

**Investigación de la actividad anti fúngica del
aceite esencial de mostaza blanca, carvacrol y
su interacción contra *Candida krusei***

Alejandra Nohemy Abrego Gavidia

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Investigación de la actividad anti fúngica del aceite esencial de mostaza blanca, carvacrol y su interacción contra *Candida krusei*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Alejandra Nohemy Abrego Gavidia

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2017

Investigación de la actividad anti fúngica del aceite esencial de mostaza blanca, carvacrol y su interacción contra *Candida krusei*

Alejandra Nohemy Abrego Gavidia

RESUMEN. El aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol han sido ampliamente estudiados por su actividad antimicrobiana. El objetivo del estudio fue demostrar la actividad antimicrobiana de WMEO y carvacrol y el tipo de interacción que existe entre ellos contra *Candida krusei*. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), evaluando *Candida krusei* bajo cinco tratamientos diferentes en intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas. Todos los tratamientos presentaron diferencias con relación al tratamiento control con una reducción de 4 Log UFC/ml y los valores de MIC fueron WMEO 0.2% y carvacrol 0.01%. Se usó un diseño de Bloques completos al Azar con medidas repetidas en el tiempo. Por medio del método de macro dilución se realizaron combinaciones fraccionarias de WMEO 0.2% y carvacrol 0.01% obteniendo un total de ocho tratamientos donde *Candida krusei* fue evaluada en intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas para poder determinar el tipo de interacción entre ellos contra *Candida krusei*. Haciendo uso de una ecuación se determinó las concentraciones fraccionarias inhibitorias (FICI). Se analizaron las relaciones entre tratamientos y tratamientos por tiempo donde hubo diferencia significativa ($P < 0.0001$) y donde los resultados obtenidos en 72 horas se utilizaron para determinar inhibición o no. En esta parte del estudio se usó un diseño de bloques completos al azar con medidas repetidas en el tiempo. Los mejores resultados se obtuvieron con WMEO y la interacción presente entre WMEO y carvacrol fue aditiva, un efecto aditivo ayuda a mejorar la vida útil de un producto.

Palabras clave: Aditiva, combinaciones fraccionarias, MIC.

Abstract. White mustard essential oil (WMEO) and carvacrol have been widely studied for their antimicrobial activity. The aim of the study was to demonstrate the antimicrobial activity of WMEO and carvacrol and type of interaction against *Candida krusei*. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by evaluating *Candida krusei* under five different treatments of essential oils in time intervals of 0, 24, 48 and 72 hours. All treatments presented differences in relation to the control treatment with a reduction of 4 log CFU/ml and MICs were WMEO 0.2% and carvacrol 0.01%. A randomize complete block design (RCB) was used with repeated measures over. In a separate experiment using the macro dilution method, fractional combinations of WMEO 0.2% and carvacrol 0.01% were evaluated, obtaining a total of eight treatments, where *Candida krusei* was exposed at intervals of 0, 24, 48 and 72 hours in order to determine the type of interaction between essential oils. A randomize complete block design (RCB) was used with repeated measures over time. In this project the best results were obtained with WMEO, and the interaction between WMEO and carvacrol was additive. An additive effect can improve in maintaining a product shelf life.

Key words: Additive, fractionary combinations, MIC.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES	13
5. RECOMENDACIONES	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS	18

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Concentración final de tratamientos de los aceites esenciales carvacrol (CARV) y de mostaza blanca (WMEO).....	4
2. Diseño de las combinaciones binarias antimicrobianas con sus concentraciones de inhibición fraccionaria (FICI) y la interpretación de los efectos.	5
3. Recuentos de <i>Candida krusei</i> (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol.	6
4. Recuentos de <i>Candida krusei</i> (Log UFC/ml) según exposiciones de diferentes mezclas de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol.	8
5. Recuentos de <i>Candida krusei</i> (Log UFC/ml) según exposición a diferentes mezclas de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol en diferentes periodos de tiempo.	9
6. Valores de concentración de inhibición final (FICI) de <i>Candida krusei</i> expuesta a mezclas de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol (CARV).	11
Anexos	Página
1. Resultados del análisis de varianza de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales carvacrol y mostaza blanca (WMEO).....	18
2. Recuentos de <i>Candida krusei</i> (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol en diferentes horas.	18
3. Resultados del análisis de varianza de la determinación de la interacción de los aceites esenciales	18

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son definidos como extractos volátiles y aromáticos de plantas, los cuales juegan una función sumamente importante en su sistema de defensa, que en algunos casos poseen propiedades antimicrobianas (Hyldgaard *et al.* 2012). Estas propiedades son aprovechadas para la conservación de alimentos, ya que los consumidores están demandando productos con menos compuestos artificiales (Rodríguez 2011). Los aceites esenciales han demostrado que no solo tienen propiedades antibacterianas además de ser, antiparasitaria, insecticida, antiviral, fúngica y antioxidante (Hyldgaard *et al.* 2012).

Entre los aceites esenciales que se han estudiado, se encuentra el aceite esencial de mostaza blanca y el carvacrol (aceite esencial presente en el orégano). El aceite esencial de mostaza blanca o WMEO (por sus siglas en inglés) contiene 4-hidroxi bencil isotiocianato, un compuesto importante en la mostaza ya que se ha demostrado que tiene acciones antimicrobianas con un mejor resultado contra bacterias Gram negativas en relación con las Gram positivas (Monu *et al.* 2014). El carvacrol es considerado un monoterpeno fenólico, el cual es el mayor constituyente del orégano, y es uno de los aceites más estudiados. Su efecto causa daños estructurales y funcionales para la membrana celular de la bacteria que está atacando (Hyldgaard *et al.* 2012). Aunque existen muchos estudios de la acción antibacteriana de los aceites esenciales, hay menos estudios de las propiedades contra levaduras que deterioran los alimentos (Monu *et al.* 2016).

Las levaduras son consideradas como microorganismos eucariotas los cuales son parte del reino Fungi, que se reproducen por medio de esporas o fisión binaria, consideradas como unicelulares y una pared celular variable (Martorel 2006). También consideradas como el grupo más importante en los microorganismos por su importancia en la industria alimentaria ya que son usadas en la producción de pan y algunas bebidas alcohólicas (Martorel 2006), a pesar de ello también pueden causar deterioro en los productos alimenticios (Fleet 1992). Entre el total de las levaduras existe un 25% que se considera como perjudicial para los productos alimenticios, consideradas como deterioradoras. Las levaduras deterioradoras, se caracterizan por causar alteración en productos alimenticios ya procesados y listos para consumo (Orbera 2004), un ejemplo de levadura alteradora podría ser *Candida krusei*.

Candida krusei crece a 37°C formando células cilíndricas y largas de color blanco (Pitt 2009), su principal característica es que tiene la capacidad de crecer en presencia de preservantes, y a pH bajo en un ambiente anaerobio (Pitt 2009).

Candida krusei, tiene un gran impacto en la industria del chocolate ya que es la levadura principal en la fermentación de cacao y también tiene una gran importancia para la fermentación en panadería (Rosa y Gábor 2006). Sin embargo, como se mencionó anteriormente esta levadura es capaz de deteriorar los alimentos y es caracterizado por la formación de una película en la superficie del alimento con una gran capacidad de acciones proteolíticas y lipolíticas, convirtiendo esto en deterioro para concentrado de frutas, bebidas alcohólicas y una gran variedad de productos lácteos (Casey y Dobson 2003).

Para poder entender y utilizar los aceites esenciales se debe tener en cuenta que una de las desventajas de usar aceites esenciales como antimicrobianos es que se necesitan altas concentraciones para poder tener el efecto de preservación, lo cual puede afectar al producto sensorialmente (Rodríguez 2011). Para poder obtener mejores resultados y bajar las concentraciones a utilizar y no comprometer tanto la capacidad antimicrobiana como la calidad sensorial del producto, se pueden realizar combinaciones entre los aceites esenciales (Hyldgaard *et al.* 2012). Las diferentes interacciones presentes en cualquier combinación entre aceites esenciales pueden dividirse en sinérgica, aditiva o antagónica. El sinergismo sucede cuando juntos los aceites esenciales tienen un mejor resultado que por separado (Hyldgaard *et al.* 2012).

Para poder determinar de manera cuantitativa que tipo de interacción se obtuvo se utiliza el concepto de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI), esto es calculado con los resultados de la concentración mínima inhibitoria de los aceites por si solos contra algún microorganismo. Valores de CFI de 0.5, 1.0 ó >1 corresponde a una relación de sinérgica, aditiva y antagónica respectivamente (Faleiro 2011). Es por estas razones que se establecieron diferentes objetivos del estudio:

- Demostrar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales carvacrol y el aceite esencial de mostaza blanca contra *Candida krusei*.
- Comparar cuál de los aceites evaluados presenta una mayor eficiencia.
- Indicar que que tipo de relación existe entre los aceites al combinar las concentraciones de MIC para evitar su crecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El proyecto fue realizado en la Universidad de Auburn situada en el estado de Alabama, Estados Unidos.

Etapas I. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales carvacrol y mostaza blanca (WMEO).

Preparación de cultivos. El cultivo de *Candida krusei* se encontraba congelado (-80 °C), por lo que primeramente se descongeló y fue inoculado en YPD (caldo de peptona levadura dextrosa) a 32 °C por 24 horas. Seguidamente se transfirieron 10 µL a YPD y se incubó a 32 °C por 24 horas. Se llevó el inóculo a 10⁷ UFC/mL, donde adicionalmente se realizó una siembra por superficie para comprobar la pureza y concentración del inóculo, se incubó a 32° por 48 horas. Finalmente, se añadieron 20 µL del cultivo a 10 tubos con 9.8 ml de YPD.

Preparación tratamiento de mostaza blanca. Una solución congelada de aceite esencial de mostaza blanca (WMEO) al 98% de pureza, se descongeló para crear dos diferentes concentraciones. La primera concentración se preparó añadiendo 0.153 ml de la solución descongelada de WMEO a 1.343 ml de dimetildisulfóxido (DMSO), resultando un tratamiento con un porcentaje de 0.20% de WMEO. La segunda concentración son 0.112 mL de la solución al 98% de pureza de WMEO a 1.388 ml de DMSO, resultando un tratamiento con 0.15% de WMEO. Se añadieron 0.2 ml de los tratamientos a dos tubos con YPD y *Candida krusei*. Se realizaron diluciones con 9 ml de agua peptonada al 0.1% para realizar los conteos en platos petri con YPD agar que fueron incubados a 32 °C por 48 horas. Las concentraciones utilizadas estuvieron basadas en estudios previos con estos aceites esenciales.

Preparación tratamiento de carvacrol. De una solución al 100% en refrigeración de carvacrol, se realizaron los diferentes tratamientos. Donde una de las concentraciones se realizaron añadiendo 10 µL de carvacrol de la solución de reserva a 990 µL de dimetildisulfóxido (DMSO), obteniendo un tratamiento con 0.02% de carvacrol. La segunda consistió en añadir 5 µL de carvacrol de la solución de reserva a 995 µL de DMSO obteniendo una solución con 0.01% de carvacrol. Se añadieron 0.2 ml de cada tratamiento a dos diferentes tubos de ensayo con YPD y *Candida krusei*, similar al tratamiento de mostaza blanca, de este se realizaron diluciones a tubos de 9 ml de agua peptonada al 0.1% los cuales se utilizaron para realizar la siembra de este tratamiento, en platos Petri YPD agar que fueron incubados a 32 °C por 48 horas. Las concentraciones utilizadas estuvieron basadas en estudios previos con estos aceites esenciales.

Monitoreo de resultados. El proyecto tuvo una duración de 4 días (0, 24, 48 y 72 horas) donde los tubos de ensayo con los tratamientos se incubaron a 22 °C y los platos Petri a 32 °C. Después de haber sembrado los tratamientos cada 0, 24, 48 y 72 horas en platos Petri con YPD agar, con repetidas diluciones en agua peptonada al 0.1%, el sembrado se realizó añadiendo 0.1 ml de cada uno de los tubos de ensayo en dos platos Petri para cada tratamiento diferente, las colonias se contabilizaron luego de 48 horas.

Análisis estadístico. Se usó un diseño de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones. Se utilizó un nivel de significancia $P < 0.05$. La separación de medias se realizó mediante una separación de medias mínimas cuadradas.

Etapas II. Determinación de la interacción de los aceites esenciales.

Preparación de cultivos. El cultivo de *Candida krusei* se encontraba congelado, se inoculó en YPD (caldo de peptona levadura dextrosa) a 32 °C por 24 horas. Seguidamente se transfirieron 10 µL del cultivo a YPD se incubó a 32 °C por 24 horas, se realizaron diluciones para poder obtener un inóculo de 10^5 UFC/mL que se incubó a 32 °C por 48 horas. De igual manera se realizó una siembra por superficie para asegurar la pureza y concentración del inóculo. Finalmente, se añadieron 20 µL del cultivo a 8 tubos con 9.8 ml de YPD.

Preparación de tratamientos. Para la elaboración de tratamientos primeramente se preparó una solución de WMEO al 0.02% y una solución de carvacrol al 0.01% consideradas como MIC las cuales se tomaran como base junto con dimetildisulfóxido para elaborar los demás tratamientos, un tratamiento no contuvo ninguno de los aceites esenciales el cual fue el tratamiento control. Las combinaciones binarias usadas para los dos aceites esenciales se encuentran representadas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Concentración final de tratamientos de los aceites esenciales carvacrol (CARV) y de mostaza blanca (WMEO).

Tratamiento	Descripción
WMEO MIC (0.2%)	Concentración mínima inhibitoria
CARV MIC (0.01%)	Concentración mínima inhibitoria
WMEO (0.1%) + CARV (0.005%)	1/2 WMEO + 1/2 CARV
WMEO (0.15%) + CARV (0.0075%)	3/4 WMEO + 3/4 CARV
WMEO (0.15%) + CARV (0.0025%)	3/4 WMEO + 1/4 CARV
WMEO (0.05%) + CARV (0.0075%)	1/4 WMEO + 3/4 CARV
WMEO (0.05%) + CARV (0.0025%)	1/4 WMEO + 1/4 CARV
Control	Dimetildisulfóxido

Se añadieron 0.2 mL de cada uno de los tratamientos a un tubo diferente con YPD y el *Candida krusei*, se realizaron diluciones con agua peptonada al 0.1%, con las cuales se realizaron las siembras de los tratamientos, donde los platos se incubaron a 32 °C a 48 horas.

Monitoreo de resultados. El proyecto tuvo una duración de 4 días (0, 24, 48 y 72 horas) donde los tubos de ensayo con los tratamientos fueron incubados a 22 °C y los platos Petri a 32 °C. Se realizaron conteos después de 48 horas después de haber sembrado los tratamientos cada 0, 24, 48 y 72 horas en platos Petri con YPD agar.

Determinación de interacción. Una vez obtenidos los resultados de los ocho diferentes tratamientos se recopilaron y con el uso del cuadro 2 se determinó el tipo de interacción entre ambos ya sea sinérgica, aditiva o antagonica.

Cuadro 2. Diseño de las combinaciones binarias antimicrobianas con sus concentraciones de inhibición fraccionaria (FICI) y la interpretación de los efectos.

Proporción MICC aceite esencial				
A	B	FICI^φ	Resultado crecimiento bacteriano	Efecto
0	0	0	Crecimiento	Control
1	0	1	No crecimiento	MIC
0	1	1	No crecimiento	MIC
3/4	1/4	1	Crecimiento	Aditivo o antagonico
			No crecimiento	Aditivo
1/2	1/2	1	Crecimiento	Aditivo o antagonico
			No crecimiento	Aditivo
1/4	3/4	1	Crecimiento	Aditivo o antagonico
			No crecimiento	Aditivo
1/4	1/4	0.5	Crecimiento	Aditivo o antagonico
			No crecimiento	Sinérgico
3/4	3/4	1.5	Crecimiento	Antagonico
			No crecimiento	Aditivo o sinérgico

^φ Interacciones sinérgicas, aditivas y antagonicas corresponden a FICIs de < 0.5, 1.0, y >1.5 respectivamente (Techathuvanan *et al.* 2014)

Análisis estadístico. Se usó un diseño de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones. Se utilizó un nivel de significancia $P < 0.05$. La separación de medias se realizó mediante el método de medias mínimas cuadradas (LS MEANS) y fueron reportados en Log UFC/mL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración mínima inhibitoria de cada aceite esencial.

Todos los tratamientos mostraron inhibición con relación al tratamiento control (Cuadro 3) teniendo una $P < 0.0001$. A pesar de que estos tratamientos también se analizaron por el tiempo de exposición, esta relación no presentó diferencia significativa ($P = 0.2409$) de igual forma entre tiempos no existió una diferencia significativa ($P = 0.4091$)

Cuadro 3. Recuentos de *Candida krusei* (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de extractos de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol.

Tratamiento	Log UFC/ml ^{&}	% reducción
Control	5.95 ± 0.87^A	-
Carvacrol 0.01%	1.97 ± 1.45^B	99.99%
Carvacrol 0.02%	1.17 ± 0.86^{BC}	100.00%
WMEO 0.15%	1.59 ± 0.98^{BC}	100.00%
WMEO 0.20%	0.95 ± 0.83^C	100.00%
R2	0.85680	
CV	42.86003	

[&]Los valores representados en el cuadro corresponden a al promedio \pm Desviación Estándar de tres repeticiones independientes y 4 observaciones por repetición. (N=60)

^{ABC} Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

^Ω % de reducción con respecto al tratamiento control

Todos los tratamientos presentaron un porcentaje de reducción de ≥ 4 Log UFC/ml sin embargo, estadísticamente los mejores resultados fueron obtenidos en WMEO 0.15%, carvacrol 0.02% y WMEO 0.20%. Las ventajas con estos resultados pueden atribuirse a que se puede hacer uso de la concentración más baja de los dos aceites esenciales, teniendo menos consecuencias en el sabor de los alimentos, pero teniendo una alta inhibición de la levadura.

Esto es una mayor ventaja para el aceite de mostaza blanca (WMEO) ya que debido a sus componentes tiene un fuerte sabor pungente y agrio muy característico lo que es debido a su alto contenido de sinalbina (glucosinolatos) (Clarke 2010), el cual no suele ser muy aceptado por los consumidores. Por otra parte, el carvacrol es un agente saborizante que puede ser utilizado en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, goma de mascar, gelatinas y

algunos dulces, donde se usa en bajas concentraciones para el consumo humano (Suntres *et al.* 2015)

El WMEO contiene un compuesto llamado sinalbina (4 hidroxibencil glucosinolato), los glucosinolatos son degradados por una enzima llamada mirosinasa, lo que da como resultado diferentes productos como los isotiocianatos, a los cuales se le atribuye su poder antimicrobiano, donde se obtiene 4 hidroxibencil isotiocianato (Monu *et al.* 2014). La forma de actuar de los isotiocianatos se le atribuye a la inactivación de enzimas extracelulares mediante la división oxidativa de los enlaces disulfuros (Brul y Coote 1999). El efecto antimicrobiano de WMEO contra *Salmonella sp.* ha sido estudiado en matrices de salsas, donde se observó una reducción de los conteos a 0.8 a 2.7 log a concentraciones de 0.025% a 0.027% de WMEO (David *et al.* 2013), resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio.

Un estudio realizado con WMEO demuestra que los isotiocianatos, tienen una mejor acción antimicrobiana contra levaduras y hongos que contra bacterias, donde se ha demostrado que *Schizosaccharomyces pombe* fue el organismo con mayor sensibilidad contra WMEO en salsa ketchup donde el valor más bajo de WMEO (0.4 g/litro) presentó un decrecimiento significativo en el conteo de colonias. También se demostró que a concentraciones de 150 mg/litro tiene una acción antimicrobiana contra *Zygosachromyces bailii* (levadura que tiene la misma característica que *Candida krusei*, ser resistente a preservantes) (Monu *et al.* 2014).

Se ha demostrado que los aceites esenciales que contienen aldehídos o fenoles, como el carvacrol, poseen una actividad antimicrobiana mayor que otros aceites esenciales (Bassole y Juliani 2012). Sin embargo, en este estudio se demuestra lo contrario, ya que la mayor acción antimicrobiana se presentó en WMEO con un mayor porcentaje de reducción contra *Candida krusei*.

Según estudios para la obtención de los resultados de MIC de cada uno de las concentraciones mínimas inhibitorias se establecen con la concentración mínima del aceite esencial donde los microorganismos son inhibidos en un 90% aprox (Sleha *et al.* 2014). Con los datos obtenidos en el cuadro 3, se establecieron como MIC 0.2% WMEO y 0.01% carvacrol, siendo la elección similar al estudio anteriormente mencionado.

Aunque se sabe que el carvacrol contiene actividades antimicrobianas son pocos aquellos estudios que dan a conocer su actividad contra levaduras que acortan la vida anaquel de los productos. En un estudio realizado por la Universidad de Tennessee se demostró que el MIC para carvacrol contra la levadura *Candida krusei* equivaldría a 0.5% (200 mg/L) (Allis 2013). La gran capacidad de inhibición presente en carvacrol está directamente relacionada con los compuestos fenólicos, de los cuales diferentes estudios reportan que poseen altos niveles de actividad antimicrobiana (Cetin *et al.* 2009). Asimismo, existe un estudio con WMEO incubado a 25 °C obteniendo un resultado de 250-500 mg/L contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Techathuvanan *et al.* 2014). Comparando esos resultados se puede indicar que la MIC para levaduras que perjudican la vida anaquel de un producto es mayor a bacterias Gram negativas al utilizar WMEO.

Se ha demostrado que el carvacrol que afecta la membrana externa de las bacterias Gram negativas, la cual se desintegra causando una liberación de los compuestos contenidos en la membrana externa lipopolisacaridos hidrofílicos. A pesar de afectar directamente la membrana externa el sitio de acción del carvacrol al actuar como antimicrobiano es la membrana citoplasmática, donde hay un transporte de iones entre la membrana. El grupo hidroxilo cumple con la función de portador de transmembrana de cationes monovalentes a través de la membrana llevando H⁺ dentro del citoplasma de la célula y transportando K⁺ de regreso (Hyldgaard *et al.* 2012). Aunque se sabe poco de la manera de actuar de carvacrol contra levaduras, un estudio realizado contra *Sccharomyces cerevisiae*, sugiere que la acción antifunginca está relacionada con la perturbación de la homeostasis de iones Ca⁺ o H⁺ (Chillot *et al.* 2015).

Efecto de combinaciones antimicrobianas.

En relación al efecto de las mezclas de aceites esenciales todos los tratamientos presentan diferencias con relación al tratamiento control (cuadro 4). Estadísticamente los tratamientos tuvieron diferencia significativa entre ellos (P <0.0001), los mejores tratamientos fueron el WMEO 0.2%, WMEO 0.1% + CARV 0.005% y WMEO 0.05% + CARV 0.0075% al reducir ≥ 4 log UFC/ml.

Cuadro 4. Recuentos de *Candida krusei* (Log UFC/ml) según exposiciones de diferentes mezclas de los extractos de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol.

Tratamiento	Log UFC/ml	% reducción ^Ω
Control	6.52 ± 1.29 ^A	-
WMEO 0.2%	1.88 ± 1.46 ^{DE}	100.00%
CARV ^β 0.01%	3.65 ± 0.82 ^B	99.87%
WMEO 0.1% + CARV 0.005%	1.97 ± 1.62 ^{CDE}	100.00%
WMEO 0.15% + CARV 0.0075%	2.36 ± 1.94 ^{CD}	99.99%
WMEO 0.15% + CARV 0.0025%	2.73 ± 2.11 ^C	99.98%
WMEO 0.05% + CARV 0.0075%	1.41 ± 1.32 ^E	100.00%
WMEO 0.05% + CARV 0.0025%	2.69 ± 1.93 ^C	99.99%
R2		0.875
CV		32.587

^βCARV= Carvacrol; ^Ω % de reducción con respecto al tratamiento control

^{ABCDE} Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0.05)

A pesar de no estar en combinaciones binarias el tratamiento WMEO 0.2% presenta uno de los mayores porcentajes de reducción con relación a los demás tratamientos y un mejor resultado contra el tratamiento de carvacrol 0.01%. Sin embargo, el tratamiento WMEO 0.05% + CARV 0.0075% representan la mitad de la concentración de WMEO y la menor

concentración de carvacrol, representa el mayor porcentaje de reducción con un resultado de ≥ 5 log UFC/ml.

Algunos estudios han demostrado que WMEO con concentraciones de 150 mg/lit muestra una acción antimicrobiana contra *Zygosaccharomyces*, una levadura que cumple con la característica de ser resistente a los preservantes, tal como *Candida krusei* (Monu *et al.* 2014). En algunos estudios se demuestra la alta capacidad del carvacrol como componente antimicrobiano, aunque el MIC del Carvacrol contra *Candida krusei* sea 0.01%, carvacrol al 0.025% presenta una inhibición completa en *Aspergillus niger* (Abbaszadeh *et al.* 2014).

También se evaluó el efecto de las mezclas de aceites esenciales en diferentes periodos de tiempo (cuadro 5) donde existieron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos, entre los tiempos y la interacción tratamiento por hora fue altamente significativa ($P < 0.0001$).

Cuadro 5. Recuentos de *Candida krusei* (Log UFC/ml) según exposición a diferentes mezclas de extractos de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol en diferentes periodos de tiempo.

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Control	4.71±0.20 ^{aA}	6.11±0.09 ^{abC}	7.38±0.04 ^{bcC}	7.91±0.02 ^{ceE}
WMEO 0.2%	3.69±0.57 _{aA}	0.80±0.17 ^{bA}	1.35±1.31 ^{bA}	1.70±1.73 ^{bA}
CARV ^β 0.01%	4.68±0.54 _{aA}	3.64±0.81 ^{abA}	2.94±0.47 ^{bA}	3.33±0.02 ^{abA}
WMEO0.1%+CARV0.005%	3.39±0.03 _{aA}	<0.70 ^{δbB}	1.68±1.70 ^{bA}	2.12±2.46 ^{abA}
WMEO0.15%+CARV0.0075%	3.20±0.02 _{aA}	<0.70 ^{bA}	1.57±1.51 ^{bA}	3.97±2.89 ^{aC}
WMEO0.15%+CARV0.0025%	3.09±0.17 _{aA}	<0.70 ^{bB}	1.36±1.15 ^{bAB}	5.77±0.17 ^{cAB}
WMEO0.05% +CARV0.0075%	3.54±0.71 _{aA}	<0.70 ^{bA}	<0.70 ^{bAB}	<0.70 ^{bC}
WMEO0.05%+CARV0.0025%	3.30±0.06 _{aA}	<0.70 ^{bBC}	1.89±2.06 ^{abA} _B	4.89±1.23 ^{cC}
R2			0.875	
CV			32.587	

^β CARV= Carvacrol

^δ No hubo presencia de colonias en este tratamiento.

^{abc} Medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre horas ($P < 0.05$)

^{ABC} Medias con letras diferentes son significativamente diferentes entre tratamientos ($P < 0.05$)

Para el tratamiento WMEO 0.2% se observó igualdad estadística desde las 24 horas, representando una reducción con relación a las 0 horas. En el tratamiento CARV 0.01%

existen diferencias significativas entre las 0 horas y las 48 horas, en el tratamiento WME0 0.1% + CARV 0.005% las 0 horas son estadísticamente diferentes con relación a las 24 y 48 horas, sin embargo las 72 horas presenta una igualdad estadística entre las horas anteriormente mencionadas. El tratamiento WME0 0.15% + CARV 0.0075%, presentó una alta reducción en las 24 horas y 48 horas, sin embargo, a las 72 horas presento igualdad significativa con la hora 0. En el tratamiento WME0 0.15% + CARV 0.0025%, a las 72 horas presentó diferencias significativas con todos los demás tiempos, donde hubo un aumento de la población. En el tratamiento WME0 0.05% + CARV 0.0075%, la hora 0 presentó diferencias significativas con las 24, 48 y 72 horas, estos tres últimos tiempos no presentaron diferencias significativas. A pesar que este tratamiento tuvo presencia de colonias similares a todos los tratamientos en la hora 0, fue el único que mantuvo desde las 24 horas a las 72 ausencia de *Candida krusei*. Para el tratamiento WME0 0.05% + CARV 0.0025% se presentaron diferencias significativas entre las 72 horas y los demás periodos de tiempo.

Entre tratamientos a la hora 0 se presentó igualdad estadística para todos los valores, sin embargo, para las 24 horas los tratamientos WME0 0.1% + CARV 0.005%, WME0 0.15% + CARV 0.0075%, WME0 0.15% + CARV 0.0025%, WME0 0.05% + CARV 0.0075% y WME0 0.05% + CARV 0.0025% presentaron ausencia de población de *Candida krusei*, junto con el tratamiento WME0 0.2% que presentó bajos recuentos de Log UFC/mL. Por otro lado, el control y el tratamiento CARV 0.01% presentaron incrementos en su población, con relación a la hora 0 como entre los tratamientos. Para las 48 horas los tratamientos que presentaron mayor reducción fueron el WME0 0.2%, WME0 0.15% + CARV 0.0025% y WME0 0.05% + CARV 0.0075%, sin embargo, todos los tratamientos son completamente diferentes al tratamiento control. En las 72 horas los tratamientos que presentaron mayor reducción fueron el WME0 0.2% y WME0 0.05% + CARV 0.0075%, mientras que el WME0 0.05% + CARV 0.0025% y WME0 0.15% + CARV 0.0025% tuvo un incremento en su población con relación a las demás medidas de tiempo.

Existen cinco tratamientos de WME0 donde se observa un decrecimiento de 0 a 24 horas y un aumento de colonias desde las 48 a las 72 horas, resultado muy similar a un estudio realizado con WME0 *Schizosaccharomyces pombe*, donde las células comienzan a recuperarse a las 24 horas resultando en conteos de 4 log menos que el control a 72 horas (Monu *et al.* 2014).

De la combinación fraccionaria de los aceites esenciales representados en el Cuadro 6 se tomaron los datos de las 72 horas comparadas con el dato del tratamiento control a 0 horas, para poder determinar si existió inhibición o no, y junto con la tabla 2 se podrá determinar la relación existente entre los aceites esenciales (Techathuvanan *et al.* 2014).

Para poder calcular el FICI (concentración fraccional inhibitoria) se utilizó la ecuación 1:

$$FICI = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B} \quad [1]$$

Donde MIC_A hace referencia al compuesto A por sí solo, $MIC_{A/B}$ es el compuesto A en combinación, MIC_B y $MIC_{B/A}$ son el compuesto B por sí solo y su combinación respectivamente (Valcourt *et al.* 2016). De acuerdo con el valor obtenido en el MIC se determinará si la interacción es aditiva, sinérgica o antagónica (cuadro 6).

Cuadro 6. Valores de concentración de inhibición final (FICI) de *Candida krusei* expuesta a mezclas de aceite de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol (CARV).

Tratamiento	FICI ^ψ	<i>Candida krusei</i>	Efecto
Control	0	Crecimiento	Control
WMEO 0.2%	1	Sin crecimiento	MIC
CARV ^β 0.01%	1	Sin crecimiento	MIC
WMEO 0.1% + CARV 0.005%	1	Sin crecimiento	Aditivo
WMEO 0.15% + CARV 0.0075%	1.5	Sin crecimiento	Aditivo o sinérgico
WMEO 0.15% + CARV 0.0025%	1	Crecimiento	Aditivo
WMEO 0.05% + CARV 0.0075%	1	Sin crecimiento	Aditivo
WMEO 0.05% + CARV 0.0025%	0.5	Crecimiento	Aditivo o antagónico

^β CARV= Carvacrol

^ψ Interacciones sinérgicas, aditivas y antagonicas corresponden a FICIs de < 0.5, 1.0, y >1.5 respectivamente.

Se considera como efecto aditivo cuando la combinación de los aceites esenciales es igual a la suma de los efectos obtenidos por el tratamiento individualmente. Una relación de sinergismo se obtiene cuando los resultados son mayores que las sumas de ellos individualmente y una relación antagónica se refiere cuando al momento de comparar se obtienen resultados menores (Faleiro 2011). Los análisis de las interacciones de los aceites esenciales son una oportunidad a la industria alimentaria para poder incrementar su eficiencia aprovechando las interacciones sinérgicas o aditivas (Bassole y Juliani 2012).

Las combinaciones de WMEO y carvacrol tuvieron una buena relación, ya que en los cinco tratamientos (excluyendo el control y las MIC) tres de ellos presentaron inhibición en el crecimiento de *Candida krusei*. Se puede concluir del cuadro 6 que la interacción presente para estos aceites esenciales es aditiva, ya que existe suficiente evidencia con las combinaciones que presentan esta relación.

Según estudios una interacción aditiva entre aceites esenciales está relacionado con sus compuestos fenólicos, los cuales están presentes en el carvacrol (Bassole y Juliani 2012). Adicionalmente, de acuerdo con algunos estudios los compuestos fenólicos presentes en el orégano (carvacrol y timol) poseen una interacción aditiva contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Faleiro 2011).

Tener una interacción aditiva de WMEO con otros aceites esenciales, ayuda a mantener la inocuidad de un alimento y su vida de anaquel reduciendo las consecuencias negativas en

la parte sensorial, ya que se reduce la cantidad de WMEO a utilizar (Techathuvanan *et al.* 2014). Según un estudio realizado WMEO posee un aroma muy sensible al gusto del ser humano, donde mantener una relación incluso aditiva con otro aceite esencial, ayudara a mantener el producto contrarrestando el efecto de aroma que posee WMEO (Techathuvanan *et al.* 2014), estos análisis de interacciones de los aceites esenciales son una oportunidad a la industria alimentaria para poder incrementar su eficiencia aprovechando las interacciones sinérgicas o aditivas (Bassole y Juliani 2012).

Tener una interacción aditiva de WMEO con otros aceites esenciales, ayuda a mantener la inocuidad de un alimento, su vida de anaquel reduciendo las consecuencias negativas en la parte sensorial, ya que se reduce la cantidad de WMEO a utilizar (Techathuvanan *et al.* 2014). Según un estudio realizado WMEO posee un aroma muy sensible al gusto del ser humano, donde mantener una relación incluso aditiva con otro aceite esencial, ayudara a mantener el producto y contrarrestando el efecto de aroma que posee WMEO (Techathuvanan *et al.* 2014).

Existen pocos estudios de carvacrol y WMEO interactuando juntos, es por ello que realizar este análisis con lleva a una gran responsabilidad para la industria de alimentos. Además, de no poseer un proyecto que estudie sus interacciones, la utilización de los mismos contra levaduras deterioradoras de alimentos son muy escasos. Existen estudios de estos aceites esenciales contra levaduras de importancia en el campo clínico o de estos contra otras bacterias patógenas, por ejemplo carvacrol ha sido estudiado contra *Candida albicans* utilizando macrodiluciones para determinar los valores de MIC (Vardar-Unlu *et al.* 2010). Igualmente existen estudios de WMEO contra *Salmonella* en una salsa con partículas, donde se estudió el mecanismo de acción de los isotiocinatos en bacterias Gram negativas (David *et al.* 2013).

4. CONCLUSIONES

- Se demostró la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a diferentes concentraciones con una reducción de ≥ 4 log UFC/ml, pudiendo utilizar las concentraciones más bajas para no afectar las características sensoriales.
- Las concentraciones correspondientes al aceite de mostaza blanca (WMEO) 0.15%, WMEO 0.20% y carvacrol 0.02% fueron los mejores tratamientos ($P < 0.05$), y pueden ser usados solos o en combinación con otros aceites esenciales.
- Existe una relación aditiva al combinar los aceites esenciales WMEO y carvacrol contra *Candida krusei*, indicando un uso eficaz en la industria para mantener la vida anaquel de un producto.

5. RECOMENDACIONES

- Identificar los aceites esenciales que tienen capacidad más alta de contrarrestar efectos negativos para el consumidor sensorialmente.
- Determinar cómo actuarían el carvacrol y WMEO en diferentes tipos de matrices alimentarias altos en grasa, proteína y carbohidratos.
- Realizar más estudios utilizando WMEO contra otras levaduras.
- Se deben tomar en cuenta los diferentes compuestos presentes en WMEO ya que pueden influenciar al momento de inhibir las bacterias tomando ventaja sobre otros aceites esenciales.

6. LITERATURA CITADA

Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Med*; [accesado junio 9 2017]. 24(2):e51-6. eng. doi:10.1016/j.mycmed.2014.01.063.

Allis A. 2013. Inhibition of Spoilage Yeasts using Spice Essential Oils and Their Components. Knoxville: University of Tennessee. 72 p; [accesado junio 2 2017]. http://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3624&context=utk_gradthes.

Bassole IHN, Juliani HR. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*; [accesado mayo 18 2017]. 17(4):3989–4006. eng. <https://ai2-s2-pdfs.s3.amazonaws.com/76dd/0c92ef742fd9ff06d378c091fc806a9d89da.pdf>. doi:10.3390/molecules17043989.

Brul S, Coote P. 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International journal of food microbiology*; [accesado junio 25 2017]. 50(1). 1-17. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00072-0

Casey G, Dobson A. 2003. Molecular detection of *Candida krusei* contamination in fruit juice using the citrate synthase gene *cs1* and a potential role for this gene in the adaptive response to acetic acid. *J Appl Microbiol*; [accesado mayo 14 2017]. 95(1). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.01940.x/full>.

Cetin B, Cakmakci S, Cakmakci R. 2009. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils; [accesado junio 8 2017]. <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-11-35-2/tar-35-2-5-0906-162.pdf>.

Chillot J, Tebbji F, Remmal A, Boone C, Brown G, Bellaoui M, Sellam A. [actualizado agosto 1 2015]. The Monoterpene Carvacrol Generates Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *American Society for Microbiology*; [accesado julio 15 2017]. en. <http://aac.asm.org/content/59/8/4584.full>.

Clarke DB. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Methods*; [accesado julio 9 2017]. 2(4):310. doi:10.1039/b9ay00280d

David JRD, Ekanayake A, Singh I, Farina B, Meyer M. 2013. Effect of white mustard essential oil on inoculated *Salmonella sp.* in a sauce with particulates. *J Food Prot*; [accesado junio 25 2017]. 76(4):580–587. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-375.

Faleiro M. 2011. The mode of antibacterial of essential oils. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. doi:10.1002/9781118266892.

Fleet G. 1992. Spoilage Yeasts; Critical Review in *Biotechnology* [accessed 2017 May 14]. 12(2):1–23. doi: 10.3109/07388559209069186

Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*; [accesado mayo 14 2017]. 3:12. eng. doi:10.3389/fmicb.2012.00012.

Martorel Guerola P. 2006. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. España: Universidad de Valencia. 221 p; [accesado mayo 18 2017]. <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/15646/martorell.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Monu EA, David JRD, Schmidt M, Davidson PM. 2014. Effect of white mustard essential oil on the growth of foodborne pathogens and spoilage microorganisms and the effect of food components on its efficacy. *J Food Prot*; [accesado junio 9 2017]. 77(12):2062–2068. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-257.

Monu EA, Techathuvanan C, Wallis A, Critzer FJ, Davidson PM. 2016. Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. *Food Control*; [accesado mayo 14 2017] 2017. 65:73–77. doi:10.1016/j.foodcont.2016.01.018.

Orbera T. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. Ciudad de La Habana; [accesado mayo 14 2017]. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662004000300016.

Pitt J HA. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York: Springer. 524 p. ISBN: 978-0-387-92206-5.

Rodríguez E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*; [accesado mayo 14 2017]. 7(1). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46116742014>.

Rosa C, Gábor P. 2006. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin, London: Springer. 579 p. (The yeast handbook).

Sleha R, Mosio P, Vydrzalova M, Jantovska A, Bostikova V, Mazurova J. 2014. In vitro antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*; [accesado junio 1 2017]. 158(2):208–211. eng. doi:10.5507/bp.2012.083.

Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr*; [accesado julio 9 2017]. 55(3):304–318. eng. doi:10.1080/10408398.2011.653458.

Techathuvanan C, Reyes F, David JRD, Davidson PM. 2014. Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *J Food Prot*; [accesado junio 2 2017]. 77(2):269–275. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-288.

Valcourt C, Saulnier P, Umerska A, Zanelli MP, Montagu A, Rossines E, Joly-Guillou ML. 2016. Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. *Int J Pharm*; [accesado junio 9 2017]. 498(1-2):23–31. eng. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.042.

Vardar-Unlu G, Yağmuroğlu A, Unlu M. 2010. Evaluation of in vitro activity of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Nat Prod Res*; [accesado junio 27 2017]. 24(12):1189–1193. eng. doi:10.1080/14786410903565184.

7. ANEXOS

Anexo 1. Resultados del análisis de varianza de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales carvacrol y mostaza blanca (WMEO)

Tratamiento	47.54	<0.0001
Tiempo	0.99	0.4091
Tratamiento * tiempo	1.34	0.2409

Anexo 2. Recuentos de *Candida krusei* (Log UFC/ml) según exposición a diferentes concentraciones de extractos de mostaza blanca (WMEO) y carvacrol en diferentes horas.

Tratamiento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Control	4.73 ± 0.41	5.95 ± 0.31	6.48 ± 0.63	6.46 ± 0.42
WMEO 0.20%	<0.70	<0.70	1.62 ± 1.60	<0.70
WMEO 0.15%	1.41 ± 1.24	0.98 ± 0.48	1.52 ± 0.71	2.9 ± 0.65
Carvacrol 0.02%	2.08 ± 0.43	1.51 ± 1.41	<0.70	<0.70
Carvacrol 0.01%	2.44 ± 1.52	1.66 ± 1.67	1.44 ± 1.28	2.35 ± 1.91

Anexo 3. Resultados del análisis de varianza de la determinación de la interacción de los aceites esenciales

Tratamiento	34.77	<0.0001
Tiempo	27.26	<0.0001
Tratamiento * tiempo	4.75	<0.0001