

APLICACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES DE EUCALIPTO Y ORÉGANO COMO ANTIFÚNGICOS EN EL DESARROLLO DE UN ENVASE ACTIVO PARA PRODUCTOS VEGETALES

Flores Meza, A., Trejo Márquez M.A.*, Lira Vargas A.A., Pascual Bustamante, S.

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales, Centro de Asimilación Tecnológica, Jiménez Cantú s/n, San Juan Atlamica, C.P. 54729, Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, México. *Correo electrónico: andreatrejo@unam.mx

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo es analizar la actividad antifúngica *in vitro* de aceite esencial de orégano y eucalipto en fase vapor contra los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*, así como su aplicación en el desarrollo de un envase activo para productos vegetales. La extracción de los aceites esenciales se realizó por el método de hidrodestilación. La actividad antifúngica del aceite de orégano y eucalipto fue evaluada a 2000, 4000 y 6000 ppm utilizando la técnica de volatilización de disco. Los resultados de las pruebas *in vitro* de ambos aceites esenciales presentaron un porcentaje de inhibición de más del 90% sobre los hongos estudiados, siendo el aceite de orégano el que inhibió en mayor proporción desde 2000 ppm, contrario, al aceite de eucalipto donde se requirió de una concentración de 6000 ppm para lograr inhibición del 90%. Con las concentraciones que tuvieron mayor efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos, se realizaron las pruebas *in vitro* con el prototipo de envase desarrollado, mostrando 100% de inhibición para el aceite esencial de orégano, mientras la actividad antifúngica del aceite de eucalipto disminuyó considerablemente. Además se desarrolló una cinética de degradación de los componentes bioactivos del aceite esencial de orégano en el interior de la matriz polimérica y sin encapsular por cromatografía de gases, dando como resultado mayor permanencia de estos compuestos en la matriz polimérica prolongando la actividad antimicrobiana.

ABSTRACT:

The aim of this paper is to analyze the *in vitro* antifungal activity of essential oil of oregano and eucalyptus vapor phase against fungi *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Colletotrichum sp.*, and their application in the development of a container for active plant products. Extraction of essential oils was carried out by the method of hydrosdistillation. The antifungal activity of oregano oil and eucalyptus was evaluated at 2000, 4000 and 6000 ppm volatilization technique using disk. The results of the *in vitro* tests both essential oils showed a significant level of inhibition of fungi studied, being oregano oil which inhibited to a greater extent from 2000 ppm, contrary to eucalyptus oil which was required concentration 6000 ppm to achieve similar results. With concentrations had higher growth inhibitory effect of fungi, *in vitro* tests were performed with the prototype package developed, showing 100% inhibition for the essential oil of oregano, while the antifungal activity of eucalyptus oil decreased considerably. Furthermore degradation kinetics of the bioactive components of the essential oil of oregano within the polymeric matrix and unencapsulated by gas chromatography was developed, resulting in greater permanence of these compounds in the polymer matrix prolonging the antimicrobial activity.

Palabras clave:

Fitopatógenos, envase activo, orégano.

Keyword:

Phytopathogenic-microorganisms, active packaging, oregano.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

El deterioro microbiológico de los alimentos se debe a la proliferación de microorganismos que estropean la comida o lo hace no apto para el consumo (Quintavalla & Vicini, 2002). Estos

microorganismos pueden ser bacterias, levaduras y mohos que pueden inducir a problemas con patógenos, provocando problemas de seguridad alimentaria y grandes enfermedades transmitidas por los alimentos. En los últimos años, un aumento de la demanda de los consumidores de productos frescos seguros ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de preservación (Rupika, 2010).

La tecnología de envases activos, puede proporcionar productos alimenticios seguros de vida más prolongada (Vermeiren *et al.*, 2002). El término envases activo hace referencia a la incorporación de ciertos aditivos al material de envase manteniendo su calidad, seguridad y propiedades sensoriales sin agregar directamente agentes activos en el producto (Camo & Roncales, 2008). Los procesadores de alimentos y los consumidores han expresado el deseo de reducir el uso de técnicas agresivas y productos químicos sintéticos en los alimentos. Por lo tanto, hay una clara necesidad de nuevos métodos de conservación de los alimentos usando aditivos naturales, y una opción muy interesante es el uso de aceites esenciales como aditivos antimicrobianos, porque son fuentes ricas de compuestos biológicamente activos (López *et al.* 2007).

Los materiales de envase que incorporen en ellos el agente antimicrobiano como una barrera protectora adicional se están convirtiendo en el método preferido de conservación pues extiende la vida útil y reduce el riesgo de patógenos transmitidos por los alimentos. Por lo que el objetivo del trabajo es desarrollar un envase activo que permita la liberación controlada de los agentes antifúngicos contenidos en aceites esenciales para el control de hongos causantes de enfermedades en frutos y hortalizas durante su almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico. El orégano (*Lippia graveolens*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) fueron adquiridos en el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, las cuales se secaron a temperatura ambiente (25°C) y molieron en un molino (marca KRUBS), el polvo se tamizó en malla 40. Las plantas molidas se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente y sin contacto con la luz.

Obtención de aceites esenciales. Con las plantas molidas se pesaron 50 g y se mezcló con 1 L de agua (relación 1:20). Se realizó la hidrodestilación durante 2 y media horas a 250°C con agitación continua. El aceite obtenido se recolectó en viales ámbar y se almacenó en congelación hasta su utilización.

Pruebas *in vitro* con aceites esenciales. Las pruebas *in vitro* se realizaron utilizando los aceites esenciales a 2000, 4000, 6000 ppm de acuerdo a la técnica volatilización de disco, reportada por Tyagi & Malik (2011), se realizó una siembra de los hongos en agar PDA, se utilizó un disco de papel filtro (10 cm de diámetro) el cual se impregnó de la sustancia antimicrobiana para posteriormente colocarlo en la superficie interior de la tapa superior. La caja petri con el hongo se invierte inmediatamente en la parte superior de la tapa y se selló. Estas se incubaron a 25°C durante 10 días y se midió el diámetro del crecimiento del microorganismo cada día.

Pruebas *in vitro* con aceites esenciales utilizando una matriz polimérica. La matriz polimérica en cuestión fue una combinación de alginato y goma gelana (1:1) que por sus

propiedades minimiza la separación de fases. La técnica utilizada fue la técnica de volatilización de disco con una variante, pues en lugar de colocar en el interior el papel filtro, se colocaron 50 g de esferas (3 mm±1mm de diámetro) creadas a partir de la emulsión de aceite esencial con la dispersión de goma gelana-alginato y Tween al 1% como emulsificante.

Cinética de degradación de compuestos volátiles en el aceite esencial y el prototipo de envase activo. La evaluación de la cinética de degradación de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial se realizó colocando la matriz polimérica en refrigeración (4°C) en envases de polietileno durante 10 días realizando muestreo cada día y evaluando por cromatografía de gases la presencia de los compuestos bioactivos del aceite esencial usando el método de estándar interno. Para la determinación se empleó un cromatógrafo de gases marca Thermo Scientific, modelo Trace GC, con un detector de ionización de flama y una columna de sílice fundida, 30 m x 0.25 mm recubierta con una fase líquida de poliglicol. Las condiciones aplicadas en el cromatógrafo de gases fueron las siguientes: volumen inyectado: 1.0 µL; temperatura inicial de la columna: 60°C; velocidad de calentamiento: 5 °C/ min hasta 120 °C, temperatura del inyector: 250 °C, la inyección se hizo en modo “splitless”. El gas portador fue nitrógeno (99.99% de pureza). Para realizar la cinética se emplearon los estándares α-pineno (147524), cimeno (W235601), timol (T0501) y carvacrol (22051) todos de marca sigma. Los resultados de concentración se expresaron en µL terpeno/g matriz polimérica y µL terpeno/µL de aceite esencial.

Tratamiento estadístico. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias aplicando un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A fin de obtener la concentración de ambos aceites esenciales que presenta mayor inhibición contra los 3 hongos estudiados, se realizaron pruebas *in vitro*. Los porcentajes de inhibición exhibidos por aceite esencial de orégano contra *B. cinerea* (Figura 1A), *Fusarium sp.* (Figura 1B) y *Colletotrichum sp.* (Figura 1C) durante 10 días de estudio se muestran en la Figura 1.

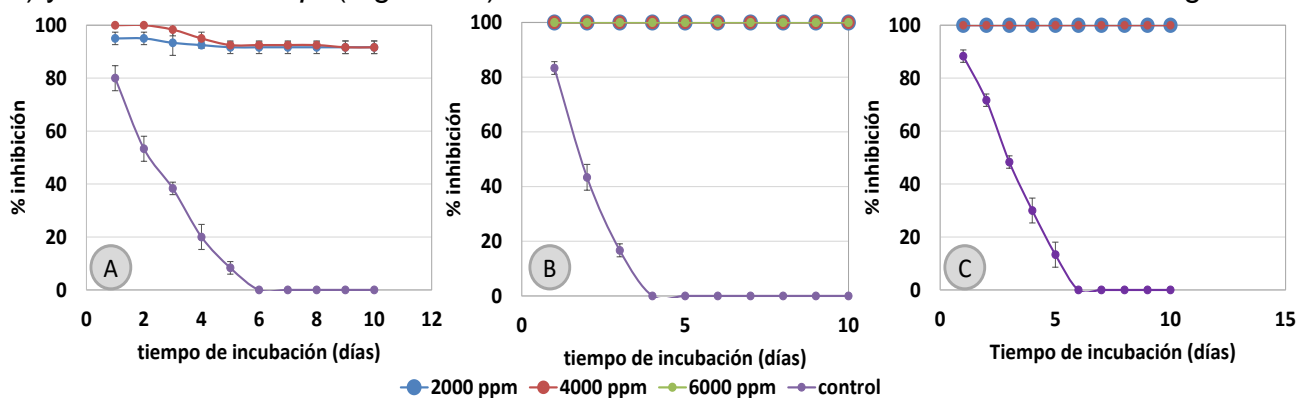


Figura 1. Porcentaje de inhibición durante 10 días de estudio de aceite esencial de orégano contra (A) *B. cinerea*, (B) *Fusarium sp.* y (C) *Colletotrichum sp.*

El aceite esencial de orégano en el caso de *B. cinerea* (Figura 1A), mostró una inhibición del 91.6%, mientras que para los hongos *Fusarium sp.* (Figura 1B) y *Colletotrichum sp.* (Figura 1C)

la inhibición del crecimiento fue del 100%. Daferera *et al.* (2003) evaluaron el efecto antifúngico de algunos aceites esenciales de plantas, entre ellos aceite de orégano contra el crecimiento de *Fusarium sp.*, *Botrytis cinerea* y *Clavibacter michiganensis*, indicando a este aceite como el mejor inhibidor para *Fusarium sp.* de entre todos los aceites analizados con un concentración de 150 g/mL para la inhibición total de este hongo, lo cual se corrobora en este estudio.

El porcentaje de inhibición mostrado por el aceite esencial de eucalipto contra los tres hongos estudiados durante 10 días se muestra en la Figura 2. El aceite esencial de eucalipto muestra importante actividad antimicrobiana en presencia de *B. cinerea* (Figura 2A) en todas las concentraciones utilizadas, en el caso de *Fusarium sp.* (Figura 2B) y *Colletotrichum sp.* (Figura 2C) se observa menor efecto del aceite esencial sobre el crecimiento micelial de estos hongos, no obstante ante *Fusarium sp.* el aceite esencial alcanzó un 76% de inhibición utilizando la concentración más baja (2000 ppm) y ante *Colletotrichum sp.* disminuyó sustancialmente su efectividad a esta misma concentración, obteniendo solo importantes resultados en la concentración más alta (6000 ppm), alcanzando una inhibición hasta del 95%

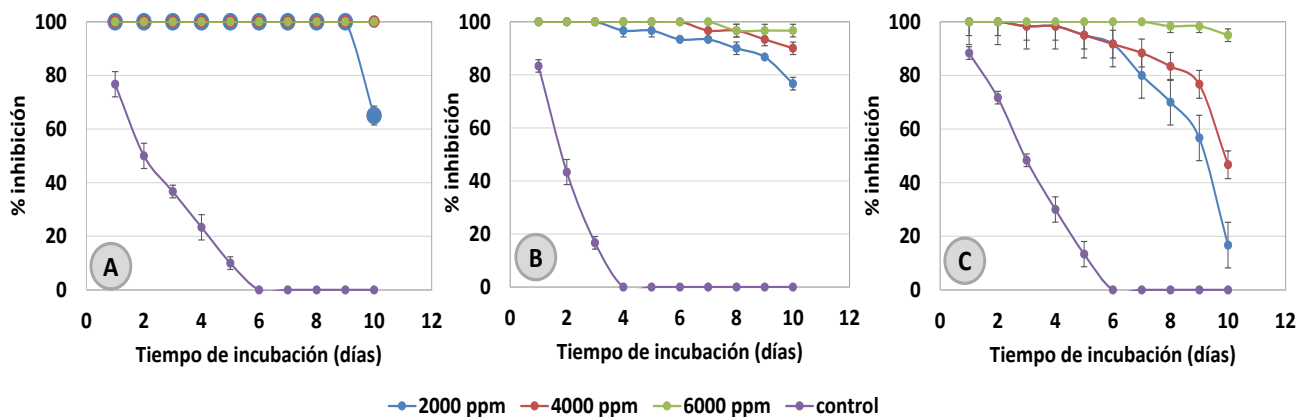


Figura 2. Porcentaje de inhibición durante 10 días de estudio de aceite esencial de eucalipto contra (A) *B. cinerea*, (B) *Fusarium sp.* y (C) *Colletotrichum sp.*

Tyagi & Malik (2011) puntualiza en su estudio como la zona de inhibición resultante de la exposición de vapores de aceite esencial de *E. globulus* es significativamente mayor que la de la misma concentración de aceite esencial en la fase líquida, su estudio demuestra claramente superior eficacia antimicrobiana en los vapores de aceite esencial, lo cual podría atribuirse a la variación en la composición relativa del aceite y de los vapores, esta última enriquecida en términos de sus componentes químicos volátiles.

Las concentraciones de aceite esencial de orégano y eucalipto que presentaron mejor inhibición en presencia de los 3 hongos estudiados fueron de 2000 ppm para orégano, mientras que para aceite de eucalipto fueron 2000 ppm para *B. cinerea*, 4000 ppm para *Fusarium sp.* y 6000 ppm para *Colletotrichum sp.* Una vez establecida estas concentraciones se realizaron pruebas *in vitro* utilizando la matriz polimérica (gelana-alginato).

La Figura 3, muestra la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenida en las pruebas *in vitro* utilizando la matriz polimérica contra *B. cinerea* (Figura 3A), *Fusarium sp.* (Figura 2B) y *Colletotrichum sp.* (Figura 3B).

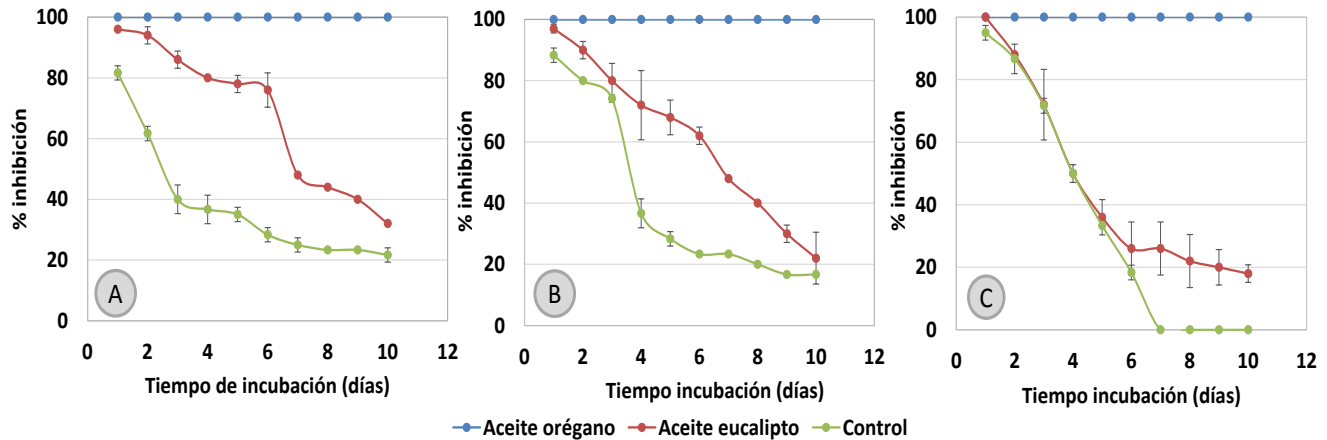


Figura 3. Porcentaje de inhibición mostrada por el aceite esencial de orégano y eucalipto contra *Fusarium sp.* (A), *Colletotrichum sp.* (B) y *B. cinerea* (C), durante 10 días de estudio.

En esta prueba se aprecia al aceite de orégano como el máximo inhibidor en los 3 hongos examinados, mientras que el aceite de eucalipto no resultó efectivo en la inhibición de los 3 hongos, lo que indica una interacción en los componentes de la matriz polimérica con los componentes volátiles del aceite esencial. Se han realizado estudios acerca de aceites esenciales o sus componentes inmersos en matrices poliméricas para el desarrollo de películas en envases de plástico, sin embargo la actividad antimicrobiana mostrada en la fase vapor se encuentra bastante reducida. No obstante López *et al.* (2007a,b) realizaron estudios de aceite de orégano en una matriz de polipropileno, polietileno/etilen-vinil-alcohol en agar y difusión en vapor contra diferentes microorganismo, demostrando el poder inhibitorio de este aceite esencial.

En el desarrollo de la cinética de degradación de los compuestos bioactivos mediante cromatografía de gases para establecer la permanencia de los compuestos presentes en el aceite esencial a temperatura de refrigeración (4°C), se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4, aceite esencial de orégano en el interior de la matriz polimérica (Figura 4A) y del aceite esencial de orégano sin encapsular (Figura 4B). Timol y cimeno son los componentes mayoritarios estudiados en el aceite esencial de orégano (Figura 4B) sin encapsular, sin embargo en la liberación de los compuestos en la matriz polimérica (Figura 4A) carvacrol y timol son los componentes lo que indica una interacción del cimeno con los componentes de esta matriz (alginato/gelana).

La pérdida de los componentes del aceite esencial de orégano en la matriz polimérica se presenta en menor proporción que en el aceite esencial sin encapsular, pues el porcentaje de concentración final con respecto a la concentración inicial es mucho menor en el aceite esencial sin encapsular que para la matriz polimérica, componentes como timol y carvacrol tienen pérdidas en la concentración del aceite esencial sin encapsular de hasta el 66%, mientras la pérdida de estos componentes en la matriz polimérica es de tan sólo 46 y 43%, respectivamente.

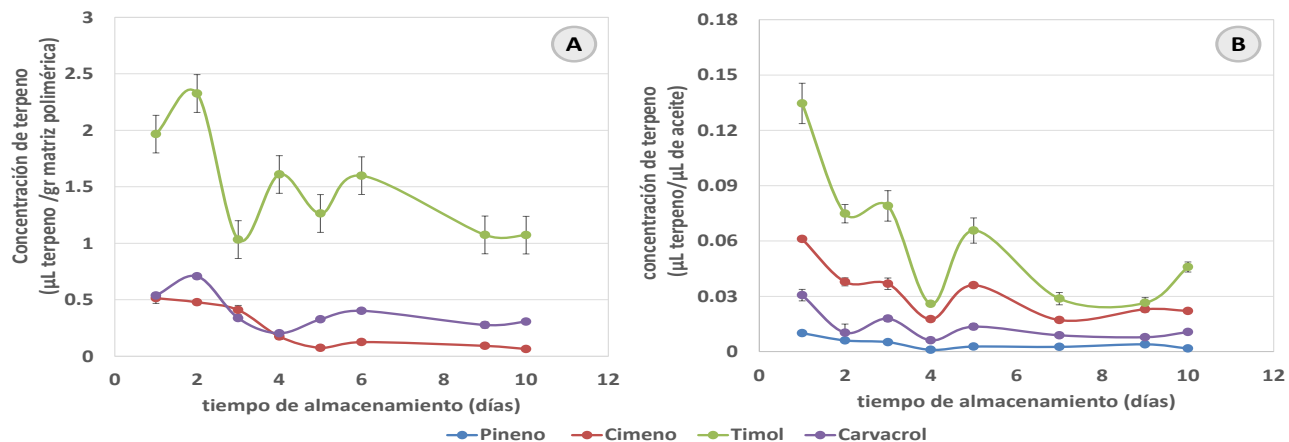


Figura 4. Cinética de degradación de los principales componentes del aceite de orégano en la matriz polimérica (A) y del aceite de orégano solo (B), durante 10 días de estudio.

CONCLUSIONES

La actividad antimicrobiana exhibida por el aceite esencial de orégano fue superior que la mostrada por el aceite esencial de eucalipto, esta actividad es atribuida principalmente a los componentes mayoritarios tales como timol y carvacrol. De acuerdo a la cinética de degradación desarrollada se puede observar como estos compontes volátiles se pierden con mayor facilidad en el aceite esencial sin encapsular. Sin embargo, si se utiliza una matriz polimérica que contenga y permita una liberación controlada, permitiendo una actividad antimicrobiana prologada.

AGRADECIMIENTOS. El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT (IT201513): Desarrollo de envases activos para frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Camo, J. B., & Roncales, P. 2008. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, 80(40):1365-1370.
- Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection*. 22: 39-44.
- López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. 2007a. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(11):4348–56.
- López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. 2007b. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(21):8814–24.
- Quintavalla, S. & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62:373-380.
- Rupika, L. A. (2010). Development and Evaluation of Density Polyethylene-Based Antimicrobial Food Packaging Films Containing Natural Agents. Packaging and Polymer Research Unit Faculty of Health, Engineering and Science Victoria University, 1-46.
- Tyagi, A. K., Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus*

oil in liquid and vapour phase against food spoile microorganisms. *Food Chemistry*. 126: 228-235.
Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Addit Contam*. 19, 163–71.