BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

TESIS:

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR CONTACTO DE VAPOR DE ANTIMICROBIANOS NATURALES ADICIONADOS A PELÍCULAS COMESTIBLES DE ALMIDÓN"

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. QFB JOAQUÍN EDUARDO CAMACHO PROO

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. RAÚL ÁVILA SOSA SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. ADDÍ RHODE NAVARRO CRUZ

Puebla, Puebla. Noviembre 2014

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todas las personas que me han honrado con su compañía durante la realización de este proyecto, por su comprensión, por su apoyo y afecto.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por el apoyo incondicional en cada aspecto de mi vida y las interminables lecciones que me han enseñado.

Agradezco al D.C. Raúl Ávila Sosa Sánchez, por la confianza puesta en mi para la realización de este proyecto, su constante ayuda, paciencia y motivación.

Agradezco a todos los profesores que intervinieron en mi formación académica.

A todos mis amigos, que juntos hemos compartido los mejores momentos, las mejores risas, las mejores batallas, las mejores experiencias, las mejores palabras y los mejores sentimientos. En mi mente siempre estarán, aunque no lo crean y aunque no lo quieran.

A todas las personas que comparten este triunfo conmigo.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo económico en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN. 1
1. INTRODUCCIÓN 2
2. OBJETIVOS 3
2.1. Objetivo general del proyecto 3
2.2. Objetivos particulares 3
3. JUSTIFICACIÓN 4
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5
4.1. Deterioro de alimentos 5
4.2. Alteración de alimentos por hongos 6
4.3. Hongos importantes en los alimentos y su caracterización 7
4.3.1. *Aspergillus niger* 7
4.3.2. *Fusarium sp.* 8
4.3.3. *Rhizopus sp.* 9
4.4. Formas de conservación de los alimentos 10
4.4.1. Uso de agentes químicos 10
4.5. Antimicrobianos de origen natural 12
4.6. Aceites esenciales 12
4.6.1. Carvacrol 14
4.6.2. Cinamaldehído 15
4.6.3. Eugenol 16
4.6.4. Timol 16
4.7. Películas y recubrimientos comestibles 17
4.8. Inhibición por contacto de vapor 19
5. DIAGRAMA DE TRABAJO 22
6. MATERIALES Y MÉTODOS 23
6.1. Material y reactivos de grado analítico 23
6.2. Material biológico 23
6.3. Métodos 23
6.4. Metodología 24
6.4.1. Preparación de suspensión de esporas 24

6.4.2. Elaboración de películas comestibles de almidón adicionadas con una solución madre de carvacrol, cinamaldehído, eugenol y timol 24
6.4.3. Evaluación de actividad antifúngica. 24
6.4.4. Elaboración de las mezclas binarias de carvacrol, cinamaldehído,eugenol y timol. 25
6.4.5. Elaboración de películas comestibles adicionadas con mezclas binarias y evaluación del efecto antifúngico sobre las cepas problema. 25
6.4.6. Análisis de datos de crecimiento de A. niger, Fusarium sp. y Rhizopus sp. 26
6.4.7. Cálculo del índice de FIC (Concentración fraccional inhibitoria). 26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 27
7.1. Concentraciones mínimas inhibitorias. 27
7.2. Análisis de parámetros de crecimiento. 28
7.3. Evaluación antifúngica por contacto de vapor de mezclas binarias de antimicrobianos 30
8. CONCLUSIONES. 38
9. SUGERENCIAS 39
10. REFERECIAS 40
11. ANEXOS 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aceites esenciales más comunes y sus componentes con actividad antimicrobiana.

Tabla 2. Ejemplo de la elaboración de mezclas binarias.

Tabla 3. Rangos del índice de FIC y su efecto producido.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (mg/L) de carvacrol, cinamaldehido, eugenol, y timol, sobre *Aspergillus niger, Fusarium sp.,* y *Rhizopus sp.*

Tabla 5**.** Concentraciones inhibitorias de mezcla binaria timol/carvacrol sobre *A. niger*. (C= creció, NC= no creció)

Tabla 6. Contracciones mínimas inhibitorias de la mezcla binaria timol carvacrol sobre *Fusarium sp.*

Tabla 7. Resultados de las mezclas binarias de carvacrol y cinamaldehido adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Tabla 8. Resultados de las mezclas binarias de eugenol y timol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp*.

Tabla A1. Resultados de las mezclas binarias de carvacrol y eugenol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp*.

Tabla A2. Resultados de las mezclas binarias de carvacrol y timol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Tabla A3. Resultados de las mezclas binarias de cinamaldehido y eugenol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Tabla A4. Resultados de las mezclas binarias de cinamaldehido y timol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Tabla A5. Índices FIC para las mezclas binarias.

Tabla A6. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *A. niger.,* sometido a diferentes concentraciones de antimicrobianos naturales.

Tabla A7. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Fusarium sp.,* sometido a diferentes antimicrobianos naturales.

Tabla A8. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Rhizopus sp.,* sometido a diferentes antimicrobianos naturales.

Tabla A9. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *A. niger.,* sometido a mezcla de carvacrol y timol.

Tabla A10. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Fusarium sp.,* sometido a mezcla de carvacrol y timol.

Tabla A11. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Rhizopus sp.,* sometido a diferentes mezclas binarias.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos utilizados en la conservación de los alimentos.

Figura 2. Estructura del carvacrol

Figura 3. Estructura del cinamaldehido.

Figura 4. Estructura del eugenol.

Figura 5. Estructura del timol.

Figura 6. Efecto de carvacrol y timol sobre *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones.

Figura 7. Efecto del carvacrol y timol a diferentes concentraciones sobre *Fusarium sp.*

Figura 8. Efecto de antimicrobianos naturales a diferentes concentraciones sobre *Rhizopus sp*.

Figura 9. Efecto de algunas mezclas binarias sobre *Aspergillus niger*. C= carvacrol y T= timol.

Figura 10. Efecto de la mezcla binaria timol/carvacrol sobre *Fusarium sp.*

Figura 11. Efecto de la mezcla binaria carvacrol/cinamaldehído sobre *Rhizpous sp*. (c= carvacrol, ci= cinamaldehido).

Figura 12. Efecto de mezcla timol/eugenol sobre *Rhizopus* sp.

RESUMEN

Las películas comestibles son recubrimientos hechos a base de sustancias biodegradables que son aplicados sobre un alimento, los cuales puede funcionar como barrera frente a las condiciones externas y pueden ser adicionadas con antimicrobianos naturales para inhibir el crecimiento de microorganismos y por lo tanto eviten el deterioro de alimentos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica por contacto de vapor de antimicrobianos naturales (carvacrol, cinamaldehido, eugenol y timol) adicionados a películas comestibles de almidón. Se estudió el efecto de los antimicrobianos por separado a diferentes concentraciones frente a *Aspergillus niger, Fusarium sp.,* y *Rhizopus sp*., hongos comúnmente encontrados como contaminantes en los alimentos. El efecto antifúngico fue evaluado por el método de la placa invertida y la medición del crecimiento radial del hongo con la finalidad de obtener concentraciones mínimas inhibitorias. Además se evaluó el efecto antifúngico de las mezclas binarias posibles con los antimicrobianos antes mencionados. Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos con el modelo de Gompertz y un análisis de varianza para determinar el comportamiento de los hongos frente a los antimicrobianos. Se concluyó que los antimicrobianos estudiados cumplen con actividad antifúngica por contacto de vapor frente a *Rhizopus sp.* a 1600 mg/L., mientras que *A. niger y Fusarium sp*., son resistentes al contacto de vapor debido a sus concentraciones muy altas de inhibición, 5000 mg/L. Lo cual aplicaciones reales podrían causar modificaciones en las propiedades sensoriales de los alimentos. Las mezclas binarias son una buena opción para disminuir las concentraciones ya que hubo inhibición en algunas de ellas a ½ de concentración mínima inhibitoria.

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de envases que permitan ofertar productos higiénicamente frescos ha llevado a la diversificación de los métodos de envasado, los materiales y los tipos de tratamientos de conservación. A esto se le une el interés de los consumidores por la seguridad en los alimentos, lo que ha hecho que en el momento actual, este tema sea centro de atención de todos los agentes que intervienen en la industria alimentaria. En los países desarrollados se demandan productos más naturales, lo más semejantes posibles desde el punto de vista organoléptico y nutritivo a los productos frescos, sin que hayan sufrido un proceso severo y que a la vez, sean seguros desde el punto de vista higiénico y que posean una vida útil más larga, cualidad que por a otra parte resulta ser la preocupación de la mayor parte de los productores, pues de ella depende una eficaz distribución de sus productos (López-Alonso y col. 2004).

La forma indiscriminada del empleo de sustancias químicas sintéticas por parte de la industria alimentaria durante sus primeros años de incorporación a las formulaciones de los productos alimenticios, planteo graves problemas sanitarios relacionados con la aparición de fenómenos toxicológicos de tipo crónico (Bello 2000). Últimamente ha comenzado la investigación de otro tipo de sustancias con actividad antimicrobiana y que sean de origen natural (Fellows, 2000; Pascual, 2005).

Como alternativa a este problema, se presentan las películas comestibles, elaboradas a base de biopolímeros, con propiedades de flexibilidad, transparencia, comestibles y con la importante capacidad de funcionar como medio de transporte de estas sustancias antimicrobianas de origen natural (Caamal y col., 2011). Estudios recientes han demostrado que los vapores generados por aceites esenciales poseen efectos antimicrobianos (López y col 2005, Gómez-Sánchez y col 2011) por lo que algunos investigadores (Aslan y col. 2004, Ávila-Sosa y col. 2012) proponen utilizarlos como alternativa de su aplicación como agentes antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica por contacto de vapor de antimicrobianos naturales adicionados a películas comestibles de almidón.

2.2 Objetivos particulares

Elaborar películas comestibles de almidón adicionadas con antimicrobianos de origen natural (timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído).

Evaluar la concentración mínima inhibitoria por contacto de vapor mediante el método de placa invertida de las películas comestibles de almidón adicionadas con antimicrobianos de origen natural frente a *Aspergillus niger*, *Fusarium sp*. y *Rhizopus sp*.

Elaborar películas comestibles adicionadas con mezclas binarias de los agentes antimicrobianos.

Evaluar el efecto de mezclas binarias de los antimicrobianos de origen natural adicionados a películas comestibles de almidón sobre *Aspergillus niger, Fusarium sp.* y *Rhizopus sp.*

3. JUSTIFICACIÓN:

Uno de los problemas principales en el campo de la conservación de alimentos el uso de productos químicos, ya que actualmente los consumidores exigen cada vez más productos alimenticios libres de estos, puesto que su consumo se asocia con enfermedades y alergias, además de no ser totalmente naturales. A pesar de las diferentes técnicas de conservación disponibles, la principal alteración de los alimentos la causan los microorganismos y procesos bioquímicos. En los alimentos, el problema principal es el ataque de microorganismos, así como, el oscurecimiento enzimático. La principal causa a esto es la resistencia generada a algunos antimicrobianos por parte de los microorganismos.

Debido a lo anterior, es importante buscar nuevas técnicas de inhibición y eliminación con una mayor posibilidad de aplicación. Una alternativa a esta problemática puede ser la elaboración de películas comestibles adicionadas con antimicrobianos de origen natural, que una vez incluidos en estas actúen inhibiendo el crecimiento de microorganismos y por lo tanto eviten el deterioro de alimentos.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Deterioro de alimentos

Todos los alimentos que proceden de plantas, tejidos u órganos animales, son productos de carácter perecedero y por consiguiente están expuestos al deterioro gradual determinado por varias reacciones bioquímicas. El grado de deterioro puede ser muy rápido o relativamente lento, dependiendo sobre todo del contenido de agua biológicamente activa. Los alimentos con una elevada cantidad de agua como la carne, el pescado y los vegetales se deterioran en tan solo algunos días (Gil, 2010).

Los alimentos están expuestos a alteraciones en mayor o en menor grado, pudiéndose clasificar en: perecederos que son aquellos que se alteran fácilmente, semiperecederos permanecen estables durante cierto tiempo y los estables que se conservan estables durante un tiempo prolongado (Pascual, 2005).

Entre las múltiples causas que ocasionan el deterioro de los alimentos se encuentran el crecimiento microbiano, los cambios químicos resultados de actividades enzimáticas y los cambios físicos, todos estos efectos conllevan a la pérdida del alimento o a la disminución del tiempo de vida útil del alimento. Con la finalidad de evitar la proliferación bacteriana, y minimizar así las pérdidas de producción durante las distintas etapas se hace el empleo de numerosos procesos tecnológicos (Hernández y Sastre, 2011).

Durante el período de poscosecha las principales causas de pérdidas económicas se deben a las malas prácticas de manejo y a la falta de aplicación de tecnologías para conservar los productos en fresco. Aunado a todo esto, es muy difícil, por no decir imposible que los alimentos sean estériles, ya que contienen distintas asociaciones microbianas. Estos microorganismos proceden tanto de la propia microflora de la materia prima como de los que se van agregando durante los diferentes procesos a los que pueden ser sometidos (Adams y Moss, 1997). Los tipos y la cantidad de microorganismos dependen de las propiedades del alimento,

de la atmósfera donde se almacenan, de las características propias de los microorganismos y de los efectos del tratamiento. Las fuentes de contaminación de los alimentos pueden ser muchas: el propio alimento, las superficies con las que entran en contacto, el medio ambiente, los seres vivos y los productos derivados de éste. Dependiendo del agente causal, la contaminación de los alimentos puede ser de tres tipos: (Ingraham e Ingraham, 1998).

-Contaminación biológica: provocada por la presencia de microorganismos patógenos, parásitos y productos tóxicos de origen biológico.

-Contaminación química: provocada por la presencia de productos o residuos químicos y contaminantes radioactivos.

-Contaminación física: provocada por la presencia de partículas de contaminantes físicos, tales como tierra, plástico o vidrio.

Si un alimento no es procesado de manera adecuada y resulta contaminado con algún tipo de microorganismo puede dar lugar a un brote, que se produce cuando una persona consume un alimento contaminado y dos o más de ellas contraen la misma enfermedad. Con frecuencia, en un brote concurren una serie de circunstancias relacionadas con la manipulación y conservación del alimento involucrado (Ingraham e Ingraham, 1998). Existen varias modalidades de procesos tecnológicos utilizados en la higienización, conservación y modificación de la estructura de los alimentos; entre los principales objetivos de los procesos tecnológicos aplicados a los alimentos están: satisfacer las necesidades de los consumidores en aspectos que se relacionan con la salubridad y la seguridad, eliminar el riesgo de transmisión de enfermedades asociado a la presencia de microorganismos patógenos, mejorar las características organolépticas, aumentar el tiempo de vida útil y mejorar su valor nutritivo (Avendaño y col., 2006).

4.2 Alteración de alimentos por hongos

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como

contaminantes en equipos mal sanitizados. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición de otros alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos junto con las levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación. Por lo tanto pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, cajetas, especias, etc. (Camacho y col., 2009).

Los hongos y levaduras pueden utilizar ciertos sustratos como pectinas, carbohidratos como polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos. También pueden causar problemas a través de: (a) síntesis de metabolitos tóxicos (micotoxinas), (b) resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación y (c) habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Pueden también causar malos olores y sabores así como la decoloración de las superficies de alimentos (Camacho y col., 2009).

4.3. Hongos importantes en los alimentos y su caracterización

4.3.1 *Aspergillus niger.*

Aspergillus niger es un hongo saprófito que puede comportarse como patógeno agresivo. Los aspergilos son mohos muy abundantes. Algunas especies intervienen en las alteraciones que experimentan los alimentos, mientras que otros son de utilidad para preparar determinados alimentos. Se han reportado casi 50 especies de *Aspergillus* como productores de metabolitos tóxicos denominados en general micotoxinas. (Camacho y col. 2009).

Aspergillus niger se distribuye mundialmente, y es común que se encuentre contaminando los granos de café pergamino (verde) al igual que otros alimentos

como cereales, cacahuates enmohecidos, vino, jugo de uva, cerveza y pan, así como en todo tipo de productos alimenticios de origen animal (Levi y col., 1974; Pohland, 1993; Romani y col., 2000).

Taxonomía*: Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiomyetidae, Eurotiales, Trichocomaceae, Aspergillus niger.*

Sus características macroscópicas son, crecimiento radial ilimitado, forma una colonia blanco amarillenta al inicio (1-2 días) conviertiendoce a negra, con aspecto arenoso, no presenta pigmentos. Su micromorfología se caracteriza por tener un micelio macrosifonado (2-4 µm), septado y hialino, su reproducción es a base de microconidias redondas o elípticas de 2-5 µm de diámetro, contiene estructuras especializadas, la cabeza aspergilar mide de 100 a 200 está compuesta por conidióforos largos 100 a 250 una vesícula redonda, (50-100 µm) donde nacen alrededor en ángulo de 360° dos series de fialides una de gran tamaño y una de menor tamaño, no ha sido reportada una fase teleoformica (Bonifaz, 2010).

4.3.2 *Fusarium*

Constituye un género amplio y complejo de hongos causante de una gran variedad de enfermedades de plantas, produce numerosas micotoxinas y se está convirtiendo en un importante patógeno humano.

Fusarium sp., puede invadir asintomáticamente raíces de plantas como guisante, lenteja (Haware y Nene, 1982), trigo (Galich, 1997) altramuz blanco, haba, judía, melón, patata, remolacha azucarera, y veza (Cabrera de la Colina y col., 1985; 1987), que proporcionan al patógeno un medio de sobrevivir parasíticamente durante periodos de tiempo en que el suelo permanece libre de su huésped cultivado.

Taxonomía: *Ascomycota, Sordariomycetes, Nectriaceae, Fusarium*

Es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado, según la planta hospedante u hospedantes

relacionados que afecte. Sus características macroscópicas, crecimiento radial ilimitado, con color de blanco a colores naranja café o lila según la especie, tiene forma vellosa seca. Sus características microscópicas son, micelio macrosifonado de 1-2 µm d diámetro, septado y hialino, las hifas se organizan en coremium, su reproducción es a base de macroconidias fusiformes de 1-3 µm de largo por 1 µm de ancho variando dependiendo la especie, presenta conidióforos largo de 5 a 10 µm y no se han reportado fase telomórfica (Bonifaz, 2010).

4.3.3 *Rhizopus*.

Rhizopus spp., es un hongo fitopatógeno versátil que puede crecer y desarrollarse en una amplia gama de temperaturas y humedades relativas. Su rápida velocidad de crecimiento le permite colonizar la superficie de los productos agrícolas y causar la enfermedad conocida como pudrición blanda que ocasiona importantes pérdidas económicas (Northover y Zhou, 2002).

Durante varios años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar a este microorganismo; sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en las cepas y además representan un riesgo potencial para la seguridad del medio ambiente y la salud humana. La especie *R. stolonifer*, o moho del pan, es muy común e interviene en la alteración de algunos alimentos: bayas, frutas, hortalizas, pan, etc. (Camacho et al. 2009).

Taxonomía: *Glomeromycota, Mucorales, mucoraceae, Rhizopus.*

Sus características macroscópicas son: color de colonia blanquecino tornándose en unos días a gris oscuro con forma vellosa algodonosa y seca no presenta pigmentos. Su micromorfología es caracterizada por micelio macrosifonado de entre 5-10 µm de diámetro, cenocítico y hialino su reproducción es a base de esporangioesporas o endoesporas de 6-8 µm de diámetro, tiene esporangioforos largos que nunca se ramifican, el esporangio llega a medir 100 a 200 µm de diámetro. Contiene zigosporas como fase teleomorfica (Bonifaz, 2010).

4.4 Formas de conservación de los alimentos

El concepto de conservación de los alimentos comprende todo el conjunto de medidas que se adoptan para evitar el deterioro de su calidad y garantizar, de este modo, la estabilidad de un alimento durante todo el periodo que dura su vida comercial. (Bello 2000).

La conservación de alimentos utiliza mecanismos tradicionales así como nuevas tecnologías (Aguilar 2012). El uso de agentes químicos (conservadores) es una práctica común en la industria de los alimentos (Nychas, 1995). El objetivo principal es preservar el sabor, los nutrientes, la textura, entre otros aspectos. Si un producto no logra lo anterior, entonces la conservación no cumple su propósito A pesar del avance de la tecnología, todavía no existe un método que ofrezca una conservación ilimitada. Cualquier producto, natural o procesado tiene una fecha de caducidad (Aguilar 2012). A continuación, se muestran los métodos más utilizados en la figura 1.

4.4.1 Uso de agentes químicos

Cuando se determina la composición química de un alimento pueden aparecer especies químicas que no corresponden a lo aportado por las materias primas usadas en su elaboración. Estos casos se trata de sustancias que se encuentran en el alimento por dos razones: a) han llegado al mismo por contaminación. b) responden a una adición intencionada.

La industria alimentaria ha introducido el uso de agentes químicos que se adicionan con el propósito de resolver alteraciones con deterioro en la calidad de un alimento (Bello 2000). Sin embargo, la tendencia es cada vez consumir productos más frescos y sanos, y lo más parecido a su forma original. Esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones, (cáncer y otras enfermedades degenerativas) como son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO^2), entre otros. Esto genera la necesidad de

buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (Álvarez-Parrilla, 2005).

Por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados (Nychas, 1995).

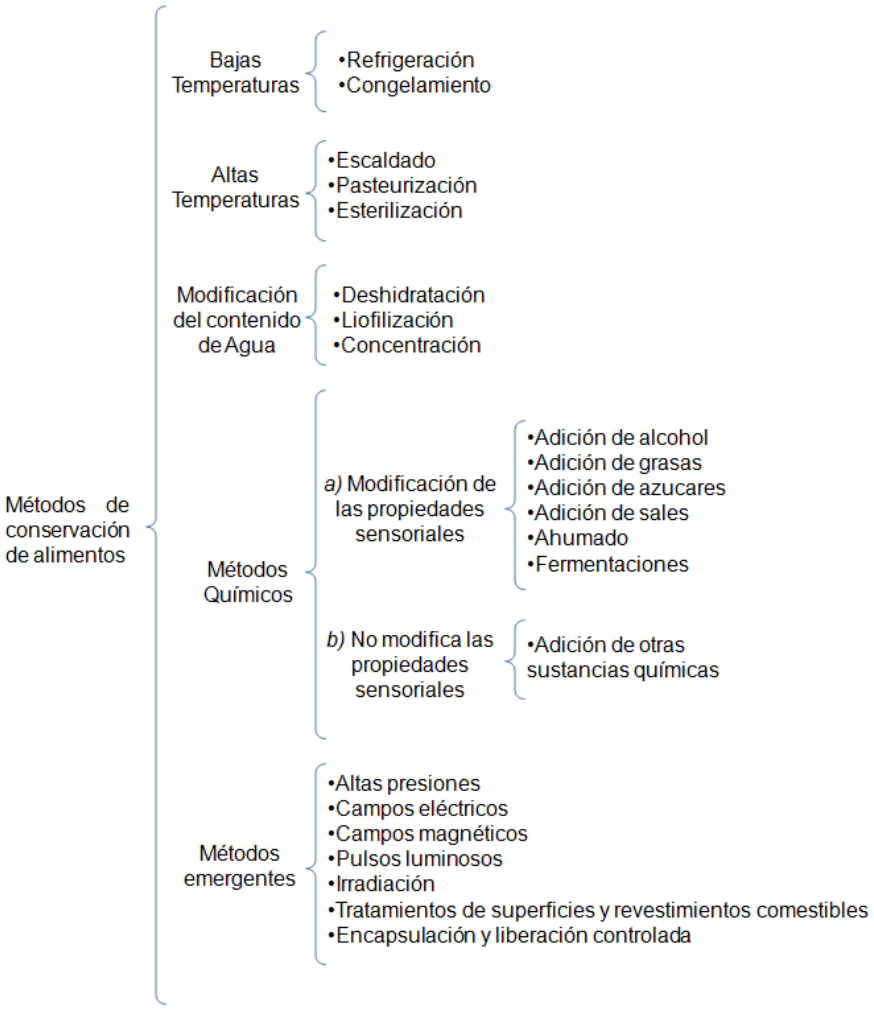


Figura 1. Métodos utilizados en la conservación de los alimentos (Aguilar 2012).

4.5 Antimicrobianos de origen natural.

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación, procesamiento o comercialización. Uno de los sistemas antimicrobianos naturales es el de origen vegetal que incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001). Muchas hierbas y especias contienen aceites esenciales que son antimicrobianos: se menciona que cerca de 80 productos de origen vegetal contiene alto niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimentos (Ismaiel y Pierson, 1990).

4.6 Aceites esenciales

Los aceites esenciales o esencias vegetales son líquidos aceitosos derivados de plantas, hierbas y especias que contienen un gran número de sustancias que inhiben la actividad metabólica de las bacterias, levaduras y mohos. Son mezclas complejas de ésteres fenólicos, aldehídos, cetonas y terpenos, además son muy olorosos, solubles en alcohol y poco solubles en agua (Rodríguez, 2011). Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas, o simplemente funcionan como inhibidores en la producción de sus metabolitos. La mayoría de estos compuestos funcionan como las enzimas hidrolíticas ya que pueden actuar sobre las membranas, otras enzimas metabólicas y la síntesis de proteínas (Ramos-García y col. 2010).

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas, ya sea en perfumería, en medicina, en la industria cosmética y principalmente en la industria alimentaria. Los aceites esenciales han sido utilizados durante mucho tiempo para mejorar el sabor de los alimentos, sin embargo, las concentraciones necesarias para que se ejerza una actividad antimicrobiana es mayor a los niveles normalmente utilizados en los alimentos como saborizantes, debido a que cuando un extracto es combinado con el alimento, el efecto antimicrobiano se ve reducido a causa de la interacción con los distintos componentes de éste. Comúnmente el tomillo y el orégano son utilizados en la industria como sazonadores y conservadores culinarios ya que sus aceites esenciales poseen una actividad antimicrobiana elevada (Solís-Campoverde, 2011).

Los aceites esenciales son la alternativa de conservadores naturales que prometen competir con el amplio mercado de los agentes químicos o sintéticos, además de ser productos económicos, de fácil aplicación y de amplio espectro se ha probado su eficacia frente a una gran variedad de microorganismos: bacterias, hongos y parásitos (Solís-Campoverde, 2011).

Los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de la planta, como las hojas, las raíces, el pericarpio, las semillas, el tallo, las flores y los frutos. En la tabla 1, se presentan los aceites esenciales más utilizados, la parte de la planta de donde son obtenidos y su principal componente con actividad antimicrobiana y que son empleados como aditivos en algunos alimentos. La función conservadora de los aceites esenciales se debe a que poseen, compuestos fenolicos o aldehídos con poder antimicrobiano. (Petrone, 2002).

Tabla 1. Aceites esenciales más comunes y sus componentes con actividad antimicrobiana.

Nombre científico	Nombre común	Parte	Componente
Cinnamomumverum	Canela	Hojas	Cinamaldehído
Origanum vulgare	Orégano	Hojas	Carvacrol
Syzygiuma romaticum	Clavo	Corteza y hojas	Eugenol
Thymus vulgaris	Tomillo	Flor y hoja	Timol
Eucalyptusglobulus	Eucalipto	Hoja	Cineol

(Zekaria, 2010)

4.6.1. Carvacrol

El carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) se encuentra presente en el aceite esencial del orégano (60% a 70%) y es extraído de la variedad *Origanum vulgare*. También presente en el tomillo (45%) en la variedad *Thymus vulgaris*. El carvacrol pertenece a los compuestos fenólicos monoterpénicos y entre sus propiedades se incluye que es antimicrobiano, antimutagénico, analgésico, antinflamatorio, insecticida y muchas más (Ardila y col., 2009). La figura 2 muestra la estructura química del carvacrol.

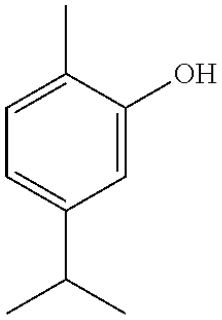


Figura 2. Estructura química del carvacrol.

Es un líquido incoloro con olor y sabor agradable, que es ligeramente soluble en éter, etanol y agua. Además de sus usos en la medicina alternativa, actualmente también es empleado en la industria cosmética, como desinfectante y como conservador en comida. Así como muchos otros aceites esenciales, el carvacrol no tiene riesgos tóxicos a largo plazo, sus efectos citotóxicos son la razón por la cual funciona como un potente agente antimicrobiano y antiséptico (Amadio y col., 2011).

4.6.2. Cinamaldehído

El cinamaldehído (3-fenil-2-propenal) es un aldehído α–β insaturado que está presente naturalmente en la corteza de los árboles del cinamomo y otras especies del género *Cinnamomum*, como el alcanfor y la canela en una proporción de 60-70%. (Li et al. 1997). La estructura química del cinamaldehido se muestra en la figura 3.

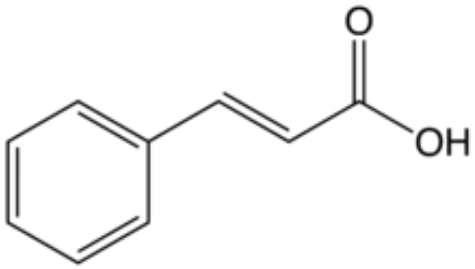


Figura 3. Estructura química del cinamaldehido.

Desde hace mucho tiempo la canela ha sido utilizada para preservar los alimentos, debido a su acción antibacteriana. Yang y col. (2011) realizaron un estudio de las propiedades de la canela, comparando la actividad de los extractos procedentes de distintas partes de la *Cinnamomum cassia* sobre *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii.* Los compuestos responsables con mayor actividad antimicrobiana fueron cinamaldehído, ometoxicinamaldehído, cumarina y eucaliptol.

4.6.3. Eugenol

El Eugenol es un derivado fenólico con fórmula $C_{10}H_2O_2$ presente en grandes cantidades en la esencia del clavo (*Syzygiuma romaticum*) entre 82 y 88% aunque también puede extraerse de la pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otras plantas (Alma y col. 2007). Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con aroma característico, poco soluble en agua y soluble en alcohol. El aceite de clavo ha sido utilizado desde el siglo XVI como antiséptico y anestésico. Entre las muchas propiedades de este compuesto se pueden destacar sus propiedades antiácidas antifúngicas, bactericidas, anestésicas, sedativas, aromatizantes e insecticidas (Chaieby col.,2007). Estudios han confirmado la actividad antibacteriana de eugenol contra varios patógenos tales como *E. coli, B. cereus, Helicobacter pylori, S. aureus, S. epidermidis, Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes* entre numerosos otros (Ali y col., 1990; Leite y col., 2007). La figura 4 muestra la estructura química del eugenol.

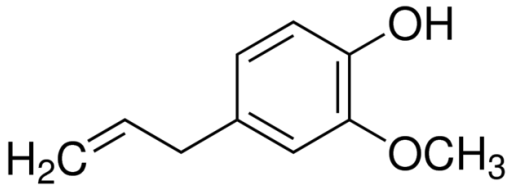


Figura 4. Estructura química del eugenol.

4.6.4. Timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un isómero del carvacrol figura 5, también pertenece a la familia de los compuestos fenólicos monoterpénicos con capacidad insecticida, bactericida, fungicida y nematicida. Este fenol se encuentra en la planta hasta en un 50%, siendo mayor su proporción que la del carvacrol. Es una sustancia cristalina incolora con olor característico (Ardila y col., 2009). La figura 5 representa la estructura del timol.

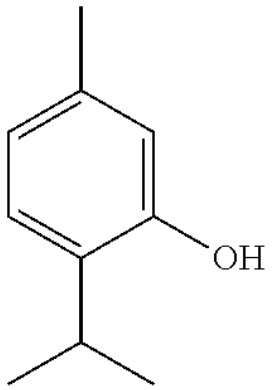


Figura 5. Estructura del timol.

Tanto el timol como su homólogo el carvacrol tienen efectos antioxidantes y efectos antimutagénicos. Estos efectos antioxidantes se deben a que el timol aumenta la producción de ácido nítrico, lo que mejora la función endotélica. Por su sabor agradable se usa en la formulación de diversos enjuagues bucales y pastas de dientes (Ortega y col., 2011). También se ha demostrado que el timol tiene una mayor actividad a temperatura ambiente que el carvacrol como antioxidante de lípidos, y a esto se debe su potencial empleo como antioxidante de alimentos (Amadio y col., 2011).

4.7 Películas y recubrimientos comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles se definen como matrices continuas que pueden ser formadas por proteínas, polisacáridos y/o lípidos (Banker, 1966), no pretenden sustituir a los empaques sintéticos diseñados para alimentos con tiempo de almacenamiento prolongado. Su utilidad recae en la capacidad de actuar como un accesorio que mejora la calidad de un alimento, extendiendo su vida en anaquel y la posibilidad de aumentar la eficiencia de los empaques de alimentos, mediante la incorporación de diversas sustancias que enriquecen sus propiedades funcionales (Kester y Fennema, 1986).

Las películas y recubrimientos comestibles están formados por tres componentes principales: polímero, solvente y plastificante. Se considera al polímero como el componente mayoritario de una película comestible. Las películas y recubrimientos comestibles se preparan a partir de polímeros como hidrocoloides o lípidos y se hacen películas compuestas cuando éstos se mezclan (Donhowe y Fennema, 1994; Cha y Chinnan, 2004). En cuanto al solvente, es necesario el uso de un compuesto que sea adecuado e inocuo para alimentos. Generalmente se limita al uso de agua con una gran variedad de valores de pH para poder solubilizar al polímero; en raras ocasiones se utilizan soluciones acuosas de etanol (Guilbert, 1996). El plastificante, a pesar de que se encuentra en menor proporción en la formulación de películas y recubrimientos comestibles, es un componente muy importante para poder formarlas. El uso de plastificantes tiene como objetivo principal emulsificar fases que no son miscibles, además de impartir características particulares a la película como flexibilidad y cierta resistencia. Es importante que el plastificante sea miscible en el polímero, generalmente se utilizan compuestos con bajo peso molecular y alto punto de fusión (Guilbert, y col., 2002; Cagri y col., 2004)

Las películas comestibles tienen la capacidad de incorporar agentes antimicrobianos para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos; ya que sirven como acarreadoras de un amplio número de compuestos (Lin y Zhao, 2007; Ozdemir y Floros, 2008).

En los últimos años con el avance de las técnicas analíticas ha puesto en duda la inocuidad de algunas sustancias que se consideraban seguras para el ser humano, generando el rechazo hacia ciertos aditivos químicos, por lo que se han tratado de diseñar películas antimicrobianas que muestren efecto sin la migración de los componentes activos, o se ha buscado añadir antimicrobianos de tipo natural (Ozdemir y Floros, 2008).

Recientemente se han descubierto propiedades antimicrobianas contra microorganismos patógenos. Zivanovic y col. (2005) incorporaron aceites esenciales de orégano, albaca y anís, en diferentes concentraciones, a películas

de quitosano; observaron un efecto inhibitorio en *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Resultados similares presentaron Rojas-Graü y col. (2007), quienes elaboraron películas de alginato-puré de manzana adicionadas con aceites esenciales de té limón, canela y orégano. De igual manera Maizura y col. (2007), presentaron resultados similares mediante la aplicación de aceite de té limón a películas de almidón, en las cuales no se vieron afectadas las permeabilidades a gases y al vapor de agua.

También se han desarrollado investigaciones en las que este tipo de películas adicionadas con aceites esenciales se aplicaron como recubrimientos a diferentes tipos de alimentos. Oussalah y col. (2004) aplicaron aceites esenciales de orégano y chile a recubrimientos de suero de leche en carne magra de res, inhibiendo a *E. coli* O157:H7. Estos investigadores también desarrollaron, para el mismo alimento, recubrimientos de alginato adicionados con aceites de orégano y canela. Los resultados mostraron que en el caso de la carne magra de res, la vida en anaquel se prolongó un 10% y hubo una reducción de 0.95 a 1.34 ciclos logarítmicos de *Pseudomonas spp.* (Oussalah y col., 2006). Recientemente se aplicó aceite de orégano a recubrimientos para embutidos (Chi y col., 2006), en los cuales se utilizaron películas de quitosano, aumentando el tiempo de almacenamiento y la inhibición microbiana. En ninguno de estos productos hubo evidencia de migración de sustancias fenólicas al alimento y en ambos casos se logró un buen nivel de aceptación sensorial.

4.8 Inhibición por contacto de vapor

Existe poca información acerca del efecto inhibitorio en fase de vapor por aceites esenciales adicionados a películas comestibles (Ávila-Sosa y col. 2012), sin embargo existen reporte de aceites esenciales como canela, te limón y clavo que son capaces de inhibir tanto hongos como bacterias patógenas en concentraciones menores a las que comúnmente se utilizarían cuando están en contacto directo con el patógeno (Inouye y col., 2001a; Tunc y col., 2000). Algunos investigadores han incorporado aceites esenciales a empaques activos de polipropileno para inhibir el crecimiento de hongos sobre la superficie de pan

incrementando tres veces el tiempo útil en anaquel de dichos productos (Gutiérrez y col., 2009).

El grado de actividad antimicrobiana en fase de vapor de los diferentes aceites esenciales depende directamente del tipo de polímero utilizado ya que tiene la capacidad de retener o liberar de manera gradual los componentes activos. Las películas comestibles de almidón tienen una estabilidad la cual le da capacidad para liberar estos compuestos activos y tener un efecto fungistático o fungicida dependiendo de las concentraciones que se tengan, que suelen ser menores que cuando se utilizan para inhibir de manera directa(Ávila-Sosa y col., 2010).

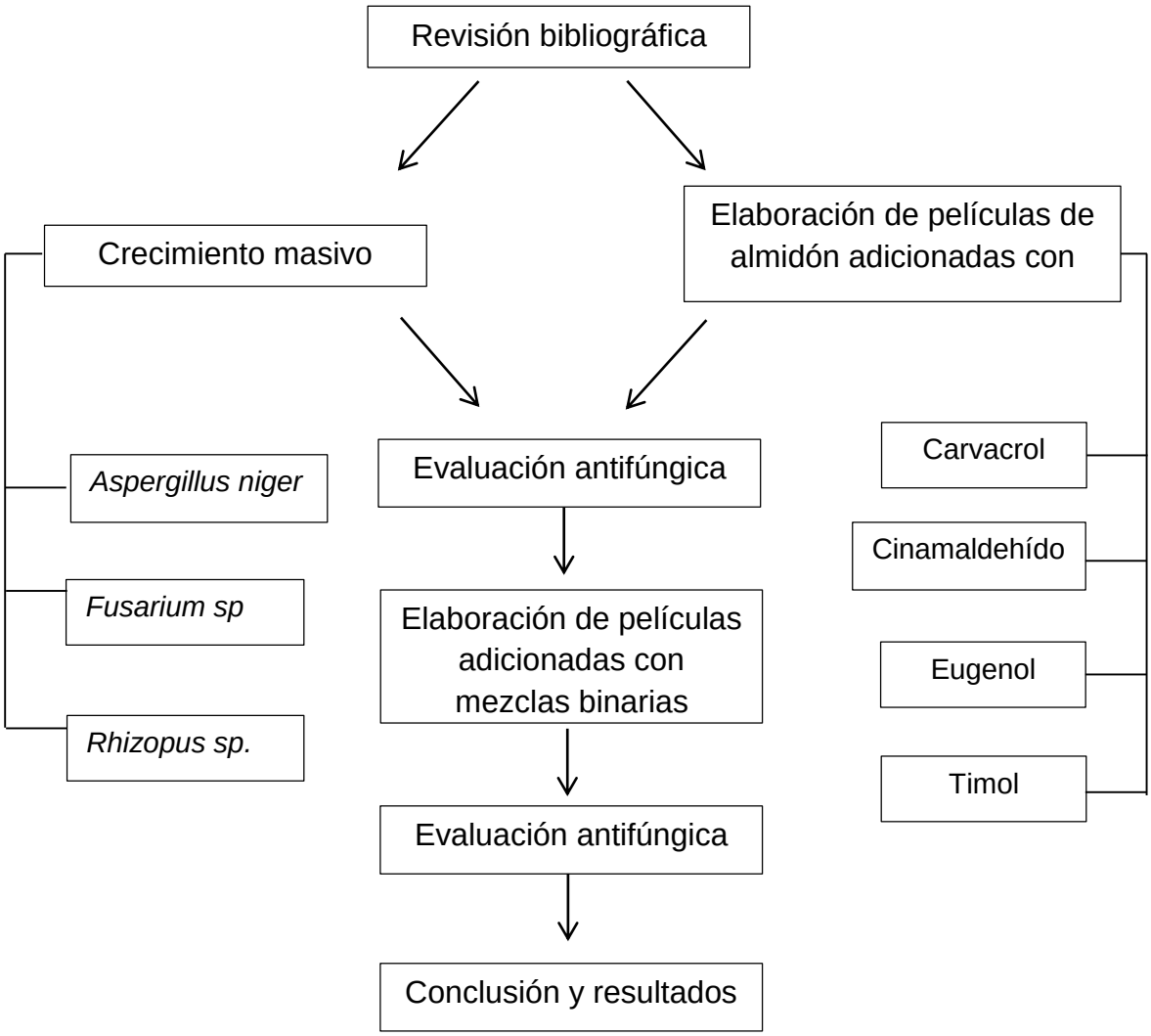
La generación de vapores de aceites esenciales se basa en la creación de una atmosfera a una cierta temperatura, o un microambiente dado por los propios aceites (López y col., 2005). Hasta el momento no se ha encontrado una metodología estándar para evaluar la inhibición microbiana por medio del contacto con vapores de aceites esenciales sin embargo existen algunos métodos reportados, dentro de los cuales destacan .

1) Uso de caja Petri invertidas, lo cual consiste en colocar los agares inoculados con el microorganismo de prueba de forma separada de los aceites esenciales previamente disueltos sobre papel filtro y manteniendo una temperatura controlada. Su principio se basa en la rápida volatilización de los vapores los cuales entran en contacto con el microorganismo. Por lo que esta técnica es mayormente utilizada para bacterias las cuales tienen mayor velocidad de crecimiento en comparacion con los mohos (Inouye y col., 2001b; Edris y Farrag, 2003; Suhr y Nielsen, 2003; Inouye y col., 2006)
2) Creacion de una atmósfera a partir de aceites esenciales, lo cual consiste en utilizar camaras de plástico con tapa transparente selladas hermeticamente en su interior y en el centro se coloca cierta concetracion de aceites esenciales, sobre una rejilla se colocan los agares incoulados, las camaras se mantien a una temperatura controlada en condiciones estandar para mohos, 25 °C por 72 horas (Suhr y Nielsen, 2003; Gomez-Sanchez y col., 2011) y 37°C por 18- 24 hrs para bacterias (Kloucek y col.,

2011). De tal manera que los vapores generados por los aceites escenciales entran en contacto con los microorganismos, y consecuentemente su evaporacion en el interior del microambiente puede generar zonas de inhibicion. Este método se usa principalmente para mohos ya que su velocidad de crecimiento es lenta.

En cualquier técnica utilizada posteriormente al periodo de incubacion, la concentracion minima inhibitoria (CMI) se expresa como la minima cantidad de vapor que inhibe el crecimiento visible ya sea de mohos, levaduras o bacterias (Lopez y col., 2005, 2007; Tullio y col., 2007)

5. DIAGRAMA DE TRABAJO:



6. MATERIAL Y MÉTODOS:

6.1. Material y reactivos de grado analítico.

Los necesarios para cada determinación

Carvacrol, cinamaldehido, eugenol y timol obtenidos de sigma aldrich.

6.2. Material biológico:

Cepas obtenidas del cepario de la facultad de Ciencias Químicas de la BUAP *Aspergilus niger, Fusarium sp., y Rhizopus sp.*

6.3. Métodos

Tabla de métodos y referencias

Determinación	Método	Referencia
Elaboración de películas comestibles	Vertido en placa	Ávila-Sosa y col. 2010
Evaluación de la sensibilidad a la sustancia antimicrobiana	Medición de crecimiento radial del microorganismo	Du y col. 2009
Diseño de mezclas binarias	Determinación del índice FIC	Davidson, 2005
Análisis de parámetros de crecimiento	Modelo de Gompertz	Char y col. 2007

6.4. Metodología

6.4.1. Preparación de suspensión de esporas.

Esta suspensión se realizó mediante el vertido de 9 ml de agua fisiológica estéril en la superficie de la placa de agar inoculado, seguido de un raspado suave usando un asa estéril para suspender la máxima cantidad de esporas posible, la suspensión se transfirió a tubos estériles. El número de esporas presente en la suspensión se determinó utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico, y expresado como el número de esporas por mililitro (esporas / ml).

6.4.2. Elaboración de películas comestibles de almidón, adicionadas con una solución madre de carvacrol, cinamaldehído, eugenol y timol

Las películas se realizaron en condiciones estériles, agregando cada uno de los componentes: agua estéril, almidón, sorbitol y ácido fosfórico por separado. Se mezclaron hasta que se obtuvo una mezcla totalmente homogénea, se ajustaron a pH 5; al final, se agregó la solución madre de los antimicrobianos antes mencionados, en concentraciones previamente definidas, mientras que algunas películas no se les agrego ningún antimicrobiano con la finalidad de utilizarlas como control. Se continuó homogeneizando y una vez listas, se vertieron en las tapas de cajas Petri. Se introdujeron las placas en una estufa de vacío a 36°C, y se dejaron ahí aproximadamente de uno a dos días para su secado. Las concentraciones que se realizaron son: 200, 400, 800, 1600, 3200, 4000 y 5000 mg/l de cada antimicrobiano.

6.4.3. Evaluación de actividad antifúngica.

Se adicionaron 10 µl de la suspensión de esporas en el centro de la placa de agar papa dextrosa y se secaron en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas a temperatura ambiente durante 30 min, después se cubrieron las cajas Petri que contienen el agar inoculado con las tapas preparadas con las películas antimicrobianas correspondientes, consecuentemente la evaporación de los antimicrobianos. Se midió el crecimiento radial cada 24 horas durante 8 días de

incubación a temperatura ambiente, con esto se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias.

6.4.4. Elaboración de las mezclas binarias de carvacrol, cinamaldehído, eugenol y timol

Una vez que se determinó las concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos correspondientes para las cepas problema se realizaron las mezclas binarias correspondientes, tomando como ejemplo el modelo de ajedrez. En la tabla 2 se muestran las mezclas binarias obtenidas y que posteriormente se adicionaron en las películas comestibles.

Tabla 2. Ejemplo de la elaboración de mezclas binarias.

Antimicrobiano 1			
Antimicrobiano 2	3/4	1/2	1/4
3/4	¾ + ¾	½ + ¾	¼ + ¾
1/2	¾ + ½	½ + ½	¼ + ½
1/4	¾ + ¼	½ + ¼	¼ + ¼

6.4.5. Elaboración de películas comestibles adicionadas con mezclas binarias y evaluación del efecto antifúngico sobre las cepas problema.

Las películas se elaboraron de la misma manera como se describió en el paso 6.4.2 y se adiciono la mezcla adecuada correspondiente para cada concentración.

El efecto de las mezclas binarias se evaluó del mismo modo que el descrito en el paso 6.4.3, se realizaron los mismos métodos y las pruebas de manera simultánea. Al final se tomó lectura de las concentraciones mínimas inhibitorias, como se describió en el mismo paso para cada concentración y para cada cepa.

6.4.6. Análisis de datos de crecimiento de *A. niger, Fusarium sp*. y *Rhizopus sp*.

Debido a que se observó un comportamiento no lineal en las condiciones evaluadas, los datos de crecimiento fueron modelados utilizando la ecuación modificada de Gompertz reportada por Char y col. (2007)

$$Ln\frac{Dt}{Do} = A\exp\{-\exp[(\upsilon_m \cdot e / A)(\lambda - t) + 1]\}$$

Donde Dt (cm) es el diámetro de las colonias en el tiempo t, y Do (cm) es el diámetro de las colonias en el tiempo inicial; (A) es el crecimiento máximo del hongo alcanzado durante la fase estacionaria (cm), V_m es la tasa máxima de crecimiento específico (cm/dias), λ es el tiempo (días) alcanzado en la fase de retraso y e = exp. Con los datos obtenidos de la regresión no lineal de las curvas de crecimiento radial, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias (LSD) con un nivel de confianza de 95%. Dichos análisis estadísticos se realizaron usando el programa Kaleidagraph (versión 4.0) y Minitab (versión 16).

6.4.7. Cálculo del índice de FIC (Concentración fraccional inhibitoria).

Este cálculo sirvió para determinar si las mezclas binarias de carvacrol y timol poseen una acción sinérgica, aditiva o antagónica, utilizando la ecuación de Davidson y Parish (Santiestebán-Lopéz y col., 2007) ejemplo:

FIC timol= CMI timol en presencia de carvacrol/ CMI timol individual

FIC carvacrol= CMI carvacrol en presencia de timol/ CMI carvacrol individual

Ìndice FIC = FIC timol + FIC carvacrol

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Concentraciones mínimas inhibitorias

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) por contacto de vapor de los antimicrobianos naturales adicionados a películas comestibles de almidón, obtenidos por el método de placa invertida y medición del crecimiento radial del microorganismo se muestran en la tabla 3. Se observó que para las concentraciones dadas eugenol y cinamaldehído no mostraron efecto inhibitorio sobre *A. niger* y *Fusarium sp.,* mientras que carvacrol y timol presentaron efecto inhibitorio a 5000 mg/L. Para *Rhizopus sp.,* los 4 antimicrobianos mostraron efecto inhibitorio a 1600 mg/L.

Dao y col. (2008) afirman que los vapores generados por los aceites esenciales atacan al ciclo de vida de mohos en etapa de germinación, en la de crecimiento de la hifa y en la etapa de esporulación. La inactivación del conidio por los vapores de aceites esenciales es el proceso clave de la inhibición, dado que el conidio (suspendido en el aire) es estable al calor, a la luz y a los compuestos químicos, siendo muy difícil de eliminar. Este efecto solo se ha observado en vapores de aceites esenciales, y no de forma directa ya que pueden unirse a la hifa reproductiva a diferencia del contacto con una solución (Suhr y Nielsen, 2003).

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (mg/L) de carvacrol, cinamaldehido, eugenol, y timol, sobre *Aspergillus niger, Fusarium sp.,* y *Rhizopus sp.*

	Aspergillus niger	*Fusarium sp.*	*Rhizopus sp.*
Carvacrol	5000	5000	1600
Cinamaldehido	> 5000	> 5000	1600
Eugenol	> 5000	> 5000	1600
Timol	5000	5000	1600

7.2. Análisis de parámetros de crecimiento.

Se realizaron los cálculos de los parámetros de Gompertz para todas las cepas estudiadas con el fin de comparar los efectos inhibitorios de las concentraciones de antimicrobianos naturales añadidas a las películas de almidón sobre el crecimiento. La figuras 6 y 7 muestran los cambios en el crecimiento radial de *A. niger* y *Fusarium sp*. en presencia de las películas de almidón añadidas con carvacrol y timol, mostrando diferencias significativas ($p<0.05$) en los valores tanto de la fase lag (λ) como del crecimiento máximo (A) a las concentraciones dadas comparados con los valores de crecimiento sin antimicrobianos. Estos resultados indican una relación inversamente proporcional entre la concentración del antimicrobiano y el crecimiento micelial de los hongos, observándose un efecto fungistático a concentraciones altas. En el caso de los antimicrobianos cinamaldehido y eugenol, no se observó efecto inhibitorio aunque los parámetros de Gompertz muestran diferencias significativas ($p<0.05$) para fase lag (ver anexo).

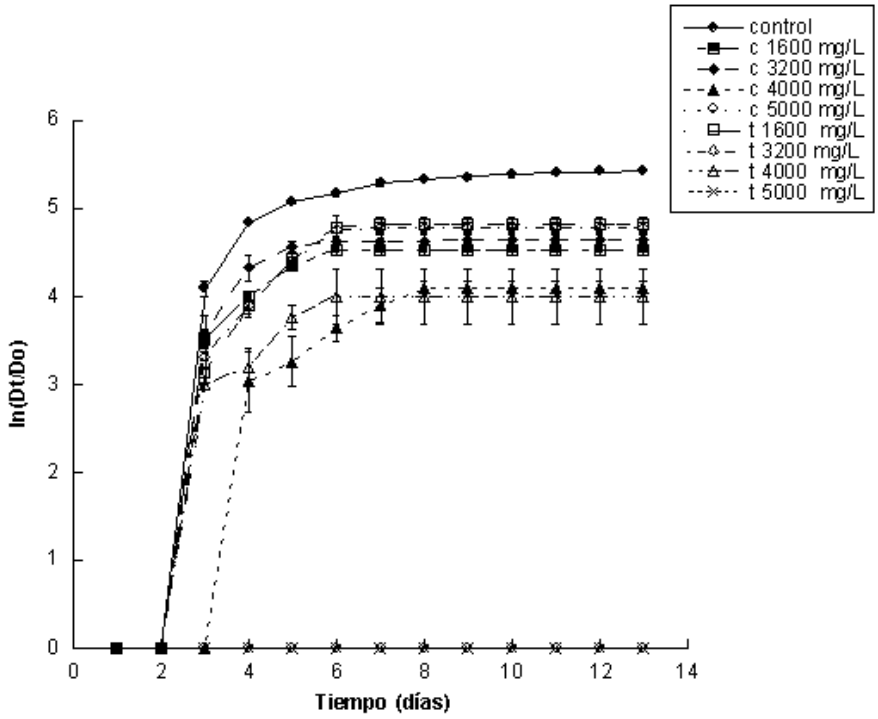


Figura 6. Efecto de carvacrol y timol sobre *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones.

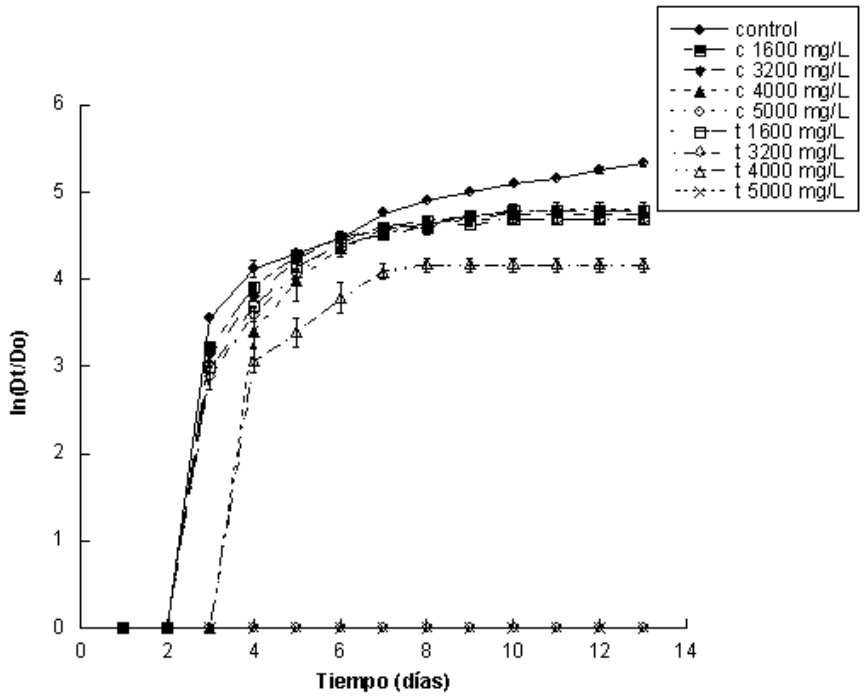


Figura 7. Efecto del carvacrol y timol a diferentes concentraciones sobre *Fusarium sp.*

Dao y col. (2008) demostraron que la actividad antimicrobiana en fase de vapor de aceites esenciales es efectiva a concentraciones altas. Lo anterior se refuerza con lo reportado por Inouye y col. (2001a) quienes demostraron que los mayores efectos inhibitorios de aceites esenciales de tomillo y canela se debe a la presencia mayoritaria de fenoles y aldehídos los cuales son carvacrol, eugenol, timol y cinamaldehido.

Para el caso de *Rhizopus sp.* (Figura 8), muestra los cambios en el crecimiento del hongo a diferentes concentraciones de los antimicrobianos. Los parámetros de Gompertz para los 4 antimicrobianos muestran diferencias significativas ($p<0.05$) para la fase lag. A pesar de que el crecimiento radial en la placa no se vio demasiado afectado a concentraciones menores que 1600 mg/L, el crecimiento micelial no se desarrolló con las mismas características que el crecimiento control. Se observaron efectos fungistáticos a concentraciones menores que a 1600 mg/L.

Edris y Farrag (2003) reportan que los vapores pueden unirse a la hifa reproductiva y debido a su crecimiento superficial es más susceptible a los mismos esto explica el bajo crecimiento micelial de *Rhizopus sp.*

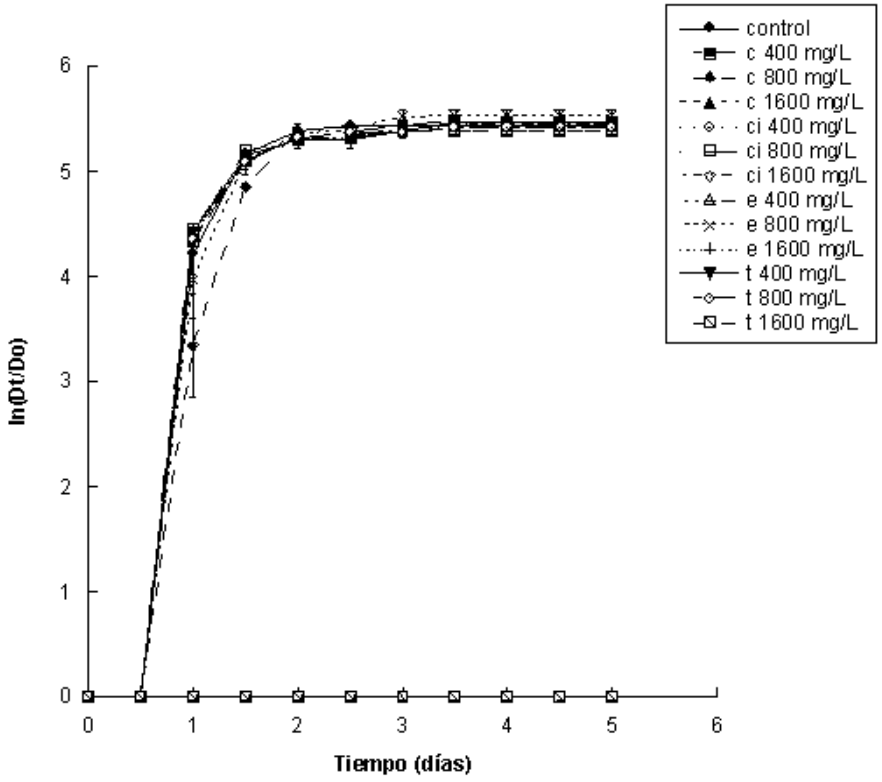


Figura 8. Efecto de antimicrobianos naturales a diferentes concentraciones sobre *Rhizopus sp.*

7.3. Evaluación antifúngica por contacto de vapor de mezclas binarias de antimicrobianos.

Con los resultados anteriores, se determinó hacer solo una mezcla binaria de carvacrol y timol para *A. niger* con 9 combinaciones, siendo 3750 mg/L de carvacrol con 2500 mg/L de timol la única efectiva para este hongo mostrando inhibición del crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones inhibitorias de la mezcla binaria timol/carvacrol sobre *A. niger*.

Aspergillus niger	Timol (mg/L)		
	1250	2500	3750
Carvacrol (mg/L)			
1250	C	C	C
2500	C	C	C
3750	C	NC	C

(C= creció, NC= no creció).

La evaluación de parámetros Gompertz sobre *A. niger* (ver anexo) muestra diferencias significativas ($p<0.05$) sobre el crecimiento máximo. Por lo tanto se observó un efecto fungistático a las concentraciones más altas de esta mezcla. La figura 9 muestra el efecto en el crecimiento de este hongo en presencia de la mezcla binaria. Se realizaron los cálculos del índice de FIC para determinar la capacidad aditiva, sinérgica o antagónica de las mezclas, los resultados se compararon con los datos que se muestran en la tabla 5. Para la combinación de timol y carvacrol sobre *A.niger* se obtuvo un índice de FIC= 1.25 (tabla 5) la cual muestra un efecto aditivo, esto se refiere a que el efecto combinado de ambas sustancias es igual a la suma de los efectos observados en los dos agentes de manera independiente, es decir que, los antimicrobianos logran inhibir a concentraciones menores de las requeridas cuando el antimicrobiano se emplea por separado.

La evaluación de la combinación de distintos agentes antimicrobianos es necesaria, ya que un microorganismo puede ser resistente a la eliminación o inhibición por dosis convencionales de un solo antimicrobiano, pero si se combinan los agentes se puede aumentar la actividad antimicrobiana.

Tabla 5. Rangos del índice de FIC y su efecto producido.

Rango de Índice FIC	EFECTO
< 0.90	Sinérgico
< 0.90 – 1.1	Aditivo
> 1.1	Antagónico

Para el caso de *Fusarium sp*., la mezcla binaria a evaluar también fue de timol y carvacrol con 9 combinaciones de concentraciones siendo efectivas 1250 mg/L de timol con 2500 mg/L de carvacrol y 2500 mg/L de timol con 2500 mg/L de carvacrol, la tabla 6 muestra el efecto de las mezclas binarias sobre el hongo.

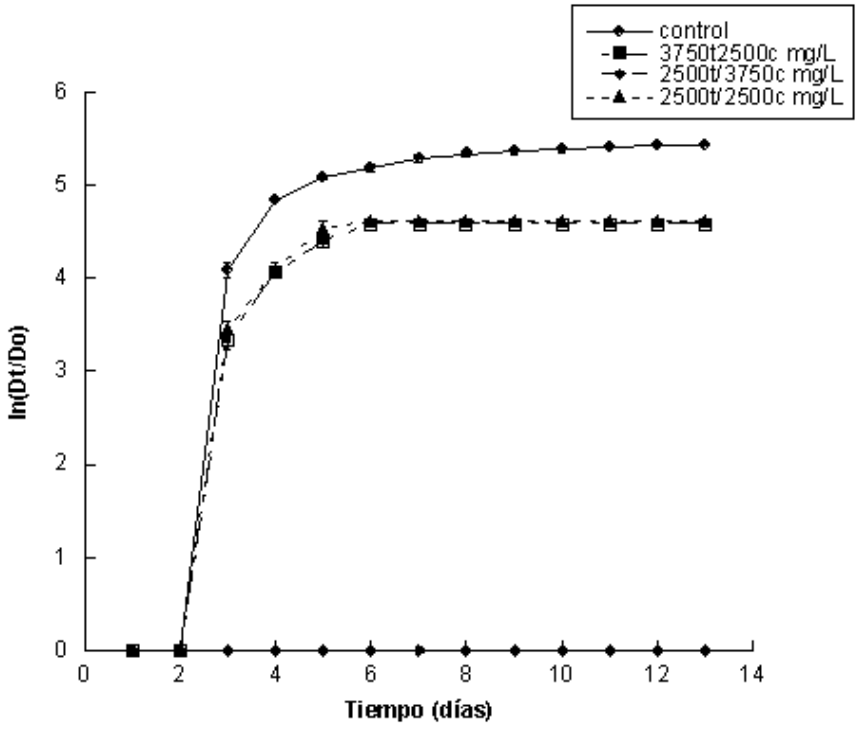


Figura 9. Efecto de algunas mezclas binarias sobre *Aspergillus niger*. C= carvacrol y T= timol.

Tabla 6 .contracciones inhibitorias de la mezcla binaria timol carvacrol sobre *Fusarium sp.*

Fusarium sp.	Timol		
	1250	2500	3750
Carvacrol			
1250	C	C	C
2500	NC	NC	C
3750	C	C	C

(C= creció, NC= no creció).

Los parámetros de Gompertz para *Fusarium sp*., indican diferencias significativas ($p<0.05$) en la fase lag para las combinaciones con mayor concentración de antimicrobianos mostrando un efecto fungistático de esta mezcla sobre el hongo. La figura 10 muestra el crecimiento del hongo en presencia de las películas adicionadas con la mezcla binaria.

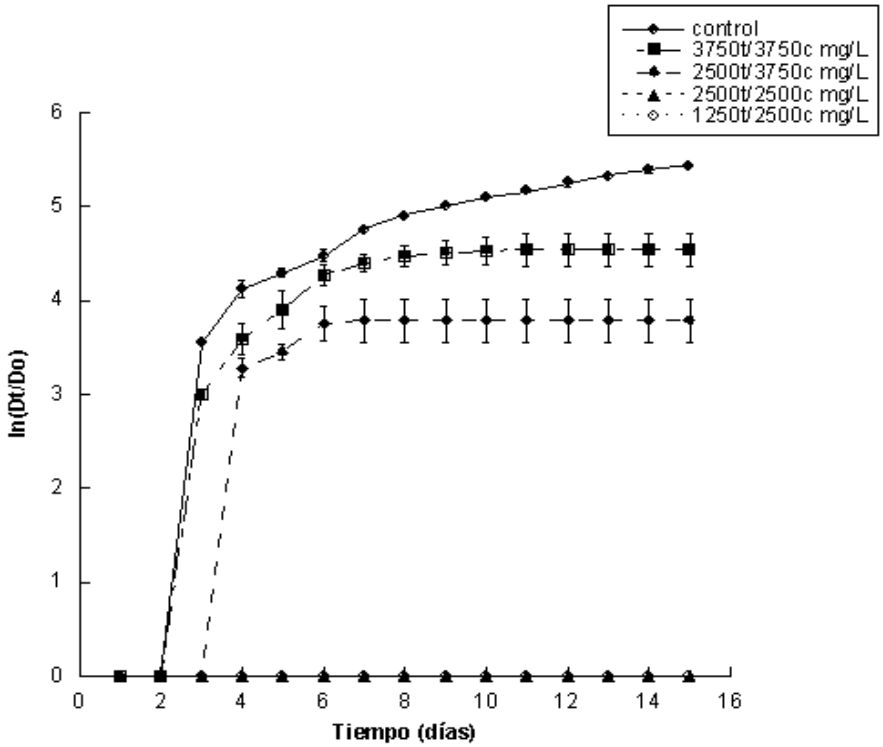


Figura 10. Efecto de la mezcla binaria timol/carvacrol sobre *Fusarium sp.*

El índice de FIC de la mezcla de timol/carvacrol dio un resultado de 0.75 (ver anexo, tabla A5) mostrando un efecto sinérgico, esto se refiere a que el efecto combinado de ambas sustancias es mayor a la suma de los efectos observados en los dos antimicrobianos aplicados por separado. A pesar de que no existe suficiente información sobre el efecto por contacto de vapor de mezclas binarias Lambert y col. (2001), Campomanes (2003), y García (2005) encontraron un efecto sinérgico entre mezclas binarias de timol y carvacrol sobre diferentes microorganismos. De igual forma Lambert y col., (2001) y Burt y col., (2007) describen que el elevado efecto antimicrobiano por parte de carvacrol y timol es provocado por sus elevadas hidrofobicidades, sin embargo Ultee y col., (2000) reportan que el contenido de un grupo hidroxilo y un sistema deslocalizador de electrones en timol y carvacrol son características que les confiere una mayor actividad antimicrobiana.

El efecto inhibitorio de carvacrol, cinamaldehido, eugenol y timol evaluados sobre *Rhizopus sp*., dio pauta para evaluar las 6 mezclas binarias posibles con 9 combinaciones de concentración cada una, siendo efectivas las mezclas de 800 mg/L de carvacrol con 800 mg/L de cinamaldehido, 800 mg/L de eugenol con 400 mg/L de timol y 800 mg/L de eugenol con 1200 mg/L de timol mostrando efecto inhibitorio (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Resultados de las mezclas binarias de carvacrol y cinamaldehido adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Rhizopus sp.		Cinamaldehido		
		400	800	1200
Carvacrol	400	C	C	C
	800	C	NC	C
	1200	C	C	C

(C= creció, NC= no creció).

Tabla 8. Resultados de las mezclas binarias de eugenol y timol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp*.

Rhizopus sp.		Timol		
		400	800	1200
Eugenol	400	C	C	C
	800	NC	C	NC
	1200	C	C	C

(C= creció, NC= no creció).

Los parámetros de Gompertz para las mezclas binarias timol/eugenol y carvacrol/cinamaldehido muestras diferencias significativas ($p<0.05$) en la fase lag donde se demostró un efecto inhibitorio. El índice de FIC para la mezcla de carvacrol/cinamaldehido fue de 1 y para la mezcla de eugenol/timol fue de 0.75 lo cual nos indica un efecto aditivo para la primera mezcla y un efecto sinérgico para la segunda mezcla se puede observar que timol aumento su efecto inhibitorio disminuyendo la concentración, lo cual confirma los efectos aditivos y sinérgicos de las mezclas binarias. A pesar de que no se tiene información suficiente sobre el efecto combinado de antimicrobianos naturales en alimentos, Santiesteban-Lopéz y col. (2007) señalan que los antimicrobianos más efectivos contra algunos microorganismos son carvacrol, timol y eugenol en un intervalo de 100 a 3000 ppm .Las figuras 11 y 12 muestran los cambios en el crecimiento de *Rhizopus* en presencias de las películas binarias mayormente efectivas.

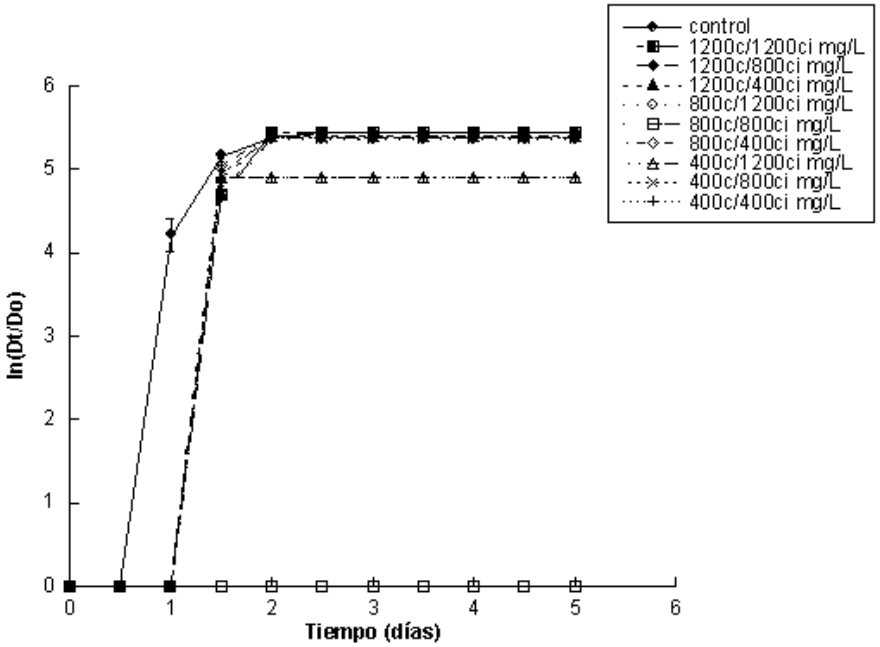


Figura 11. Efecto de la mezcla binaria carvacrol/cinamaldehído sobre *Rhizpous sp*. c= carvacrol, ci= cinamaldehido.

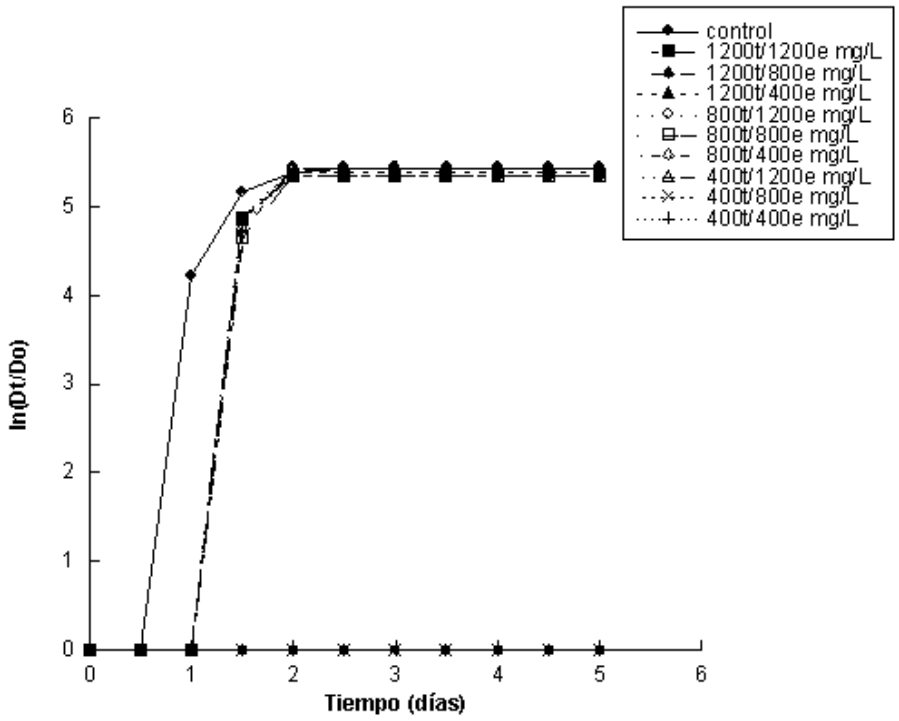


Figura 12. Efecto de mezcla timol/eugenol sobre *Rhizopus* sp.

8. CONCLUSIONES

Se puede afirmar que los antimicrobianos estudiados cumplen con actividad antifúngica por contacto de vapor frente a *Rhizopus sp*., en condiciones *in vitro*. Las aplicaciones reales sobre alimentos necesitan más investigación para evaluar el modo de acción sobre estos, las modificaciones que podrían sufrir los productos y su producción a nivel industrial.

Debido a las concentraciones mínimas inhibitorias muy altas sobre *Aspergillus niger* y *Fusarium sp*., estos pueden ser considerados resistentes al contacto de vapor de antimicrobianos naturales en condiciones *in vitro*, abriendo oportunidad para nuevas investigaciones sobre las aplicaciones de otros antimicrobianos y mezclas de estos para obtener resultados favorables a menores concentraciones de antimicrobianos. Las aplicaciones reales podrían causar modificaciones en las propiedades sensoriales de los alimentos.

Las mezclas binarias son una buena opción para disminuir las concentraciones de antimicrobianos naturales en la aplicación de películas adicionadas con estos.

9. SUGERENCIAS

Evaluar el efecto antimicrobiano a concentraciones mayores a 5000 mg/l de cinamaldehido y eugenol sobre cepas de *Aspergillus sp.,* y *Fusarium sp.*

Evaluar las posibles pérdidas por volatilización de los antimicrobianos carvacrol, cinamaldehido eugenol y timol en la etapa de elaboración y secado de películas comestibles de almidón.

Determinar si a concentraciones altas la fase de vapor de antimicrobianos naturales altera las propiedades organolépticas de productos recubiertos con películas comestibles de almidón.

Evaluar la rentabilidad de aplicar carvacrol, cinamaldehido, eugenol y timol a nivel industrial sobre productos susceptibles a contaminación por *Rhizopus sp*.

Evaluar la actividad antifúngica de los antimicrobianos antes mencionados en conjunto con otros antimicrobianos con el fin de reducir las concentraciones utilizadas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M. R., Moss, M. O. 1997. Microbiología de los Alimentos. España: Editorial Acribia S. A.
2. Aguilar, J. 2012. Métodos de conservación de los alimentos. Mexico: Editorial Red Tercer Milenio.
3. Ali, S.M.; Khan, A.A.; Ahmed, I.; Musaddiq, M.; Ahmed, K.S.; Polasa, H.; Rao, L.V.; Habibullah, C.M.; Sechi, L.A.; Ahmed, N. 2005 Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen Helicobacter pylori. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.. 4, 20–24.
4. Alma MH, Ertas M, Nitz S, *et al.* 2007. Chemical composition of content of essential oil from the bud of cultivated Turkish Clove. *BioRes.* Vol.2(2): 265–269.
5. Álvarez-Parrilla, 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas. Disponible en: http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf.
6. Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M., Miralles, S. 2011. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, 43(1).
7. Ardila, Q. M., Vargas, A. A., Pérez C. J., Mejía G. L. 2009. Ensayo Preliminar de la actividad antibacteriana de extracto de Allium sativum, Coriandrum sativum, Eugenia Caryophyllata, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis y Thymus vulgaris frente a Clostridium perfringens. Biosalud, 8(1), 47-57.
8. Avendaño, R. B., Rindermann, R. S., Lugo, M. S., Mungaray, L. A. 2006. La inocuidad alimentaria en México: Las hortalizas frescas de exportación. México: Ediciones Miguel Ángel Porrúa.
9. Ávila-Sosa, R., Palou E., Jiménez M.T., Nevárez-Moorillón G., Navarro Cruz, A., 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. Vol.153, 66–72.

10. Ávila-Sosa, R., Hernández-Zamorán, E., López-Mendoza, I., Palou, E., Jiménez, M. M., Nevárez-Moorillón, G., López-Malo, A. 2010. Fungal inactivation by Mexican Oregano (LippiaberlandieriSchauer) essential oil added to amaranth, chitosan, or starch edible films. Journal of Food Science, 75(3),127-133.
11. Banker, G.S. 1966. Film coating theory and practice. Journal of Pharmaceutical Sciences. 55(1): 81-89.
12. Bello-Gutierrez, J. 2000. Ciencia Bromatologica. España: Ediciones Díaz Santos.
13. Beuchat, L.R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: Microbial Food Contamination. Wilson CL, S Droby. (Ed.). CRC Press. London, UK. Chap. 11: 149-169.
14. Bonifaz, A. 2010. Micología médica básica. México. Editorial McGraw-Hill.
15. Burt, S. A., Van der Zee, R., Koets, Ad. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. y Veldhuizen, J. A. 2007. Inhibición de la síntesis del Flagelo en Escherichia coli.O157:H7. Diario de Microbiología Aplicada. Vol. 73. Pp. 4484-4490.
16. Caamal-Herrera, I., Pereira-Pacheco, F., Madera-Santana, T. 2011. Caracterización óptica y mecánica de películas comestibles a base de mezclas binarias de almidones de Phaseolus lunatus L, Manihot esculenta Crantz y Zea mays L. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 12(1) ,101-109. Recuperado de: http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=81318808016 ISSN 1665-0204 [citado 2012-10-08].
17. Cabrera de la Colina, J., Trapero-Casas, A. y Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Races of Fusarium oxysporum f. sp. ciceri in Andalucía, southern Spain. Int. Chickpea Newsl. 13:24-26.
18. Cabrera de la Colina, J., Trapero Casas, A., y Jiménez Díaz, R. M. 1987. Host range and symptomless carriers of Fusarium spp. Infecting chickpeas

in Andalucía. En: Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. SEF/MPU, eds. pp. 20-26.

19. Cagri, A., Ustunol, Z. y Ryser, E.T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. Journal of FoodProtection. 67(4): 833-848.
20. Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
21. Campomanes M.J. 2003 Evaluación del efecto de mezclas ternarias y cuaternarias de antimicrobianos sobre Aspergillus parasiticus. Temas selectos de Ingenieria de Alimentos. Vol. 2 Pp. 57-66.
22. Cha, D., Chinnan M. 2004. Biopolymer-based Antimicrobial Packaging . A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol. 44(4): 223-237
23. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, *et al.* 2007. The chemical composition and biological activity of cloveessential oil, *Eugenia caryophyllata*(*Syzigiumaromaticum*L. Myrtaceae) Vol.21: 501–506.
24. Char, C.D., Guerrero, S.N., Alzamora, S.M., 2007. Growth of Eurotium chevalieri in milk jam: influence of pH, potassium sorbate and water activity. Journal of Food Safety. 27, 1–6.
25. Cheng-Hong Yang, Cheng-San Yang, Mei-Lee Hwang, Chi-Chun Chang, Rong-Xian Li and Li-Yeh Chuang. 2011. Antimicrobial Activity of Various Parts of Cinnamomum Cassia Extracted with Different Extraction Methods. Journal of Food Biochemistry. doi: 10.1111/j.1745-4514.2011.00584.
26. Chi, S., Zivanovic, S. y Penfield M.P. 2006. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna-active compounds and sensory attributes. *Food Science Technology International.* 12(2): 111-117.
27. Dao, T., Benseoussan, M., Gervais, P. y Dantigny, P. 2008. Inactivation of conidia of penicillium chrysogenum, P. digitatum and P. italicum by etanol solution and vapours. International Journal of Food Microbiology. 122 (1-2): 68-73.
28. Davidson, M. 2005. Antimicrobials in food. U.S: CRC Taylor & Francis Group.

29. Donhowe, I.G. y Fennema, O. 1994. Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions and testing methods. En: J. M. Krochta, E.A. Baldwin y M. O. Nisperos-Carriedo (eds.) Edible coating and films to improve food quality. Lancaster: Technomic Publishing, Basilea. pp. 1-24.
30. Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Mandrell, R.,Friedman, M., 2009. Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor phase methods. Journal of FoodScience 74, M390–M397.
31. Edris, A. y Farrag, E. 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. Molecular Nutrition Food Reserch.
32. Fellows, J. 2000. Food Processing Technology: Principles and Practice. Editorial CRC Press.
33. Galich, M.T.V. 1997. Fusarium head blight in Argentina. In H.J. Dubin, L. Gilchrist, J. Reeves & A. McNab, eds. Fusarium head scab: global status and future prospects. Mexico, DF, CIMMYT.
34. García, L.T. 2005. Evaluación de mezclas de agentes antimicrobianos en sistemas modelo líquidos. J. Agric. Food Chem. 49:41 68-4170.
35. Gil, A. 2010. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos (639-700). Editorial Médica Panamericana.
36. Gomez- Sanchez, A,. Palou, E. y lopez-Malo, A. 2011: antifungal activitiy evaluation of Mexican oregano(Lippia Berliandieri Schauer) essential oil on the Growth of Aspergillus Flavus by gaseous contacto: journal o f food Protection. 74 (12): 2192- 2198.
37. Gutiérrez, L., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C., 2009. New antimicrobial active package for bakery products. Trends in Food Science & Technology 20, 92–99.
38. Guilbert, S. 1996. Technology and application of edible protective films. En: G. Barbosa-Cánovas, y J. S. Welti-Chanes (Eds). Food Preservation by

moisture control, Fundaments and applications. Isopow Practicum II, N.Y. EE.UU. pp. 371-394.

39. Guilbert, S., Redl, A. y Gontard, N. 2002. Mass transport within edible and biodegradable protein-based materials: Application to the design of active biopackaging. En: J.S. Welti-Chanes, G. Barbosa-Cánovas, y J.M. Aguilera (Eds).
40. Haware, M. P. y Nene, Y. L. 1982. Races of Fusarium oxysporum f. sp. ciceri. Plant Dis. 66:809-810.
41. Hernández, R. M., Sastre, G. A. 2011. Tratado de Nutrición (451-475). Madrid: Editorial Díaz de Santos.
42. Ingraham, J. L., Ingraham, C. A. 1998. Introducción a la Microbiología. España: Editorial Reverté.
43. Inouye S., Yamaguchi H, Takizawa T. 2001 (a). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. Journal of Infection and Chemotherapy. Recuperado de:http://link.springer.com/article/10.1007/s101560170022
44. Inouye, S., Takisawa, T. y Yamaguchi, H. 2001 (b). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of antimicobial Chamotherapy: 47 (5): 565-573.
45. Inouye, S., Uchida, K. y Abe, S. 2006. Vapor activity of 72 essential oils against Trichiphyton mentragrophytes. Journal of infections and Chemoteraphy. 12 (4): 210-216
46. Ismaiel, A. y Pierson, M.D. 1990. Inhibitory of growth and germination of C. Botulinum 33A, 40B Y 1623E by essential oil of apices. J. Food Sci. 55(6):1676.
47. Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I. y Pavela, R. 2011. Fast screening method of assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. Food Research International. 0(0): 1-5.

48. Kester, J.J. y Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology.* 12: 47-59.
49. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G.J.E. 2001. Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria y el modo de acción del Aceite Esencial de Orégano, Timol y Carvacrol. Diario de Microbiología aplicada. P.453-462.
50. Leite, A.M.; Lima, E.D.O.; de Souza, E.L.; Diniz, M.D.F.F.M.; Trajano, V.N.; de Medeiros, I.A. Inhibitory effect of β-pinene, α-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Braz. J. Pharm. Sci. 2007, 43, 121–126.
51. Levi, C. P., H. L. Trenk, H. K. Mohr, 1974. A study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. Journal - Association of Official Analytical Chemists 57: 866-870.
52. Li, G. J., Li, T., Xu, Y. D., Wong, S. T., & Guo, X. X. 1997. Selective hydrogenation of cinnamaldehyde to cinnamyl alcohol on L-zeolite supported catalysts. Studies in Surface Science and Catalysis105B, 1203.
53. Lin, D. y Zhao, Y. 2007.Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 6: 60-74.
54. López Alonso R., Torres Zapata T., Antolín Giraldo G. 2004. Envasado y conservación de alimentos: Últimas tendencias. Alimentación, equipos y tecnología: 187(23): 45-54
55. Lopez, P. Sanchez, C.; Balte, R. y Nerin , C. 2005. Solid and vapor phase anticribioal activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food chemestry. 53(17) 6939-6946.
56. Lopez, P., Sanchez, C., Batle, R. y Nerin, C. 2007. Vapor-Phase activities of cinammon, thyme and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. Journal of Agricultural and Food Chemestry. 55(11): 4348-4356.

57. Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M.H. y Karim, A.A. 2007. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch-alginate edible film containing lemongrass oil. Journal of Food Science. 72 (6): C324-C330.
58. Northover, J., Zhou, T. 2002. Control of Rhizopus rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and Pseudomonas syringae. Canadian Journalof Plant Pathology 24:144-153.
59. Nychas, G.J.E., P.N., Skandamis, C.C., Tassou. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. En: Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Roller S. (Ed.). CRC Press. Washington, D.C. Chap. 9: 177-199.
60. Ortega, N. M., Robles, B. M., Acedo, F. E., González, L. A., Morales, T. A., Vazquez, M. L. 2011. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (Lippiapalmeri S. WATS). Revista Fitotecnia Mexicana, 34(1), 11-17. Recuperado de: http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/34-1/2a.pdf
61. Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L. y Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 5598-5605.
62. Ozdemir M. y Floros J.D. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. Journal of FoodEngineering. 84: 116–123.
63. Pascual, A. M. 2005. Enfermedades de origen Alimentario: su prevención (3-47). España: Editorial Díaz de Santos.
64. Pohland, A. E., 1993. Mycotoxins in review. Food Additives & Contaminants 10:17-28.
65. Ramos-García, M., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejacal, I., Estrada-Carrillo, M. 2010. Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. Revista Mexicana de Fitopatología, 28(1), 44-57.

Recuperado de: http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61214206005

66. Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., Pan, Z. y McHugh, T.H. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. Journal of FoodEngineering. 81: 634-641.
67. Rodríguez, S. E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai, 7(1), 153-170. Recuperado de: http://redalyc.uaemex.mx/pdf/461/46116742014.pdf
68. Romani, S., G. Sacchetti, C. I. Chavez, G. Goetano, M. Dalla, 2000. Screening on the occurrence of ochratoxin A in coffea beans of different origins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:3616-3619.
69. Santiesteban-Lopez, A., Palou, E., Lopez-Malo A. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. Journal of Applied Microbiology, 102(2), 486-497. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241355
70. Solís Campoverde, P. 2011. Evaluación de la acción antimicrobiana de los aceites esenciales de Orégano y Tomillo como potenciales bioconservadores en carne de pollo. (Tesis de Grado, Escuela Superior de Chimborazo, Ecuador). Recuperado de: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1992/1/56T00300.pdf
71. Suhr, K. y Nielsen, P. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated two different application techniques against rye bread spoilage fungi. Journal of applied Microbiology. 94 (4): 665-674.
72. Tullio, V. Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A., Alonzo, V. y CArlone, N. A. 2007. Antifungal activity os essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. Journal of Applied Microbiology. 102 (6): 1544-1550.

73. Tunc I, Berger BM, Erler F, Dagli F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-products insects. Journal of Stored Products. Vol. 36: 161-168.
74. Ultee, A., Bennink, M.H.J. y Moezelaar, R. 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68 Pp. 1561-1568.
75. Zekaria, D. 2010. Los aceites esenciales, una alternativa a los microbianos. [en línea] Asociación Española de Ciencia Avícola – wpsa.Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=846fecha de consulta 15/01/2014.
76. Zivanovic, S., Chi, S. y Draughon E. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of FoodScience.* 70 (1): M45-M51.

ANEXOS

Tabla A1. Resultados de las mezclas binarias de carvacrol y eugenol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp*.

Rhizopus sp.		Eugenol		
		400	800	1200
Carvacrol	400	C	C	C
	800	C	C	C
	1200	C	C	C

(C= creció,).

Tabla A2. Resultados de las mezclas binarias de carvacrol y timol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Rhizopus sp.		Timol		
		400	800	1200
Carvacrol	400	C	C	C
	800	C	C	C
	1200	C	C	C

(C= creció,).

Tabla A3. Resultados de las mezclas binarias de cinamaldehido y eugenol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Rhizopus sp.		Cinamaldehido		
		400	800	1200
Eugenol	400	C	C	C
	800	C	C	C
	1200	C	C	C

(C= creció,).

Tabla A4. Resultados de las mezclas binarias de cinamaldehido y timol adicionadas en películas comestibles de almidón sobre *Rhizopus sp.*

Rhizopus sp.		Timol		
		400	800	1200
Cinamaldehido	400	C	C	C
	800	C	C	C
	1200	C	C	C

(C= creció,).

Tabla A5. Índices FIC para las mezclas binarias.

	Índices FIC		
	A. niger	*Fusarium sp.*	*Rhizopus sp.*
Carvacrol/ Cinamaldehído	-	-	1
Carvacrol/Eugenol	-	-	2
Carvacrol/Timol	1.25	0.75	2
Cinamaldehído/Eugenol	-	-	2
Cinamaldehido/Timol	-	-	2
Eugenol/Timol	-	-	0.75

Tabla A6. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *A. niger.,* sometido a diferentes antimicrobianos naturales.

	Aspergillus niger		
	A	Vmax	λ
Control	5.29+0.02[a]	5.23+0.17a,b	1.14+0.002[a]
Carvacrol			
200	4.81+0.05[b]	6.47+0.20 [a,b,c]	1.24+0.02[a,b]
400	4.81+0.04[b]	5.68+0.14 [a,b,c,d,e]	1.17+0.01[a]
800	4.73+0.04[b]	5.13+0.34 [c,d,e,f]	1.14+0.01[a]
1600	4.48+0.05[b,c]	4.43+0.20 [e,f,g,h,i]	1.13+0.01[a]
3200	4.60+0.10[b]	4.85+0.59 [d,e,f,g,h]	1.17+0.02[a]
4000	3.98+0.09[c,d]	3.33+1.39 [j]	2.03+0.15[b]
5000	-	-	>14[c]
Cinamaldehido			
200	4.69+0.03[b]	6.69+0.46 [a]	1.27+0.02[a,b]
400	4.76+0.03[b]	6.58+0.33 [a,b]	1.17+0.02[a]
800	4.76+0.01[b]	5.29+0.28 [b,c,d,e,f]	1.15+0.01[a]
1600	4.77+0.00[b]	4.22+0.00 [e,f,g,h,i,j]	1.15+0.00[a,b]
3200	4.78+0.03[b]	4.05+0.15 [f,g,h,i,j]	1.16+0.01[a]
4000	4.82+0.04[b]	2.66+0.31 [j]	1.01+0.04[a]

5000	4.61+0.22[b]	3.07+0.41 [i,j]	1.08+0.06[a]
Eugenol			
200	4.79+0.08[b]	6.58+0.19 [a,b]	1.25+0.02[a,b]
400	4.64+0.09[b,c]	6.02+0.33 [a,b,c,d]	1.18+0.02[a]
800	4.75+0.01[b,c]	4.99+0.03 [d,e,f,g]	1.14+0.00[a]
1600	4.85+0.09[c]	4.22+0.12 [f,g,h,i,j]	1.15+0.02[a]
3200	4.85+0.02[c]	4.10+0.09 [f,g,h,i,j]	1.14+0.01[a]
4000	4.83+0.09[c]	3.41+0.29 [i,j]	1.09+0.03[a]
5000	4.76+0.04[b,c]	3.43+0.10 [i,j]	1.08+0.02[a]
Timol			
200	4.80+0.02[b]	6.53+0.02 [a,b]	1.26+0.02[a,b]
400	4.69+0.02[b]	5.76+0.13 [a,b,c,d,e]	1.17+0.01[a]
800	4.77+0.05[b]	5.10+0.30 [c,d,e,f]	1.15+0.02[a]
1600	4.76+0.07[b]	3.05+0.22 [i,j]	1.03+0.02[a]
3200	4.71+0.06[b]	3.39+0.58 [h,i,j]	1.05+0.06[a]
4000	3.95+0.28[d]	3.69+1.06g [h,i,j]	1.46+0.72[a,b]
5000	-	-	>14[c]

Tabla A7. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Fusarium sp.,* sometido a diferentes antimicrobianos naturales.

	Fusarium sp.		
	A	Vmax	λ
Control Carvacrol	4.08±0.08[a]	3.36±0.43 [a,b,c]	2.07±0.04[a]
Carvacrol			
200	4.21+0.01[a]	4.73+0.28 [a,b]	1.16+0.01 [b]
400	4.71+0.06[b,c]	2.99+0.15 [b,c]	1.03+0.00 [b,c,d]
800	4.62+0.06[b,c]	4.02+1.02 [a,b,c]	1.10+0.06 [b,c,d]
1600	4.65+0.01[b,c]	3.29+0.01 [a,b,c]	1.05+0.00 [b,c,d]
3200	4.62+0.02[b,c]	3.06+0.15 [b,c]	1.03+0.01 [b,c,d]
4000	4.66+0.08[b,c]	3.75+0.52 [a,b,c]	2.08+0.04 [a]
5000	-	-	>14[a]
Cinamaldehido			
200	4.16+0.08[a]	4.59+0.60 [a,b]	1.15+0.03 [b,c]
400	4.76+0.04[b]	3.31+0.16 [a,b,c]	1.08+0.00 [b,c,d]
800	4.55+0.09[b,c]	4.01+0.13 [a,b,c]	1.11+0.01 [b,c,d]
1600	4.75+0.06[b,c]	3.40+0.29 [a,b,c]	1.06+0.04 [b,c,d]
3200	4.71+0.07[b,c]	4.02+0.88 [a,b,c]	2.09+0.06 [a]
4000	4.65+0.02[b,c]	3.81+0.03 [a,b,c]	2.10+0.06 [a]

5000	4.68+0.03[b,c]	3.57+0.61 [a,b,c]	2.07+0.04 [a]
Eugenol			
200	4.19+0.05[a]	4.96+0.16 [a]	1.17+0.01 [b]
400	4.76+0.02[b]	2.96+0.54 [b,c]	1.02+0.03 [b,c,d]
800	4.23+0.27[a]	3.21+1.71 [a,b,c]	0.97+0.26 [c,d]
1600	4.70+0.04,[b,c]	3.40+0.31 [a,b,c]	1.06+0.02 [b,c,d]
3200	4.66+0.02[b,c]	2.96+0.26 [b,c]	1.03+0.02 [b,c,d]
4000	4.75+0.03[b,c]	4.58+0.54 [a,b]	2.12+0.02 [a]
5000	4.71+0.02[b,c]	3.94+0.55 [a,b,c]	2.07+0.04 [a]
Timol			
200	4.21+0.00[a]	4.50+0.01 [a,b]	1.15+0.00 [b,c]
400	4.69+0.03[b,c]	3.71+0.46[a,b,c]	1.09+0.02 [b,c,d]
800	4.60+0.19[b,c]	3.16+0.58 [b,c]	1.09+0.04 [b,c,d]
1600	4.50+0.11[c]	3.07+0.55 [b,c]	1.04+0.06 [b,c,d]
3200	4.59+0.03[b,c]	2.42+0.22 [c]	0.95+0.03[d]
4000	4.08+0.08[a]	3.36+0.43 [a,b,c]	2.07+0.04 [a]
5000	-	-	>14[a]

Tabla A8. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Rhizopus sp.,* sometido a diferentes antimicrobianos naturales.

	Rhizopus sp.

	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[a,b]	1.19±0.01[a,b]
Carvacrol			
200	5.32±0.05[a]	8.59±0.32[a]	2.18±0.00[a]
400	5.40±0.02[a]	5.97±0.15[a]	1.17±0.01[b]
800	5.42±0.02[a]	5.34±2.19[a,b]	1.52±0.59[a,b]
1600	-	-	>5[b]
Cinamaldehido			
200	5.38±0.01[a]	6.00±0.23[a]	1.19+0.01[a]
400	5.36±0.01[a,b]	6.21±0.01[a,b]	1.18±0.00[a]
800	5.34±0.03[a]	6.56±0.08[a]	1.20±0.01[a]
1600	-	-	>5[b]
Eugenol			
200	5.24±0.02[a]	9.01±0.34[a]	2.18±0.00[a]
400	5.38±0.05[a,b]	6.14±0.05[a,b]	1.18±0.00[b]
800	5.46±0.04[a]	5.07±0.69[a,b]	1.16±0.01[b]
1600	-	-	>5[b]
Timol			
200	5.21±0.02[a]	8.68±0.18[a]	2.20±0.00[a]
400	5.38±0.01[a,b]	6.27±0.14[a,b]	1.18±0.00[b]

800	5.36±0.00[a,b]	6.08±0.23[a,b]	1.17±0.01[b]
1600	-	-	>5[b]

Tabla A9. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *A.niger.,* sometido a mezcla de carvacrol y timol.

	Aspergillus niger		
timol/carvacrol	A	Vmax	λ
0	5.29±0.02[a]	5.23±0.18[a]	1.14±0.00[a]
3750/3750	4.61±0.03[b,c]	3.79±0.13[b]	1.15±0.02[a]
3750/2500	4.54±0.03[c]	4.02±0.23[b]	1.13±0.01[a]
3750/1250	4.55±0.05[c]	3.83±0.36[b]	1.11±0.03[a]
2500/3750			
2500/2500	4.58±0.01[c]	4.23±0.27[b]	1.13±0.02[a]
2500/1250	4.72±0.08[b]	3.64±0.26[b]	1.13±0.01[a]
1250/3750	4.67±0.10[b,c]	3.92±0.21[b]	1.15±0.03[a]
1250/2500	4.58±0.02[b,c]	4.11±0.50[b]	1.13±0.02[a]
1250/1250	4.65±0.02[b,c]	3.82±0.33[b]	1.12±0.02[a]

Tabla A10. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Fusarium sp.,* sometido a mezcla de carvacrol y timol.

	Fusarium sp.		
timol/carvacrol	A	Vmax	λ
0	4.08±0.08[a,d]	3.36+0.43[a]	2.07±0.04[a]
3750/3750	4.44±0.15[a,b,c]	3.23±0.74[a]	1.38±0.63[b]
3750/2500	4.53±0.12 [b,c]	3.97±0.31[a]	1.12±0.02[b]
3750/1250	4.67±0.04 [b,c]	3.57±0.52[a]	1.12+0.01[b]
2500/3750	3.76±0.21[d]	4.90±0.38[a]	2.16±0.02[a]
2500/2500			
2500/1250	4.80±0.02[c]	4.29±0.40[a]	2.13±0.02[a]
1250/3750	4.40±0.24 [a,b]	3.45±1.13[a]	2.04±0.10[a]
1250/2500			
1250/1250	4.82±0.08[c]	3.98±0.35[a]	2.12±0.02[a]

Tabla A11. Parámetros de Gompertz (media + desviación estándar) de las curvas de crecimiento de *Rhizopus sp.,* sometido a diferentes mezclas binarias.

	Rhizopus sp.		
car/cin	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[a]	1.19±0.01[a]
1200/1200	5.44±0.00[a]	16.37±0.00[a]	1.14±0.00[a]
1200/800	5.39±0.01[a]	16.10±0.50[a]	1.14±0.01[a]
1200/400	5.41±0.05[a,b]	17.68±1.15[a]	1.13±0.01[a,b]
800/1200	5.36±0.01[a]	16.17±0.00[a]	1.14±0.00[a]
800/800	-	-	0.00±0.00,[b]
800/400	5.41±0.03[a]	19.73±1.06[a,b]	1.13±0.00[a]
400/1200	4.91+0.00[a,b]	131.91±0.00[c]	1.03±0.00[a]
400/800	5.38±0.04[a]	18.70±1.81[a,b]	1.13±0.01[a]
400/400	4.91±0.00[a,b]	131.91±0.00[b,c]	1.03±0.00[a,b]

	Rhizopus sp.		
eug/cin	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[a]	1.19±0.01[a]
1200/1200	5.37±0.02[a]	14.55±1.53[a]	1.10±0.01[a]
1200/800	5.38±0.04[a]	14.41±2.05[a]	1.10±0.01[a]

1200/400	5.38±0.07[a]	14.22±0.47[a]	1.10±0.01[a]
800/1200	5.36±0.09[a]	14.19±3.12[a]	1.09±0.02[a]
800/800	5.41±0.00[a]	14.48±0.60[a]	1.10+0.00[a]
800/400	5.43±0.00[a]	15.32±0.54[a]	1.10±0.00[a]
400/1200	5.40±0.05[a]	14.50±5.28[a]	1.09±0.02[a]
400/800	5.42±0.02[a]	15.16±0.13[a]	1.10±0.00[a]
400/400	5.41±0.00[a]	13.94±0.78[a]	1.10±0.01[a]

	Rhizopus sp.		
tim/cin	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[b]	1.19±0.01[a]
1200/1200	5.37±0.05[a]	17.46±0.38[a]	1.13±0.0[a]
1200/800	5.41±0.05[a]	17.05±0.60[a]	1.13±0.01[a]
1200/400	5.40±0.01[a]	17.72±0.36[a]	1.14±0.00[a]
800/1200	5.40±0.01[a]	17.28±1.03[a]	1.14±0.01[a]
800/800	5.38±0.01[a]	18.05±0.07a	1.14±0.00[a]
800/400	5.34±0.05[a]	17.21±1.14[a,b]	1.14±0.01[a]
400/1200	5.40±0.01[a]	17.14±0.67[a]	1.15±0.01[a]
400/800	5.39±0.01[a]	17.12±0.99[a]	1.13±0.01[a]
400/400	5.44±0.00[a]	17.37±0.62[a]	1.14±0.01[a]

	Rhizopus sp.		
tim/car	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[a]	1.19±0.01[a]
1200/1200	5.31±0.12[a]	18.16±0.38[a]	1.13±0.00[a]
1200/800	5.44±0.00[a]	16.87±0.31[a]	1.13±0.01[a]
1200/400	5.42±0.00[a]	17.80±0.55[a]	1.13±0.00[a]
800/1200	5.37±0.00[a]	18.09±0.03[a]	1.13±0.01[a]
800/800	5.34±0.05[a]	18.55±1.22[a]	1.13±0.01[a]
800/400	5.36±0.06[a]	18.69±1.16[a]	1.13±0.01[a]
400/1200	5.37±0.02[a]	17.96±0.77[a]	1.13±0.01[a]
400/800	5.38±0.03[a]	19.57±0.93[a]	1.13±0.01[a]
400/400	5.40±0.03[a]	19.37±0.82[a]	1.13±0.01[a]

	Rhizopus sp.		
tim/eug	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[a]	1.19±0.01[a]
1200/1200	5.34±0.14[a]	17.85±1.69[a]	1.13±0.00[a]
1200/800	-	-	>7 [b]
1200/400	5.39±0.06[a]	17.85±0.16[a]	1.14±0.00[a]

800/1200	5.44±0.00[a]	17.19±0.76[a]	1.13±0.01[a]
800/800	5.35±0.00[a]	15.57±0.00[a]	1.13±0.00[a]
800/400	5.44±0.00[a]	16.10±0.00[a]	1.14±0.00[a]
400/1200	5.44±0.00[a]	16.92±0.38[a]	1.14±0.02[a]
400/800	0.00±0.00[a]	0.00±0.00a	0.00±0.00[a]
400/400	5.44±0.00[a]	17.60±0.89[a]	1.13±0.01[a]

	Rhizopus sp.		
eug/car	A	Vmax	λ
0	5.41±0.01[a]	5.79±0.40[a]	1.19±0.01b
1200/1200	5.41±0.03[a]	16.61±0.49[a]	1.15±0.01
1200/800	5.38±0.03[a]	15.48±0.98[a]	1.13±0.01
1200/400	5.40±0.02[a]	15.20±1.88[a]	1.15±0.00
800/1200	5.44+0.00[a]	17.17±0.00[a]	1.15±0.00
800/800	5.42±0.03[a]	16.49±0.37[a]	1.14±0.00
800/400	5.44±0.00[a,b]	19.10±0.54[a]	1.13±0.01
400/1200	5.44±0.00[a]	17.38±0.77[a]	1.14±0.00
400/800	5.43±0.00[a]	17.61±1.09[a]	1.11±0.00
400/400	5.09±0.02[b]	137.07±1.05[a]	1.03±0.00