



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ESPECIALIDAD EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE
ALIMENTOS**

TESINA

“Estudio de la inhibición de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* por fase de vapor del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer)”

Presenta:

Fatima Reyes Jurado

Director interno:

Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Director externo:

Dr. Aurelio López-Malo

OCTUBRE 2014

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
4.1 Aceites esenciales.....	4
4.1.1 Extracción de aceites esenciales.....	4
4.1.2 Caracterización química de los aceites esenciales.....	5
4.2 Efecto antimicrobiano.....	7
4.3 Mohos representativos en alimentos.....	9
4.3.1 Género de <i>Penicillium</i>	9
4.3.2. Género de <i>Aspergillus</i>	11
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	13
6. MATERIALES	
6.1 Materia prima.....	14
6.2 Microorganismos.....	14
7. MÉTODOLÓGÍA	
7.1 Obtención del aceite esencial.....	14
7.2 Composición química del aceite esencial.....	15
7. 3 Preparación de los sistemas modelo.....	15
7. 4 Preparación del inóculo.....	15
7.5 Medición de actividad de agua y pH.....	16
7.6 Inoculación e incubación en los sistemas modelo.....	16
7.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).....	16
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
9. CONCLUSIONES.....	25
10. RECOMENDACIONES.....	25
11. BIBLIOGRAFÍA.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

1. Algunos componentes volátiles de acuerdo al grupo funcional mayoritario del aceite esencial.....	6
2. Principales componentes volátiles de aceites esenciales de especias y plantas encontradas comúnmente.....	7
3. Principales compuestos en el aceite esencial del orégano mexicano (<i>Lippia berlandieri</i> Schauer) determinados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. (CG-MS).....	18
4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los aceites esenciales en fase vapor....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema del proceso de la extracción asistida por microondas.....	5
2. Morfología del género <i>Penicillium</i>	10
3. <i>Penicillium expansum</i>	11
4. Morfología del género <i>Aspergillus</i>	12
5. <i>Aspergillus niger</i>	12
6. Respuesta de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.99.....	20
7. Respuesta de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.97.....	20
8. Respuesta de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.99.....	21
9. Respuesta de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.97.....	21
10. Respuesta de <i>Penicillium expansum</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.99.....	22
11. Respuesta de <i>Penicillium expansum</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.97.....	23
12. Respuesta de <i>Penicillium expansum</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.99.....	23
13. Respuesta de <i>Penicillium expansum</i> en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.97.....	24

RESUMEN

La actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas y especias adicionados en forma directa a sistemas modelo ha sido estudiada y evaluada constantemente durante los últimos años. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en fase vapor y su efectividad contra mohos, levaduras y bacterias empezó a investigarse recientemente, siendo aún escasos los reportes sobre el efecto de diversos aceites esenciales sobre distintos microorganismos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antifúngico que tiene el aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en su fase vapor contra el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* a fin de identificar su posible uso potencial como antimicrobianos naturales. El aceite esencial fue obtenido mediante extracción asistida por microondas, la actividad antifúngica fue probada mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), las cuales fueron establecidas mediante la inoculación de esporas de ambos mohos en sistemas modelo formulados con agar papa-dextrosa y ajustado a dos niveles de pH (4.5 y 5.5) que a su vez fueron ajustados a dos valores de actividad de agua (0.97 y 0.99), dichos sistemas modelo fueron expuestos a los vapores generados por diferentes concentraciones del aceite esencial e incubados a temperatura a 25°C. El crecimiento radial en ambos mohos fue determinado durante 21 días; asimismo, se determinaron las curvas de crecimiento bajo las distintas condiciones de actividad de agua, pH y concentración del aceite esencial. El aceite esencial de orégano mexicano presentó actividad antifúngica contra ambos mohos puesto que en la mayoría de los sistemas modelo logró frenar el máximo crecimiento radial de

ambos mohos, por lo que abre una posibilidad de emplear el aceite esencial como conservador natural.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se puede apreciar un incremento en la demanda por productos naturales, inocuos y de buena calidad; tomando en cuenta esta tendencia, se ha promovido el desarrollo de investigaciones dentro del área de microbiología de alimentos, que busquen el avance tecnológico de alimentos mínimamente procesados y del control microbiano en diferentes productos (Goñi y *col.*, 2009)

En este sentido, considerando las exigencias de los consumidores, y con el fin de suplir aditivos sintéticos comúnmente utilizados por aditivos naturales, se han realizado numerosas investigaciones sobre el efecto antimicrobiano que poseen los aceites esenciales extraídos de plantas y especias, obteniendo resultados efectivos. Sin embargo, su uso real en alimentos al aplicarlos de forma directa, ha mostrado también modificaciones sensoriales en los alimentos a los cuales se les han incorporado (Inouye y *col.*, 2006; Goñi y *col.*, 2009). Recientes investigaciones han demostrado que el uso de aceites esenciales en fase vapor, también poseen propiedades antimicrobianas (Gómez- Sánchez y *col.*, 2011; Avila-Sosa y *col.*, 2012), lo que pudiera resultar en una mínima modificación sensorial en los productos en los que se apliquen. No obstante, la importancia de seguir investigando las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales en fase vapor reside en un avance tecnológico y en una posible aplicación real en alimentos (Tzortzakis, 2007).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la fase vapor del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en la conservación de alimentos; para ello se determina la composición química del mismo y su efecto antifúngico sobre la inhibición de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a las tendencias actuales por consumir alimentos seguros, naturales y de buena calidad, se ha incrementado la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y de compatibilidad con los alimentos. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural derivados de plantas y especias que pueden sustituir a los antimicrobianos tradicionales. Por otro lado, en los últimos años, la industria alimentaria ha mostrado interés en los extractos y aceites esenciales derivados de las plantas debido a sus propiedades antimicrobianas. Sin embargo, se ha observado que existe una modificación organoléptica cuando se emplean los aceites esenciales de manera directa en los alimentos. Por lo anterior, el estudiar el efecto que tienen los vapores de los aceites esenciales contra diferentes microorganismos podría ser una buena alternativa en la búsqueda de métodos de conservación de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inhibición de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* durante la exposición a los vapores generados por el aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) mediante extracción asistida por microondas.
2. Caracterizar los componentes químicos del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
3. Evaluar la inhibición de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* durante la exposición a los vapores generados por el aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en sistemas modelo con diferentes valores de actividad de agua y pH

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Aceites esenciales

En muchos países existe una gran variedad de plantas y especias, las cuales tienen diferentes usos conforme a la cultura y costumbres de cada región. Muchas de estas plantas y especias se han relacionado con propiedades antimicrobianas (López-Malo y *col.*, 2005; Raybaudi-Massilia y *col.*, 2006). De acuerdo a Tajkarimi y *col.* (2010), se han encontrado alrededor de 1340 plantas a las que se les han atribuido propiedades antimicrobianas y en las cuales se han identificado alrededor de 30,000 componentes activos.

Los principales componentes de una planta y/o especia incluyen a los glucósidos, saponinas, taninos, alcaloides, ácidos orgánicos y componentes volátiles, entre otros; de los cuales muchos actúan como protección de las plantas y especias contra infecciones microbiológicas del medio ambiente (Tajkarimi y *col.*, 2010).

Un subproducto de las diferentes partes de las plantas y especias son los aceites esenciales los cuales son líquidos volátiles y aromáticos, ellos se forman normalmente en células vegetales especiales, que se encuentran en hojas y tallos, y comúnmente se concentran en una región en particular, tales como hojas, corteza o frutos (Gutierrez y *col.*, 2008).

4.1.1 Extracción de aceites esenciales

Para la extracción de los aceites esenciales se utilizan diferentes métodos, dos de los principales son la destilación por medio de arrastre de vapor y la extracción con solventes orgánicos (Sivropoulou y *col.*, 1996). En ambos casos, la energía utilizada y las emisiones de dióxido de carbono resultan una desventaja, además de que debe tenerse especial cuidado en el manejo y almacenamiento de los aceites esenciales, dado que son líquidos viscosos, altamente volátiles y sensibles a altas temperaturas (Kalemba y Kunicka, 2003; Raybaudi-Massilia y *col.*, 2006).

Por lo anterior, y con el fin de reducir las emisiones de dióxido de carbono y ahorrar energía, la industria alimentaria ha encontrado una nueva tecnología para extraer los aceites esenciales. La mayor ventaja de la técnica “extracción asistida con microondas” reside en la reducción del tiempo y del volumen del solvente requerido, lo que automáticamente ayuda

a desarrollar menores cantidades de dióxido de carbono en la atmósfera (Périno-Issartier y *col.*, 2010). La extracción asistida por microondas (Figura 1) es una técnica que utiliza la energía de las microondas para calentar los solventes que entran en contacto con la muestra por lo que, la rápida habilidad para calentar la muestra y el solvente, el poco tiempo requerido en el proceso (15-30 min) y los bajos volúmenes de solventes utilizados son la mayor ventaja en esta técnica (Sparr y Björklund, 2000).

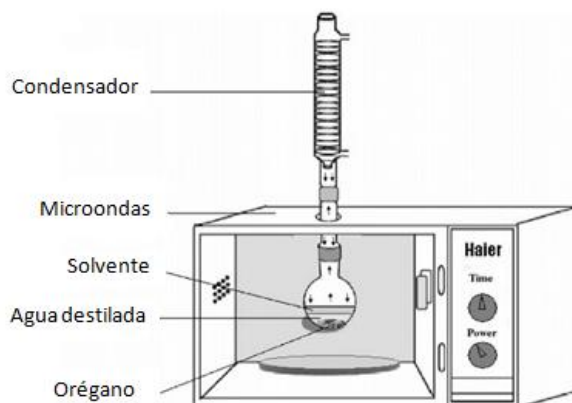


Fig. 1 Esquema del proceso de la extracción asistida por microondas

4.1.2 Caracterización química de los aceites esenciales

La composición de los aceites esenciales varía de acuerdo a las diferentes partes de la planta de las cuales se extrae (Burt, 2004), y puesto que sus compuestos volátiles son los que presentan el efecto antimicrobiano, la determinación de su composición es importante; para ello, diversos investigadores emplean la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS) (Caccioni y *col.*, 1998; Lee y *col.*, 2005; Tyagi y Malik, 2011; Gómez-Sánchez y *col.*, 2011).

Asimismo, se ha demostrado que los principales componentes volátiles de estos aceites derivan de un grupo de terpenoides, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos, los cuales a su vez contienen diferentes grupos de hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres y cetonas. Por lo tanto, de acuerdo al grupo químico funcional de cada aceite esencial, se derivan sus componentes principales. En la Tabla 1 se pueden apreciar algunos de los diferentes componentes dependiendo del grupo químico funcional al que pertenecen.

Tabla 1. Algunos componentes volátiles de acuerdo al grupo funcional mayoritario del aceite esencial

Grupo Químico Funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol, eugenol, timol
Aldehídos	Citral, citronela, benzaldehido, cinamaldehido
Alcoholes	Terpenos, borneol, mentol, geraniol, linalol, feniletanol
Alcoholes sesquiterpenos	Farnesol, cedro
Cetonas	Alcanfor, carvona, α -tujona
Ésteres	Acetato de linalilo, salicilato de metilo, etil acetato, anetol
Éteres y Oxidos	Metil timol, cineol
Hidrocarburos	Careno, β -cariofileno, α -pineno, limoneno

Adaptada de Inouye *et al.*, 2006

Se ha reportado que los componentes mayoritarios pueden alcanzar hasta un 85% de la composición total del aceite esencial, mientras que los demás pueden estar presentes sólo como trazas, tal como se observa en la Tabla 2 (Solórzano-Santos y Miranda-Novales 2011; Fisher y Phillips, 2008 y Tajkarimi y *col.*, 2010).

Tabla 1. Principales componentes volátiles de aceites esenciales de especias y plantas encontradas comúnmente

Nombre común	Nombre científico	Componente mayoritario	Composición aproximada (%)
Cilantro	<i>Coriandrum sativum (seeds)</i>	Linalol E-2-decanal	70% -
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol Y-Terpineno p-cimeno	traza 80% traza 64% 2-52% traza 52%
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno Acetato de bornilo Alcanfor 1,8 cineol	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Acetato de eugenilo	75-85% 8-15%
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol Carvacrol Y-Terpineno p-cimeno	10-64% 2-11% 2-31% 10-56%

Adaptada de Burt, 2004

4.2 Efecto antimicrobiano de aceites esenciales

De acuerdo al creciente interés por utilizar aditivos naturales que aseguren la inocuidad y calidad alimentaria, numerosos investigadores han propuesto el uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos (Kalemba y Kunicka, 2003). El efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente y su actividad puede ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo (propiedades bacteriostáticas o fungistáticas) (Smith-Palmer, y col., 1998) o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9% de la población del microorganismo (propiedades bactericidas o fungicidas) (Burt, 2004). Igualmente, la actividad de los aceites esenciales contra mohos también puede ser evaluada por el control de la inhibición de la esporulación y la producción de toxinas (Kalemba y Kunicka, 2003).

En este sentido, se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que debe atacar (Kalemba y Kunicka 2003; López-Malo *y col.*, 2005; Fisher y Phillips, 2008; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2011).

El modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter (hidrófilo o hidrófobo) se debe a que tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplásmicas, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo. Respecto a sus componentes, ellos también pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Smith-Palmer *y col.*, 1998; Kalemba y Kunicka 2003; Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008; Solórzano-Santos y Miranda-Novales 2011). Delaquis *y col.* (2002) y Holley y Patel (2005) mencionan que los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. En el mismo sentido, en una investigación realizada por Fisher y Phillips (2008), se reporta que el carvacrol aumenta la fluidez de la membrana y causa fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y la inhibición de la síntesis del ATP. Por otra parte, la citronela interfiere con los procesos de fotosíntesis, lo que indicaría que los aceites esenciales no sólo pueden estar actuando en la pared celular, sino que además pueden tener un efecto mayor sobre los sistemas metabólicos. Del mismo modo, Fisher y Phillips (2008) refieren que el mentol tiene un efecto “antiplásmido” (secuencia extracromosómica de ADN que no puede ser compartida entre los patógenos) lo que hace interrumpir la eficiencia de la célula.

Por otro lado, en las bacterias Gram-negativas se ha observado mayor susceptibilidad a los aceites esenciales a diferencia de las Gram-positivas y aunque aún no se sabe exactamente la razón por la cual se da este hecho, Smith-Palmer *y col.* (1998), Kalemba y Kunicka (2003) y Fisher y Phillips (2008) plantean que la susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas puede estar relacionada con la membrana externa que poseen este tipo de bacterias, ya que la hidrofobicidad de la membrana la hace impermeable. Sin embargo, Fisher y Phillips (2008) mencionan que solo hay un retardo del efecto, por lo que proponen

que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias, se requeriría de un mayor tiempo de exposición a los aceites esenciales en los sistemas modelo. No obstante, la sensibilidad de los diferentes tipos de bacterias solo se ha observado al utilizar aceites esenciales en forma *in vitro*, pero no en alimentos.

4.3 Mohos representativos en alimentos

Las especies de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* son los responsables del 50% de las pérdidas postcosecha en países tropicales debido principalmente al deterioro y a la producción de toxinas. Alrededor del 25% de la comida contaminada por micotoxinas altera la salud y la economía de muchos países (Nguefack y col., 2012). Por lo que, las restricciones impuestas por la industria alimentaria en la utilización de aditivos sintéticos han impulsado a buscar nuevas alternativas “naturales” para agentes fungicidas.

4.3.1 Género *Penicillium*

Los *Penicillium* son mohos comunes que se desarrollan sobre granos, paja, frutas, etc. La importancia de estos mohos en la alimentación humana radica en que además de causar deterioro, producen toxinas. Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. En la Figura 2 se esquematizan los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen (Carrillo, 2003).

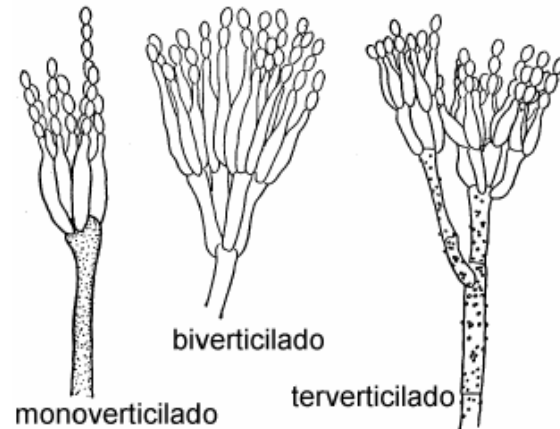


Fig 2. Morfología del género *Penicillium*

Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres micrómetros y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípite, las ramas o las méntulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris (Figura 3). La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies. Las colonias de *Penicillium* son circulares si no hay impedimento alguno para su crecimiento, con un borde neto muchas veces sin fructificación y mostrando el color del micelio. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. Estos mohos crecen sobre los alimentos preparados o sus materias primas, ya sean de origen vegetal o animal, si encuentran la actividad del agua y los nutrientes necesarios para su desarrollo (Carrillo, 2003).

Penicillium expansum es responsable de deteriorar manzanas, lo que causa la enfermedad llamada “pudrición azul”. Este moho sintetiza roquefortina C, citrinina, patulina y otras micotoxinas, algunas de ellas han tenido toxicidad en humanos y animales (Nguefack y col., 2012). La temperatura óptima de crecimiento de este moho es 25-26°C pero también se desarrolla en un rango de -3 a 35°C; la actividad de agua óptima es 0.99; sin embargo resiste valores entre 0.82-0.83 (Carrillo, 2003).

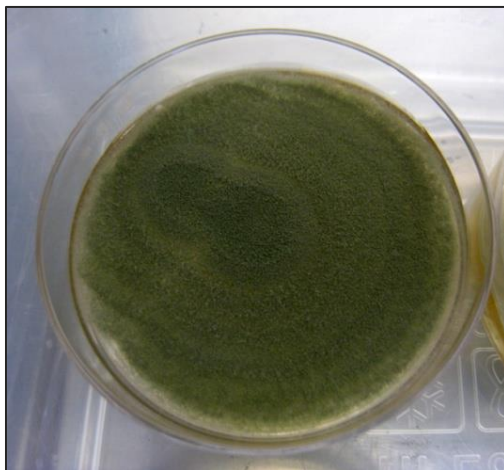


Fig 3 *Penicillium expansum*

Fuente: Tomada en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

4.3.2. Género *Aspergillus*

Los mohos del género *Aspergillus* causan deterioro en diferentes alimentos. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser tóxicos para el hombre. La principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos es el color, ya que poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro.

Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Figura 4). En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Carrillo, 2003).

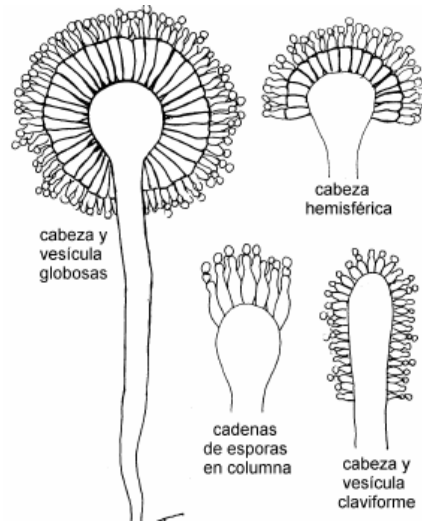


Fig 4 Morfología del genero *Aspergillus*

Aspergillus niger es responsable del deterioro de muchas frutas, tiene el conidio de color negro y su vesícula es globosa (Figura 5). La temperatura óptima de crecimiento de *A. niger* es 25-35°C; sin embargo, también se logra desarrollar en un rango de 4 a 39°C; el efecto de la actividad de agua sobre su crecimiento es significativa, ya que su máximo crecimiento se da en una actividad de agua de 0.95, sin embargo también puede crecer en valores de hasta 0.75 (Carrillo, 2003).

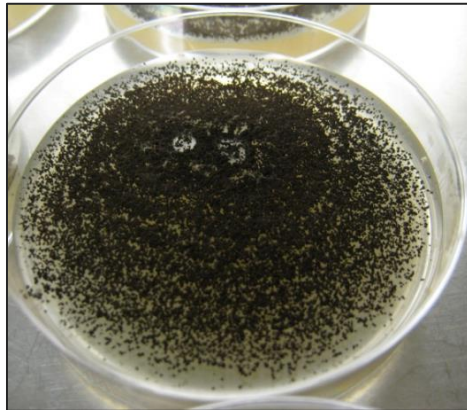
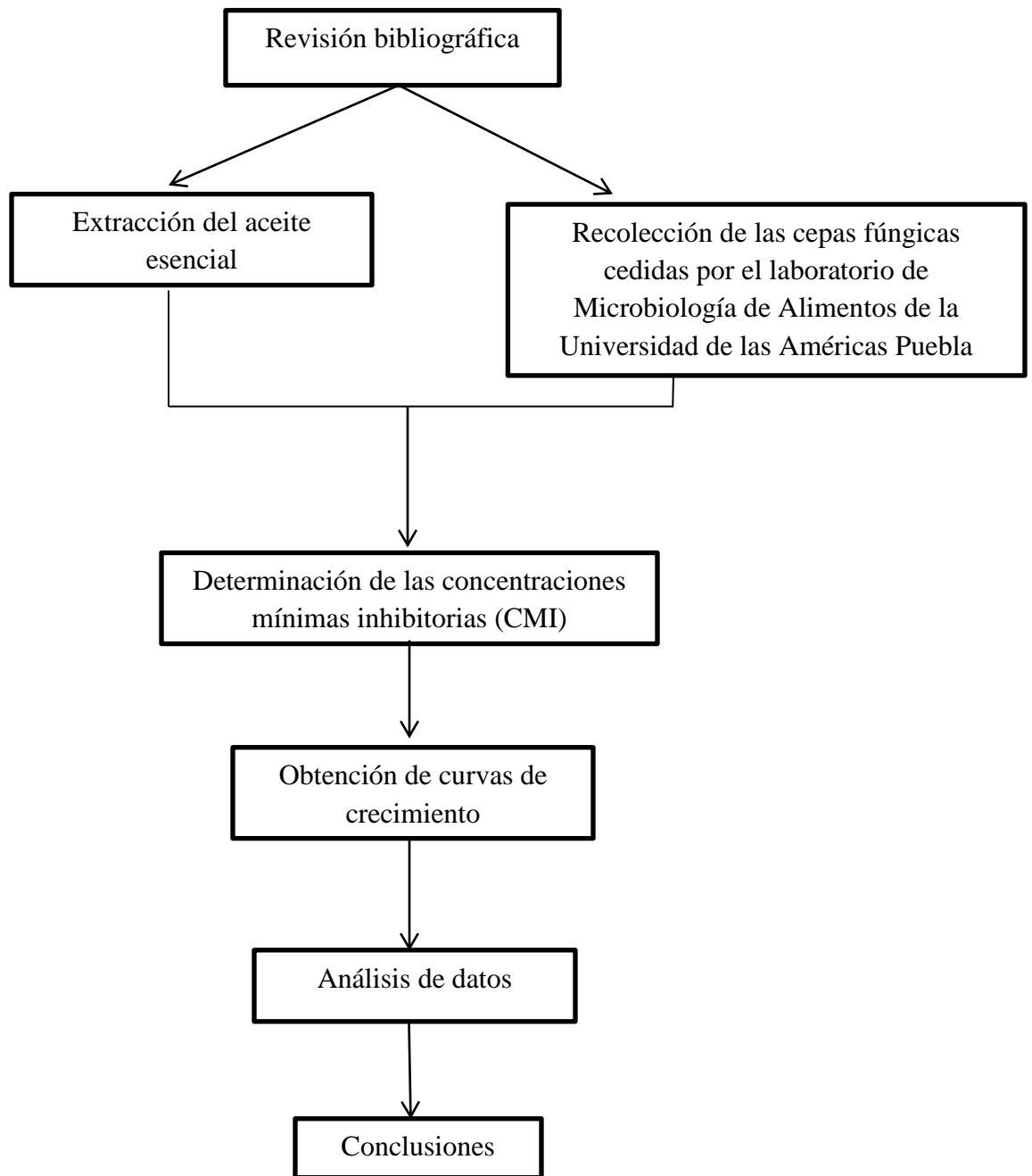


Fig 5 *Aspergillus niger*

Fuente: Tomada en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

La esporulación a una baja actividad del agua permite a los mohos completar su ciclo de vida sobreviviendo a las condiciones adversas. Tanto los penicilios como los aspergilos no son afectados por la luz y esporulan fácilmente en la obscuridad (Carrillo, 2003).

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



Fuente: Diseño del estudio

6. MATERIALES

6.1 Materia prima

El aceite esencial se obtuvo por medio de extracción asistida por microondas. Se utilizó orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) proveniente de un mercado local de la ciudad de Puebla.

6.2 Microorganismos

Se obtuvo de la colección del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, los mohos *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*. Las cepas se mantuvieron en cuñas de agar papa-dextrosa (Bioxon, México) a 25°C durante 7 días, posteriormente se conservaron en refrigeración a 4°C y se resembraron continuamente (López-Malo, 1995).

7. METODOLOGÍA

7.1 Obtención del aceite esencial

El aceite esencial se obtuvo mediante la extracción asistida por microondas utilizando un microondas doméstico (Daewo, China) a 600 W y 60 Hz utilizando la siguiente metodología: una cantidad conocida de la muestra (200 g de orégano) se colocó en un matraz de bola de 1000 ml y se adicionó 200 ml de agua destilada; el matraz de bola que contenía la muestra con el agua se introdujo en el microondas y se acopló a un refrigerante. El microondas se programó a las condiciones deseadas (90% de potencia por 30 minutos) para permitir el calentamiento de la muestra con el agua y por consecuencia la generación de vapores. Los vapores empezaron a subir hasta el cuello del matraz hasta alcanzar el refrigerante donde se enfrió, el líquido condensado se recibió en una trampa, donde el aceite esencial se pudo recoger con una micropipeta y posteriormente se secó con sulfato de sodio anhidro. El aceite esencial se colocó en un recipiente ámbar, cerrado herméticamente y en refrigeración hasta su utilización.

7.2 Composición química del aceite esencial

Se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-SM) en un cromatógrafo marca Agilent Technologies modelo 6850N, equipado con un detector de masa de triple eje 5975C. Para la separación de los componentes se usó una columna capilar HP5-MS, helio grado cromatográfico como gas acarreador en modo de flujo constante (1.5 ml/min), y el inyector a una temperatura de 240°C. El tiempo de ejecución total fue de 45 minutos. La temperatura de la columna, tras un período inicial, se mantuvo durante 10 min a 60 °C. Posteriormente, se incrementó cada 5 minutos hasta alcanzar 240° C y se mantuvo en este valor durante 50 min. El espectrograma se comparó con la librería del NIST y los índices de retención para obtener la composición cualitativa de los aceites.

7.3 Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon sistemas modelo, utilizando como base agar papa-dextrosa ajustando el pH con ácido clorhídrico (HCl) y la actividad de agua (a_w) con sacarosa. Las suspensiones del agar con la cantidad necesaria de sacarosa para obtener las dos actividades de agua (0.97 y 0.99) se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C; se enfriaron y se acidificaron con HCl (1N) hasta ajustar los valores de pH deseados (4.5 y 5.5). Las combinaciones de a_w y pH a evaluar se obtuvieron a partir de un diseño factorial a tres niveles

7.4 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se tomaron las esporas de las cuñas sembradas previamente. Las esporas se removieron lavando la superficie de los cultivos con 10 ml de agua estéril; las suspensiones de esporas se ajustaron para contener 10^6 esporas/ml. (Gómez-Sánchez y *col.*, 2011).

7.5 Medición de actividad de agua y pH

Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro UB-5 (Denver Instrument) y para la actividad de agua, un equipo AQUA LAB series 3 (Decagon Devices, Inc.). Ambas determinaciones se realizaron por triplicado.

7.6 Inoculación e incubación en los sistemas modelo

Los medios correspondientes de cada sistema fueron vertidos en cajas Petri, y después de solidificarse, se inocularon 10 μ L de la suspensión de esporas de cada moho, en el centro del agar (Suhr y Nielsen, 2003; Gómez-Sánchez y *col.*, 2011). Las diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano mexicano se colocaron en cajas petrí, las cuales se introdujeron dentro de recipientes de plástico con cierre hermético (para que desprendan los vapores de los aceites). Posteriormente, se colocaron los sistemas modelo en el recipiente y se incubaron a 25°C por 21 días o hasta observar crecimiento radial (Suhr y Nielsen, 2003; Gómez-Sánchez y *col.*, 2011). En los casos en los que se detectó crecimiento radial de los mohos, se midió el diámetro de las colonias diariamente utilizando un vernier. A partir de los datos obtenidos del diámetro de la colonia en función del tiempo, se realizaron curvas de crecimiento.

7.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales de forma individual

La determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial en fase vapor se definió como la concentración menor probada que inhiba el crecimiento visible por lo menos 21 días (Gómez-Sánchez y *col.*, 2011). El crecimiento de los mohos se determinó a partir del diámetro de las colonias.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración y cantidad de los componentes de los aceites esenciales puede variar debido a los factores ecológicos y de crecimiento de la planta (Lee y *col.*, 2005). En este estudio, los componentes del aceite esencial fueron identificados y determinados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS). La Tabla 3 muestra la composición química del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer); se identificaron nueve componentes representando el 65.38% del aceite, siendo el carvacrol (27.91%) y el o- cimeno (22.95%) los componentes mayoritarios. Esto concuerda con Inouye y *col* (2006), quienes reportaron al timol, carvacrol y al cimeno como componentes mayoritarios en el aceite esencial de orégano. Por su parte, Holley y Patel (2005) mencionan que el carvacrol, el p-cimeno y el timol son probablemente los responsables de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del orégano. El mecanismo de acción en los diferentes componentes de los aceites esenciales ha sido reportado por algunos autores. Fisher y Phillips (2008), mencionan que el carvacrol aumenta la fluidez de la membrana y causa fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y en la inhibición de la síntesis del ATP.

Por tanto, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende no sólo de la composición química, sino también de las propiedades lipofílicas, la potencia de los grupos funcionales y de su solubilidad en agua; por lo que la mezcla de compuestos con diferentes propiedades químicas y bioquímicas pueden aumentar su eficacia (Gutiérrez y *col.*, 2008).

Tabla 3. Principales compuestos en el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) determinados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. (CG-MS)

COMPUESTO	ORÉGANO MEXICANO
α - Terpineno	1.68%
o - Cimeno	22.59%
Eugenol	1.84%
Cariofileno	1.84%
β - Mirceno	1.70%
γ - Terpineno	4.02%
Timol	2.74
Carvacrol	27.91%
α - carofileno	1.06%

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

Se estudiaron diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en fase vapor a fin de inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*. Debido a que la actividad en cada aceite esencial es diferente, la actividad antifúngica se evaluó como la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual en este estudio se definió como la concentración mínima (entre aquellas evaluadas) requerida del aceite esencial que logre inhibir el crecimiento del moho (actividad fungistática) (Smith-Palmer y col., 1998) y la concentración mínima letal la cual asegura que no haya crecimiento del microorganismo una vez que se incuba en un ambiente libre del aceite esencial (actividad fungicida) (Burt, 2004).

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI); se puede apreciar que a medida que los factores de estrés (a_w y pH) aumentan, las CMI son menores. De acuerdo con la Tabla 4 de los dos mohos estudiados se observa que el más susceptible es *Penicillium expansum* ya que requiere menor concentración del aceite esencial para ser inhibido en comparación con *Aspergillus niger*. Asimismo se observa que el pH es un factor importante en la inhibición ya que a pHs bajos se requerían menores concentraciones del aceite esencial de orégano mexicano.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los aceites esenciales en fase vapor

Moho	pH	a_w	CMI Orégano ($\mu\text{L/L}$ de aire)
<i>A. niger</i>	4.5	0.99	1500
		0.97	
<i>A. niger</i>	5.5	0.99	2000
		0.97	
<i>P. expansum</i>	4.5	0.99	800
		0.97	
<i>P. expansum</i>	5.5	0.99	1000
		0.97	

Experimentos realizados durante 21 días expuestos a los vapores generados por el aceite esencial de orégano mexicano

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

Se evaluaron las concentraciones de 50, 300, 500, 800, 1000, 1500, 2000 y 4000 $\mu\text{L/L}$ de aire, determinando que con 1500 y 2000 $\mu\text{L/L}$ de aire se inhibe el crecimiento de *Aspergillus niger* en sistemas formulados con pH de 4.5 y 5.5, respectivamente. Gómez-Sánchez y col. (2011) obtuvieron efecto fungistático sobre *Aspergillus flavus* al utilizar tres concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano (294.1, 588.2 y 882.4 $\mu\text{L/L}$ de aire). Por su parte, López y col. (2007) encontraron que con 17.5 $\mu\text{L/L}$ de aceite esencial de orégano, se logró inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Kalembe y Kunicka (2003) demostraron que para inhibir a *Aspergillus niger* con aceite esencial de *Origanum syriacum* requirieron de 1% v/v. Sin embargo, en otro estudio reciente realizado por Ávila-Sosa (2012), se requirió 4% de aceite esencial de orégano mexicano añadido en películas comestibles de amaranto para inhibir el crecimiento *Aspergillus niger*. Por su parte, Gómez-Sánchez y col. (2011) reportan concentraciones entre 294.1-1,470 $\mu\text{L/L}$ de aire al utilizar orégano mexicano en fase vapor para inhibir *Aspergillus flavus*; sugiriendo que para inhibir a *Aspergillus* se necesitan mayores cantidades de aceite esencial cuando están en fase vapor. En la Figura 6, se ilustran las curvas de crecimiento de *Aspergillus niger* en un sistema modelo ajustado a pH 5.5 y a_w de 0.99, sometidos a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor. Se puede apreciar que en las concentraciones probadas, se retrasa el crecimiento (aumenta la fase lag), además que logran detener el máximo crecimiento del moho (48mm). De la Figura 6 a la 9 se observa el

mismo comportamiento dado que en todos los sistemas modelo al exponerlos a las diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano, la fase lag aumenta sin lograrse el máximo crecimiento radial.

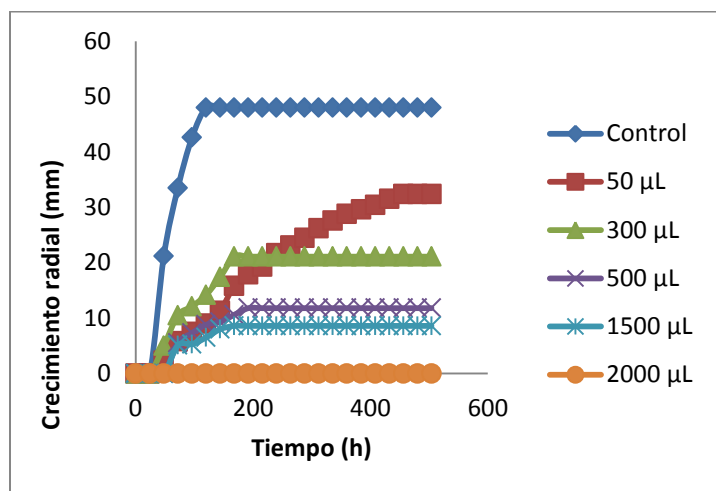


Fig 6. Respuesta de *Aspergillus niger* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.99

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

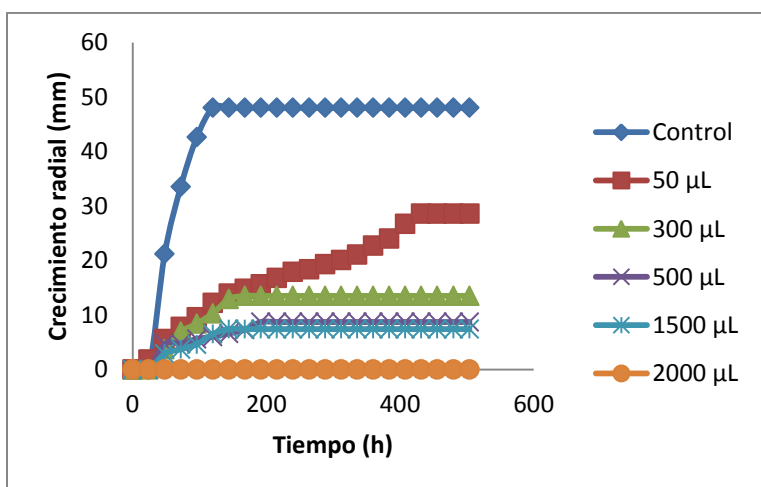


Fig 7. Respuesta de *Aspergillus niger* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.97

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

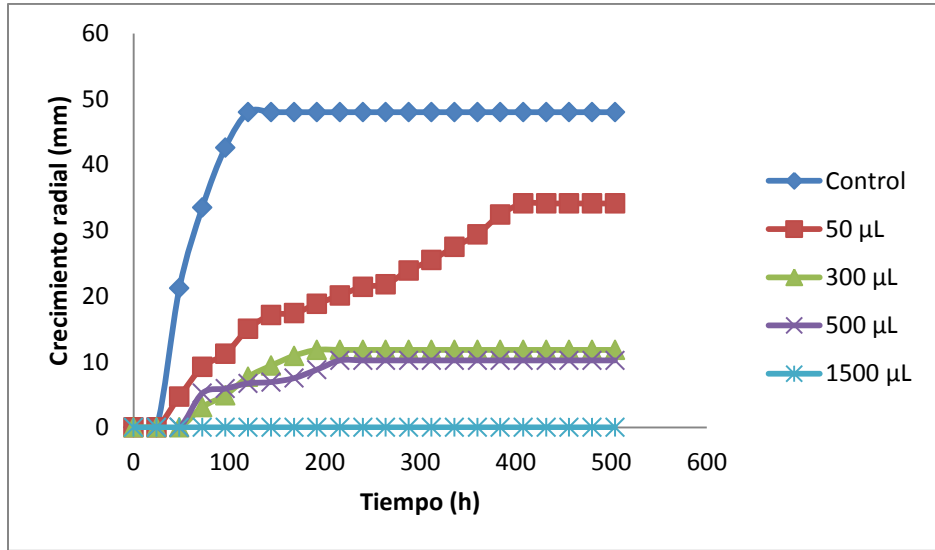


Fig 8. Respuesta de *Aspergillus niger* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.99

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

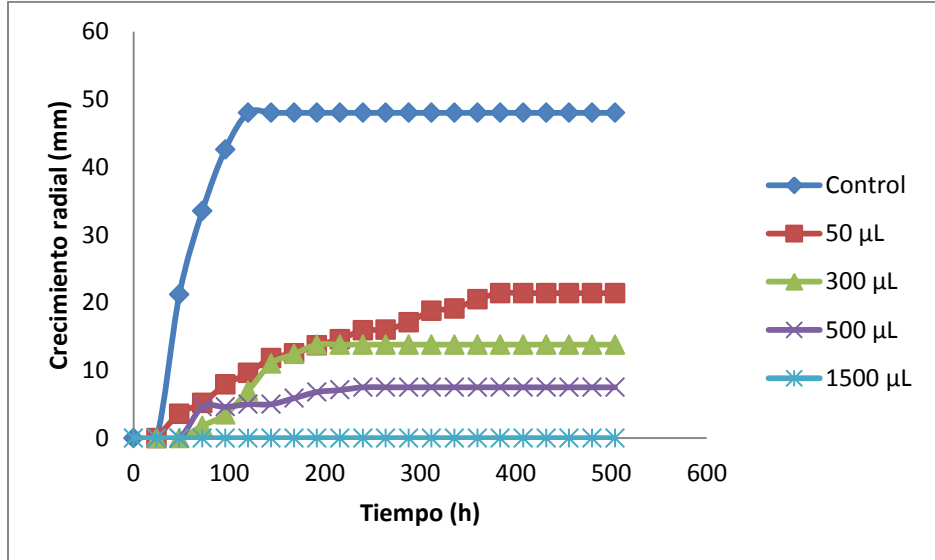


Fig 9. Respuesta de *Aspergillus niger* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.97

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

Se logra apreciar que el aceite esencial de orégano tiene un fuerte potencial para frenar e inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger*; esto concuerda con Elgayyar y col. (2001), quienes mencionan que el aceite esencial de orégano tiene gran efecto contra dicho microorganismo.

Para el caso de *Penicillium expansum* concentraciones de 800 y 1000 $\mu\text{L/L}$ de aire de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor fueron suficientes para inhibir el crecimiento del moho en los sistemas modelos ajustados a pH de 4.5 y 5.5, respectivamente (Tabla 4).

Ávila-Sosa y col. (2012), demostraron que al añadir aceite esencial de orégano mexicano a películas comestibles de almidón, la CMI para *Penicillium digitatum* fue de 0.75%.

La Figura 10 ilustra las curvas de crecimiento de *Penicillium expansum* en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.99 al ser sometido a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor. Se puede observar que a las concentraciones probadas retrasan el crecimiento (aumenta la fase lag), además que logran detener el máximo crecimiento del moho (48mm). El mismo efecto se obtuvo en todos los sistemas modelo como se ilustra de la Figura 10 a la 13.

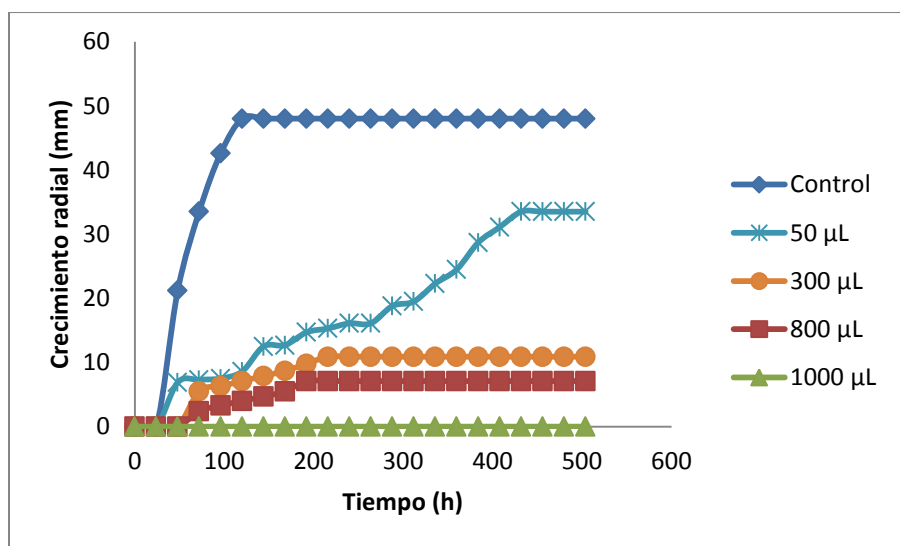


Fig 10. Respuesta de *Penicillium expansum* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.99

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

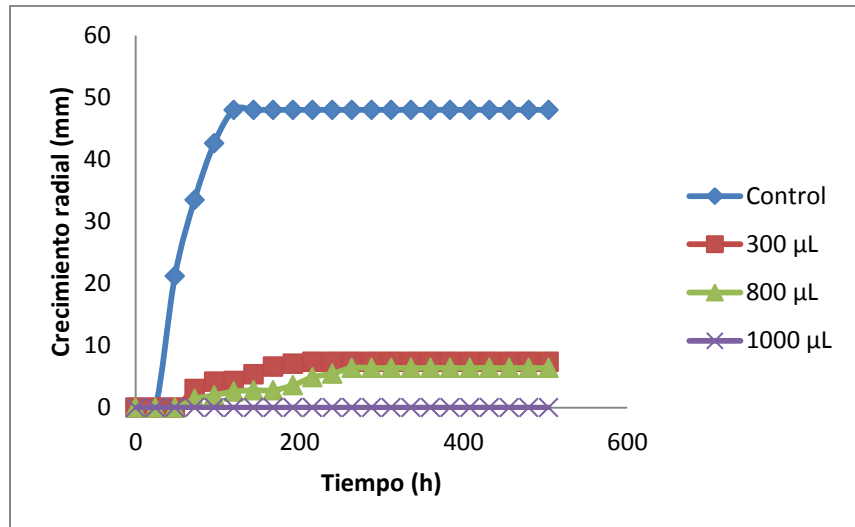


Fig 11. Respuesta de *Penicillium expansum* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 5.5 y a_w de 0.97

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

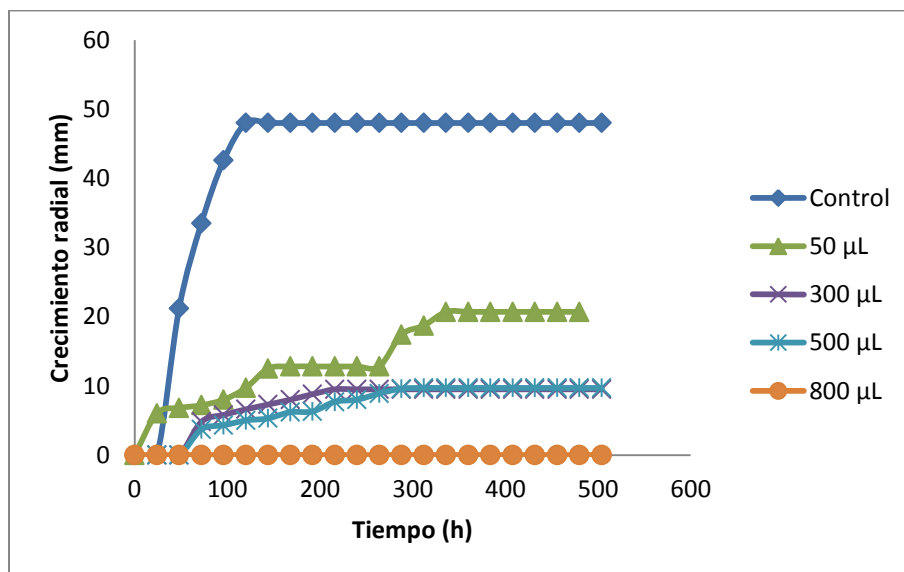


Fig 12. Respuesta de *Penicillium expansum* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.99

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

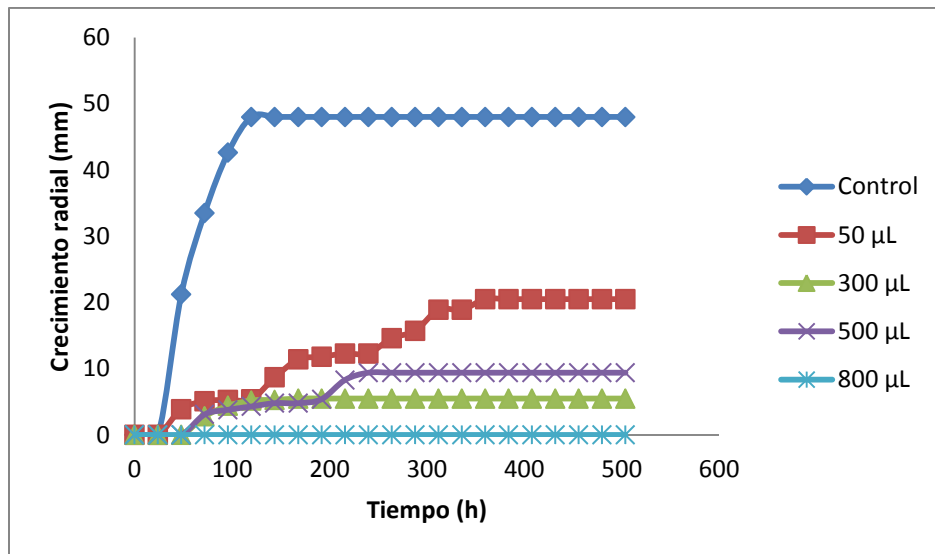


Fig 13. Respuesta de *Penicillium expansum* en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano mexicano en fase vapor en un sistema modelo ajustado a pH de 4.5 y a_w de 0.97

Fuente: Resultados del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UDLAP

La actividad antimicrobiana del aceite esencial es mejor a pH ácidos y actividades de agua bajas, esto se confirma con el comportamiento de ambos mohos en los sistemas modelo ya que conforme se disminuye el pH, la fase lag es más larga y la velocidad de crecimiento es más lenta.

Si bien al comparar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas en el presente estudio con otras investigaciones, las obtenidas son mayores, esto puede atribuirse a que principalmente en fase líquida los aceites esenciales están en contacto directo con los microorganismos, por lo que las cantidades requeridas para inhibirlos son menores que en fase vapor, además de que los microorganismos y los agentes antimicrobianos evaluados son diferentes.

9. CONCLUSIONES

1. La extracción asistida por microondas fue un método adecuado para obtener el aceite esencial, ya que redujo tiempo y solvente.
2. Los componentes químicos mayoritarios presentes en el aceite esencial de orégano Mexicano fueron el Carvacrol y el o-Cimeno.
3. Los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias indican que el aceite esencial de orégano mexicano tiene efecto antifúngico, además a pH bajos se requieren menores cantidades del aceite esencial.
4. El aceite esencial en fase vapor puede ser capaz de inhibir o retardar el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* en un sistema cerrado, teniendo especial impacto en la fase Lag.
5. Los resultados obtenidos evidencian la factibilidad de la aplicación del aceite esencial de orégano mexicano para utilizarse como aditivo o conservador en alimentos utilizando empaques activos y/o atmosferas controladas. Además, se abre una posibilidad de proteger productos alimenticios en donde el sabor y aroma del orégano no influyan negativamente en sus propiedades sensoriales

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda para estudios posteriores:

Seguir estudiando otros microorganismos variando los factores de estrés como pH, actividad de agua, temperatura y agentes antimicrobianos.

Estudiar los aceites esenciales de manera combinada en alimentos de interés tales como frutas cortadas listas para consumo, carnes sazonadas, panes saborizados entre otros.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez, M.T., Nevárez-Moorillón, G.V., Navarro, A. R. y López-Malo, A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*. 153 (1-2): 66-72.
2. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (3): 223-253
3. Caccioni, D., Guizzardi, M., Biondi, D., Renda, A. y Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*. 43 (1-2): 73-79.
4. Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. ISBN. Universidad Nacional de Salta
5. Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B. y Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74 (1-2): 101-109.
6. Elgayyar, M., Draughon, FA., Golden, DA y Mount, JR. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 64(7): 1019-1024.
7. Fisher, K. y Phillips C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Food Science and Technology*. 19 (3): 156-164.
8. Gómez-Sánchez, A., Palou, E. y López-Malo, A. 2011. Antifungal Activity Evaluation of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil on the Growth of *Aspergillus flavus* by Gaseous Contact. *Journal of Food Protection*. 74 (12): 2192-2198.
9. Goñi, P., López P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. y Nerín C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 116 (14): 982-989.
10. Gutiérrez, J., Barry-Ryan, C y Bourke, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (1):91-97.

11. Holley, R. y Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22 (4): 273-292.
12. Inouye, S., Uchida, K. y Abe, S. 2006. Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 12 (4):210-216.
13. Kalemba, D. y Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10 (10): 813-829.
14. Lee, H. C., Cheng, S. S. y Chang, S.T. 2005. Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (12): 2047-2053.
15. López, P., Sánchez, C., Batle, R. y Nerín, C. 2007. Vapor-Phase activities of cinnamon, thyme, and orégano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(11): 4348-4356.
16. López-Malo, A. 1995. Efecto de diversos factores sobre la capacidad antimicótica de vainillina. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas-Puebla.
17. López-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R. y Alzamora, S. 2005. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Advances in Food Mycology*. 571 (4): 261-286.
18. Nguenfack, J., Tamgue, O., Lekagne, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Amvam, P.H., Nkengfack., A.E. 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citrates*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control*. 23 (2): 377-383.
19. Périno-Issartier, S., Z. Maryiline, A. Vian and F. Chemat; 2010. Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products, *Food Bioprocess and Technology*. 4 (6):1020-1028.
20. Raybaudi-Massilia, R., Soliva R. y Belloso, O. 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. Simpósio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil

21. Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. y Arsenakis M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (5): 1202-1205.
22. Smith-Palmer A., Stewart J. y Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26 (2): 118-122.
23. Solórzano-Santos, F. y Miranda-Navales, MG. 2011. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23 (0):1-6.
24. Sparr, C. y Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227–250.
25. Suhr, K. y Nielsen, P. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 94 (4): 665-674.
26. Tajkarimi, M., Ibrahim, S. y Cliver D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21 (19): 1199-1218.
27. Tyagi, A.K. y Malik, A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 126 (1): 228-235.
28. Tzortzakis N. 2007. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8 (1): 111-116.