintéticos tradicionales basada en la aplicación de antimicrobianos de origen natural.

2.2 *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium

Salmonella es un género de bacilos Gram negativos perteneciente a la familia Enterobacteracea causante de la enfermedad conocida como salmonelosis. Se encuentra distribuida en alimentos de naturaleza variada como vegetales, hortalizas, diferentes tipos de carnes y sus derivados como huevo y leche, ocasionando infecciones en todo el mundo (Agregán *et al.* 2021).

Salmonella enterica es un patógeno zoonótico y uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis. A nivel global, anualmente se le atribuyen 80.3 millones de casos y 155,000 muertes (Gong *et al.* 2022). Para establecer la infección, cuenta con un amplio conjunto de proteínas que le permiten su adhesión al epitelio intestinal, alteraciones en los enterocitos y formación de vacuolas en el tejido para reproducirse. Dicho proceso es gobernado por el sistema de secreción tipo III (Dos Santos *et al.* 2019).

Otra de las preocupaciones por la presencia de *Salmonella* sp contaminando alimentos es su producción de endotoxinas y exotoxinas. El lípido A del lipopolisacárido de membrana es considerado como una endotoxina causante de la respuesta inmune. Por su parte, las exotoxinas pueden ser clasificadas como citotoxinas y enterotoxinas. Las exotoxinas son termolábiles, sin embargo, su interés cobra relevancia en aquellos alimentos etiquetados como listos para su consumo, siendo la enterotoxina Stn, la mejor estudiada (van Asten y van Dijk 2005). Otra de las toxinas de interés son la salmolisina, una toxina de carácter lítico necesaria para el establecimiento de la infección mediante la ruptura de eritrocitos para la obtención de hierro (Sousa *et al.* 2020).

En México, se han registrado 70,000 casos del género *Salmonella*, de los cuales, la especie *enterica* es la más común y a la que se le reconocen más de 2,600 serotipos que, a su vez, se distinguen las serovariedades Typhimurium y Enteritidis como las de mayor importancia. Entre los años de 1984 y 2017, se registró un aumento de casos de fiebre tifoidea de 7,629 a 45,280 mientras, la fiebre paratifoidea pasó de 31,943 a 104,471, de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica donde se

registró que los estados de México con mayor incidencia fueron Sinaloa y Chiapas (Contreras-Soto *et al.* 2019).

Salmonella enterica contamina los alimentos por medio de diferentes vías, incluyendo el suelo contaminado utilizado para la cosecha o pastoreo del ganado, la contaminación por materia fecal durante su manipulación o por medio de agua con el patógeno utilizada para la irrigación de cultivos; particularmente, esta última es el principal mecanismo de transmisión, lo cual a su vez se ve favorecido por su capacidad para adaptación medioambiental (Iwu y Okoh 2019).

Para lograr su establecimiento *Salmonella* spp también es capaz de formar biopelículas, las cuales son aglomerados de células rodeadas por una matriz de polisacáridos y proteínas que la protegen y aíslan del medio, incrementando así su resistencia a tratamientos físicos y químicos. Este fenómeno de adherencia puede ocurrir sobre diferentes sitios de los alimentos ya procesados (como cascarones de huevo) y en áreas de procesamiento como paredes, suelo y superficies de acero (Merino *et al.* 2019; Iwu y Okoh 2019).

Finalmente, cabe señalar que el interés por el control de esta bacteria se debe a la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos que tradicionalmente son utilizados como tratamiento ante la salmonelosis, ya que, se han aislado cepas provenientes de alimentos que son resistentes a estreptomycin, espectinomycin, sulfonamides, neomycin, chloramphenicol, florfenicol, tetracyclines and betalactams (Castro-Vargas *et al.* 2020).

2.3 *Listeria monocytogenes*

Es un patógeno intracelular, Gram positivo causante de ETA y que se transmite por alimentos como carnes y sus derivados, mariscos, vegetales y jugos. Cabe señalar que *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir en temperaturas de refrigeración y con poca disponibilidad de agua (Shamloo *et al.* 2019; Ranjbar y Halaji 2018). Además, esta bacteria puede ser aislada de suelo o muestras de agua, mientras que, en la naturaleza

se desarrolla como un saprófito en la materia vegetal en descomposición (Vázquez-Boland *et al.* 2001).

A pesar de que no se cuenta con un registro establecido de la incidencia de listeriosis, como con otras enfermedades, se estima una incidencia de solo 0.3 infectados por cada 100, 000 habitantes (Castro *et al.* 2022). Sin embargo, su interés recae en la alta severidad de los casos que se establecen, ya que, el 92 % de estos requieren de hospitalización y el 20 % terminan como decesos (WHO 2018). En México, no hay datos suficientes sobre la incidencia de casos de listeriosis. Solo se cuenta con registros de brotes puntuales, en los que puede resaltar la tendencia a incrementar el porcentaje de mortalidad a 50 % (Castañeda-Ruelas *et al.* 2014).

La listeriosis se caracteriza por presentarse en pacientes con algún tipo de inmunosupresión, personas de edad avanzada o mujeres embarazadas. Cuando la enfermedad se logra establecer, puede llegar a provocar desde fiebre y vómito hasta bacteriemia con un 70 % de mortalidad, endocarditis o meningoencefalitis o parálisis del nervio craneal, en los casos más extremos (Vázquez-Boland *et al.* 2001).

Rutinariamente las infecciones por *L. monocytogenes* son tratadas con antibióticos como penicilina, ampicilina y eritromicina, sin embargo, se han encontrado cepas resistentes a antibióticos como tetraciclina y fosfomicina (Marín *et al.* 2021). No obstante, de acuerdo con lo reportado por Abdollahzadeh *et al.* (2016), quien evaluó aislados de *L. monocytogenes* en alimentos, encontró una fuerte resistencia a antibióticos como ampicilina, penicilina y cefotaxima. Entre los factores promotores de esta resistencia se mencionan el uso de desinfectantes a base de sales de amonio cuaternario y triclosán, que propician la selección de cepas mejor adaptadas con bombas de flujo capaces de eliminar sustancias nocivas de su interior (Olaimat *et al.* 2018).

Además, *L. monocytogenes* cuenta con la capacidad de formar biopelícula, la cual le permite adherirse sobre los alimentos y las superficies, además de protegerla de moléculas que son nocivas para ella, como antibióticos y desinfectantes (Tabit 2018)

L. monocytogenes también representa un interés económico dentro del área de alimentos, puesto que, de acuerdo con Ivanek *et al.* (2005) el costo estimado que generan las hospitalizaciones provocadas por el consumo de alimentos contaminados con este patógeno es de 2.333 billones de dólares.

2.4 Aditivos sintéticos

Uno de los grandes retos que ha enfrentado la sociedad a lo largo del tiempo ha sido la conservación y preservación de la calidad de los alimentos. Para lograrlo, se han utilizado diferentes técnicas para retardar su descomposición y/o contaminación, las cuales se basan en disminuir la disponibilidad de agua en el alimento, como la salazón o el ahumado (Pittia y Antonello 2016).

Desde el siglo XIX fue introducida la idea de añadir aditivos sintéticos que evitaran la proliferación de los microorganismos. Desde entonces se ha tenido una basta cantidad de agentes conservadores como el ácido benzoico, el ácido ascórbico, las sales del nitrato y las sales del sulfato. No obstante, estas moléculas han sido relacionadas con algunos efectos adversos debido a que generan compuestos tóxicos por su metabolización. Por ejemplo, los nitratos y el ácido sórbico son precursores de nitrosaminas y 4,5-oxohexanoato, respectivamente, los cuales son moléculas con potencial actividad cancerígena y mutagénica (Carocho *et al.* 2014). El conocimiento del potencial efecto adverso a la salud de dichos conservadores ha propiciado preocupación por parte de los consumidores y ha resultado en una mayor aceptación por los alimentos libres de aditivos (Song y Im 2018).

A pesar de sus efectos adversos contra la salud, actualmente, los aditivos sintéticos siguen siendo necesarios durante el procesamiento de alimentos y lo seguirán siendo hasta encontrar una alternativa que pueda cumplir su función, mínimamente igual a la de ellos.

2.5 Aceites esenciales como agentes conservadores naturales

Ante la necesidad por encontrar nuevos conservadores capaces de retardar o inhibir la proliferación de microorganismos patógenos, aunado a la preferencia del consumidor por productos mínimamente industrializados, los productos naturales (PN), como los extractos y aceites esenciales (AE), han sido propuestos como una alternativa a los

aditivos y conservadores sintéticos utilizados en la actualidad, principalmente, debido a su actividad antimicrobiana contra patógenos del humano (Inobeme y Adetunji 2024).

Los AE son un concentrado de metabolitos secundarios producidos por diferentes órganos de más de 15,500 plantas aromáticas. Son caracterizados físicamente por su naturaleza oleosa, olor intenso y alta volatilidad, mientras que, químicamente se caracterizan por estar compuestos por una amplia cantidad de moléculas (Baptista-Silva *et al.* 2020). Entre los metabolitos sintetizados por las plantas se han encontrado moléculas con actividades que incluyen la larvicida, antitumoral, antiinflamatoria, analgésica y antimicrobiana (Murbach *et al.* 2014).

En particular, los AE pueden contener familias de moléculas con capacidad antimicrobiana como los terpenoides (*e.g.* alcanfor, carvacrol, timol, limoneno, 1,8-cineol) o los fenilpropanoides (*e.g.* flavonoides y ácido fenólico). La disponibilidad de estos compuestos en el AE depende de factores, tanto genéticos, como climatológicos (Aminzare *et al.* 2016).

La composición química de los AE está asociada a su actividad inhibitoria contra microorganismos; además, pueden presentar algunas de las características que describen a un antimicrobiano como potencial agente conservador (Barberis *et al.* 2018):

- 1) Requerir de bajas concentraciones para lograr la inhibición microbiana.
- 2) Tener un bajo costo.
- 3) No alterar las propiedades organolépticas del alimento.
- 4) Poseer un amplio espectro de inhibición.
- 5) No ser tóxico.

La actividad antimicrobiana de los AE no puede asignarse a un solo modo de acción, ya que, poseen moléculas con diferentes grupos funcionales que le otorgan diferentes dianas celulares. Se ha observado que la actividad antimicrobiana de los componentes individuales de los AE puede deberse a factores como su lipofilicidad, debido a que contribuye a su unión con los lípidos membranales, produciendo así un aumento de su

permeabilidad, interrupción de la fosforilación oxidativa, alteraciones de la composición de los lípidos de membrana, interferencia con la captación de glucosa o inactivación de enzimas (Pateiro *et al.* 2021; Angane *et al.* 2022).

Así mismo, se ha observado que los AE tienen una actividad antimicrobiana mayor que cuando sus componentes mayoritarios se evalúan de manera individual. Esto podría deberse a interacciones favorables o sinérgicas entre las moléculas presentes como componentes minoritarios, lo que potencia su efecto inhibitorio frente a los microorganismos (Bassolé & Juliani 2012).

2.5.1 Aceite esencial de tomillo

Thymus vulgaris L. es un subarbusto perteneciente a la familia Lamiaceae que es cultivado ampliamente en el mundo con diferentes fines, destacando su uso alimenticio como sazónador y sus aplicaciones en el mantenimiento de la salud debido a sus actividades farmacológicas como antiséptico, antiinflamatorio, antiviral y antimicrobiano contra patógenos (Mandal y DebMandal 2016). Se han descrito distintos quimiotipos de este arbusto en base al componente mayoritario de su AE, entre los que destacan linalool, borneol, geraniol, sabineno, timol y carvacrol (Satyal *et al.* 2016).

Tardugno *et al.* (2022) evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (AET) frente a cepas de *L. monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y de alimentos. Se encontraron que los componentes mayoritarios presentes en el AE fueron timol, *p*-cimeno y γ -terpineno con porcentajes de abundancia de 41.5, 21.7 y 18.2%, respectivamente; además, encontraron que el AE inhibía el crecimiento bacteriano a concentraciones de 2.5 μ L/mL.

En otro estudio, realizado por Quynh y Trang (2019), se evaluó la actividad antimicrobiana del AE de *T. vulgaris*, el cual contenía timol, cimeno y γ -terpineno. Se encontró una concentración mínima inhibitoria y bactericida de 1.56 μ L/mL frente a un aislado de *Salmonella* Typhimurium.

Por su parte, Monteiro *et al.* (2023) evaluaron la capacidad de AET para inhibir a las bacterias formadoras de biopelícula que, normalmente, se encuentran contaminando

las superficies de líneas de producción de alimentos. Se determinó una CMI y CMB contra *L. monocytogenes* de 0.24 µg/µL y 0.49 µg/µL, respectivamente. Además, para simular de una manera más aproximada las condiciones en que se emplean los desinfectantes, se utilizaron combinaciones de microorganismos. Se evaluó la actividad antimicrobiana del AET contra mezclas de *L. monocytogenes* y otros microorganismos como *Enterococcus faecalis*, *Brochothrix thermosphacta* y *Aeromonas hydrophila*, encontrándose una CMI entre 0.12 y 0.97 µg/µL, dependiendo de la combinación evaluada.

2.5.2 Aceite esencial de orégano

Lippia sp es un género de planta perteneciente a la familia Verbenaceae cultivada en Centro y Sudamérica para su empleo como un tratamiento tradicional para malestares gástricos, antiséptico y antiinflamatorio; además, debido a la presencia de moléculas como carvacrol y timol, se ha comenzado a estudiar su potencial como antimicrobiano (Guimarães *et al.* 2015).

Considerando el uso del orégano como antimicrobiano, Monteiro *et al.* 2021 evaluaron dicha actividad del AE de *Lippia sinusoides* obtenido mediante hidrodestilación. Los componentes mayoritarios del AE se determinaron mediante cromatografía de gases con detector de ionización en llama y correspondieron al timol (77 %), p-cimeno (6 %), y β-cariofileno (5 %); además, se determinó que tenía actividad antimicrobiana efectiva contra *Aeromonas* spp.

Ortega-Nieblas *et al.* (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana del AE de *Lippia palmeri* frente a bacterias transmitidas por alimentos. En el AE se identificaron como componentes mayoritarios al p-cimeno (22 %), timol (21 %) y γ-terpineno (6 %). Al realizar el ensayo de inhibición de crecimiento, los autores reportaron que *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *E. coli* tuvieron una alta sensibilidad a concentraciones de 6.6 mg/mL.

En otro estudio, Ribeiro *et al.* (2021) evaluaron la capacidad del AE de *Lippia origanoides* para inhibir el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistentes a fármacos. El AE fue obtenido mediante hidrodestilación y caracterizado mediante cromatografía de gases donde se determinó

la presencia de 1-8 cineol (35.04 %), carvacrol (11.32 %) y *p*-cimeno (8.53 %) como los componentes mayoritarios del AE. Además, los investigadores determinaron una CMI frente a *S. aureus* de 2.5 µL/mL y de 5 µL/mL frente a *E. coli*.

Por otra parte, Botelho *et al.* (2007) evaluaron la actividad del AE de orégano como antimicrobiano frente a patógenos de la cavidad bucal. El aceite esencial fue obtenido mediante hidrodestilación, del cual, se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas que sus principales constituyentes fueron timol (56.67 %), carvacrol (16.73 %), *p*-cimeno (7.13 %) y timol metil éter (5.06 %). Al determinar la CMI frente a *Streptococcus mutans* se reportó un valor de 5 mg/mL, mientras que, para *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius* se reportó un valor de 10 mg/mL.

2.5.3 Actividad antimicrobiana sinergista entre aceites esenciales

En la medicina tradicional era frecuente recurrir a la combinación de diferentes especies vegetales para tener una mejor respuesta en el tratamiento de algún padecimiento. De la misma manera, se ha observado que los AE poseen una mayor actividad biológica que la de los componentes individuales que lo conforman (Rajčević *et al.* 2022). Así, es probable que la mezcla de AE provenientes de diferentes organismos vegetales provea una mezcla de mayor complejidad y diversidad molecular que derive en un incremento de su actividad como agente antimicrobiano.

Esta estrategia ya ha sido propuesta por Kon y Rai (2012) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de una combinación del AE de tomillo en presencia de otros AE mediante la técnica de difusión en disco. Se encontró un aumento en el diámetro de los halos de inhibición y una concentración de inhibición fraccional (FIC) menor a 0.5 en presencia de los AE de *Cinnamomum zeylonicum*, *Aniba rosaeodora* y *Melissa officinalis*.

Tabla I. Uso de los aceites esenciales de orégano y tomillo como agentes antimicrobianos.

Aceite esencial	Microorganismo	Concentración antimicrobiana	Referencia
Orégano	<i>E. coli</i>	4 mg/mL	Granataa <i>et al.</i> 2018
	<i>S. aureus</i>	4 mg/mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	2 mg/mL	
	<i>Aeromonas</i> sp.	1.3 mg/mL	Monteiro <i>et al.</i> 2023
	<i>S. aureus</i>	2 µg/mL	Ribeiro <i>et al.</i> 2021
	<i>E. coli</i>	5 µg/mL	
	<i>S. mutans</i>	5 mg/mL	Botelho <i>et al.</i> 2017
	<i>S. mitis</i>	10 mg/mL	
	<i>S. sanguis</i>	10 mg/mL	
	<i>S. salivarius</i>	10 mg/mL	
Tomillo	<i>S. Typhimurium</i>	6.6 mg/mL	Ortega-Niebla <i>et al.</i> 2011
	<i>L. monocytogenes</i>	6.6 mg/mL	
	<i>S. aureus</i>	0.29 mg/mL	Machado <i>et al.</i> 2014
	<i>L. monocytogenes</i>	0.58 mg/mL	
	<i>L. innocua</i>	0.58 mg/mL	
	<i>E. coli</i>	1.17 mg/mL	
	<i>S. cholersuis</i>	9.37 mg/mL	
	<i>P. aeruginosa</i>	9.37 mg/mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	2.5 µl/mL	Tardugno <i>et al.</i> 2022
	<i>L. monocytogenes</i>	0.24 µg/µL	Monteriro <i>et al.</i> 2023
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	1.56 µL/mL	Quynh y Trang 2019

De la misma manera, Bag y Chattopadhyay (2015) evaluaron combinaciones de AE extraídos de diferentes especies frente a bacterias comúnmente encontradas en alimentos. Se determinó una actividad sinergista entre los AE de cilantro y comino cuando se probaron frente a *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, mientras que, al evaluar la combinación frente a *S. Typhimurium* se observó una interacción de tipo aditivo.

Se han propuesto varios modelos para explicar por qué una combinación de moléculas (e.g. aceites esenciales) tiene una actividad antimicrobiana mayor que cuando se evalúan de manera separada (Caesar y Cech 2019), estos incluyen:

1. Farmacodinámicos: interacciones con múltiples sitios de acción (*multi-target*) hacia distintas enzimas de vías metabólicas necesarias para la supervivencia del microorganismo.
2. Farmacocinéticos: ciertos componentes mejoran la biodisponibilidad del resto, mejorando su actividad.
3. Inhibición simultánea de mecanismos de defensa: evita que la bacteria recurra a mecanismos de resistencia para sobrevivir a la exposición de antibióticos.

El empleo de más de un agente antimicrobiano pretende: I) abarcar un mayor espectro contra diferentes microorganismos, II) reducir la posibilidad de resistencia III) reducir la cantidad necesaria de cada uno de ellos para tener el efecto que tendrían originalmente de manera individual y, por ende, IV) distanciarse de las dosis de toxicidad donde puedan presentarse efectos adversos (Moody 2004).

En este contexto, se ha propuesto el uso de AE, solos o combinados con algún otro antimicrobiano, como conservadores naturales de alimentos. Sin embargo, las características fisicoquímicas de los AE son una limitante que dificulta su aplicación debido a su alta volatilidad a temperatura ambiente, su naturaleza hidrofóbica y su tendencia a oxidarse por factores ambientales como luz, presencia de oxígeno y pH (Zhu Y *et al.* 2021). Así, es necesario considerar su formulación en un vehículo que haga viable su aplicación para aprovechar sus actividades antimicrobianas y antioxidantes en la conservación de alimentos.

2.6 Ensayos *in silico* para evaluar actividad antimicrobiana de productos naturales

En los últimos años, los ensayos *in silico* han ganado popularidad como una herramienta inicial para evaluar la actividad antimicrobiana de nuevas moléculas. Estos métodos aprovechan la capacidad de los sistemas computacionales para predecir posibles interacciones biológicas entre la molécula propuesta y su diana biológica, con el fin de anticipar los efectos que podrían manifestarse *in vitro* o *in vivo*. Dichas interacciones se determinan en función de las propiedades fisicoquímicas tanto de los ligandos como de las dianas biológicas involucradas (Dipa et al., 2025; Danel et al., 2023).

Como se mencionó anteriormente, la actividad antimicrobiana de los AE ha sido asociada al daño en las estructuras celulares presentes en la membrana del microorganismo (Swamy *et al.* 2016). Este hecho ha sido aprovechado para evaluar los componentes fitoquímicos presentes en los extractos naturales frente a dianas celulares de importancia metabólica del microorganismo y predecir una posible interacción que afecte su función y viabilidad (Alexa V *et al.* 2024).

En el caso de *S. Typhimurium*, existen diversas proteínas que han sido objeto de estudio por su vitalidad metabólica. Por ejemplo, el complejo BAM (del inglés *β -barrel assembly machinery*) es un conjunto de proteínas necesarias para el correcto plegamiento de otras proteínas transmembranales. Por lo tanto, su incorrecto funcionamiento influye directamente sobre la viabilidad celular, lo que le ha convertido en una diana para el desarrollo de nuevos fármacos (Xu *et al.* 2023). Así mismo, la proteína OmpC permite el flujo de moléculas a través de la membrana celular, siendo esencial para la supervivencia de las bacterias gram negativas (Valero N *et al.* 2020).

Por otra parte, *L. monocytogenes* presenta en su membrana proteínas del complejo ATP-asa necesarias para conservar el pH en equilibrio en ambos lados de la membrana celular, siendo uno de sus factores de patogenicidad al permitirle adaptarse a inclemencias por acidez del medio circundante (Cotter P *et al.* 2000). Otra proteína membranar de interés para su supervivencia es la manosa fosfotransferasa, encargada de la asimilación de carbohidratos y su fosforilación (Jeckelmann y Erni 2000).

2.7 Encapsulación de aceites esenciales

Las nanopartículas poliméricas (NP) son suspensiones de sólidos coloidales de tamaño comprendido entre 100 y 400 nanómetros (nm) que funcionan como un sistema de administración donde las moléculas con actividad biológica son incorporadas al interior de la NP, protegiéndolas así de factores ambientales como la oxidación por luz, oxígeno, pH, y agua, entre otros (Espinosa-Carranza 2021).

De acuerdo con Zielińska *et al.* (2020) en la encapsulación de AE el polímero formador de las NP puede ser de diferente material dependiendo de la naturaleza y propiedades del AE a encapsular y del sitio en que se va a aplicar. Por ejemplo, algunos carbohidratos (*e.g.* alginato o quitina) y proteínas (*e.g.* albúmina) han sido usados para la obtención de NP (Ribeiro-Santos *et al.* 2017); así mismo, pueden utilizarse polímeros sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), poli- ϵ -caprolactona (PCL), polietilenglicol (PEG) y polimetilacrilatos (Eudragit®).

La encapsulación de moléculas con actividad biológica en NP se convierte en una alternativa atractiva debido a que establece ventajas frente a formas de dosificación convencionales, ya que, I) por su tamaño nanométrico pueden internalizarse en células, además, II) su gran área superficial le permite tener una mayor superficie de contacto con mayor biodisponibilidad y estabilidad (Hami *et al.* 2021), III) la densidad de carga en su superficie, dada por la composición del polímero, también permite darle cierta especificidad al sitio de aplicación deseado, ya que, por medio de interacciones electrostáticas o de van der Waals, puede existir mayor atracción hacia el sistema biológico de interés (Olea-Flores 2018).

En particular, la nanoencapsulación de un AE para su aplicación en alimentos potencialmente, tiene las siguientes ventajas: I) hace viable su aplicación y puede mejorar su actividad antimicrobiana, II) al aislar al AE en su interior, impide que se modifiquen las propiedades organolépticas de la matriz alimenticia, III) al liberar al AE de manera controlada se reduce la concentración para mantener su actividad biológica, sin sobrepasar los límites permisibles, y IV) aumenta la “solubilidad” de aditivos de naturaleza lipídica que no se pueden incorporar homogéneamente en medios acuosos (Pateiro *et al.* 2021).

En este contexto, Froiio *et al.* (2019) formularon NP del polímero RS100 cargadas con los AE de *Citrus sinensis* y *Citrus bergamia*, con tamaño de 150 nm y porcentajes de encapsulación superiores al 50 y 20, respectivamente. En todas las formulaciones probadas, empleando desde 5 hasta 400 mg de AE, se determinó una máxima mortalidad antimicrobiana frente a *E. coli* de 90 %.

En otro estudio, Jummes *et al.* (2020) evaluaron la capacidad antimicrobiana del AE de *Cymbopogon martinii* encapsulado en NP de PCL. Se obtuvieron NP con un diámetro de 282 nm y una eficiencia de encapsulación del 99 %. Al evaluar la actividad antimicrobiana contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, los investigadores reportaron que la nanoformulación obtenida tuvo una actividad antimicrobiana considerable, al presentar halos de inhibición de 10-11 y 6-7 mm, respectivamente.

Así mismo, Granata *et al.* (2018) encapsularon AE de *Thymus capitatus* y *Origanum vulgare* en nanopartículas de PCL, mediante la técnica de nanoprecipitación, con tamaños de 171 y 175 nm, respectivamente; además, la eficiencia de encapsulación en ambas formulaciones fue mayor al 90 %. En cuanto a su actividad antimicrobiana contra los patógenos de alimentos *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, se reportó que ambos AE tuvieron CMI menores cuando se encontraban encapsulados que cuando se encontraban libres. Este comportamiento se atribuyó a una mayor actividad biológica de los componentes presente en mayor abundancia.

Bajo este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los AE de tomillo y orégano coencapsulados en NP de Eudragit RL100 para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos presentes en alimentos como *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son padecimientos provocados por el consumo de alimentos contaminados, siendo los microorganismos una de las principales causas. Entre los patógenos comúnmente encontrados en los alimentos, *Salmonella enterica* destaca por su alta incidencia alrededor de todo el mundo, ocasionando salmonelosis tifoidea o no tifoidea y, dependiendo del estado del sistema inmunológico de la persona, puede llegar a ser mortal. Por otra parte, *Listeria monocytogenes* es un patógeno con brotes menos frecuentes, sin embargo, cuando la listeriosis se establece los porcentajes de mortalidad son más altos. Los aceites esenciales son una mezcla de metabolitos secundarios producidos por las plantas aromáticas. Están constituidos por diferentes moléculas, a las cuales se les atribuyen diferentes actividades biológicas que incluyen su capacidad para inhibir el crecimiento microbiano. No obstante, las características como su volatilidad y su poca solubilidad en agua limitan su aplicación en alimentos. Ante esta problemática, las nanopartículas poliméricas se consideran una alternativa como vehículo para la dosificación de aceites esenciales. Además, las nanopartículas poliméricas presentan características que mejoran la aplicación de los aceites esenciales como un tamaño nanométrico que facilita su internalización en la célula diana y una densidad de carga que le permite interactuar de mejor manera con las mismas; así mismo, puede liberar de manera controlada al activo encapsulado para aumentar su eficacia. Por lo tanto, esta investigación presenta la aplicación de los aceites esenciales de orégano y tomillo coencapsulados en nanopartículas poliméricas como una potencial alternativa a los conservadores tradicionales para evitar la proliferación de microorganismos patógenos presentes en alimentos.

4. HIPÓTESIS

La coencapsulación de los aceites esenciales de *Lippia graveolens* HKB y *Thymus vulgaris* L. en nanopartículas poliméricas, incrementará su potencial antimicrobiano contra *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener una nanoformulación con los aceites esenciales de *Lippia graveolens* y *Thymus vulgaris* L. coencapsulados y determinar su actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y *Listeria monocytogenes*.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar fisicoquímicamente los aceites esenciales de *Lippia graveolens* HKB y *Thymus vulgaris* L.
2. Formular los aceites esenciales de *Lippia graveolens* HKB y *Thymus vulgaris* L. coencapsulados en nanopartículas poliméricas.
3. Caracterizar las formulaciones de nanopartículas poliméricas en tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z.
4. Desarrollar un método analítico para determinar el porcentaje de encapsulación de los AE en las formulaciones de nanopartículas con los AE coencapsulados.
5. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in silico* de la formulación de NP con AE coencapsulados frente a *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ensayos para la verificación de la integridad de los aceites esenciales

El AE de tomillo fue previamente obtenido por Piña-Barrera (2019), mientras que, el AE de orégano fue obtenido por González-Moreno (2024). Para ello, se utilizaron las hojas y tallos frescos de cada una de las especies vegetales, los cuales fueron sometidos a una hidrodestilación con un adaptador tipo Clevenger. Los AE recuperados fueron deshidratados con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y almacenados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones de oscuridad para su posterior uso y análisis.

6.1.1 Índice de refracción

Se llevó a cabo en un refractómetro (AntonPaar® modelo Abbermat 300) calibrado con agua destilada a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y empleando anetol grado CG como control, siguiendo el procedimiento descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), método general de análisis 0741.

6.1.2 Densidad relativa

Se utilizó un densímetro (AntonPaar® modelo DMA35) empleando anetol grado CG como control. El parámetro fue determinado a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de acuerdo con lo señalado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos método general de análisis 0251.

6.1.3 Caracterización química

La determinación de la composición de los AE se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotómetro de masas (GC-MS, 6890N, Agilent Technologies). Se utilizó una columna capilar HP-5MS (5 % Fenil)-metilpolisiloxano de $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ y una energía de ionización de 70 eV .

Para el programa del horno se siguieron las condiciones descritas por Silva-Flores (2019) con un programa de temperatura que inició a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante 9 min, después, se incrementó la temperatura ($3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$) hasta $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante 10 min. Posteriormente se incrementó la temperatura ($10\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$) hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ para finalmente aumentar ($3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$) hasta $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Se utilizó helio (99.999 %, INFRA) como gas acarreador con un flujo de 0.5 mL/min . La temperatura de

ionización del detector fue de 250 °C mientras que la temperatura del inyector fue de 250 °C. Se inyectó un volumen de 2 µL de los AE solubilizados en diclorometano a una concentración de 2 mg/mL.

La composición del AE obtenido se determinó al compararlos con la biblioteca del NIST (National Institute of Standards and Technology), índice aritmético y porcentaje de Kovats (Adams, 2007).

Posteriormente, mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama, con una columna capilar (HP-5MS, Agilent Technologies, 5 % de fenilmetilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm, Agilent J&W) y bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, se obtuvieron los porcentajes de abundancia (% A) de cada uno de los componentes y se establecieron como componentes de seguimiento aquellos que se encontraron en mayor abundancia.

6.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

6.2.1 Ensayo de difusión en pozo

Se llevó a cabo mediante la técnica del pocillo de acuerdo con lo mencionado por el CLSI (1999), con ligeras modificaciones. El ensayo consistió en inocular el cultivo de *S. Typhimurium* (ST) ATCC 13311 o *Listeria monocytogenes* (LM) ATCC 19111 mediante un hisopo estéril sobre la superficie de una caja Petri con agar Müller–Hinton (MH) ajustadas a 10⁸ UFC/mL según la escala de McFarland. Posteriormente, utilizando un sacabocados, se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro, en los cuales se agregaron 15 µL de los AE. Las placas se llevaron a una pre-incubación de 2 h a 4 °C para permitir la difusión de los AE y, posteriormente, ser incubaron durante 24 h a 37 °C. Se midieron los halos de inhibición alrededor del pocillo para clasificar la sensibilidad de las cepas a los AE. Para la prueba se utilizó agua estéril y una solución de ampicilina al 1 % (v/v) como controles negativo y positivo, respectivamente.

6.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida de aceites esenciales libres y coencapsulados

Cada AE se incorporó en agua destilada junto con Tween 20 al 1.5 % (v/v), asistido por sonicación, para obtener una solución inicial de 4,000 µg/mL y, a partir de esta, se realizaron diluciones seriadas 1:2 para determinar la concentración mínima a la cual el AE inhibe el crecimiento bacteriano (CMI).

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con lo establecido por la CLSI (1999). Se ajustó una suspensión de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en caldo Müller-Hinton a un valor de 0.5 en la escala de McFarland (D.O. de 0.08 – 0.1 a 600 nm) que, posteriormente, fue diluida a una concentración de 10⁵ UFC/mL para su empleo en el ensayo. Una vez obtenida la concentración de microorganismos deseada, se inocularon en los pocillos de una microplaca que contenía las diluciones seriadas del AE, cada microplaca se incubó durante 24 h a 37° C. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 10 µL de rezasurina como agente revelador de la viabilidad celular en cada pocillo, determinándose la CMI como la concentración a la cual no se observó un viraje de azul a rosado, indicando la ausencia de células metabólicamente activas. De acuerdo con los resultados, las concentraciones inhibitorias más bajas se inocularon en una caja Petri con medio de cultivo y se incubaron bajo los criterios anteriormente mencionados, determinándose como la concentración mínima bactericida (CBM) aquella concentración a la cual no se observó la formación de colonias. Se utilizó ampicilina como control positivo, mientras que, como control negativo se utilizó una solución de Tween 20 al 1 %.

Una vez obtenida y caracterizada la nanoformulación, su actividad antimicrobiana se evaluó por este mismo método.

6.2.3 Evaluación del sinergismo entre el AEO y el AET mediante la técnica de *checkerboard*

Una vez determinada la CMI de cada uno de los AE de manera individual, se procedió a evaluar la interacción que existía al combinar los AE en distintas proporciones de acuerdo con el diseño del método de *Checkerboard*, según lo reportado por Leber 2016,

y evaluar si estas combinaciones actúan de manera sinérgica, aditiva o antagónica para la inhibición del crecimiento bacteriano. Se agregó resazurina después del periodo de incubación para visualizar el patrón de inhibición presente en la microplaca y calcular su Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI del inglés *Fractional Inhibitory Concentration Index*), a partir de calcular su Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC del inglés *Fractional Inhibitory Concentration*), utilizando las Fórmulas 1 y 2, respectivamente.

$$FICI = FIC AEO + FIC AET$$

Fórmula 1

Donde:

$$FIC AEO = \frac{CMI AEO \text{ en presencia AET}}{CMI AEO}$$

Fórmula 2

$$FIC AET = \frac{CMI AET \text{ en presencia de AEO}}{CMI AET}$$

Fórmula 3

El criterio para determinar la actividad de la combinación como sinérgica, aditivo o antagonista; fue que el valor del FICI resultara ≤ 0.5 , de $1 - 4$ o ≥ 4 , respectivamente (Leber A, 2020).

6.3 Obtención y caracterización fisicoquímica de nanopartículas

6.3.1 Obtención de nanopartículas con aceites esenciales

Para la elaboración de los lotes de NP se utilizó la técnica de nanoprecipitación desarrollada por Fessi *et al.* (1989). Se preparó una fase orgánica con el polímero Eudragit RL100 (RL100) y una mezcla de ambos AE en proporción 1:1. La fase

orgánica se inyectó en una fase acuosa. Una vez obtenidas las NP, el solvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida en un rotavapor (Yamato RE301).

6.3.2 Caracterización fisicoquímica de las Nanopartículas

Tamaño e índice de polidispersidad

Se estableció como referencia un tamaño diametral inferior a 200 nm debido a que es el tamaño con mejor interacción en aplicaciones a sistemas biológicos (Dolai 2021). Para el índice de polidispersidad (IPD) se tomó como referencia un valor menor a 0.2, ya que, este parámetro es un indicador de que el tamaño de la población de nanopartículas en la suspensión es homogéneo, es decir, que las NP formadas tienen tamaños semejantes (Danaei 2018). Ambos parámetros se midieron mediante dispersión dinámica de luz en un analizador de partículas (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments).

Potencial Zeta (ζ)

Es un indicador de la densidad de carga eléctrica efectiva existente en la superficie de las partículas y que ocurre por desplazamiento los iones del medio circundantes a la NP. El potencial Zeta sirve para predecir la estabilidad de la suspensión al medir la magnitud con la cual las partículas se repelen entre sí (Selvamani 2019). El potencial Z se determinó mediante la técnica de microelectroforesis de Láser Doppler en un analizador de partículas (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments).

6.3.3 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La formulación y sus componentes fueron analizados mediante un espectrómetro FT-IR (UATR, Perkin Elmer, USA). En el caso de los AE, se utilizó como un control de calidad al compararse los espectros generados el día de su obtención con los generados hasta su utilización. Se llevó a cabo en la región de infrarrojo medio (4,000 – 400 cm⁻¹), colocando las muestras sobre el accesorio de refracción total atenuada (ATR), realizando 64 barridos mediante el accesorio universal de punta de diamante.

6.3.4 Contenido de AE en las nanopartículas

Para su determinación se llevó a cabo la técnica de microextracción en fase sólida en modalidad *head Space* (HS-SPME) utilizando una fibra de carboxeno/polidimetilsiloxano en base a lo establecido previamente en el grupo de trabajo (Lugo-Estrada et. al 2019). Se analizó cada AE por separado y en mezcla por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID) de acuerdo con lo establecido por Lugo-Estrada (2018) y Piña-Barrera (2018). Por otro lado, se analizaron 3 lotes distintos de NP con AE coencapsulados por duplicado con el método validado en la sección 6.5. Se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE), es decir, el porcentaje del componente de seguimiento incorporado en la formulación del total disponible en el AE (Fórmula 4) y el porcentaje de encapsulación (Fórmula 5), el cual corresponde al porcentaje del componente de seguimiento del AE con respecto al polímero en las nanopartículas.

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulacion } (\% EE) = \frac{\text{mg del componente encapsulado}}{\text{mg del componente en el AE total}}$$

Fórmula 4

$$\% \text{ Encapsulación } (\% E) = \frac{\text{mg del componente encapsulado}}{\text{mg de polimero} + \text{mg del componente en el AE total}}$$

Fórmula 5

6.5 Evaluación del desempeño del método con HS-SPME por CG-FID para cuantificar los componentes de seguimiento de los AE en la nanoformulación

6.5.1 Validación del sistema

Para validar el sistema se preparó una solución metanólica con el estándar de carvacrol (componente de seguimiento) y se emplearon 5 niveles de concentración de carvacrol (10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL). El análisis cromatográfico fue por CG-FID con HS-SPME en base al método previamente desarrollado por Espinosa-Carranza 2022. Brevemente, se inició a 60 °C, se incrementó la temperatura (5 °C / min) hasta 116 °C,

se mantuvo por 1 min., seguida de un incremento de temperatura (1 °C / min) hasta 118 °C para finalmente aumentar (45 °C / min) hasta 280°C y se mantuvo por 4 min. El inyector y detector se utilizaron a una temperatura de 250 °C en modo *splitless*. Como gas acarreador se utilizó Helio (pureza de 99.9 %) a un flujo de 1.5 mL/min. Se determinaron los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación bajo los criterios establecidos en la Guía para la Validación de Métodos Fisicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P058, 2011).

Linealidad

Se emplearon 5 niveles de concentración del estándar de carvacrol (10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL) por triplicado para determinar el nivel de concordancia entre la respuesta analítica obtenida y las concentraciones del estándar de carvacrol. La linealidad se evaluó mediante el análisis del coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r), indicadores del nivel de asociación entre los puntos graficados cuyos valores deben ser mayores a 0.99 (CCAYAC-P058, 2011).

Límite de detección (LD)

Para establecer la concentración más baja del componente que el sistema puede detectar, los valores obtenidos mediante la regresión lineal se procesaron mediante la Fórmula 6:

$$LD = \frac{(3.3)(SB_o)}{m}$$

Fórmula 6

Donde:

SB_o = desviación estándar de la ordenada al origen;

m = pendiente de la recta.

Límite de cuantificación (LQ)

Para establecer la concentración más baja que puede ser cuantificada de manera confiable con el método desarrollado, los valores de la ordenada al origen y la pendiente fueron procesados mediante la Fórmula 7:

$$LQ = \frac{(10)(SB_o)}{m}$$

Fórmula 7

Donde:

SB_o = desviación estándar de la ordenada al origen;

m = pendiente de la recta.

Precisión

La capacidad del sistema para generar picos cromatográficos con valores de área bajo la curva constantes se evaluó mediante la determinación de la desviación estándar relativa (DER %) con los estándares de la curva de calibración

$$\% DER = \frac{S}{X} \times 100$$

Fórmula 8

Donde:

S = desviación estándar;

X = promedio de área bajo la curva

6.5.2 Validación del método: confirmación del desempeño

El desempeño del método se evaluó mediante la determinación de la selectividad, la precisión intradía y la precisión interdía:

Selectividad

Se evaluó con el análisis por quintuplicado de nanopartículas blanco, es decir, sin la mezcla de aceites esenciales. Se analizaron los cromatogramas para verificar la

ausencia de señales que puedan interferir con el componente de seguimiento en las nanopartículas.

Precisión intradía (repetibilidad)

Se realizó el análisis por sextuplicado de lotes de NP cargadas con los AE coencapsulados, en igualdad de condiciones cromatográficas que los análisis anteriores, el mismo día y por el mismo analista. Se determinó el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) del tiempo de retención y del área bajo la curva de las señales correspondientes al carvacrol. Se consideró como criterio de aceptación un valor menor al 15% (Williams y Buica 2020, Castellanos-Molina 2007).

Precisión interdía

Se realizó el análisis por sextuplicado de lotes de NP cargadas con los AE coencapsulados, en igualdad de condiciones cromatográficas que los análisis anteriores, en días no consecutivos y el mismo analista. Se determinó el % DER de las áreas bajo la curva y tiempo de retención de la señal correspondiente al carvacrol, tomando como criterio de aceptación un valor menor al 15% (Williams y Buica 2020, Castellanos-Molina 2007).

6.6 Actividad antimicrobiana *in silico* de la nanoformulación

La actividad antimicrobiana de los componentes encapsulados fue evaluada mediante un estudio de *docking molecular*. Para lo cual, las estructuras de los metabolitos secundarios encapsulados fueron obtenidas de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y refinadas mediante el programa Avogadro (<https://avogadro.cc/>), utilizando un campo de fuerza universal (UFF) de 4 pasos para finalmente convertir los archivos a formato.Mol2. Las proteínas membranales manosa fosfotransferasa y la ATP-asa de *L. monocytogenes* y la porina transmembranal OmpC y BamA de *S. Typhimurium* fueron obtenidas del Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) con los códigos 7VLX, 6ZHF, 5OR1 y 3UPG, respectivamente. La energía de afinidad (ΔG) por estas proteínas fue evaluada utilizando el programa PYRX 0.8–Virtual Screening Tool (<https://pyrx.sourceforge.io/>) con un *Grid* de dimensiones maximizadas y sin precisar una región en específico de la proteína,

considerando para esta prueba que, a menor energía de afinidad existe mayor afinidad por la proteína. Finalmente, se utilizó el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) para visualizar las interacciones existentes entre los metabolitos presentes en el AE y las proteínas membranales de los microorganismos evaluados (Hossain, M *et. al* 2025).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención y caracterización de los aceites esenciales

Los AE fueron obtenidos previamente en el grupo de trabajo a partir del material vegetal mediante la técnica de hidrodestilación. Gonzalez-Moreno (2024) reportó un porcentaje de rendimiento de 5.32 % (p/p) para el AE de orégano (AEO), mientras que, para el aceite esencial de tomillo (AET), Piña-Barrera (2019) reportó un porcentaje de rendimiento de 0.37 % (p/p). Ambos valores se encontraron dentro de los porcentajes normalmente reportados que están entre 0.05 y 18 % (Rathore *et al.* 2023).

El rendimiento del AEO fue más elevado que el reportado por otros autores como Rocha-Uribe *et al.* (2024) quienes obtuvieron un de rendimiento de 4.1 %, mientras que, Salgueiro *et al.* (2003) obtuvieron un rendimiento de 3.5 %. De la misma manera, el rendimiento obtenido para el AET difiere del encontrado en la literatura, ya que, Borugă *et al.* (2014) obtuvieron un rendimiento de AET de 1.25 % y Gedikoğlu *et al.* (2019) un rendimiento de 1.59 %.

Las discrepancias en los valores de rendimiento están asociadas a las condiciones ambientales en las que se desarrollan las especies vegetales, así como, al órgano vegetal del que se extrajo, la temporada de colecta y la región de cultivo (Yavari *et al.* 2010; Geng *et al.* 2011; Yuan *et al.* 2016).

En el presente estudio, se realizó la caracterización física de los AEO y AET mediante las mediciones de los parámetros de densidad relativa e índice de refracción (Tabla II), conforme a lo estipulado en los Métodos de Medición Generales de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, para evaluar la integridad de su composición desde su obtención hasta su uso en el presente trabajo.

Así mismo, se llevó a cabo un análisis de los AE mediante espectroscopia de infrarrojo con la finalidad de compararlos con los registrados en fechas cercanas a su obtención (Figuras 1 y 2).

Tabla II. Parámetros fisicoquímicos del anetol (control) y los AE de orégano y tomillo ($\bar{X} \pm DS$; n=3).

Evaluación Aceite esencial	Parámetro			
	Índice de refracción *		Densidad relativa (g/mL)	
	Obtenido	Referencia	Obtenido	Referencia
Control⁴	1.558±0.000	1.557±0.000 ³	0.984±0.003	0.983±0.005 ³
Orégano	1.502±0.000	1.510±0.001 ¹	0.922±0.005	0.947±0.040 ²
Tomillo	1.495±0.000	1.494±0.002 ¹	0.940±0.003	0.914±0.004 ²

* Valor adimensional, ¹ Ruiz-González et al. 2019; ² Zamora-Mendoza 2022; ³ FEUM y ⁴ Anetol

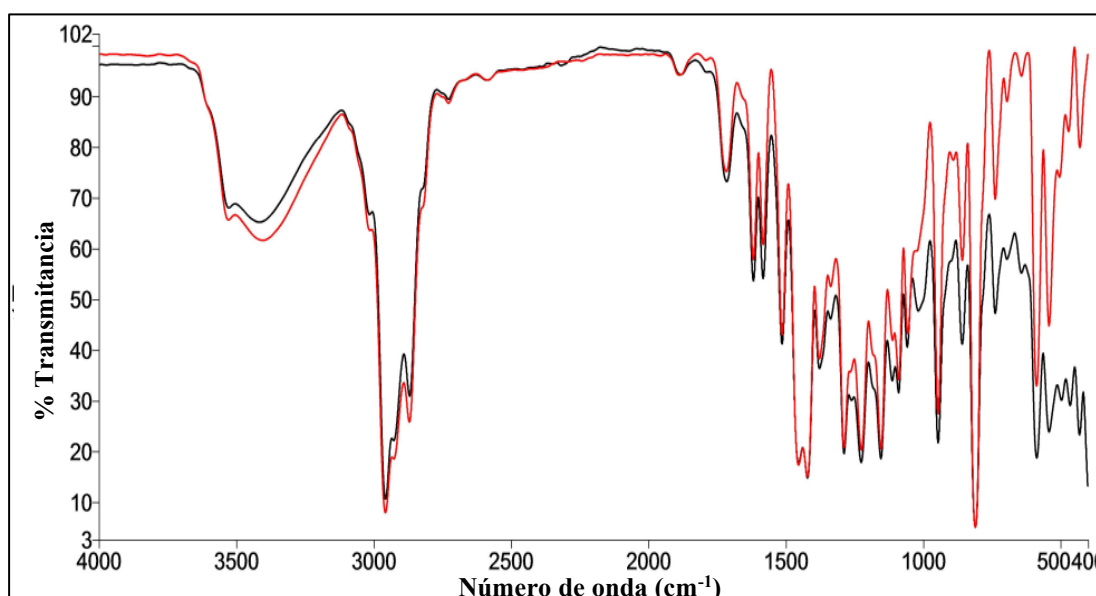


Figura 1. Comparación de los espectros de infrarrojo del AET registrados en 2017 (negro) y el utilizado en 2023 (rojo).

Al observar que no existe diferencias considerables entre los espectros obtenidos desde el día de su extracción, puede inferirse que los AE se mantienen libres de contaminaciones y/o productos de degradación. Particularmente, en el caso de metabolitos secundarios, como los terpenos, a medida que sufren procesos de oxidación, las señales de transmitancia tienden a aumentar su intensidad, por lo que, mantenerlos de manera constante durante el tiempo de almacenamiento garantiza que los AE se han mantenido íntegros desde su extracción (Turek y Stintzing 2013).

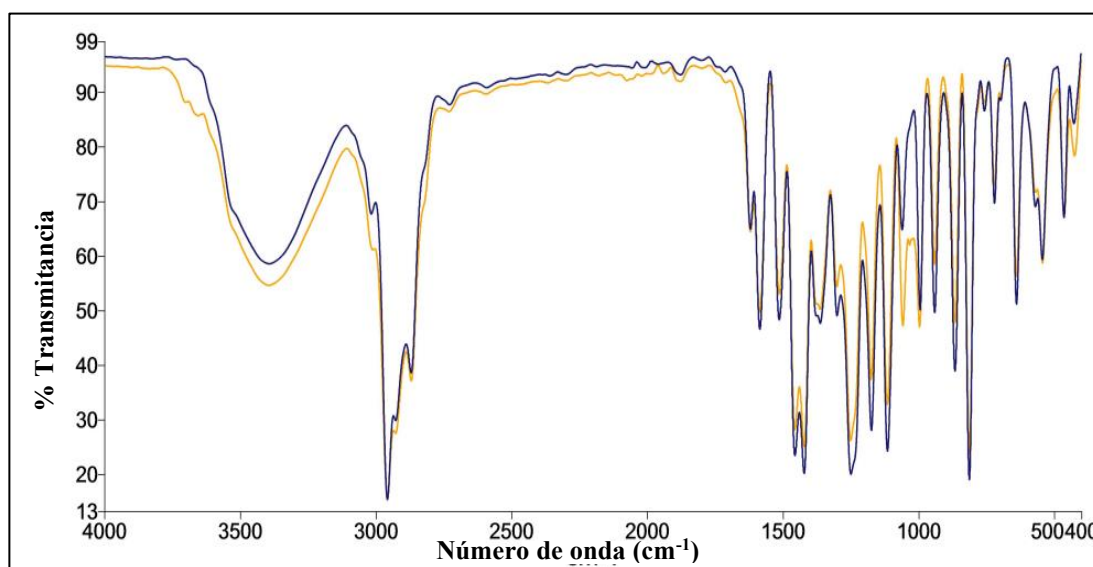


Figura 2. Comparación de los espectros de infrarrojo del AEO registrado en 2016 (azul) y el utilizado en 2023 (amarillo).

7.2 Análisis cualitativo y cuantitativo de los AE mediante técnicas cromatográficas

La composición química del AE de tomillo y orégano fueron determinadas previamente por Piña-Barrera (2019) y Gonzalez-Moreno (2024), respectivamente, mediante cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas (CG-MS, Anexo 1 y Anexo 2).

En el presente estudio, se identificaron los componentes a los que correspondía cada una de las señales del cromatograma de manera individual (Figuras 3 y 4). Así mismo, se determinó la distribución de los componentes en conjunto al mezclar los aceites esenciales en proporciones 1:1 (Figura 5).

Para el AEO se identificaron un total de 16 componentes de los cuáles, el *p*-cimeno (14.87 %), γ -terpineno (7.58 %) y carvacrol (57.94 %) fueron los componentes en mayor abundancia. El AEO perteneció al quimiotipo de carvacrol por ser su componente de mayor presencia, lo cual concuerda con el AEO mexicano, en el que comúnmente puede encontrarse como uno de los 3 principales metabolitos secundarios (Mazzarrino *et al.* 2015; Marin-Tinoco *et al.* 2023). El carvacrol es un monoterpreno oxigenado de gran interés por su remarcable actividad antimicrobiana conferida por su

lipofilicidad que le permite aumentar la fluidez y permeabilidad membranal al insertarse entre los lípidos de la membrana de microorganismos como *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (Marchese *et al.* 2018).

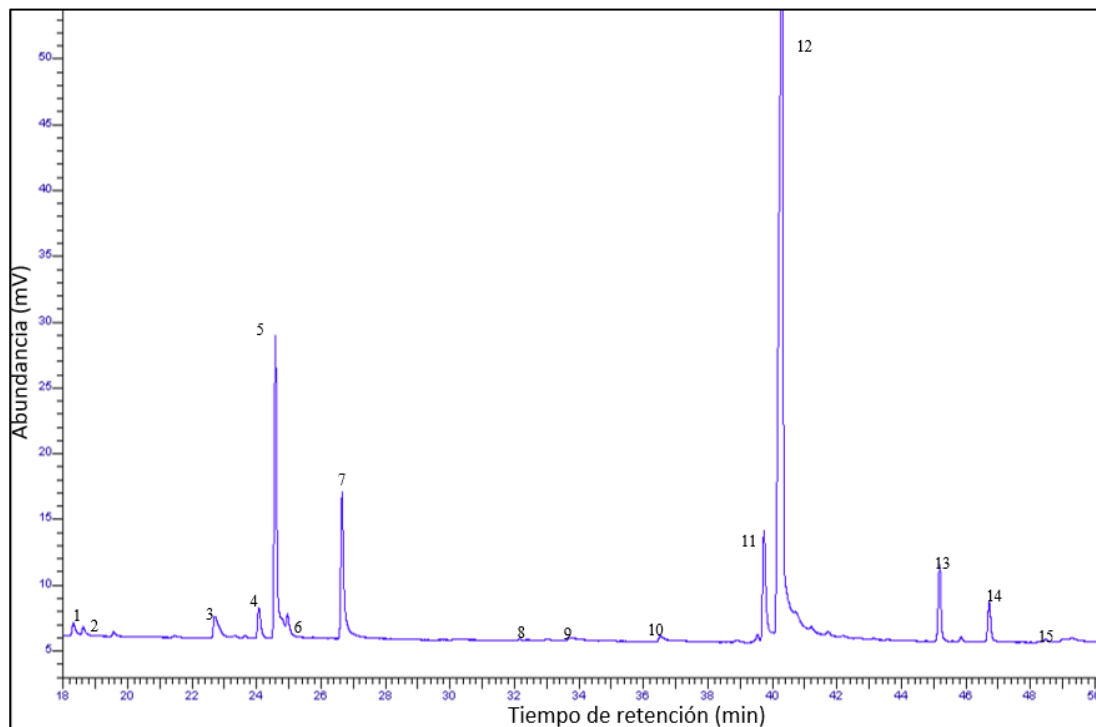


Figura 3. Cromatograma del aceite esencial de orégano obtenido mediante CG-FID: 1) Tujeno, 2) α -Pino, 3) Mirreno, 4) α -terpino, 5) *p*-cimo, 6) 1-8 Cineol, 7) γ -terpino, 8) Linalool, 9) Terpinen-4-ol, 10) Timol metil éter, 11) Timol, 12) Carvacrol, 13) Cariofileno, 14) Humuleno, 15) Butilhidroxianisol y 16) Óxido de cariofileno.

En cuanto al AET, se identificaron un total de 20 componentes, de los cuales, el *p*-cimo (33.49 %), γ -terpino (16.22 %) y timol (27.09 %) fueron los mayoritarios; estos resultados coinciden con los presentados por Valková V *et al.* (2021), quienes determinaron la presencia del timol, *p*-cimo y γ -terpino como los componentes del AET en mayor proporción. En particular, el timol sería la molécula con mayor presencia y bioactividad reportada en la bibliografía, con potencial aplicación en alimentos gracias a su capacidad para inhibir la formación de radicales libres, evitando así la rancidez oxidativa de los lípidos en los alimentos; además, de su amplia actividad antimicrobiana reportada (Escobar *et al.* 2020; Marchese *et al.* 2016).

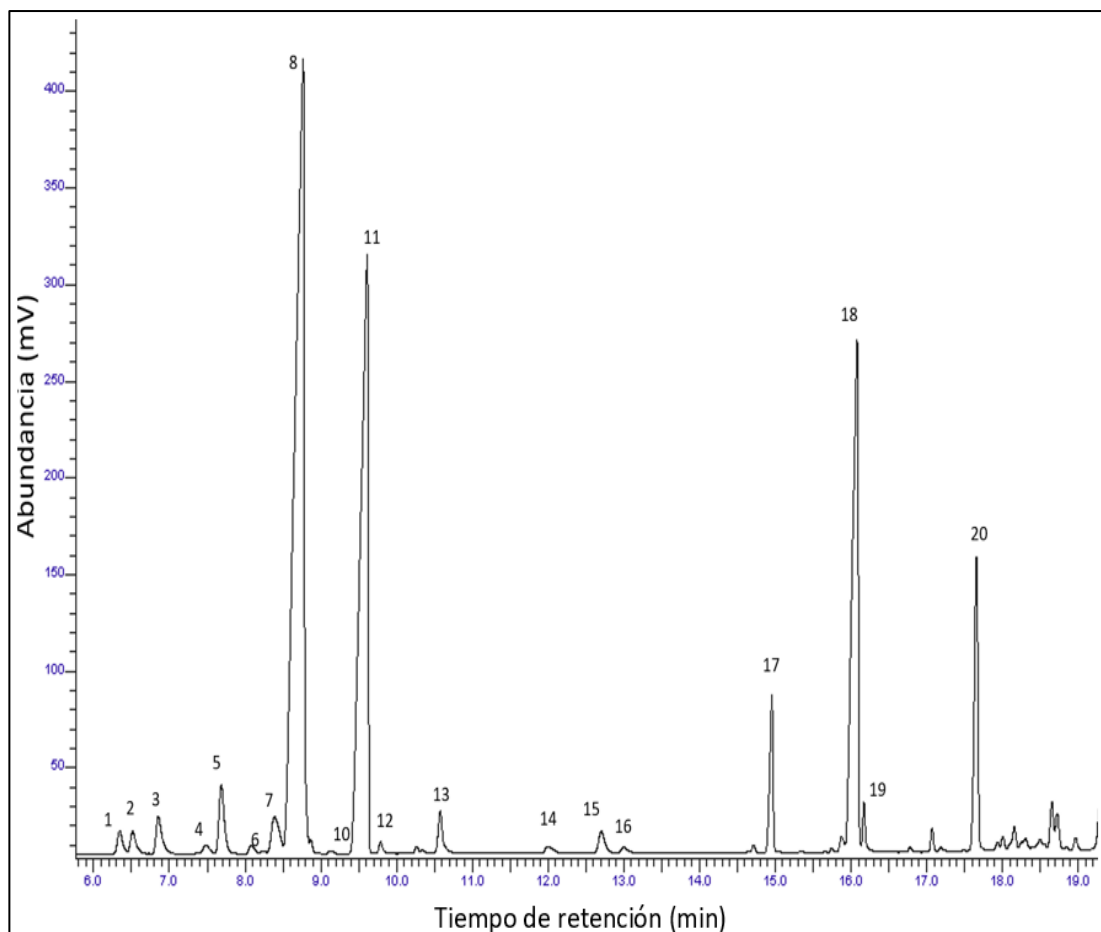


Figura 4. Cromatograma del aceite esencial de tomillo obtenido mediante CG-FID: 1) Tujeno, 2) α - Pineno, 3) Camfeno, 4) β - pineno, 5) 1-octen-3-ol, 6) Mirceno, 7) α - terpineno, 8) p - cimeno, 9) Silvestreno, 10) 1-8 Cineol, 11) γ - Terpineno, 12) Cis hidrato sabineno, 13) Linalool, 14) Camfor, 15) Borneol, 16) Terpinen-4-ol, 17) Metil éter, 18) Timol, 19) Carvacrol y 20) β -Cariofileno.

Por otra parte, al analizar una mezcla de ambos AE en proporción 1:1, se obtuvieron un total de 24 señales (Figura 5) de las cuales el carvacrol (25.38 %), timol (22.44 %) y *p*-cimeno (22.03 %) fueron sus componentes mayoritarios (Tabla III). Resulta favorable que ambos monoterpenos oxigenados se encuentren en mayores proporciones debido al amplio espectro de actividades biológicas a las que se les asocia, además, son capaces de actuar de manera sinérgica cuando se encuentran en conjunto (Rajčević *et al.*, 2022; Ju *et al.*, 2022).

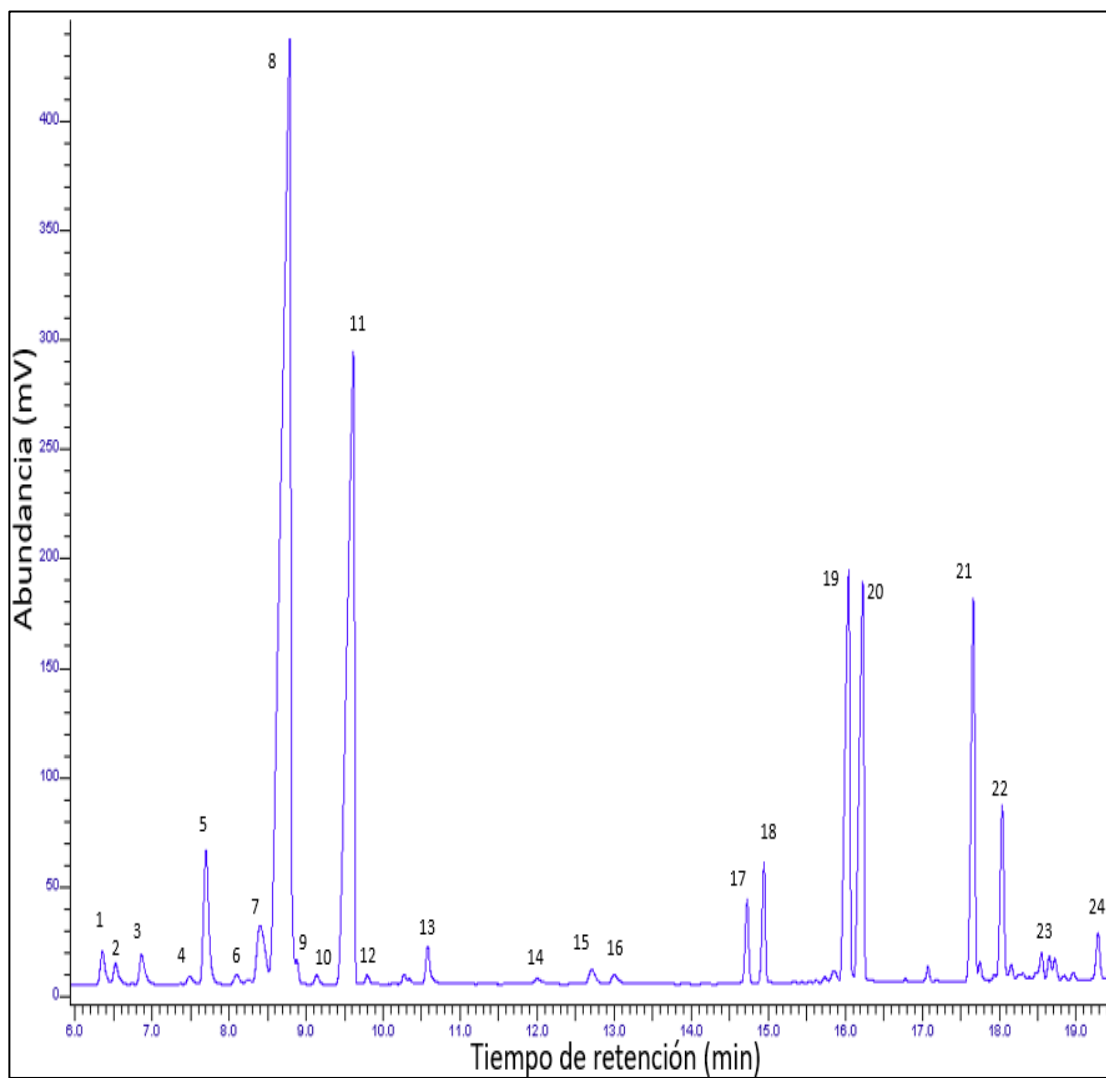


Figura 5. Cromatograma de la mezcla de ambos aceites esenciales obtenido mediante CG-FID: 1) Tujeno, 2) α - Pineno, 3) Canfeno, 4) β - pineno, 5) 1-octen-3-ol, 6) Mirceno, 7) α - terpineno, 8) p - cimeno, 9) Silvestreno, 10) 1-8 Cineol, 11) γ - Terpineno, 12) Cis hidrato sabineno, 13) Linalool, 14) Canfor, 15) Borneol, 16) Terpinen-4-ol, 17) Metil éter, 18) Metil éter, 19) Timol, 20) Carvacrol, 21) β -Cariofileno, 22) Humuleno, 23) Butilhidroxianisol, 24) Óxido de cariofileno.

Tabla III. Composición molecular de los aceites esenciales de orégano y tomillo individuales y en una mezcla 1:1 determinadas por CG-FID.

Componente	AEO		AET		AETO	
	tR (min)	% A	tR (min)	% A	tR (min)	% A
α -tujeno	18.31	0.63	13.73	1.37	18.37	1.10
α -pineno	18.62	0.35	14.03	1.51	18.7	0.78
Canfeno	-	-	14.94	2.19	19.63	0.92
β -pineno	-	-	17.95	0.26	21.51	0.20
1-octen-3-ol	-	-	18.28	1.92	22.76	2.11
β -mirceno	22.7	2.07	18.82	0.21	23.41	0.13
α -terpineno	24.06	1.72	19.61	1.47	24.17	1.55
<i>p</i> -cimeno	24.58	14.87	20.23	33.49	24.73	21.99
Silvestreno	-	-	20.38	1.79	24.92	0.18
1,8-cineol	-	-	20.56	0.86	25.1	0.64
γ -terpineno	26.65	7.85	22.31	16.12	26.78	11.71
Cis hidrato sabineno	-	-	22.91	0.52	27.54	0.34
Linalool	33.00	0.14	24.99	3.26	29.56	1.01
Canfor	-	-	27.06	1.39	31.73	0.56
Borneol	-	-	28.37	2.67	33.13	1.41
Terpinen-4-ol	33.71	0.20	28.97	0.68	33.69	0.56
Metil Timol Éter	36.52	0.52	-	-	36.62	0.33
Metil Éter	-	-	32.47	1.05	37.09	0.45
Timol	39.72	6.07	35.36	27.09	40.15	22.40
Carvacrol	40.3	57.94	35.68	0.99	40.62	25.33
β -Cariofileno	45.18	4.00	40.46	1.15	45.32	1.52
α -Humuleno	45.85	0.20	-	-	46.86	0.58
Butilhidroxianisol	46.71	2.20	-	-	48.54	0.69
Óxido de cariofileno	53.49	0.64	-	-	54.8	3.51
Total	-	100	-	100	-	100

7.3 Actividad antimicrobiana

7.3.1 Ensayo de difusión en pozo

Se evaluó la capacidad de ambos AE para delimitar un diámetro que no permitiera el crecimiento de los microorganismos inoculados. El tamaño de los halos de inhibición se presenta en la Tabla IV.

Tabla IV. Evaluación de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano y tomillo mediante la técnica de difusión en pozo ($\bar{X} \pm DS$, $n=3$, $p<0.05$).

Antimicrobiano	Halos de inhibición (mm)	
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Orégano	37 ± 2.64	27 ± 1.15
Tomillo	31 ± 1.52	27 ± 1.50
CTR +	30 ± 0.57	25 ± 2.64
CTR -	S/I*	S/I*

CTR +: ampicilina 1% (p/v); CTR-: agua destilada estéril; S/I*: sin inhibición.

Ambos microorganismos evaluados mostraron mayor sensibilidad ante el AEO que frente al AET ($p<0.05$). Las diferencias en la sensibilidad que muestra un microorganismo frente a distintos AE (o inclusive entre AE de la misma especie) es debido a la variabilidad de los metabolitos secundarios que lo componen (Thielmann *et al.* 2019).

Los componentes con presencia de un grupo hidroxilo en su estructura fenólica tienen una actividad antimicrobiana considerablemente mayor, por ejemplo, el carvacrol, principal componente del AEO, mientras que, aquellos metabolitos solamente hidrocarbonados y alifáticos tienden a mostrar una actividad antimicrobiana más débil, como en el caso del *p*-cimeno, principal componente del AET (Saad *et al.* 2013).

Otro parámetro importante en la actividad antimicrobiana de una molécula determinada por este método es su coeficiente de partición octanol/agua ($\log P$), el cual, es un reflejo de su lipofiliidad y, por lo tanto, de su capacidad para atravesar la bicapa lipídica bacteriana e interactuar con componentes intracelulares (Rzycki *et al.* 2024; Fikri *et al.* 2020). Los metabolitos secundarios presentes en los AEO y AET evaluados, cuentan con valores positivos para este parámetro, lo que apoyaría su propuesta como agentes antimicrobianos en diversos sectores.

Para ambos AE se observaron halos de inhibición mayores a 20 mm, por lo que se les consideró con una buena actividad antimicrobiana (Rubio-Ortega 2018).

7.3.2 Ensayo de microdilución en placa de 96 pocillos

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los AEO y AET contra ambos microorganismos (Tabla V). El AEO presentó una CMI de 500 µg/mL frente a ST y de 1,000 µg/mL contra LM. Estos resultados son semejantes a los reportados por Rivero-Cruz *et al.* (2011) quienes determinaron una CMI de 512 µg/mL del AEO frente a *Salmonella* Typhi; así mismo, son consistentes a los reportados por Machado *et al.* (2014) quienes obtuvieron una CMI de 1,333 µg/mL al evaluar el AE de *Lippia alba* frente a LM.

Por otra parte, se determinó que el AET inducía la inhibición del crecimiento de ST a una concentración de 1,000 µg/mL, mientras que, frente a LM fue a 2,000 µg/mL. Estos resultados son concordantes con los reportados por Quynh y Trang (2019) quienes reportaron una CMI de 1.5 µL/mL al evaluarlo frente a ST; así mismo, Tardugno *et al.* (2020) obtuvieron una CMI de 2.5 µL/mL.

El criterio para clasificar la actividad antimicrobiana de los AE varía entre autores, no obstante, los resultados obtenidos en esta prueba caen dentro de criterios clasificados como con un efecto antimicrobiano destacable (Orchard y van Vuuren, 2017).

Tabla V. Concentración mínima requerida de cada AE para inhibir el crecimiento microbiano.

Microorganismo	CMI (µg/mL)	
	AEO	AET
ST	500	1,000
LM	1,000	2,000

ST: Salmonella enterica ser. Typhimurium; LM: Listeria monocytogenes; AEO: aceite esencial de orégano; AET: Aceite esencial de tomillo; CMI: concentración mínima inhibitoria.

Rubio-Ortega (2023) investigó el mecanismo de acción bajo el cual el AEO ejerce su efecto antimicrobiano frente a ST y determinó que producía la desestabilización membranal de la célula, al interactuar con la bicapa lipídica y con los sistemas

energéticos de la bacteria. Así mismo, Akermi *et al.* (2022) evaluaron mediante modelos de acoplamiento molecular la afinidad de los principales componentes de AET frente a ST y LM, observando mediante simulaciones computacionales que componentes como el timol son capaces de inhibir enzimas topoisomerasas y polimerasas de ADN y ARN, necesarias para procesos de replicación celular.

El mecanismo bajo el cual los productos naturales ejercen un efecto antimicrobiano no puede ser atribuido a uno solo de sus componentes, sino más bien, es asociado a un efecto conjunto donde los múltiples componentes del AE interactúan con las múltiples dianas biológicas presentes en los microorganismos, es decir, cuentan con múltiples mecanismos de acción (Rajčević *et al.* 2022; Pinto *et al.* 2023). Esto permite postular que una combinación de componentes provenientes de diferentes organismos vegetales otorgue una mezcla de mayor diversidad molecular que incremente su actividad como agente antimicrobiano. Por lo tanto, se evaluó la actividad antimicrobiana de los AE de manera conjunta, proponiendo que, al tener mayor cantidad de moléculas bioactivas presentes en el medio, el efecto antimicrobiano aumentaría.

7.3.3 Evaluación antimicrobiana de combinaciones de AEO y AET mediante la técnica de *checkerboard*

Se evaluaron las fracciones del CMI de ambos AE frente a los patógenos alimenticios LM y ST. Los resultados de esta prueba pueden interpretarse de acuerdo con el patrón de inhibición que se forma sobre la microplaca (Figura 6) y mediante el cálculo de su FICI (Fórmulas 1, 2 y 3) a partir de la reducción de la CMI (Wambaugh y Brown 2018).

La CMI del AEO puede disminuirse a $\frac{1}{4}$ de su valor, mientras que, la CMI del AET se reduce a $\frac{1}{2}$ de su valor original (Tabla VI). El FICI calculado fue de 0.5, por lo que, de acuerdo con el criterio de la prueba este resultado representaría que ambos AE interactúan de manera sinérgica para lograr el efecto inhibitorio frente a *S. Typhimurium* (Leber 2016), es decir, el efecto inhibitorio de los AE se ve potenciado mutuamente al requerir de concentraciones significativamente menores de cada uno para impedir el crecimiento bacteriano de *S. Typhimurium* (Caesar y Cech 2019).

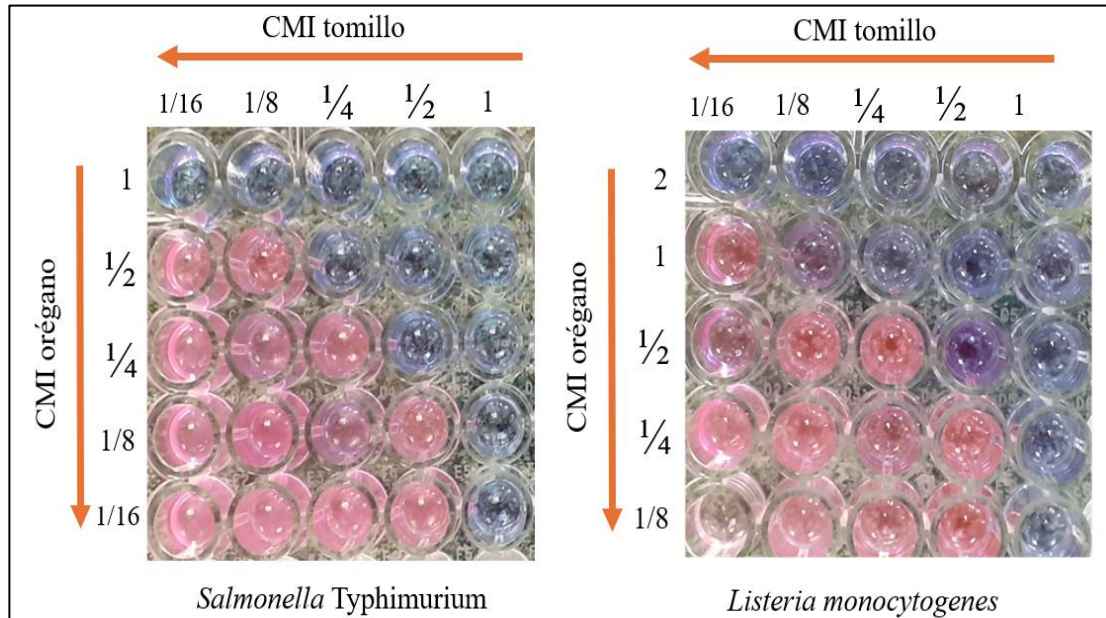


Figura 6. Patrones de inhibición al evaluar combinaciones fraccionadas del CMI de los AE de orégano y tomillo contra *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (n=3).

Estos resultados son concordantes con los presentados por Reyes-Jurado *et al.* (2016), quienes evaluaron combinaciones de los AE de orégano y tomillo para inhibir el crecimiento de microorganismos presentes comúnmente en alimentos, entre ellos *S. Typhimurium*. Se observó que al probar un 50 % de la CMI del AET y un 25 % de la CMI del AEO se mantenía el efecto inhibitorio y se reducían las cantidades necesarias de cada AE, aumentando así la eficiencia de su actividad antimicrobiana.

Por otra parte, al evaluar las combinaciones frente a LM se determinó que el AEO requería de 1/2 de su CMI en presencia de 1/4 del CMI del AET para mantener un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano (Tabla VI), obteniendo un FICI de 0.75. De acuerdo con el criterio establecido, el efecto de ambos AE sería de tipo aditivo, lo cual indica el efecto antimicrobiano presentado es debido a la sumatoria de sus efectos individuales (Doern C 2014), por lo tanto, la presencia de ambos AE en una misma formulación no perjudicaría su actividad biológica.

Tabla VI. Efecto de la combinación de los aceites esenciales de orégano y tomillo sobre el crecimiento microbiano de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (n=3).

Proporciones CMI		Microorganismo	
Aceite esencial de orégano	Aceite esencial de tomillo	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
1	1	-	-
	1/2	-	-
	1/4	-	-
	1/8	-	-
1/2	1	-	-
	1/2	-	-
	1/4	-	+
	1/8	+	+
1/4	1	-	-
	1/2	-	+
	1/4	+	+
	1/8	+	+
1/8	1	-	-
	1/2	+	+
	1/4	+	+
	1/8	+	+

Sin inhibición de crecimiento (+); Inhibición del crecimiento: (-).

Los AE son mezclas de múltiples moléculas bioactivas que interactúan entre sí para llevar a cabo su actividad biológica. De hecho, se ha determinado que, al evaluar los componentes individuales de un AE, su actividad no es superior a la demostrada por el conjunto de metabolitos (Bassolé y Juliani, 2012). Este comportamiento puede explicarse considerando que las moléculas bioactivas individuales solo pueden unirse a puntos específicos de estructuras celulares, mientras que, actuando en conjunto estas moléculas pueden unirse de manera indistinta a múltiples estructuras simultáneamente, lo que les permite interferir en un mayor número de vías metabólicas (Langeveld 2013). Por ejemplo, las cadenas de carbono insaturadas pueden formar enlaces covalentes con estructuras aminoácidas de proteínas y péptidos, mientras que, los aldehídos pueden formar amidas con bases nitrogenadas y grupos amino de aminoácidos. Estas ligaduras

proteicas pueden provocar un desarreglo en su conformación alterando su funcionabilidad (Bunse *et al.* 2022).

Emplear combinaciones de AE es una alternativa importante para su aplicación, debido a que, al requerir de una menor cantidad de cada uno de los AE, manteniendo su actividad antimicrobiana, se podría reducir su impacto organoléptico; además, al contar con mayor diversidad de compuestos, se puede aumentar el rango de microorganismos sobre los cuales actúa (Moody 2004). Por ejemplo, Alvarez *et al.* (2019) evaluaron el impacto sensorial que tendría la aplicación de los AE de *Lippia graveolens* y *Rosmarinus officinalis* aplicados en un recubrimiento sobre brócoli. Los autores reportaron que al tratarlo con los AE individuales había percatación de sus propiedades sensoriales, mostrando desagrado y rechazo. No obstante, al emplear la mezcla de los AE y requerir de menores cantidades, su aceptabilidad organoléptica se vio favorecida.

El incremento de la actividad antimicrobiana de los AET y AEO cuando eran administrados en conjunto, condujo la propuesta de coencapsularlos en una misma nanoformulación para potenciar su efecto antimicrobiano.

7.4 Obtención y caracterización fisicoquímica de nanoformulación de los AE coencapsulados

Para la encapsulación de los AEO y AET se utilizó como polímero formador de las nanopartículas al Eudragit RL100 y nanoprecipitación como técnica de nanoencapsulación. Para ello, una fase orgánica que contiene un solvente miscible en agua, el polímero y los AE, es inyectado en una fase acuosa. Cuando el solvente difunde hacia la fase acuosa, las cadenas del polímero precipitan alrededor de las gotas de AE y forman las nanocápsulas (Lammari *et al.* 2020).

Las formulaciones con AE coencapsulados en las nanopartículas poliméricas (NP-AETO) presentaron las características fisicoquímicas que se muestran en la Tabla VII.

El tamaño de la formulación NP-AETO de 124 nm resulta favorecedor para la aplicación de nanosistemas como acarreadores de moléculas con actividad biológica, ya que, este tamaño favorece la interacción con sistemas biológicos al aumentar su superficie de contacto (Olea-Flores 2018). Así mismo, se pudo observar diferencia

significativa en el tamaño, al compararlo con las NP sin el AETO (102 nm), lo cual podría ser atribuido a la formación de un núcleo lipídico formado por la encapsulación del AETO al interior de la nanocápsula (Vanti, 2021).

Tabla VII. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas con los aceites esenciales de orégano y tomillo coencapsulados con el polímero Eudragit RL100 ($\bar{X} \pm DS$, n=3, p<0.05).

Formulación	Propiedades		
	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP - BCO	102.00 $\pm$ 4.35	0.16 $\pm$ 0.01	39.23 $\pm$ 1.95
NP - AETO	124.16 $\pm$ 4.07	0.14 $\pm$ 0.01	37.00 $\pm$ 3.74

NP – BCO: nanopartícula sin AE; NP – AETO: nanopartícula con AET y AEO coencapsulados.

Por su parte, tanto la formulación de NP-AETO y NP-BCO tuvieron valores de PDI menores a 0.2, siendo un parámetro indicativo de que el tamaño de la población de NP es homogéneo, es decir, sus dimensiones espaciales se encuentran dentro de un mismo rango (Ubgade *et al* 2019). Esta es una característica deseable en las nanoformulaciones, ya que, asegura que la población de NP tiene un tamaño homogéneo y, por lo tanto, su interacción biológica sería similar (Danaei *et al.* 2018).

En el caso del potencial Z, la formulación NP-AETO presentó un valor de 37 mV. Este es un parámetro que permite suponer la estabilidad de la formulación, ya que, al ser un reflejo de la densidad de carga superficial de las NP, entre mayor sea su valor existirá una mayor tendencia a repelerse electrostáticamente, evitando que sus superficies puedan interaccionar y flocular (Jain y Thareja 2019). Otro punto para destacar dentro de este parámetro es su valor positivo, lo que indica que la suspensión de NP tiene un carácter catiónico, que puede atribuirse a los grupos de amonio cuaternario presentes en la estructura del polímero Eudragit RL100. Dicha característica de las NP favorecería su interacción electrostática con las membranas de los microorganismos, las cuales generalmente presentan cargas superficiales negativas que son atribuidas a lípidos de membrana como el LPS o la mureína (Spireescu *et al.* 2021).

7.4.1 Caracterización química de la nanoformulación

Las formulaciones obtenidas también fueron analizadas por medio de FT-IR, analizando por separado sus componentes (AETO y Eudragit RL100) y, posteriormente, los formulados de NP (NP-BCO y NP-AETO).

En la Figura 7, se puede observar el espectro de la mezcla AETO (Figura 7c) con señales en la región del grupo hidroxilo ($\nu = 3650\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$), que corresponderían a los terpenos oxigenados como el carvacrol, linalool o timol; así mismo, se obtuvieron señales en la región del enlace C-C ($\nu = 3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$), presentes en los terpenos como β -mirceno y α -tujeno. En la estructura de la NP blanco (Figura 7b), se pueden observar señales características del grupo funcional amino ($\nu = 3650\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) y carbonilo ($\nu = 1850\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$) presentes del polímero Eudragit RL100. Por su parte, en la NP-AETO (Figura 7d) pueden presenciarse grupos funcionales de presentes tanto en el polímero (Figura 7a) como en la mezcla AETO. Esto puede ser asociado a la presencia de metabolitos secundarios adsorbidos en la NP. Esto podría considerarse beneficioso, ya que, su presencia superficial otorgaría a la formulación una liberación inicial inmediata del AETO antes de comenzar su liberación prolongada (Cam *et al.* 2020; Huang y Brazel 2001; Mora-Huerta *et al.* 2010).

Posteriormente, la nanoformulación fue analizada por CG-FID mediante una microextracción en fase sólida en modalidad *HS-SPME*. Se observó que, de los 24 componentes disponibles en la mezcla de AETO (Figura 5), se incorporaron 14 de ellos en la formulación, de los cuales el timol y el carvacrol fueron mayoritarios (Figura 8).

Cabe resaltar que la alta proporción de carvacrol y timol se mantuvo en la nanoformulación. Guarda *et al.* (2011) evaluaron la actividad sinergista del carvacrol y timol y el efecto de su encapsulación en micropartículas. Se obtuvo una inhibición del crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria innocua* al aplicar una formulación con 10% de cada uno de los monoterpenos y se demostró su potencial aportación como un componente dentro de empaques activos.

Además, en la formulación de NP-AETO se determinó la presencia de compuestos como el butilhidroxianisol (BHA), el cual es reconocido por su actividad como antioxidante y ha sido empleado para evitar la degradación de los ácidos grasos en los alimentos (Felter y Thompson 2021). La formulación también mostró una considerable encapsulación de β -cariofileno y humuleno, sesquiterpenoides antimicrobianos que afectan la membrana celular de microorganismos (Moo *et al.* 2020).

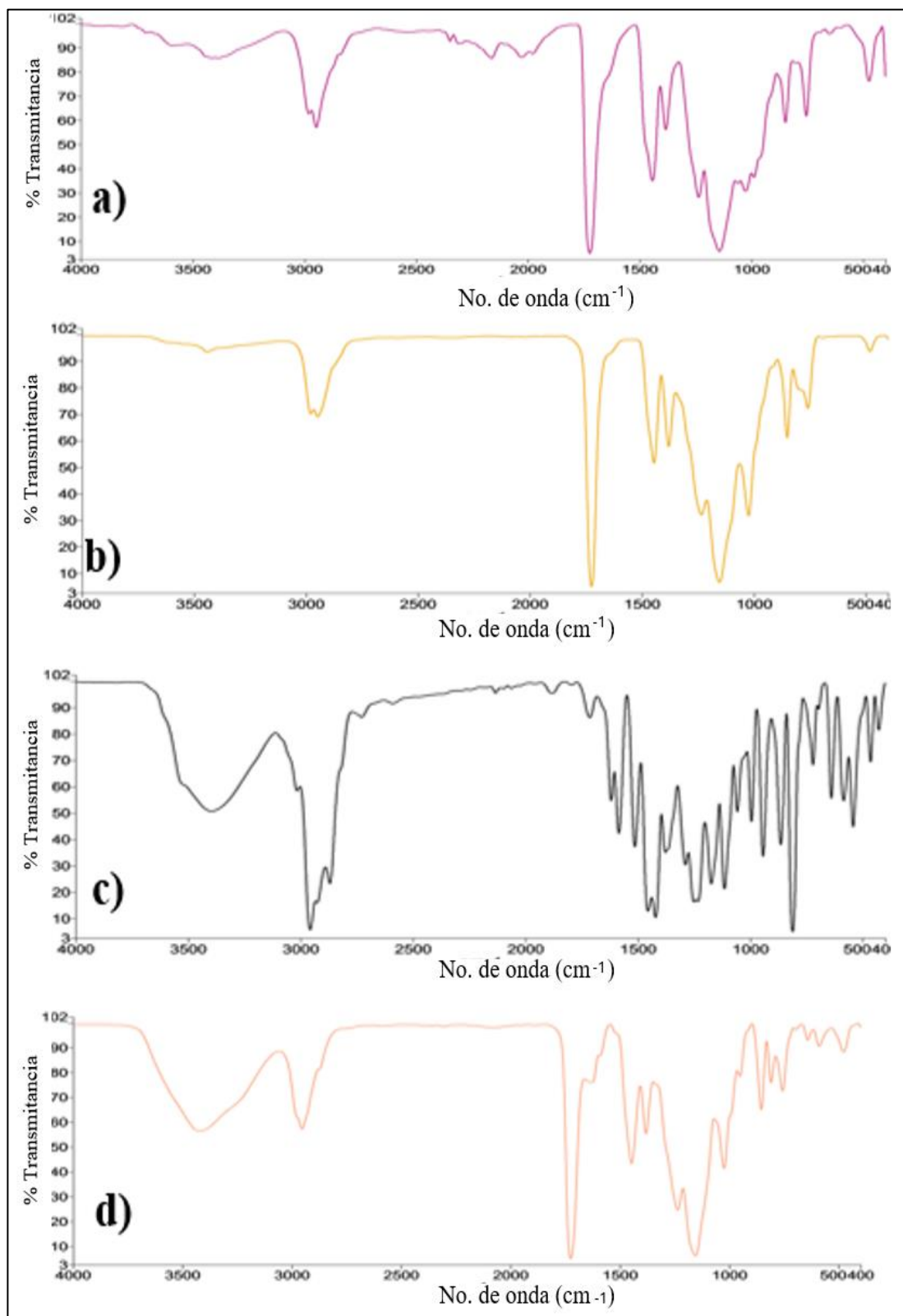


Figura 7. Espectros de FT-IR de a) Eudragit RL100, b) NP sin AETO, c) AETO y d) NP-AETO.

Así mismo, se tuvo la incorporación de *p*-cimeno, el cual posee una baja actividad antimicrobiana, no obstante, la importancia de su presencia radica en su capacidad para potencializar la actividad antimicrobiana de otros metabolitos como el carvacrol (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn 2010).

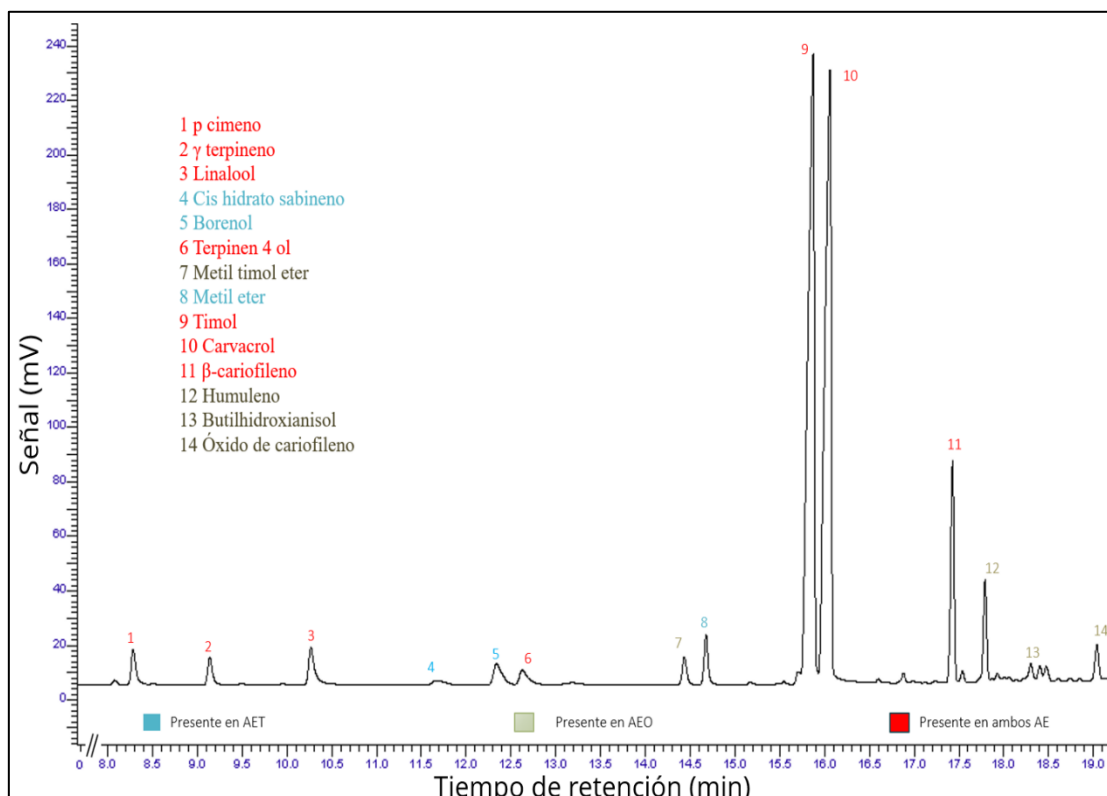


Figura 8. Componentes de la mezcla de los aceites esenciales de orégano y tomillo coencapsulados en la formulación de NP de Eudragit RL100.

7.5 Cuantificación de la incorporación del AETO en la nanoformulación

Para cuantificar el AETO incorporado en las nanopartículas, se seleccionó al carvacrol como componente de seguimiento en base a su porcentaje de abundancia y actividad biológica. utilizando el mismo método cromatográfico y condiciones de *HS-SPME* establecidas. Se analizaron 3 lotes distintos de NP con AE coencapsulados por duplicado con el método validado según la sección 7.6. Posteriormente, se calculó el porcentaje de encapsulación y de eficiencia de encapsulación (Tabla VIII).

Tabla VIII. Incorporación del carvacrol en las NP de Eudragit RL100 a partir del AETO ($\bar{X} \pm DS$, n=3).

Porcentaje de encapsulación	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
3.78 % $\pm$ 1.94	62.89 % $\pm$ 2.59

Estos resultados son concordantes con los reportados por González-Moreno *et al.* (2024) quienes lograron encapsular en NP del polímero Eudragit L100-55 un 62.89 % del carvacrol procedente del AE de orégano. Cabe señalar que dicho polímero pertenece al mismo grupo que el empleado en el presente trabajo, lo cual indicaría que su estructura favorecería la incorporación de los fitoquímicos del AETO en las NP.

El porcentaje de encapsulación corresponde a la proporción de carvacrol (en masa) que se ha integrado en la formulación. Si se considera, en primera instancia, que porcentajes superiores al 10 % representan una buena encapsulación (Liu *et al* 2020.), podría suponerse que se obtuvo un porcentaje de encapsulación no óptimo. No obstante, debe resaltarse que en el caso de las NP-AETO se incorporaron simultáneamente diferentes moléculas con actividad biológica, lo cual hace viable su coadministración en una sola formulación, aumentando así la posibilidad de poder sumar sus efectos biológicos (Shen *et al.* 2017).

7. 6 Evaluación de desempeño de un método analítico por cromatografía de gases para cuantificar el AE incorporado

Si bien se utilizó el método de CG-FID desarrollado y validado por Espinosa-Carranza *et al.* 2022, es necesario confirmar el desempeño del método para cuantificar el carvacrol incorporado en las NP formadas con el AETO y el polímero Eudragit L100-55. Para la evaluación de desempeño del método analítico, en una primera etapa, se realizó la validación del sistema con una curva de calibración (Figura 9) por triplicado con el estándar de carvacrol con 5 niveles de concentración (10, 20, 40, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$).

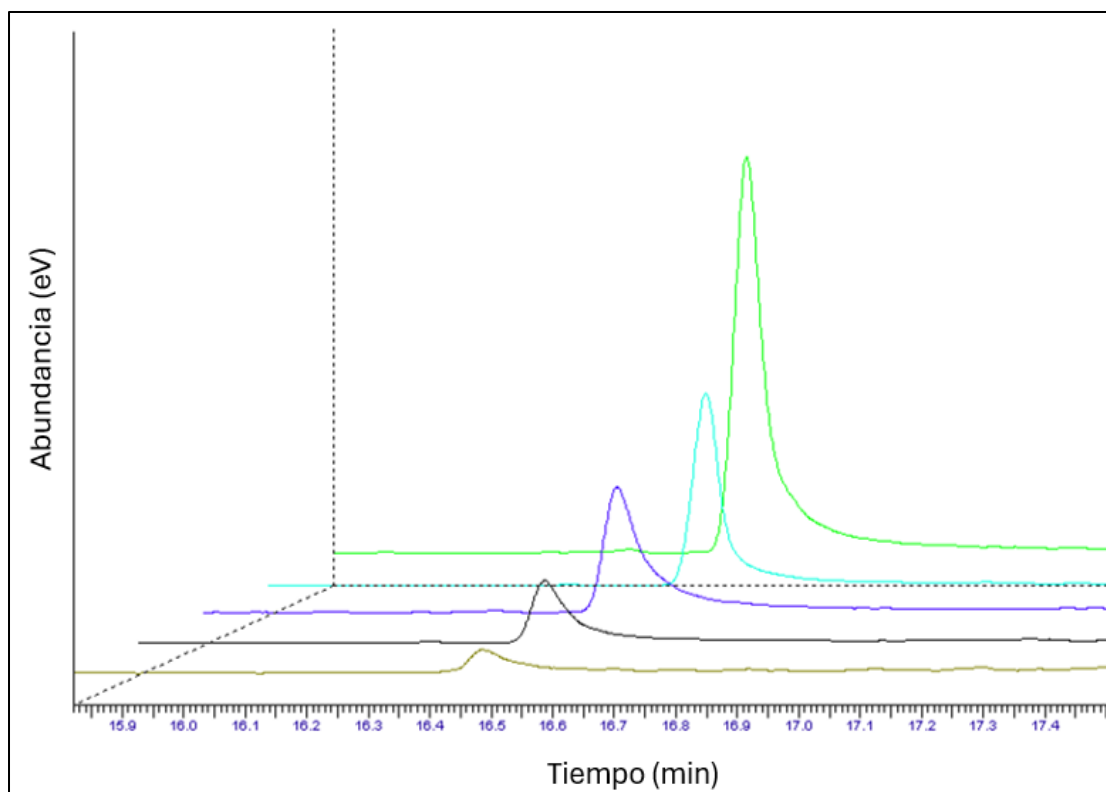


Figura 9. Cromatogramas de la curva de calibración del estándar de carvacrol a cinco niveles de concentración (10, 20, 40, 80 y 100 µg/mL) con HS-SPME por CG-FID.

Se prosiguió con la etapa de validación del método analítico por medio de la confirmación del desempeño del método analítico. La validación de un método analítico es un procedimiento a través del cual se establece con certeza que el método es adecuado y reproducible para los fines que fue diseñado (Thompson *et al.* 2002). Así, se estableció que todos los parámetros evaluados se encontraban dentro de los criterios de aceptación (Tabla IX). Se demostró que el método analítico con HS-SPME por CG-FID permite cuantificar el carvacrol de forma selectiva, repetible y precisa a partir de NP formadas con el AETO y el polímero Eudragit L100-55.

En la Tabla IX se observa el coeficiente de determinación mayor a 0.99 de esta forma se establece que la respuesta analítica del carvacrol presenta un comportamiento lineal a su concentración. De igual forma, tanto el LD como el LQ fueron menores al nivel

inferior de la curva de calibración del carvacrol (10 µg/mL). Con lo anterior, los tres parámetros de validación del sistema son aceptados según la SSA (2011)

Tabla IX. Parámetros de validación del sistema y método para cuantificar el carvacrol con HS-SPME por CG-FID.

	Parámetro	Valor obtenido	Criterio de aceptación
Validación del Sistema	Coefficiente de determinación (r^2)	0.992	$>0.99^1$
	Coefficiente de correlación (r)	0.996	$>0.99^1$
	Precisión (% DER)	6.40	$< 15 \%^2$
	Límite de detección (µg/mL)	2.57	Menor al límite inferior del intervalo de trabajo ¹
	Límite de cuantificación (µg/mL)	7.80	Menor al límite inferior del intervalo de trabajo ¹
Desempeño de Método	Precisión intradía del tiempo (% DER)	7.20	$< 15 \%^3$
	Precisión interdía del tiempo (% DER)	13.27	$< 15 \%^3$
	Precisión intradía del área (% DER)	0.03	$< 15 \%^3$
	Precisión interdía del área (% DER)	0.41	$< 15 \%^3$

¹ CCAYAC-P-058; ² Castellanos-Molina 2007; ³ Williams y Buica 2020.

7.7 Actividad antimicrobiana de la nanoformulación de AE coencapsulados

7.7.1 Concentración mínima inhibitoria

Al evaluar las NP-AETO mediante el método de microdilución en placa, se determinó una CMI contra ST de 96.16 µg/mL, mientras que, contra LM se obtuvo una CMI de 49.08 µg/mL (Figura 10).

En ambas bacterias se logró observar que la CMI de la nanoformulación era considerablemente menor que las CMI de los AE individuales (Tabla V). Esta misma tendencia fue observada por Granata *et al.* 2010 quienes encapsularon los AE de *Thymus capitatus* y *Origanum vulgare* en nanopartículas formadas con el polímero

poli- ϵ -caprolactona y evaluaron su actividad contra los patógenos alimentarios *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. En el estudio se obtuvieron reducciones de la CMI de hasta 4 veces al comparar los AE libres y nanoencapsulados. Este efecto se atribuyó a la capacidad de transporte y difusión de los AE encapsulados a través de la membrana de los microorganismos.

En formulaciones de antimicrobianos, es una tendencia apreciable y esperada que, al utilizar polímeros catiónicos, se favorezca la actividad antimicrobiana, debido a que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano al ser atraídos mediante interacciones electrostáticas hacia las membranas de los microorganismos e insertarse en sus dominios liposolubles, permitiendo la entrada y salida de moléculas ajenas al metabolismo (Zhen *et al.* 2022).

Por su parte, Romero *et al.* (2012) evaluaron la fijación de NP de Eudragit E100 (perteneciente a la misma familia que el Eudragit RL100) con ofloxacino a la membrana celular de *P. aureginosa*. A través de citometría de flujo, determinaron que la presencia de las NP catiónicas inducía la permeación membranal, permitiendo el flujo de ofloxacino al interior de la célula, potencializando su actividad como antimicrobiano al sensibilizar a una cepa resistente a este antibiótico. De manera notable, se requirió de una dosis hasta 16 veces menor en comparación a cuando se encontraba sin encapsular.

A su vez, se logró observar mayor sensibilidad de LM a la formulación en comparación con ST (Figura 10). Estos resultados son afines con lo reportado por Wang y Shao (2017), quienes determinaron que las bacterias gram positivas son más sensibles al efecto antimicrobiano de las NP de carácter catiónico en comparación con las bacterias gram negativas. Esto es debido a que las bacterias gram negativas tienen una superficie de mayor complejidad, conformada por componentes lipofílicos (por ejemplo, el lipopolisacárido A, lipoproteínas y fosfolípidos) que la vuelven específica a la entrada y salida de solo macromoléculas determinadas. En contraste, las bacterias gram positivas poseen membrana lipídica de menor grosor, poseyendo en mayor medida una pared de peptidoglicano porosa de menor selectividad, además, de una carga superficial negativa de mayor intensidad debido a la presencia del ácido murámico y ácido teicoico

que atraen con mayor fuerza a las nanopartículas de carácter catiónico (Caudill *et al.* 2020; Vassallo *et al.* 2020; Zaidi y Khan 2017).

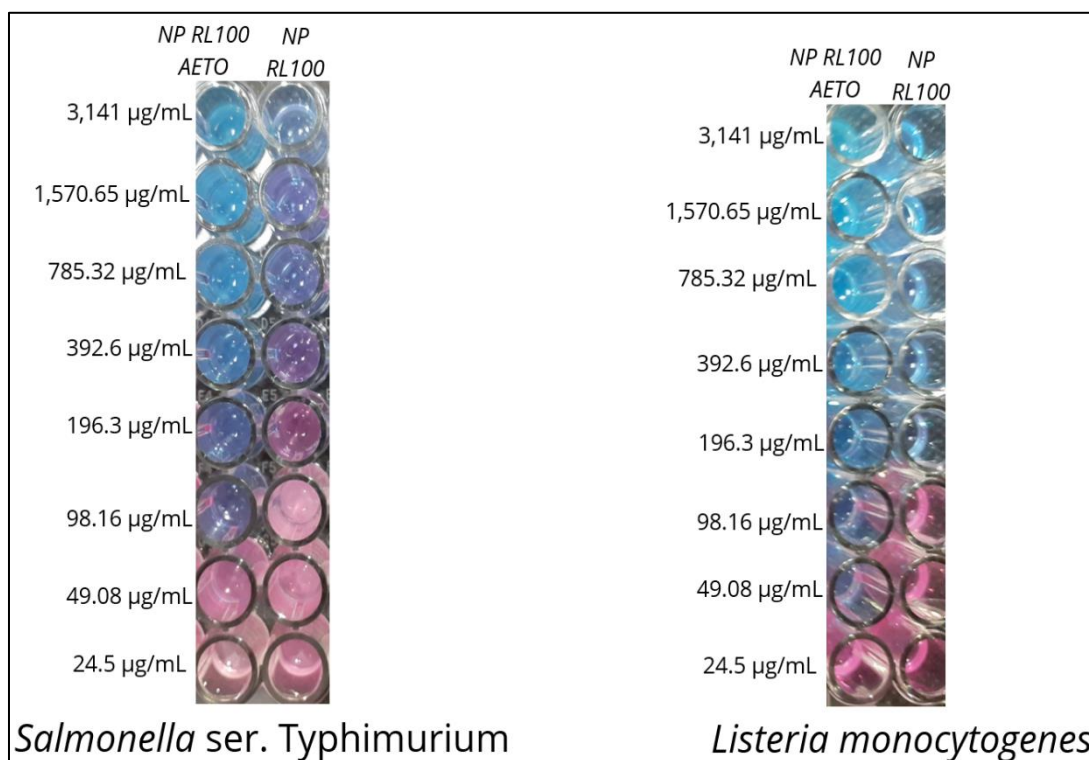


Figura 10. Concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas con los aceites esenciales coencapsulados (NP-RL100-AETO) y nanopartículas blanco (NP-RL100) frente a *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*.

El carácter catiónico de las NP evaluadas es debido a los grupos de amonio cuaternario presentes en su estructura (Figura 11) que, a su vez, son los encargados de mediar el flujo del principio activo al formar canales en la superficie de la NP, permitiendo el paso del medio acuoso hacia su interior (Soltani *et al.* 2016), con la consecuente disolución y liberación del principio activo hacia el medio externo que rodea la NP.

Así mismo, se pudo observar que las NP blanco, es decir, aquellas que no contenían la combinación de AETO, también poseían un efecto inhibitor sobre ambas cepas. Este es un resultado esperado al formular NP de carácter catiónico y que aporta un efecto antimicrobiano adicional a la formulación. La actividad antimicrobiana intrínseca de las nanopartículas catiónicas ha sido asociada con los grupos funcionales amino presentes en las cadenas que conforman al polímero. Estos grupos catiónicos son atraídos electrostáticamente por las membranas biológicas que, normalmente, tienen

una carga superficial negativa, la cual está asociada a moléculas como el ácido teicoico y ácido N–acetilmurámico que forman parte del peptidoglucano de las bacterias gram positivas. El mismo efecto se presenta con el lipopolisacárido A en las membranas de las bacterias gram negativas (Dillen K *et al.* 2008).

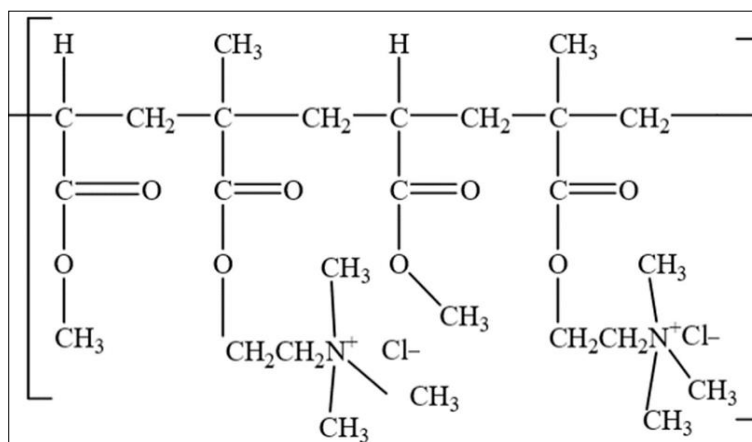


Figura 11. Fórmula desarrollada del monómero que conforma al polímero Eudragit RL100 (Gupta, P. *et al* 2015).

Estos grupos catiónicos son atraídos electrostáticamente por las membranas biológicas que, normalmente, tienen una carga superficial negativa, la cual está asociada a moléculas como el ácido teicoico y ácido N–acetilmurámico que forman parte del peptidoglucano de las bacterias gram positivas. El mismo efecto se presenta con el lipopolisacárido A en las membranas de las bacterias gram negativas (Dillen K *et al.* 2008).

El efecto antimicrobiano de las NP, por sí mismas, es una ventaja adicional a las ya mencionadas como acarreadores de moléculas con actividad biológica. La interacción entre estos polímeros multivalentes y las membranas microbianas desencadenan la pérdida de la viabilidad celular mediante lisis de la pared celular, provocada por un desequilibrio en el balance eléctrico membranal que es inducido por un desajuste en el potencial y despolarización de la membrana (Beyth N *et al.* 2015). De esta manera, los repetitivos grupos funcionales amino presentes en la cadena polimérica funcionan como múltiples ligandos que interactúan con múltiples sitios de unión de la diana biológica,

conocidas como interacciones multivalentes (Liu *et al.* 2010), ejerciendo así el efecto inhibitorio observado durante el ensayo.

7.7.2 Actividad antimicrobiana *in silico* de la nanoformulación

Se seleccionaron proteínas membranales de cada uno de los microorganismos para llevar a cabo el ensayo de acoplamiento molecular, justificándose su elección en que rutinariamente el accionar antimicrobiano de los AE es vinculado a un daño en la membrana microbiana (Yap *et al.* 2021; Aouadhi *et al.* 2024; Andrade-Ochoa *et al.* 202; Nazzaro *et al.* 2024). Para ST se seleccionaron las proteínas BamA y OmpC debido a su importancia metabólica para la correcta formación de poros membranales que permiten el flujo de moléculas necesarias para el metabolismo (Gu *et al.* 2017; Belousov *et al.* 2023).

Por otra parte, para LM se seleccionó la proteína manosa fosfotransferasa (Man-PTS), debido a que está relacionada a su sensibilidad ante agentes antimicrobianos (Zhu *et al.* 2022) y la proteína ATP-asa 1 de calcio, necesaria para el balance osmótico mediante el flujo de calcio a través de la membrana celular (Hansen *et al.* 2021). En la tabla XI se muestran las energías de afinidad existentes entre las moléculas encapsuladas en la formulación y las proteínas seleccionadas expresadas en términos de energía libre de Gibbs (ΔG).

Puede observarse que las energías de afinidad presentadas rondan entre -4.5 y -7.5 Kcal/mol. Estos resultados son concordantes por los presentados por otros fitoquímicos evaluados a través de esta metodología (Naveed *et al.* 2021), siendo un indicativo de la capacidad de estas moléculas para unirse a dianas biológicas como las porinas de membrana (Kovačević, Z *et al.* 2024), ocasionando fallas en su correcto plegamiento, perdiendo su estructura y funcionalidad (Bunse *et al.* 2022).

Al emplear el visualizador de BIOVIA Discovery Studio, se pudo observar que los resultados obtenidos son producto de interacciones electrostáticas entre los fitoquímicos y las proteínas evaluadas (Figura 11).

Tabla X. Afinidad de los componentes encapsulados por las proteínas seleccionadas utilizando el programa PYRX.

Ligando	Energía de afinidad (Kcal/mol)			
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella Typhimurium</i>	
	Man-PTS	ATP asa	BamA	OmpC
α – humuleno	-6.9	-5.7	-6.7	-6.0
p – cimenol	-6.4	-5.3	-5.3	-6.8
γ – terpineno	-6.3	-5.2	-5.2	-6.8
β-cariofileno	-7.4	-5.7	-6.4	-6.8
Borneol	-6.0	-4.5	-5.9	-6.4
Butilhidroxisol	-6.5	-5.2	-5.9	-6.7
Carvacrol	-6.3	-5.1	-6.2	-6.7
Terpinen 4 ol	-6.0	-4.5	-5.7	-6.4
Timol	-7.5	-5.6	-5.8	-6.5
Timol metil éter	-5.6	-5.0	-5.6	-5.5
Óxido de cariofileno	-7.4	-5.6	-6.0	-6.2

Las interacciones entre proteínas y las moléculas presentes en los metabolitos secundarios pueden darse a través de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Yilmaz *et al.* 2022). La asociación del ligando con la proteína genera una pérdida de la función de esta última. A su vez, los componentes oxigenados son capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos funcionales amino o carboxilo aminoácidos. Además, los componentes alifáticos altamente hidrofóbicos del AE pueden interactuar con las regiones no polares de las proteínas por medio de interacciones hidrofóbicas (Zhang *et al.* 2021).

La combinación de los AE de orégano y tomillo mostró un efecto antimicrobiano sinérgico que incrementa su actividad biológica, a su vez, la co-encapsulación de los AE en NP ofrece una vía de administración que potencializa su actividad antimicrobiana y vuelve factible su uso como una alternativa a los conservadores sintéticos, pudiendo tener mayor aceptabilidad del público y manteniendo su efecto inhibitorio.

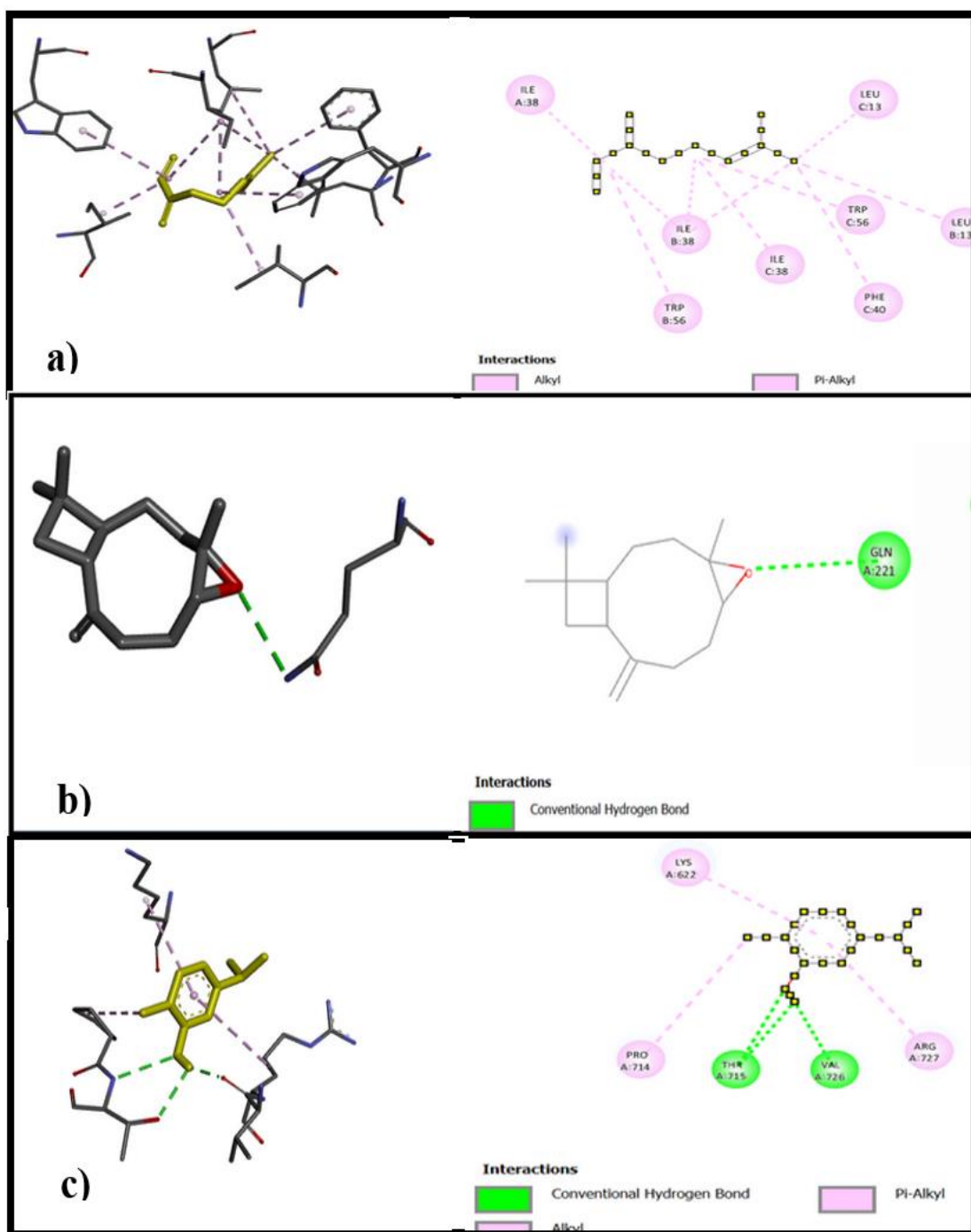


Figura 12. Interacciones entre fitoquímicos encapsulados y las proteínas evaluadas: a) β -mircenol interactuando hidrofóbicamente con los aminoácidos ILE 38, LEU 13, TRP 56, PHE 40 de la proteína OmpC de *S. Typhimurium*. b) Óxido de cariofileno unido mediante puentes de hidrógeno a la GLN221 de la Man PTS presente en *L. monocytogenes*. c) Carvacrol interactuando con puentes de hidrógeno con la THR715 y VAL726 y con interacciones hidrofóbicas con la PRO714, ARG727 y LYS627 de la proteína BamA de *S. Typhimurium*.

8. CONCLUSIÓN

La combinación de los AE de orégano y tomillo mostró un efecto antimicrobiano sinergista que incrementa su actividad biológica, a su vez, la co-encapsulación de los AE en NP ofrece una vía de administración que potencializa su actividad antimicrobiana y vuelve factible su uso como una alternativa a los conservadores sintéticos, pudiendo tener mayor aceptabilidad del público y manteniendo su efecto inhibitorio.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahzadeh E, Ojagh SM., Hosseini H., Ghaemi E. A., Irajian G., & Heidarlo, M. N.** 2016. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 100:70-74.
- Adams, R.P.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (2007). *Allured Publishing Corporation*: Carol Stream, IL, USA; pp. 1–804.
- Agregán R, Munekata PE, Zhang W, Zhang J, Pérez-Santaescolástica C & Lorenzo JM.** 2021. High-pressure processing in inactivation of *Salmonella* spp. in food products. *Trends in Food Science & Technology*, 107:31-37.
- Akermi, S., Smaoui, S., Fourati, M., Elhadef, K., Chaari, M., Chakchouk Mtibaa, A., & Mellouli, L.** 2022. In-depth study of *Thymus vulgaris* essential oil: towards understanding the antibacterial target mechanism and toxicological and pharmacological aspects. *BioMed Research International*, 2022: 1-20
- Alexa, V. T., Fratila, A. D., Oancea, R., Galuscan, A., Balean, O., Bolchis, V., ... & Jumanca, D.** 2024. Molecular Docking and Experimental Analysis of Essential Oil-Based Preparations on Biofilm Formation on Orthodontic Archwires. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(24): 13378.
- Ali A, Parisi A, Conversano M, Iannacci A, D’Emilio F, Mercurio V, & Normanno G.** 2020. Food-borne bacteria associated with seafoods: a brief review. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 7: 4-10.
- Aljamali, N. M.** 2021. Review on food poisoning (types, causes, symptoms, diagnosis, treatment). *Global Academic Journal of Pharmacy and Drug Research*, 3(4): 54-61.
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F.** 2019. Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(3), e13889.

- Aminzare M, Hashemi M, Hassanzadazar H, & Hejazi J.** 2016. The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products; a review. *Journal of Human, Environment and Health Promotion*, 1(2): 63-74.
- Andrade-Ochoa, S., Chacón-Vargas, K. F., Sánchez-Torres, L. E., Rivera-Chavira, B. E., Nogueta-Torres, B., & Nevárez-Moorillón, G. V.** 2021. Differential antimicrobial effect of essential oils and their main components: Insights based on the cell membrane and external structure. *Membranes*, 11(6): 405.
- Angane M, Swift S, Huang K, Butts C A, & Quek S. Y.** 2022. Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. *Foods*, 11(3): 464.
- Aouadhi, C., Jouini, A., Maaroufi, K., & Maaroufi, A.** 2024. Antibacterial effect of eight essential oils against bacteria implicated in bovine mastitis and characterization of primary action mode of *Thymus capitatus* essential oil. *Antibiotics*, 13(3): 237.
- Armendariz-Barragan B.** 2018. Nanomedicinas a base de productos naturales para el tratamiento de la tuberculosis. (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Asbahani A, Miladi K, Addi EA, Bitar A, Casabianca H, El Mousadik A, & Elaissari A.** 2015. Antimicrobial activity of nano-encapsulated essential oils: Comparison to non-encapsulated essential oils. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 4(1): 39-48.
- Avogadro - Free cross-platform molecular editor.** Avogadro. Recuperado el 6 de marzo de 2024, de <https://avogadro.cc/>
- Bag, A., & Chattopadhyay, R. R.** 2015. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PloS one*, 10(7): e0131321.

- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., & Sarmento, B.** 2020. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(4): 279-295.
- Bari ML & Yeasmin S.** 2018. Foodborne diseases and responsible agents. In *Food Safety and Preservation*. Elsevier: United Kingdom, pp: 195-229.
- Barberis S, Quiroga H, Barcia C, Talia M & Debattista N.** 2018. Natural food preservatives against microorganisms. *Food safety and preservation*, 621-658.
- Bassolé I & Juliani H.** 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4): 3989-4006.
- Belousov, M. V., Kosolapova, A. O., Fayoud, H., Sulatsky, M. I., Sulatskaya, A. I., Romanenko, M. N., ... & Nizhnikov, A. A.** (2023). OmpC and OmpF outer membrane proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* form Bona Fide amyloids. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21): 15522.
- Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R.** (2015). Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2015: 246012. <https://doi.org/10.1155/2015/246012>
- Bintsis T.** 2017. Patógenos transmitidos por los alimentos. *Microbiología AIMS*, 3 (3): 529–563.
- BIOVIA.** (2020). *Free download: BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. Dassault Systèmes. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G.** 2014. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7(Spec Iss 3), 56.
- Botelho MA, Nogueira P, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJA, & Brito GAC.** 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40: 349-356.

- Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D. R., Keusgen, M., ... & Wink, M.** 2022. Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. *Frontiers in Pharmacology*, 13: 956541.
- Caesar, L. K., & Cech, N. B.** 2019. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+ 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, 36(6): 869-888.
- Cam, M. E., Yildiz, S., Alenezi, H., Cesur, S., Ozcan, G. S., Erdemir, G., ... & Edirisinghe, M.** 2020. Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: an *in vitro* and *vivo* comparison study. *Journal of the Royal Society Interface*, 17(162): 20190712.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C.** 2014. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(4): 377-399.
- Castañeda-Ruelas G, Eslava-Campos C, Castro-del Campo N, León-Félix J, & Chaidez-Quiroz C.** 2014. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México* 56(6): 654-659.
- Castellanos Molina, F. R.** 2007. Biotransformación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de Naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Castro, H.** 2022. Epidemiology and growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* in raw milk production. (Tesis) University of Helsinki, Finlandia.
- Castro-Vargas R, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, & Rondón-Barragán IS** 2020. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*. 13(10): 2070.
- Caudill, E. R., Hernandez, R. T., Johnson, K. P., O'Rourke, J. T., Zhu, L., Haynes, C. L., ... & Pedersen, J. A.** 2020. Wall teichoic acids govern cationic gold

- nanoparticle interaction with Gram-positive bacterial cell walls. *Chemical Science*, 11(16): 4106-4118.
- Chen L, Wang J, Zhang R, Zhang H, Qi X, He Y, & Chen J.** 2022. An 11-year analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in Zhejiang province, China. *Foods*. 11(16): 2382.
- Christopoulou SD, Androutsopoulou C, Hahalis P, Kotsalou C, Vantarakis A, & Lamari FN.** 2021. Rosemary extract and essential oil as drink ingredients: An evaluation of their chemical composition, genotoxicity, antimicrobial, antiviral, and antioxidant properties. *Foods*. 10(12): 3143.
- Clinical Laboratory Standart Institute.** 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, 12 (9).
- Comisión de control analítico y ampliación de cobertura (CCAYAC).** 2011. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. *Secretaria de Salud*, revisión 0.
- Contreras-Soto MB, Medrano-Félix JA, Ibarra-Rodríguez JR, Martínez-Urtaza J, Chaidez Q C, Castro-del Campo N.** 2019. The last 50 years of *Salmonella* in México: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias*. 6: 1-26.
- Cotter, P. D., Gahan, C. G., & Hill, C.** 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response. *International Journal of Food Microbiology*, 60 (2-3): 137-146.
- Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, & Mozafari MR.** 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 10(2): 57.
- Danel, T., Łęski, J., Podlewska, S., & Podolak, I. T.** 2023. Docking-based generative approaches in the search for new drug candidates. *Drug Discovery Today*, 28(2): 103439.

- Dillen, K., Bridts, C., Van der Veken, P., Cos, P., Vandervoort, J., Augustyns, K., ... & Ludwig, A.** 2008. Adhesion of PLGA or Eudragit®/PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2): 234-240.
- Dipa, C. D., Hossain, S., Chy, M. M. K., Rahman, M. S. F., Kayes, T., Easha, A. M., ... & Sarkar, B. K.** 2025. *In silico* exploration of anticancer plant phytochemicals for EGFR-targeted lung cancer therapy. *Scientific Reports*, 15(1): 27809.
- Doern, C. D.** 2014. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12): 4124-4128.
- Dolai J, Mandal K, & Jana NR.** 2021. Nanoparticle size effects in biomedical applications. *ACS Applied Nano Materials*. 4(7): 6471-6496.
- Dos Santos, A. M., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A.** 2019. Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*, 76: 762-773.
- Escobar, A., Perez, M., Romanelli, G., & Blustein, G.** 2020. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12): 9243-9269.
- Espinosa-Carranza, N.** 2021. Valoración biofísica del carvacrol nanoencapsulados para su uso como dermoprotector (Tesis). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** 2011. Método General de Análisis 0251 (10ª ed.)
- Felter, S. P., Zhang, X., & Thompson, C.** 2021. Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121: 104887.

- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammourey N, & Benita S.** 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1): 1-4.
- Fikri, H. I., Fechtali, T., Timinouni, M., Zouheir, Y., & Mamoumi, M.** 2020. Structure activity modeling of essential oils compounds and plant secondary metabolites: a Mini review of Antimicrobial Activity. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 6(1): 85-91.
- Flores T, & Rojas, F.** 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5): 388-390.
- Froio F, Ginot L, Paolino D, Lebaz N, Bentaher A, Fessi H, & Elaissari A.** 2019. Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers*, 11(6): 1017.
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A.** 2019. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Science & Nutrition*, 7(5): 1704-1714.
- Geng, S., Cui, Z., Huang, X., Chen, Y., Xu, D., & Xiong, P.** 2011. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. *Industrial Crops and Products*, 33(1): 248-252.
- Granata G. Stracquadanio S, Leonardi M, Napoli E, Consoli GML, Cafiso V, & Geraci C.** 2018. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*, 269: 286-292.
- Gong, B., Li, H., Feng, Y., Zeng, S., Zhuo, Z., Luo, J., ... & Li, X.** (2022). Prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* in hospitalized patients in Conghua District of Guangzhou, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12: 805384.

- González Moreno, B. J.** 2024. Efecto conservador de cubiertas biopoliméricas a base de nanoingredientes con aceite esencial de *Lippia graveolens* en la vida de anaquel de productos hortofrutícolas (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Gu, Y., Zeng, Y., Wang, Z., & Dong, C.** 2017. BamA β 16C strand and periplasmic turns are critical for outer membrane protein insertion and assembly. *Biochemical Journal*, 474(23): 3951-3961.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., & Galotto, M. J.** 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2): 144-150.
- Guimarães L, da Silva MLM, Reis PCJ, Costa MTR, & Alves LL.** 2015. General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of *Lippia sidoides*. *Natural Product Communications*, 10(11):1861-1867.
- Gupta, P., Kumar, M., & Sachan, N.** 2015. An overview on polymethacrylate polymers in gastroretentive dosage forms. *Open Pharmaceutical Sciences Journal*, 2(1).
- Hami, Z.** 2021. A brief review on advantages of nano-based drug delivery systems. *Annals of Military and Health Sciences Research*, 19 (1).
- Hansen, S. B., Dyla, M., Neumann, C., Quistgaard, E. M. H., Andersen, J. L., Kjaergaard, M., & Nissen, P.** 2021. The crystal structure of the Ca^{2+} -ATPase 1 from *Listeria monocytogenes* reveals a pump primed for dephosphorylation. *Journal of Molecular Biology*, 433(16): 167015.
- Hossain, M. J., Samadd, M. A., Urmi, M. N. Z., Reshmi, M. F. Y., Hossen, M. S., & Rashid, M. A.** 2025. Phytochemical isolation and antimicrobial, thrombolytic, anti-inflammatory, analgesic, and antidiarrheal activities from the shell of commonly available *Citrus reticulata* Blanco: Multifaceted role of polymethoxyflavones. *Nutrition and Metabolic Insights*, 18: 11786388251327668.

- Huang, X., & Brazel, C. S.** 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3): 121-136.
- Inobeme, A., & Adetunji, C. O.** 2024. Application of essential oils in the food industry. In *Applications of Essential Oils in the Food Industry*, 2024, 1-8.
- Ivanek R, Gröhn YT, Tauer LW, & Wiedmann M.** 2005. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8): 513-523.
- Iwu CD, & Okoh AI.** 2019. Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22): 4407.
- Jain, A. K., & Thareja, S.** 2019. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1): 524-539.
- Jeckelmann, J. M., & Erni, B.** 2020. The mannose phosphotransferase system (Man-PTS)-Mannose transporter and receptor for bacteriocins and bacteriophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862 (11): 183412.
- Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, & Liu XL.** 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(1): 63-68.
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W.** 2022. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: A new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(7): 1740-1751.
- Jummes B, Sganzerla WG, da Rosa CG, Noronha CM, Nunes MR, Bertoldi FC, & Barreto, PLM.** 2020. Antioxidant and antimicrobial poly-ε-caprolactone nanoparticles loaded with *Cymbopogon martinii* essential oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23: 101499.

- Kon, K., & Rai, M.** 2012. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. *Nusantara Bioscience*, 4: 50-56.
- Kovačević, Z., Čabarkapa, I., Šarić, L., Pajić, M., Tomanić, D., Kokić, B., & Božić, D. D.** (2024). Natural Solutions to Antimicrobial Resistance: The Role of Essential Oils in Poultry Meat Preservation with Focus on Gram-Negative Bacteria. *Foods*, 13(23): 3905.
- Lalani, A., Pouyani, N., Askari, A., Tavajohi, S., Akbari, S., & Jafarzadeh, E.** 2024. Food additives, benefits, and side effects: A review article. *Journal of Chemical Health Risks*, 1(1): 1.
- Lammari N, Louaer O, Meniai AH, & Elaissari A.** 2020. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*, 12(5): 431.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., & Burt, S. A.** 2014. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1): 76-94.
- Leber, A.** (Ed.) 2016. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4: 5.16.1-5.16.23. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>
- Liu, S. P., Zhou, L., Lakshminarayanan, R., & Beuerman, R. W.** 2010. Multivalent antimicrobial peptides as therapeutics: design principles and structural diversities. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16: 199-213.
- Liu, Y., Yang, G., Jin, S., Xu, L., & Zhao, C. X.** 2020. Development of high-drug-loading nanoparticles. *ChemPlusChem*, 85(9): 2143-2157.
- Lugo Estrada, L.** 2018. Nanoencapsulación de aceites esenciales para el control *Aedes aegypti* (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Lugo-Estrada L, Galindo-Rodríguez SA, Pérez-López LA, Waksman-de-Torres N and Álvarez-Román R.** 2019. Headspace–solid-phase microextraction gas

- chromatography method to quantify *Thymus vulgaris* essential oil in polymeric nanoparticles. *Pharmacognosy Magazine*, 15(1): 473–478.
- Machado TF, Nogueira NAP, Pereira RDCA, Sousa CTD, & Batista VV.** 2014. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45: 699-705.
- Mandal, S., & DebMandal, M.** 2016. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 1: 825-834.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... & Nabavi, S. M.** 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210: 402-414.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., ... & Daglia, M.** 2018. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: Mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*, 34(6): 630-656.
- Marín M, Gómez ML, Molinos ACM, Belloso MS, Negru GC, & Moraleda BJ.** 2021. Infección por *Listeria monocytogenes*: Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Revista Sanitaria de Investigación*, 2(9): 168.
- Marin-Tinoco, R. I., Ortega-Ramírez, A. T., Esteban-Mendez, M., Silva-Marrufo, O., Barragan-Ledesma, L. E., Valenzuela-Núñez, L. M., ... & Navarrete-Molina, C.** 2023. Antioxidant and antibacterial activity of Mexican oregano essential oil, extracted from plants occurring naturally in semiarid areas and cultivated in the field and greenhouse in Northern Mexico. *Molecules*, 28(18): 6547.
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., ... & Serio, A.** 2015. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50: 794-803.

- Merino L, Procura F, Trejo FM, Bueno DJ, & Golowczyc MA.** 2019. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control, and eradication strategies. *Food Research International*, 119: 530-540.
- Monteiro PC, Majolo C, Chaves FCM, Bizzo HR, Almeida O'Sullivan FL, & Chagas EC.** 2021. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* against *Aeromonas* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 33(2): 152-161.
- Monteiro Marques, J., Serrano, S., Selmi, H., Giesteira Cotovio, P., & Semedo-Lemsaddek, T.** (2023). Antimicrobial and antibiofilm potential of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils against pure and mixed cultures of foodborne bacteria. *Antibiotics*, 12(3): 565.
- Moo, C. L., Yang, S. K., Osman, M. A., Yuswan, M. H., Loh, J. Y., Lim, W. M., ... & Lai, K. S.** 2020. Antibacterial Activity and Mode of Action of β -caryophyllene on. *Polish Journal of Microbiology*, 69(1): 49-54.
- Moody, J.** 2004. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution method. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 1-28.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A.** (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2): 113-142.
- Murbach-Teles BF, Nunes Barbosa L, da Silva PI, & Fernandes JA.** 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1): 34-40.
- Naveed, M., Ali, N., Aziz, T., Hanif, N., Fatima, M., Ali, I., ... & Albekairi, T. H.** 2024. The natural breakthrough: phytochemicals as potent therapeutic agents against *Spinocerebellar ataxia* type 3. *Scientific Reports*, 14(1): 1529.
- Nazzaro, F., Ombra, M. N., Coppola, F., De Giulio, B., d'Acierno, A., Coppola, R., & Fratianni, F.** 2024. Antibacterial activity and prebiotic properties of six types of lamiaceae honey. *Antibiotics*, 13(9): 868.

- Olaimat AN, Al-Holy MA, Shahbaz HM, Al-Nabulsi AA, Abu Ghoush MH, Osaili TM, & Holley RA.** 2018. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5): 1277-1292.
- Olea-Flores.** 2018. Perfil toxicológico de una nanoformulación a base de extractos de *Schinus molle* obtenido a partir de ensayos *in vivo* e *in vitro*. (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Orchard, A., & van Vuuren, S.** 2017. Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: 4517971.
- Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgueño MR, Acedo-Félix E, González-León A, Morales-Trejo A, & Vázquez-Moreno L.** 2011. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Lippia palmeri* S. Wats). *Rev Fitotec Mex*, 34(1): 11-17.
- Pateiro M, Munekata PE, Sant'Ana AS, Domínguez R, Rodríguez-Lázaro D, & Lorenzo JM.** 2021. Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337: 108966
- Piña Barrera, A. M.** 2019. Desarrollo de nanoingredientes funcionales a base de productos naturales para preservar productos hortofrutícolas. (Tesis). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Pinto, L., Tapia-Rodríguez, M. R., Baruzzi, F., & Ayala-Zavala, J. F.** 2023. Plant antimicrobials for food quality and safety: Recent views and future challenges. *Foods*, 12(12): 2315.
- Pittia, P., & Antonello, P.** 2016. Safety by control of water activity: Drying, smoking, and salt or sugar addition. *In Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*, 2016: 7-28.

- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, & Ignacimuthu S.** 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1): 1-8.
- PubChem. Recuperado el 6 de febrero de 2024, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- PyRx – python prescription – virtual screening tool.** Recuperado el 6 de febrero de 2024, de <https://pyrx.sourceforge.io/>
- Rajčević, N., Bukvički, D., Dodoš, T., & Marin, P. D.** 2022. Interactions between Natural Products—A Review. *Metabolites*, 12(12): 1256.
- Ranjbar R, & Halaji M.** 2018. Epidemiology of *Listeria monocytogenes* prevalence in foods, animals and human origin from Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 18(1): 1-12.
- Rathore, S., Mukhia, S., Kumar, R., & Kumar, R.** 2023. Essential oil composition and antimicrobial potential of aromatic plants grown in the mid-hill conditions of the Western Himalayas. *Scientific Reports*, 13(1): 4878.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P.** 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5): 614-619.
- RCSB Protein Data Bank.** *RCSB PDB: Homepage*. Recuperado el 6 de febrero de 2024, de <https://www.rcsb.org/>
- Regenthal P, Hansen JS, André I, & Lindkvist-Petersson K.** 2017. Thermal stability and structural changes in bacterial toxins responsible for food poisoning. *PloS one*, 12(4): e0175989
- Reyes-Jurado, F., López-Malo, A., & Palou, E.** (2016). Antimicrobial activity of individual and combined essential oils against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, 79(2), 309-315.
- Ribeiro FP, Santana de Oliveira M, de Oliveira A, Santana Barbosa MP, Moacir do Rosario Marinho A, de Aguiar AEH, & Favacho RA.** 2021. Chemical

- composition and antibacterial activity of the *Lippia origanoides* kunth essential oil from the carajás national forest, Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021: 930336.
- Ribeiro-Santos R, Andrade M, & Sanches-Silva A.** 2017. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 14: 78-84.
- Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E., & Mata, R.** 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *Journal of Food Science*, 76(2): C309-C317.
- Rocha-Uribe, J. A., Sandoval-Peraza, V. M., Córdova, M. F., & Armenta, L. C. S.** 2024. Comparison of the composition and cost estimation of steam distillation and supercritical fluid extraction from leaves of *Lippia graveolens*. *Latin American Applied Research-an International Journal*, 54(2): 271-276.
- Rodríguez-Cavallini, Evelyn, Rodríguez, César, Gamboa, María del Mar, & Arias, María Laura.** 2010. Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60 (2): 179-183.
- Romero, V. L., Pons, P., Bocco, J. L., Manzo, R. H., & Alovero, F. L.** (2012). Eudragit E100® potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 334(2): 102-110.
- Rosas, M. R.** (2007). Contaminaciones alimentarias. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 26(6): 95-100.
- Rubio-Ortega, A., Travieso-Novelles, M. D. C., Riverón-Alemán, Y., Martínez-Vasallo, A., Peña-Rodríguez, J., Espinosa-Castaño, I., & Pino-Pérez, O.** 2018. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. *Revista de Salud Animal*, 40(3): e2224-4700

- Rzycki, M., Gładysiewicz-Kudrawiec, M., & Kraszewski, S.** 2024. Molecular guidelines for promising antimicrobial agents. *Scientific Reports*, 14(1): 4641.
- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A.** 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5): 269-279.
- Saeed, K., Pasha, I., Jahangir Chughtai, M. F., Ali, Z., Bukhari, H., & Zuhair, M.** 2022. Application of essential oils in food industry: Challenges and innovation. *Journal of Essential Oil Research*, 34(2): 97-110.
- Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., & Da Cunha, A. P.** 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, 69(01): 80-83.
- São Pedro A, Santo I, Silva C, Detoni C, & Albuquerque E.** 2013. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 2: 1364-1374.
- Satyal, P., Murray, B. L., McFeeters, R. L., & Setzer, W. N.** 2016. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4): 70.
- Selvamani V.** 2019. Stability studies on nanomaterials used in drugs. En *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, 2019: 425-444.
- Shannon E, Majowicz JM, Elaine S, Frederick J.A, Martyn K, Sarah J. O'Brien, Timothy F.J, Aamir F, Robert M.H.** 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (6): 882–889.
- Shamloo E, Hosseini H, Abdi Moghadam Z, Halberg Larsen M, Haslberger A, Alebouyeh M.** 2019. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran J Vet Res*, 20 (4): 241-254.

- Shen, S., Wu, Y., Liu, Y., & Wu, D.** 2017. High drug-loading nanomedicines: progress, status, and prospects. *International Journal of Nanomedicine*, 2017: 4085-4109.
- Sienkiewicz M, Łysakowska M, Pastuszka M, Bienias W, & Kowalczyk E.** 2013. The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18(8): 9334-9351.
- Silva-Flores, P.** 2019. Desarrollo y evaluación dermatocinética de nanopartículas con aceites esenciales para su aplicación en piel. (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Simpson R, Sallade L, Sanchez E, Zhang Y, & Naumova E.** 2022. Analysing foodborne illness outbreak severity in the USA, 2009–19. *The Lancet Global Health*, 10: 5.
- Šojić B, Pavlić B, Ikonić P, Tomović V, Ikonić B, Zeković Z, & Ivić M.** 2019. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. *Meat Science*, 157: 107879.
- Soltani, S., Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., & Jelvehgari, M.** 2016. Design of eudragit RL nanoparticles by nanoemulsion method as carriers for ophthalmic drug delivery of ketotifen fumarate. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(5): 550.
- Sousa Geros, A., Simmons, A., Drakesmith, H., Aulicino, A., & Frost, J. N.** 2020. The battle for iron in enteric infections. *Immunology*, 161(3): 186-199.
- Spiorescu, V. A., Chircov, C., Grumezescu, A. M., & Andronescu, E.** 2021. Polymeric nanoparticles for antimicrobial therapies: An up-to-date overview. *Polymers*, 13(5): 724.
- Stanaway JD, Parisi A, Sarkar K, Blacker BF, Reiner RC, Hay SI, & Crump JA.** 2019. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(12): 1312-1324.

- Song, M. R., & Im, M.** 2018. Moderating effects of food type and consumers' attitude on the evaluation of food items labeled “additive-free”. *Journal of Consumer Behaviour*, 17(1): 1-12.
- Sundar, S. K., & Parikh, J. K.** 2023. Advances and trends in encapsulation of essential oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 635: 122668.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R.** 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1): 3012462.
- Quynh, C. T. T., & Trang, V. T.** 2019. Volatile composition, antioxidant property and antimicrobial activities against food-borne bacteria of Vietnamese thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(3B): 127-136.
- Tabit FT.** 2018. Contamination, Prevention and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Processing and Food Service Environments. *IntechOpen*, 2018: 72-80.
- Tardugno, R., Serio, A., Purgatorio, C., Savini, V., Paparella, A., & Benvenuti, S.** 2022. *Thymus vulgaris* L. essential oils from Emilia Romagna Apennines (Italy): phytochemical composition and antimicrobial activity on food-borne pathogens. *Natural Product Research*, 36(3): 837-842.
- Thielmann, J., Muranyi, P., & Kazman, P.** 2019. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6).
- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R.** 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5): 835-855.
- Turek, C., & Stintzing, F. C.** 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1): 40-53.

- Ubgade, S., Kilor, V., Ittadwar, A., & Ubgade, A.** 2019. Nanosuspensions as Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *Medicinal Chemistry with Pharmaceutical Product Development*, 2019: 105-154.
- Valero-Pacheco, N., Blight, J., Aldapa-Vega, G., Kemlo, P., Pérez-Toledo, M., Wong-Baeza, I., ... & López-Macías, C.** 2020. Conservation of the OmpC porin among typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* serovars. *Frontiers in Immunology*, 10: 2966.
- Valková V, Ďuranová H, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, & Kačániová M.** 2021. *In vitro* antimicrobial activity of lavender, mint, and rosemary essential oils and the effect of their vapours on growth of *Penicillium* spp. in a bread model system. *Molecules*, 26(13): 3859.
- Van Asten, A. J., & van Dijk, J. E.** 2005. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(3): 251-259.
- Vanti, G.** 2021. Recent strategies in nanodelivery systems for natural products: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6): 4311-4326.
- Vassallo, A., Silletti, M. F., Faraone, I., & Milella, L.** 2020. Nanoparticulate antibiotic systems as antibacterial agents and antibiotic delivery platforms to fight infections. *Journal of Nanomaterials*, 2020(1): 6905631.
- Vázquez-Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, & Kreft J.** 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (3): 584–640.
- Velázquez-Dávila L.** 2017. Evaluaciones dermatocinéticas y antimicóticas de productos naturales incorporados en nanocápsulas biodegradables. (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

- Wambaugh, M. A., & Brown, J. C.** 2018. High-throughput identification of synergistic drug combinations by the Overlap2 method. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 135: 57241.
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L.** 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 2017: 1227-1249.
- WHO.** 2018. Listeriosis. [Listeriosis \(who.int\)](http://www.who.int)
- World Health Organization, N. D.** 2002. Food safety and foodborne illness. *Biochim. Clin*, 26, 39. Recupe rado de [who-food_safety_fact-sheet.pdf \(wordpress.com\)](http://www.who-food_safety_fact-sheet.pdf)
- Xu, Q., Guo, M., & Yu, F.** 2023. β -Barrel assembly machinery (BAM) complex as novel antibacterial drug target. *Molecules*, 28(9): 3758.
- Yap, P. S. X., Yusoff, K., Lim, S. H. E., Chong, C. M., & Lai, K. S.** 2021. Membrane disruption properties of essential oils—A double-edged sword? *Processes*, 9(4): 595.
- Yavari, A., Nazeri, V., Sefidkon, F., & Hassani, M. E.** 2010. Influence of some environmental factors on the essential oil variability of *Thymus migricus*. *Natural Product Communications*, 5(6): 1934578X1000500629.
- Yilmaz, H., Gultekin Subasi, B., Celebioglu, H. U., Ozdal, T., & Capanoglu, E.** 2022. Chemistry of protein-phenolic interactions toward the microbiota and microbial infections. *Frontiers in Nutrition*, 9, 914118.
- Yuan, Y., Huang, M., Pang, Y. X., Yu, F. L., Chen, C., Liu, L. W., ... & Hu, X.** 2016. Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. *Molecules*, 21(8): 1024.
- Zaidi, S., Misba, L., & Khan, A. U.** 2017. Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(7): 2281-2301.

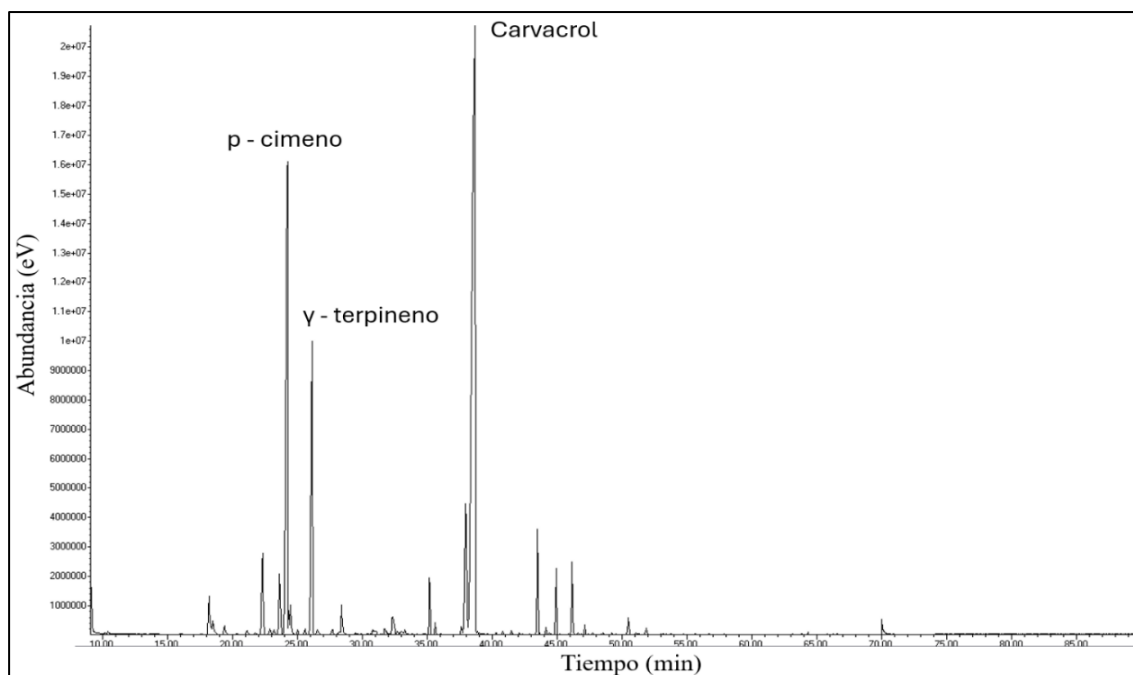
- Zamora-Mendoza A.** 2022. Efecto de la nanoencapsulación de los aceites esenciales de *Schinus molle* L. y *Thymus vulgaris* L. sobre la concentración letal 50 utilizando los modelos de hemólisis eritrocitaria inducida y *Artemia salina*. (Tesis) Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Zhang, Q., Cheng, Z., Wang, Y., & Fu, L.** 2021. Dietary protein-phenolic interactions: Characterization, biochemical-physiological consequences, and potential food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(21): 3589-3615.
- Zhen, J. B., Yi, J., Ding, H. H., & Yang, K. W.** 2022. Self-assembled cationic nanoparticles combined with curcumin against multidrug-resistant bacteria. *ACS omega*, 7(34): 29909-29922.
- Zhu, L., Zeng, J., Wang, C., & Wang, J.** 2022. Structural basis of pore formation in the mannose phosphotransferase system by pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3): e01992-21.
- Zhu Y, Li C, Cui H, & Lin L.** 2021. Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. *Food Control*, 2021:123
- Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, Durazzo A, Lucarini M, Eder P, Silva AM, Santini A, & Souto EB.** 2020. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16): 3731.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de las combinaciones de los AE de orégano y tomillo frente a microorganismos patógenos de distinta naturaleza.
- Evaluar la integración de la formulación en empaques activos para su aplicación en alimentos.
- Co-encapsular los AE en nanopartículas de distinta naturaleza polimérica para mejorar su incorporación.

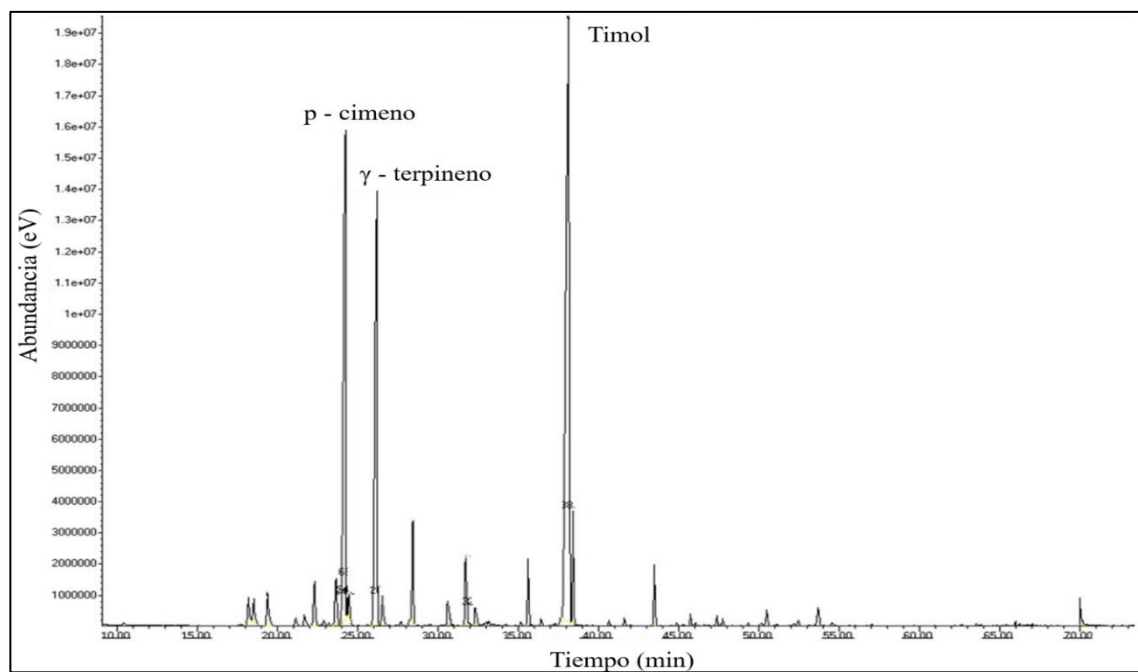
11. ANEXOS

ANEXO 1



Espectro de masas del AE de orégano obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de espectroscopia de masas (González-Moreno, 2024).

ANEXO 2



Espectro de masas del AE de tomillo obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de espectroscopia de masas (Piña-Barrera, 2019).