

## **CAPACIDAD ANTIMICÓTICA DE PELÍCULAS COMESTIBLES CON CARVACROL Y EUGENOL PARA INHIBIR *Rhizopus stolonifer* EN SISTEMA MODELO Y TOMATE (*Physalis ixocarpa Brot.*)**

Coyotl Huerta J.\*<sup>1</sup>, Guevara Mora M. A.<sup>1</sup>, López Mejía O. A.<sup>1</sup>, Flores Morales A.<sup>1</sup>

Instituto Tecnológico del Altiplano Tlaxcala. km 7.5. Carretera Federal San Martín-Tlaxcala, San Diego Xocoyucan, Tlaxcala. 90122. Tlaxcala, México.

[judycoyotl@gmail.com](mailto:judycoyotl@gmail.com)

### **RESUMEN**

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de antimicótico de carvacrol y eugenol en películas comestibles de carboximetilcelulosa, en forma individual y en mezclas binarias, para inhibir *Rhizopus stolonifer* en sistema modelo y en tomate (*Physalis ixocarpa Brot.*), las películas se colocaron sobre un sistema modelo elaborado con agar PDA, aw de 0.99, pH de 4.11 y rangos de concentración de de 0 a 5% con inóculo, tanto encima como por debajo de la película, para simular la capacidad antimicrobiana de las películas cuando el microorganismo deteriora el tomate o cuando pueda ocurrir contaminación una vez recubierto.

### **ABSTRACT**

The objective was to determine the effect of antifungal carvacrol and eugenol in edible films carboxymethylcellulose, and tomato individually and in binary mixtures to inhibit *Rhizopus stolonifer* in model system, the films were placed on a model system made with agar PDA and aw 0.99, pH 4.11 and concentration ranges of 0-5% with inoculum, both above and below the film to simulate the antimicrobial activity of the films when the organism deteriorates tomato or when contamination may occur once coated.

**Palabras clave:** Películas comestibles, carvacrol, eugenol, *Rhizopus stolonifer*

**Área:** Microbiología y biotecnología.

### **INTRODUCCIÓN**

En los últimos años, la creciente demanda de alimentos que conserven al máximo sus propiedades organolépticas, ha fomentado una mejora continua de los procesos empleados en la industria alimentaria, con el objetivo de asegurar su conservación, sin afectar su calidad y vida de anque, una variedad de polímeros naturales tales como polisacáridos, proteínas y lípidos, han sido utilizados, tanto solos como en combinación, para producir películas comestibles (Da Silva and Taylor, 2005).

El carvacrol está presente en los aceites esenciales de orégano entre 60-70% y en tomillo en un 45% (Ultee *et al.*, 2002). El eugenol está presente en los aceites esenciales de clavo entre 60-70% y tomillo en un 45%. (Ultee *et al.*, 2002). Lambert *et al.* (2001) señalan que carvacrol y eugenol son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias *Gram negativas*, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. En presencia de compuestos alifáticos y fenólicos se reportaron como potenciales inhibidores del crecimiento fúngico (Farag, 1989).

*R. stolonifer* posee una rápida velocidad de crecimiento y se desarrolla en una amplia variedad de temperaturas y humedades relativas, características que le permiten colonizar rápidamente a su hospedero (Northover and Zhou, 2002).

En muchas aplicaciones de alimentos, la función más importante de las películas comestibles es la reducción de la pérdida de humedad, debido a que se debe de mantener ciertos niveles de *aw* ya que es un factor de suma importancia en la calidad y seguridad del alimento. (Labuza y Contreras–Medellin, 1981) En la tabla I, se mencionan algunas de las propiedades funcionales que desempeñan las películas comestibles aplicadas a algunos alimentos.

Tabla I. Funciones de las películas comestibles

---

Reducir la pérdida de humedad
Reducir el transporte de gases (CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> )
Reducir la migración de aceites y grasas
Mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos
Retener los compuestos volátiles
Contener aditivos

---

Fuente: Adecuado de Kester y Fennema, 1986.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon soluciones al 5% de eugenol y carvacrol, se microfiltraron y se almacenaron en refrigeración para su utilización posterior.

Las películas comestibles se prepararon con una solución al 1% de carboximetilcelulosa, a la cual se le ajustó el pH a 4.11 con una solución de HCl 1 N, se adiciono 1.5% de glicerol y Tween y las soluciones de eugenol y carvacrol se adicionaron para obtener concentraciones en las películas de 0 a 5% de acuerdo a un diseño tipo tablero de ajedrez, para poder realizar las mezclas binarias de extractos etanólicos en la película, dicha mezcla, se agito hasta homogeneizar, se midieron 7 ml y se vertió la solución formadora de película en cajas petri,

posteriormente se colocaron en una estufa de secado convectiva durante un tiempo de 4 horas a 37°C.

El sistema modelo se preparó con agar papa dextrosa (PDA) al que se le ajustó la  $A_w$  a 0.99 con sacarosa comercial y el pH de 4.11 con ácido clorhídrico (HCl) (Merck, México) al 1 N y se esterilizó.

La cepa de *Rhizopus stolonifer* se aisló del tejido de tomate y se identificó la especie mediante la evaluación de crecimiento a temperaturas de 26 y 40°C. Una vez esporulado se sembró en cuñas de PDA. La suspensión de esporas se obtuvo mediante el lavado de las cuñas de agar con 10 ml de agua estéril.

Para evaluar la actividad antimicótica se cortaron círculos de película de carboximetilcelulosa con diferentes concentraciones simples y mezclas binarias de antimicrobianos, se colocaron en el centro de las cajas petri sobre el agar papa dextrosa, (PDA), luego se inocularon 3  $\mu$ l de solución de lavado de esporas por encima o por debajo de las películas por triplicado. La solución de esporas se agitó continuamente por medio de un vortéx, para evitar la precipitación de esporas. El crecimiento se monitoreó por un periodo de 504 horas.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como la concentración más baja en donde no hay crecimiento en un medio nutritivo. Esta se determinó colocando las concentraciones empleadas en un arreglo tipo tablero de ajedrez.

Partiendo de las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI's). Para cada agente antimicrobiano individual, dividiendo la concentración del antimicrobiano combinado con un segundo agente sobre la concentración inhibitoria del antimicrobiano individual. Se suman las CFI's de los agentes individuales y se obtiene el índice de la concentración fraccional inhibitoria ICFI,  $ICFI = CFI_A + CFI_B$ . Con los ICFI se determina si la interacción es aditiva, sinérgica o antagónica dependiendo del valor obtenido si es  $1 > 1$  o  $< 1$ .

Con las concentraciones mínimas inhibitorias de las películas aplicadas al sistema modelo se aplicaron a tomate *Physalis ixocarpa* Brot y se evaluó el efecto inhibitorio.

## RESULTADOS

Al evaluar el efecto antimicótico en el sistema modelo de  $A_w$  0.99 y pH 4.11 y películas con concentraciones en el rango de 0 a 0.5 % en intervalos de 0.1 %, inoculadas con *R. stolonifer* por debajo y por encima de las películas de carboximetilcelulosa, se determinó que la concentración mínima inhibitoria individual para eugenol fue de 0.5% y para carvacrol fue de 0.5%, así como para las

mezclas binarias fue de 0.4% eugenol con 0.3% carvacrol por debajo y por encima de las películas como se muestra en las tablas **II y III**.

**Tabla II.** Efecto antimicótico de películas adicionadas con carvacrol y eugenol inoculadas por debajo de estas con *R. stolonifer*, en sistema modelo con aw 0.99, pH 4.11.

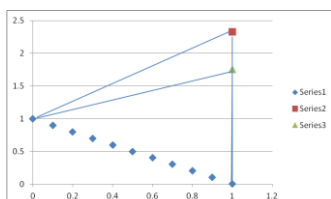
		eugenol %					
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
carvacrol %	0	c	c	c	c	c	nc
	0.1	c	c	c	c	c	nc
	0.2	c	c	c	c	c	nc
	0.3	c	c	c	c	nc	nc
	0.4	c	c	c	c	nc	nc
	0.5	nc	c	c	c	nc	nc

**Tabla III.** Efecto antimicótico de películas adicionadas con carvacrol y eugenol en películas de carboximetilcelulosa inoculadas por encima de estas con *R. stolonifer* en el sistema modelo con aw 0.99, pH 4.11

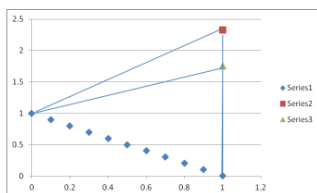
		eugenol %					
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
carvacrol %	0	c	c	c	c	c	nc
	0.1	c	c	c	c	c	nc
	0.2	c	c	c	c	c	nc
	0.3	c	c	c	c	nc	nc
	0.4	c	c	c	c	nc	nc
	0.5	nc	c	c	c	nc	nc

El Índice de la Concentración Fraccional Inhibitoria (ICFI), resultó ser de 1.4, lo cual indica un efecto antagónico.

Con las Concentraciones Fraccionales Inhibitorias (CFI) de mezcla binarias se construyeron los isoblogramas, mostrados en la figura 1 y 2 en los cuales se puede observar también efecto antagónico.



**Figura 1.** Isoblograma de CFI de la mezcla de extractos etanólicos de eugenol y carvacrol en sistema modelo ( $A_w$  0.99 y pH 4.11) para inhibir *Rhizopus stolonifer* inoculado por encima de la película de carboximetilcelulosa.



**Figura 2.** Isoblograma de CFI de la mezcla de extractos etanólicos de eugenol y carvacrol en sistema modelo ( $A_w$  0.99 y pH 4.11) para inhibir *Rhizopus stolonifer* inoculado por debajo de la película de carboximetilcelulosa.

Los resultados obtenidos, no es recomendable hacer mezclas binarias ya que el tipo de interacción es antagónica, es decir que uno de los antimicrobianos naturales inhibe la actividad del otro, por lo tanto se recomienda utilizar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias en forma individual para inhibir *Rhizopus stolonifer*, lo cual así se hizo para películas aplicadas a tomate, resultando inhibición a las CMI.

## BIBLIOGRAFÍA

- Farag R. S., Daw Y. and Abo-Raya S. H. 1989. Influence of Some Spice Essential Oils on *Aspergillus parasiticus* Growth and Production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 54:74
- Kester, J.J. y Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology*. 12: 47-59.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453-462.
- Lambert, RJW. Skandamis. PN, Coote, P. J, Nychas, G-J, E, 2001, "Un estudio de la concentración inhibitoria mínima y el modelo de acción del aceite esencial del orégano, el timol y carvacrol". *Diario de la microbiología aplicada*. 91, pp 453-462.
- Northover, J., and Zhou, T. 2002. Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:144–153.

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*.68(4):1561-1568.