



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

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

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ANDREA FLORES MEZA

ASESORAS:

Dra. Ma. Andrea Trejo Márquez

M. en C. Selene Pascual Bustamante

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Aplicación de extractos naturales de eucalipto y orégano como antifúngicos en el desarrollo de un envase activo para productos vegetales.

Que presenta la pasante: **Andrea Flores Meza**

Con número de cuenta: **410084513** para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Febrero de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*

Este trabajo fue financiado
por el proyecto PAPIIT:
**Desarrollo de envases
activos para la
conservación de productos
frescos y mínimamente
procesados (IT201513)**, de
la Dirección General de
Asuntos del Personal
Académico de la UNAM

A mis asombrosos padres, Marino y Dolores.

Agradezco...

*A mis padres, **Dolores y Marino**, por enseñarme a amar mi esencia, por apoyarme en cada paso que use en el camino que yo elegí, además de darme la oportunidad de estar en esta espontánea, no convencional aventura de cursar mi vida universitaria lejos de casa. A ti mamá, que me has enseñado mucho, y lo que soy es gracias a ti y a mis torpezas. A ti papá, que me enseñaste a seguir mis latidos sobre mis propios pies, para estar y sonreír desde el alma a quien afortunadamente tenga en los ojos. Gracias por ser.*

Gracias a mis hermanos, **Isaac y Marcos**, los ~~golpearé~~ quiero. A mi tía **Martha**, quien destila una locura innata, tía May, gracias por apoyarme en todo. A mi tía **Gloria** y mis primos **Julieta y Gilberto**, que siempre están ahí para compartir historias y hacer historia juntos.

A **Oscar Sin Acento**, créeme, no estaría aquí si no fuera por ti. Gracias mejor amigo, te llevo en mi ~~frío~~ corazón.

A **Doña Glo** y **Don Charlie Brown**, quienes fueron mis segundos padres. Gracias por todo el apoyo y los regañíos durante mi vida universitaria, gracias a ustedes caminé por caminos desconocidos con ese apoyo extra.

A **Aidee Nájera**, con quien descubrí que la magia en tiempos de guerra, existe. Y que la guerra en tiempos de amor, también. A **Saddam**, gracias por apoyarme cuando pensé que nunca terminaría esta ~~equivocación~~ tesis, los quiero chicos.

A **Vero Trejo** y **Ale Armijos**, las más locas en toda mi vida. Fue una fortuna que esos momentos que compartimos nos encontraran rodeados de amigos. Gracias por gastarse mi ~~dinero~~ risa con los chicos grandes cuando olvidaban su IFE, las quiero. A **Mariana López**, por estar siempre ahí para celebrar la vida. Gracias a tu mamá, a tu papá, a tu hermana y a tu abuelita que me hicieron sentir como en casa estando lejos.

A **Karla**, con quien compartí toda una vida de enseñanzas en psicología. Gracias Karla por estar en los momentos difíciles y escuchar una canción que siempre se repetía. A **Janeli Solís**, quien siempre me ~~regaña~~ anima, tú eres la culpable de terminar los reportes de LEM a tiempo. Gracias Janeli por estar siempre apoyando el buen funcionamiento de todo un equipo con tu liderazgo único.

A **Gabriela Hermosillo, Mia Lazcano, Jessica Duran, Andrea Tiare, Michelle, Mony Canales, Ivonne Torres, Pablo Alcántara, Priz Escamilla, Fanny Vega, Omar Díaz, Alina Kuri, Brian Campuzano, Sebastián Contreras, Rozze, Manelly, Luis con L, Misraín Salez, Sandra Tobon y Hugo Ugarte**, quienes me ~~sensacionaron~~ enseñaron mucho con todo ese tiempo que compartimos. Gracias chicos.

A los chicos de la generación 35, quienes me recibieron en su grupo sin preguntar quién era, gracias a **Rocío, Sam, Chucho, Walter, Carlitos, Yatziri, Eerika y Julián**, por esa única experiencia en Monterrey, los quiero muchachos.

A **Angie Tovar, Gaby H., Lilian, Steph, Alex** y a todo el equipo de Farmacia 04 por la oportunidad de formar parte de esa gran familia, esos partidos jugados nos unieron con un solo objetivo, ~~no perder~~ ~~por tanto~~ ganar.

A la máxima casa de estudios que es la **UNAM**, por abrirme las puertas de la Facultad para formar parte de esta familia. A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, por darme las herramientas para desempeñar mi deber con la sociedad.

A todos y cada uno de los académicos de la carrera de Ingeniería en Alimentos por haber compartido su tiempo, sus conocimientos y sus experiencias con nosotros, ayudándonos así a desempeñar esta profesión. En especial a aquellos que me inspiraron a ~~ravarse el coche~~ seguir adelante. Hoy tenemos en la mente aquello que trascenderá, no solo en la carrera de Ingeniería en Alimentos, sino hasta el final de nuestros latidos, mientras lo sigamos compartiendo. A **Laura Cortázar Figueroa, Olivia Noguez, Antonio Trejo, Edgar Arechavaleta, Norma Casas, Edith Fuentes, Saturnino Maya, Juan Manuel Aceves, Julieta González, Omar Reyes**, gracias por cada palabra.

Dra. **Andrea Trejo**, gracias por darme la oportunidad de hacer esta tesis, gracias por ser mi asesora y por haber tenido toda la paciencia del mundo hasta el día que escribí estos agradecimientos. Pero ante todo, gracias por permitirme desarrollar este proyecto en el taller de frutos para conseguir mi título de Ingeniera.

Gracias a M. en C. **Selene Pascual**, por darme siempre ~~golpes~~ impulsos cuando los necesitaba, gracias a ti terminé esta tesis y a todos esos mensajes de presión durante la madrugada, sin tu apoyo este proyecto de tesis no tendría la calidad con la que hoy cuenta, ni las hojas ~~bien resumidas~~ como las tiene. Gracias por estar siempre conmigo. Dra. **Adela Lira**, gracias por haber sido mi profesora del taller y compartir tus vivencias, experiencias y conocimientos.

Estos párrafos son la mejor forma de dar gracias por todo lo que me han dado, pero tratar de dar gracias es imposible porque nunca podré compensar lo que de ustedes he recibido.

Andrea Flores Meza

“Por mi raza hablará mi espíritu”

Por la diversidad de las criaturas que forman este singular universo,
por la razón, que no cesará de soñar con un plano del laberinto.
“Otro poema de los dones”.

Jorge Luis Borges.

“Nuestras virtudes y nuestros defectos son inseparables, como la fuerza y la materia. Cuando
se separan, el hombre no existe”.

Nikola Tesla.

“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela”.

Albert Einstein.

Words are, in my not-so-humble opinion, our most inexhaustible source of magic.

“Harry Potter and the Deathly Hallows”.

J.K. Rowling.

Ah, music, he said, wiping his eyes. A magic beyond all we do here!

“Harry Potter and the Sorcerer's Stone”.

J.K. Rowling.

“Si A es el éxito en la vida, entonces $A = X + Y + Z$.

Donde X es trabajo, Y es placer y Z es mantener la boca cerrada”.

Albert Einstein.

Debes disfrutar de los pequeños desvíos, disfrútalos mucho; porque de ese modo,
encontrarás aquello que es más importante que lo que querías.

Gin Freecss.

“¿A vos no te pasa que te despertás a veces con la exacta conciencia de que en ese
momento empieza una increíble equivocación?”.

Julio Cortázar.

ÍNDICE

Índice de tablas	iv
Índice de figuras	v
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Envasado de alimentos	5
2.2. Nuevas tecnologías de envasado en alimentos	6
2.3. Envases activos	7
2.4. Legislación de envases activos	8
2.5. Tipos de envases activos	9
2.5.1. Sistemas de envases activos	9
2.5.1.1. Sistemas absorbedores	9
2.5.1.2. Sistemas liberadores	11
2.6. Envases activos con agentes que inhiben el crecimiento de hongos de gran importancia económica	12
2.6.1. Hongos de alta importancia económica	12
2.6.1.1. Botrytis	12
2.6.1.2. Colletotrichum	13
2.6.1.3. Fusarium	13
2.6.2. Agentes antimicrobianos naturales	16
2.6.3. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales	18
2.6.4. Efecto antimicrobiano de vapores de aceites esenciales	21
2.6.5. Generación de vapores	21
2.6.6. Actividad antimicrobiana en fase vapor	22
2.7. Orégano, eucalipto como agentes antimicrobianos	22
2.7.1. Orégano	23
2.7.1.1. Clasificación botánica y sinónimos	23
2.7.1.2. Descripción botánica	24

2.7.1.3.	Composición química	24
2.7.1.4.	Actividad antimicrobiana timol y carvacrol	25
2.7.2.	Eucalipto	26
2.7.2.1.	Clasificación botánica y sinónimos	26
2.7.2.2.	Descripción botánica	26
2.7.2.3.	Composición química	27
2.8.	Modo de acción antibacteriana de aceites esenciales	28
3.	OBJETIVOS	30
3.1.	Objetivo general	30
3.2.	Objetivos particulares	30
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1.	Desarrollo de las pruebas <i>in-vitro</i> en hongos	35
4.2.	Desarrollo de matriz polimérica	36
4.3.	Desarrollo de pruebas <i>in-vitro</i> utilizando la matriz polimérica	37
4.4.	Cinética de degradación de compuestos volátiles en el aceite esencial y el prototipo de envase activo	37
4.5.	Métodos analíticos	38
4.5.1.	Cuantificación de fenoles totales	38
4.6.	Análisis estadísticos	38
5.	RESULTADOS	39
5.1.	Efecto antifúngico de los extractos etanólicos de orégano, gobernadora, eucalipto y los aceites esenciales de orégano y eucalipto por medio de pruebas <i>in-vitro</i> .	39
5.1.1.	Pruebas <i>in-vitro</i> utilizando extractos etanólicos etanólicos para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> .	39
5.1.2.	Pruebas <i>in-vitro</i> utilizando aceites esenciales para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> .	45
5.1.3.	Pruebas <i>in-vitro</i> utilizando extractos etanólicos etanólicos para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de <i>Colletotrichum sp.</i>	48
5.1.4.	Pruebas <i>in-vitro</i> utilizando aceites esenciales para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de <i>Colletotrichum sp.</i>	52

5.1.5. Pruebas <i>in-vitro</i> utilizando extractos etanólicos para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i>	55
5.1.6. Pruebas <i>in-vitro</i> utilizando aceites esenciales para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de <i>Fusarium sp.</i>	60
5.2. Realizar pruebas <i>in-vitro</i> utilizando matrices poliméricas con los extractos naturales que presentaron la mayor actividad antifúngica en pruebas <i>in-vitro</i> que permitan establecer el control de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium sp.</i> y <i>Colletotrichum sp.</i>	63
5.3. Cinética de degradación de los compuestos bioactivos de extractos naturales.	66
6. CONCLUSIONES	69
7. RECOMENDACIONES	70
8. REFERENCIAS	71
9. ANEXO	80

Índice de tablas

Tabla 1. Sistemas de envasado activo de absorbedores con tipos de materiales, principios de funcionamiento y aplicaciones.	10
Tabla 2. Tipos y características de sistemas de envasado activo liberadores de compuestos	11
Tabla 3. Ejemplos de agentes antimicrobianos con uso potencial en los materiales de envasado de alimentos.	15
Tabla 4. Nombres comerciales y fabricantes de materiales antimicrobianos comerciales	16
Tabla 5. Componentes volátiles de acuerdo al grupo funcional mayoritario del aceite esencial.	18
Tabla 6. Componentes mayoritarios de aceites esenciales que exhiben propiedades antibacterianas	19
Tabla 7. Componentes mayoritarios de aceite esencial de <i>E. globulus</i>	27
Tabla 8. Concentraciones utilizadas de extracto etanólico contra cada uno de los hongos estudiados	36
Tabla 9. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de los extractos de orégano y eucalipto en presencia de <i>B. cinerea</i> a diferentes concentraciones	43
Tabla 10. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de extracto de gobernadora en presencia de <i>B. cinerea</i> a diferentes concentraciones	44
Tabla 11. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de aceite de orégano y eucalipto en presencia de <i>B. cinerea</i> a diferentes concentraciones	47
Tabla 12. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de los extractos de orégano y eucalipto en presencia de <i>Colletotrichum sp.</i> a diferentes concentraciones.....	50
Tabla 13. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de extracto de gobernadora en presencia de <i>Colletotrichum sp.</i> a diferentes concentraciones.....	51
Tabla 14. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de aceite de orégano y eucalipto en presencia de <i>Colletotrichum sp.</i> a diferentes concentraciones.....	54
Tabla 15. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de los extractos de orégano y eucalipto en presencia de <i>Fusarium sp.</i> a diferentes concentraciones.....	58
. Tabla 16. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de extracto de gobernadora en presencia de <i>Fusarium sp.</i> a diferentes concentraciones.....	59
Tabla 17. Seguimiento fotográfico de pruebas <i>in-vitro</i> de aceite de orégano y eucalipto en presencia de <i>Fusarium sp.</i> a diferentes concentraciones.....	62
Tabla 18. Seguimiento fotográfico del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en presencia de aceite de orégano (A) y eucalipto (B) encapsulados en la matriz polimérica	65
Tabla 19. Seguimiento fotográfico del crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> en presencia de aceite de orégano (A) y eucalipto (B) encapsulados en la matriz polimérica	65
Tabla 20. Seguimiento fotográfico del crecimiento de <i>Colletotrichum sp.</i> en presencia de aceite de orégano (A) y eucalipto (B) encapsulados en la matriz polimérica	66

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de función de envases.....	7
Figura 2. Estructura química de algunos componentes mayoritarios de los aceites esenciales.....	19
Figura 3. Orégano.....	24
Figura 4. Eucalipto (eucaliptus).....	27
Figura 5. Ubicaciones y mecanismos en la célula bacteriana que se cree que son los sitios de acción de los componentes de los aceites esenciales. Fuente: Burt (2004).....	28
Figura 6. Plantas utilizadas: A) Eucalipto, B) Orégano, C) Gobernadora.	32
Figura 7. Diagrama de proceso para obtener los extractos etanólicos.	33
Figura 8. Diagrama para obtener los aceites esenciales.....	34
Figura 9. Disposición de la caja Petri en la técnica de volatilización de disco	35
Figura 10. Gelificación de esferas en solución de cloruro de calcio.	37
Figura 11. Disposición de la caja Petri en pruebas <i>in-vitro</i>	37
Figura 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Botrytis cinerea</i> en presencia de los extractos etanólicos de A) orégano, B) eucalipto y C) gobernadora, a diferentes concentraciones durante 10 días.....	40
Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Botrytis cinerea</i> en presencia de aceites esenciales de A) orégano y B) eucalipto, a diferentes concentraciones durante 10 días.	45
Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Colletotrichum sp.</i> en presencia de los extractos etanólico de A) Orégano, B) Eucalipto y C) Gobernadora, a diferentes concentraciones durante 10 días.....	48
Figura 15, Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum sp.</i> en presencia de aceites esenciales de A) Orégano y B) Eucalipto, a diferentes concentraciones durante 10 días.	52
Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Fusarium sp.</i> en presencia de los extractos etanólicos de A) orégano, B) eucalipto y C) gobernadora, a diferentes concentraciones durante 10 días.....	55
Figura 17. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Fusarium sp.</i> en presencia de aceites esenciales de A) Orégano y B) Eucalipto, a diferentes concentraciones durante 10 días.	60

Figura 18. Porcentaje de inhibición mostrada por el aceite esencial de orégano y eucalipto contra <i>Fusarium sp.</i> (A), <i>Colletotrichum sp.</i> (B) y <i>B. cinerea</i> (C), durante 10 días de estudio.....	63
Figura 19. 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.....	67
Figura 20. Cromatograma de terpenos presentes en el aceite esencial de orégano utilizados como estándares.....	80
Figura 21. Seguimiento de terpenos de aceite esencial de orégano (AEO) durante los días 1 (A), 5 (B) y 10 (C), cada uno con sus respectivas replicas.	81
Figura 22. Seguimiento de terpenos de aceite esencial de orégano encapsulado en la matriz polimérica (MP) durante los días 1 (A), 5 (B) y 10 (C).	82

RESUMEN

El orégano es una de las plantas con las que cuenta el territorio mexicano y se conoce su uso desde tiempos ancestrales como planta medicinal y como condimento de platillos regionales. El eucalipto, por otra parte, es un árbol ampliamente propagado en territorio nacional, con usos en la industria farmacéutica, principalmente. Finalmente, la gobernadora es una planta originaria de las zonas semidesérticas de México y, al igual que las dos plantas anteriores, ha sido utilizada por la población por sus propiedades benéficas para la salud. La importancia del orégano, eucalipto y gobernadora dio pie a la elaboración de este trabajo, que tiene como objetivo desarrollar un envase activo que permita la liberación controlada de agentes antifúngicos contenidos en los extractos naturales para el control de hongos causantes de enfermedades en frutos y hortalizas durante su almacenamiento.

El eucalipto (*Eucalyptus*) y la gobernadora (*Larrea tridentata*) utilizados en este estudio se adquirieron en el mercado del Carmen en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. En cuanto al orégano, se utilizó orégano mexicano (*Lippia graveolens*) adquirido en la Central de Abastos de Atizapán.

Para determinar el efecto antifúngico de las plantas de estudio se realizaron pruebas *in-vitro* con extractos etanólicos de orégano, eucalipto y gobernadora, obtenidos a partir de una extracción con ultrasonido asistido, empleando las concentraciones de 2000, 3000, 4000 ppm, además se utilizaron aceites esenciales de orégano y eucalipto, los cuales se obtuvieron por hidrodestilación, utilizando las concentraciones de 2000, 4000, 6000 ppm. Las pruebas *in-vitro* se llevaron a cabo evaluando el crecimiento micelial de los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* A partir de los resultados obtenidos de las pruebas *in-vitro* se procedió a seleccionar los extractos vegetales y la concentración que se emplearía para el desarrollo de un prototipo de envase activo, empleando una matriz polimérica (gelana/alginato) como vehículo.

Los extractos vegetales tuvieron efecto antifúngico sobre los hongos propuestos, observándose que los aceites esenciales de orégano y eucalipto inhibieron con mayor efectividad el crecimiento micelial de los hongos. El aceite esencial de orégano inhibió el 100% de crecimiento micelial de *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*, a una concentración de 2000ppm, mientras que en *Botrytis cinerea* todas las concentraciones utilizadas (2000 y 4000 ppm) alcanzaron una inhibición de 91%, ya que los resultados no presentaron diferencias significativas, se seleccionó la concentración más baja, 2000 ppm. El aceite de eucalipto a 4000 ppm inhibió el 100% de crecimiento micelial en *Botrytis cinerea*, a una

concentración de 6000 ppm se inhibió el 96% en *Fusarium sp.* y 95% en *Colletotrichum sp.*, por lo tanto se utilizaron estas concentraciones para el desarrollo del prototipo de envase activo.

Al prototipo de envase activo se le realizaron nuevamente pruebas *in-vitro*, los extractos naturales utilizados fueron, aceite esencial de orégano y eucalipto, evaluando la liberación de los compuestos fenólicos responsables de la inhibición del crecimiento fúngico durante 10 días sobre los mismos hongos patógenos. Los resultados mostraron al aceite esencial de orégano encapsulado en esta matriz polimérica como el máximo inhibidor de los tres hongos, inhibiendo al 100% a *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.*

Para determinar la liberación de los compuestos fenólicos presentes en la matriz polimérica, se realizó una cinética de degradación, con la que se estableció el tiempo aproximado de efectividad del prototipo de envase. De acuerdo a los resultados de la cinética de degradación, la matriz polimérica presenta una menor liberación de compuestos fenólicos durante los primeros días del estudio, dando como resultado una liberación controlada, manteniendo activos por más tiempo estos compuestos y reduciendo el crecimiento de los hongos de manera constante durante todo el estudio.

Se concluyó que el aceite esencial de orégano es la mejor opción para el desarrollo de un envase activo utilizando la matriz polimérica de gelatina/alginato.

1. INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria, el deterioro de los productos alimenticios, incluido el que es por microorganismos, es una importante preocupación (Padgett *et al.*, 1998). 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 y Vicini, 2002). Estos microorganismos pueden ser bacterias, levaduras y mohos resultando una calidad degradada, vida útil acortada y cambios en la microflora que pueden inducir a problemas con patógenos, provocando problemas de seguridad alimentaria y grandes enfermedades transmitidas por los alimentos (Rupika, 2010). 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.

La tecnología de envases activos, puede proporcionar productos alimenticios seguros, extendiendo su vida útil (Vermeiren *et al.*, 2002). El término envase 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 productos (Camo y Roncales, 2008). Las funciones activas pueden incluir la compactación de oxígeno, la humedad o etileno, emisión de etanol y sabores y actividad antimicrobiana (Quintavalla y Vicini, 2002).

El envasado antimicrobiano de alimentos actúa para reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos que pueden estar presentes en el alimento envasado o material de embalaje en sí (Appendini y Hotchkiss, 2002). Los agentes antimicrobianos (principalmente sintéticos) son comúnmente incorporados directamente en la comida. Sin embargo, en los últimos años, los agentes antimicrobianos naturales han atraído mucho la atención en las industrias de alimentos y envasado como un reemplazo para los sintéticos en la conservación de alimentos (Kuorwel *et al.*, 2011).

Especias y extractos a base de hierbas se sabe que contienen una amplia gama de compuestos capaces de exhibir actividad antimicrobiana. Estos compuestos se producen como metabolitos secundarios asociados con el aceite esencial, fracción volátil de estas plantas, y forman parte de mezclas variables, principalmente terpenoides y una variedad de ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes (Meyer *et al.*, 2002).

El orégano es una hierba culinaria popular que contiene aceite esencial que está altamente enriquecidos con terpenoides, particularmente fenoles monoterpenoides (carvacrol), que se ha reportado que poseen numerosas propiedades funcionales. Atribuido

a las propiedades y a los componentes de los aceites esenciales, el orégano además de proporcionar sabor y capacidades conservantes a los alimentos también demuestra beneficios potenciales para la salud, actividad antioxidante y efectos antimicrobianos (Kuorwel *et al.*, 2011). Sin embargo, la evidencia científica sobre los efectos conservadores del orégano se documentó recientemente, en donde se informó que se trata de uno de los mejores candidatos de amplio espectro para la inhibición de patógenos transmitidos por los alimentos y los organismos de descomposición (Suhr y Nielsen 2003).

El eucalipto por otra parte es un árbol alto de hoja perenne, nativo de Australia pertenece al género de la familia *Myrtaceae*, Algunos aceites esenciales de eucalipto se utilizan con fines medicinales y farmacéuticos y algunos extractos presentan diversos efectos biológicos, tales como antibacterianos, antifúngicos y actividades antioxidantes, especialmente *E. citriodora* que se ha demostrado tener un amplio espectro de actividad antifúngica (Tyagi y Malik, 2011).

Los aceites esenciales en fase líquida tienen una alta eficiencia contra microorganismos causantes del deterioro de alimentos, pero este efecto sólo se logra con mayor concentración de aceites esenciales. Este hecho puede implicar un impacto organoléptico, causada por alterar el sabor natural de los alimentos por la superación de los umbrales de sabor aceptables. Para reducir el efecto sensorial, uno de los enfoques alternativos puede ser el uso de aceite esencial en la fase de vapor. El aceite esencial en fase de vapor puede ser muy eficaz contra los patógenos transmitidos por los alimentos y bacterias de descomposición a concentraciones relativamente bajas que la fase líquida, lo que provoca un efecto mínimo sobre las propiedades organolépticas (Tyagi y Malik, 2011). Por lo tanto, la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de plantas en fase vapor abriría una dimensión nueva con inmensas aplicaciones potenciales en alimentos.

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 combina propiedades de barrera con la función activa, lo que extiende la vida útil y reduce el riesgo de patógenos transmitidos por los alimentos. Por lo que el objetivo del trabajo fue desarrollar un envase activo que permita la liberación controlada de los agentes antifúngicos contenidos en extractos naturales para el control de hongos causantes de enfermedades en frutos y hortalizas durante su almacenamiento.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1. Envasado de alimentos

El envasado se ha convertido en un elemento esencial en las sociedades desarrolladas actuales (López-Rubio *et al.*, 2004), en México se estima que el 55% de la demanda de envases corresponde al sector de alimentos y bebidas, de acuerdo con la AMEE (Asociación Mexicana de Envase y Embalaje). El valor de la producción de la industria del envase y embalaje ascendió a 12 mil 773. 3 millones de dólares en 2012, lo que significa un aumento del 15% con relación a 2011 (Arenaza, 2013). En particular, el envasado de alimentos ha experimentado una extraordinaria expansión, porque los alimentos que más se comercializan, incluyendo frutas y verduras frescas, se comercializan ya envasados (López-Rubio *et al.*, 2004).

El envase es todo producto fabricado con materiales de cualquier naturaleza y que se utilice para contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercancías, desde materias primas hasta artículos acabados, en cualquier fase de la cadena de fabricación, distribución y consumo, se le conoce también como empaque primario, el cual facilita la distribución y almacenamiento de alimentos, satisfaciendo las necesidades del consumidor para su conveniencia y seguridad. Las funciones primordiales del envase son (Brown, 1992, Coles *et al.*, 2004):

- **Contiene:** el envase, principalmente contiene el producto. Dependiendo de los productos, los envases tendrán tamaños y formas diferentes.
- **Protección:** el envase protege el producto y evita que sufra daños mecánicos durante su almacenamiento, distribución, etc.
- **Conservación:** el envase inhibe o evita los cambios químicos, bioquímicos o microbiológicos.
- **Conveniencia:** los envases ayudan a manejar mejor los productos.
- **Presentación:** los envases se pueden presentar en diferentes colores, formas, etc., muy atractivos.
- **Publicidad de marca:** en el envase se pueden poner anagramas, colores, ilustraciones, símbolos, etc. Típicos de una marca que ayudan a identificarla.
- **Promoción:** para aumentar las ventas, se puede regalar un producto por “tantos” comprados, se puede promocionar un producto nuevo, se puede hacer un descuento, dar más producto por el mismo precio, etc.

- Economía: con el envasado se aumenta la eficacia en la distribución, producción y almacenamiento.
- Responsabilidad ambiental: hay que fabricar, utilizar, reciclar y/o eliminar los envases de la mejor forma posible para preservar el medio ambiente.

El mundo del envasado está en constante cambio con la introducción de nuevos envases, tecnológicas y procesos. De esta forma se trata de mejorar la calidad del producto, la productividad, el medio ambiente y los beneficios de las empresas. Los materiales comúnmente utilizados en el envasado de alimentos son vidrio, hojalata, aluminio, papel, cartón y plásticos (Coles *et al.*, 2004).

2.2. Nuevas tecnologías de envasado en alimentos

Tradicionalmente, los envases de alimentos se han definido como barreras pasivas para retrasar los efectos adversos del ambiente sobre el producto contenido. Sin embargo, las tendencias actuales incluyen el desarrollo de materiales de embalaje, que interactúan con el medio ambiente y con la comida, y juegan un papel activo en la preservación (López-Rubio *et al.*, 2004).

El envasado de alimentos es muy diferente de los envases de productos duraderos debido a la naturaleza perecedera y heterogénea de los alimentos. Además, los aspectos de seguridad deben tenerse en cuenta, ya que la mayoría de los alimentos tienen una vida útil relativamente corta (Rupika, 2010). Durante las últimas décadas se ha producido un gran desarrollo tecnológico en el envasado de los alimentos para intentar satisfacer las demandas de los consumidores en cuando a métodos más naturales de conservación y a formas de control de envaso y almacenamiento para asegurar la calidad y seguridad de alimentos (Fernández, 2000). Además, los cambios en las prácticas comerciales, como la globalización de los mercados, dando como resultado distancias de distribución más largos (López-Rubio *et al.*, 2004), o el modo de vida de los consumidores (lo que resulta menos tiempo en la compra de alimentos frescos en el mercado y la cocina), esto presenta grandes retos de la industria de envasado de alimentos y actúa como motor para el desarrollo de nuevas y mejoras conceptos de envase que extiendan la vida útil, manteniendo el control de la seguridad y calidad de los alimentos (Dainelli *et al.*, 2008).

Los envases activos y envases inteligentes son las principales áreas en donde la mayor parte de las ideas innovadoras recientes se han aplicado para satisfacer las necesidades de ampliar y redefinir la función del envasado de alimentos (Lee *et al.*, 2008).

Los envases inteligentes están por encima de la función comunicación en el modelo que se propone en la Figura 1, proveen de mayor comunicación y los envases activos proveen de protección reforzada. Por lo tanto, en el sistema total de envases, el envase inteligente tiene un componente responsable de detectar el medio ambiente y transformar esa información, y envase activo tiene el componente responsable para tomar alguna acción para proteger el producto alimenticio (Lee *et al.*, 2008). Con estas técnicas se pretende que el envase desempeñe alguna otra función, además de constituir una simple barrera física en el producto y su entorno, aprovechando la posible interacción entre el envase y el alimento en beneficio de la mejora de su calidad y aceptabilidad (Fernández, 2000).



Figura 1. Modelo de función de envases.

Fuente: Lee *et al.* (2008).

2.3. Envases activos

Un envase activo es un concepto innovador que ha sido introducido como respuesta a los continuos cambios actuales, la demanda del consumidor y las tendencias del mercado (Quintavalla y Vicini, 2002). Se han definido como un modo de envase, en el cual éste, el producto y el ambiente interactúan para prolongar la vida de anaquel y aumenta la seguridad y las propiedades sensoriales, mientras mantiene la calidad del producto (Suppakul *et al.*, 2003). El termino envase activo hace referencia a la incorporación de ciertos aditivos al material de envase o en el envase (Coles *et al.*, 2004), sin agregar directamente agentes activos en el producto (Camo y Roncales, 2008). La adición directa de conservadores o aditivos sobre el alimento tiene un serie de inconvenientes, tales como,

una concentración inicial elevada de este aditivo, una rápida pérdida de actividad, la posibilidad de que dicha sustancia tenga un efecto contrario al deseado (Quintavalla y Vicini, 2002) y las propiedades del aditivo sean neutralizadas en reacciones y/o interacciones con el complejo sistema alimenticio. Además el aditivo adicionado directamente no puede actuar selectivamente en la superficie del alimento donde las reacciones de deterioro ocurren frecuentemente. El envase activo es un método alternativo para evitar estas limitaciones mediante liberación controlada del compuesto activo a una velocidad apropiada (Gemili y Altunkana, 2009). Si un agente activo se puede liberar del envase durante cierto periodo, la actividad también puede extenderse durante el transporte, almacenamiento y distribución del alimento (Quintavalla y Vicini, 2002).

2.4. Legislación de envases activos

Es evidente que las investigaciones acerca del desarrollo de mejores materiales se concentran en el desarrollo de materiales inteligentes y activos, por otro lado también se está investigando la mejor manera de producirlo a bajo costo y de manera generalizada para que su aplicación en el mercado llegue a corto plazo. Este desarrollo de materiales inteligentes es una realidad, sin embargo solo se pueden encontrar en el mercado en algunos países de Europa, en Japón y en Estados Unidos (Hispack, 2012).

Las normas que emite la Comunidad Europea se encuentran a la vanguardia, como resultado de la necesidad de generar estándares que regulen el desarrollo de nuevos materiales y métodos de envasado que demanda los nuevos productos de envase, ya que son las únicas que contemplan en sus lineamientos aspectos como envases activos e inteligentes, materiales compostables, etiquetados que brinden información adecuada, así como los lineamientos para los materiales que tienen contacto con los productos alimenticios (Rubio, 2013).

Marco regulatorio (Elika, 2012).

- Reglamento (CE) 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, contempla por primera vez, los envases activos e inteligentes.
- Reglamento (CE) 450/2009 de la Comisión sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Reglamento (UE) 10/2011 de la Comisión sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos.

2.5. Tipos de envases activos

En el envase activo, el componente activo del envase puede ser parte del material de envasado o algún material ajeno incluido en él. De este modo podemos hablar de varias posibilidades (Fernández, 2000).

El método “clásico”, es el más desarrollado hasta el momento, pues se utilizan sobres o bolsitas que contienen el producto activo y se introducen en el interior del envase. Estos sobres deben estar constituidos de un material permeable para permitir la actividad del compuesto activo pero a su vez deben impedir el contacto del mismo con el alimento. Deben, además, ser muy resistentes para evitar roturas y tienen que ir convenientemente etiquetados para evitar accidentes por ingestión de su contenido (Fernández, 2000). Tres formas de envasado activo han predominado con este método, los absorbedores de oxígeno, absorbedores de humedad y los generadores de vapor de etanol. Usados principalmente en aplicaciones de envase para panadería, pastas, carnes y aves (Rupika, 2010).

En otros casos, los compuestos activos se incorporan a las películas de envases, o se utiliza un revestimiento con el aditivo en la superficie de la película de envasado. Recubrimientos en forma de ceras comestibles, envolturas y cubiertas que contienen los aditivos, aplicados sobre la superficie interior del material de envasado (Rupika, 2010). Esta técnica tiene la ventaja de que el componente está en contacto con el producto en toda la superficie y no, como en el caso de los sobres, con un área restringida (Fernández, 2000).

2.5.1. Sistemas de envases activos

Los sistemas activos se pueden clasificar en absorbedores y emisores. Los absorbedores eliminan sustancias no deseadas como oxígeno, exceso de agua, etileno, dióxido de carbono, olores, sabores y otros componentes específicos de los alimentos. Los emisores aportan activamente al alimento envasado sustancias como dióxido de carbono, agua, antioxidantes o conservadores (AIMPLAS, 2014).

2.5.1.1. *Sistemas absorbedores*

Algunos componentes presentes en el espacio cabeza en los alimentos como el oxígeno, humedad y etileno, a menudo causan reacciones indeseables o dan cambios desagradables en la calidad de los alimentos. Estos componentes pueden existir desde que se empaca el alimento en la producción, puede ser producido por actividades fisiológicas del alimento o penetrar al envase. La respuesta activa de los dispositivos es remover estos

componentes para poder mejorar la estabilidad del almacenamiento de los alimentos y del envase (Lee *et al.*, 2008). En la Tabla 1, se muestran los sistemas de envasado activo de absorbentes con tipos de materiales, sus principios de funcionamiento y aplicaciones.

Tabla 1. Sistemas de envasado activo de absorbedores con tipos de materiales, principios de funcionamiento y aplicaciones.

Tipo de función activa	Material	Principio de funcionamiento	Efecto deseado y aplicaciones
<p>Absorbedor de oxígeno</p> 	<p>Fierro reducido; ácido ascórbico; sulfato; oxidasas</p>	<p>Reacción de oxidación de Fe, ácido ascórbico, sulfatos; catálisis enzimática de oxidación de glucosa o etanol</p>	<p>Reducción o prevención de crecimiento microbiano aerobio en panadería; prevención y reducción del deterioro de la calidad por oxidación de grasas y productos secos.</p>
<p>Absorbedor de humedad</p> 	<p>Gel de sílice; poliacrilato; CaO; propilenglicol; azúcar; sales inorgánicas</p>	<p>Adsorción de humedad; reacción de hidratación.</p>	<p>Retención de bajo contenido de humedad lo que conduce a una textura crujiente y una mínima pérdida de calidad de los productos secos; la eliminación del exceso de agua que la superficie produce en la carne recién cortada.</p>
<p>Absorbedor de dióxido de carbono</p> 	<p>Ca(OH)₂; Na₂CO₃; zeolita; gel de sílice.</p>	<p>Reacción química con el CO₂; adsorción física</p>	<p>Prevención del abultamiento del envase o combustión causado por el CO₂ proveniente de la fermentación de ácido láctico.</p>
<p>Absorbedor de etileno</p> 	<p>KMnO₄ en oxido de aluminio o gel de sílice; SiO₂; zaolita; carbón activado</p>	<p>Oxidación de etileno a ácido acético y alcohol; adsorción física.</p>	<p>Retarda la madurez y senescencia de productos frescos.</p>

Fuente: Lee *et al.* (2008).

2.5.1.2. Sistemas liberadores

Algunos gases son producidos o liberados dentro del envase causando efectos desagradables en la estructura del envase o en la calidad del alimento. Para un envase liberador de oxígeno, el dióxido de carbono a menudo se produce en proporción a la absorción del oxígeno para prevenir el colapso del envase. Antimicrobianos y antioxidantes son incorporados en el material de envase para ser liberados a velocidad controlada en contacto directo o indirecto con el alimento. El efecto deseado sería mejorar la estabilidad de almacenamiento y extender la vida útil. Varios conceptos y aplicaciones en el sistema de la liberación en el envasado activo se describen a continuación en la Tabla 2 (Lee *et al.*, 2008).

Tabla 2. Tipos y características de sistemas de envasado activo liberadores de compuestos

Tipo de función activa	Material	Principio de funcionamiento	Efecto deseado y aplicaciones
Liberador de dióxido de carbono	FeCO ₃ ; NaHCO ₃ ; Na ₂ CO ₃ ; ácido ascórbico	Reacción de hidrólisis de FeCO ₃ ; reacción de NaHCO ₃ o Na ₂ CO ₃ con ácidos orgánicos; oxidación de ácido ascórbico	Inhibición y reducción del crecimiento de bacterias Gram negativas y mohos en productos preparados; prevención de colapsos en envases
Envases antimicrobianos	Antimicrobianos incorporados o encapsulados en el material de envase; superficie interna del envase	Liberación de agente antimicrobiano sobre la superficie del alimento en contacto; supresión del crecimiento microbiano sin migración; liberación de vapor de etanol en el espacio cabeza de los envases	Inhibición del crecimiento microbiano
Liberador de antioxidantes	Antioxidantes (BHA, BHT, tocoferol) incorporados en los materiales del envase	Liberación de antioxidantes o consumidores de oxígeno	Retardan los cambios oxidativos y protección del polímero

Fuente: Lee *et al.* (2008).

2.6. Envases activos con agentes que inhiben el crecimiento de hongos de gran importancia económica

El deterioro de los productos alimenticios se debe tanto biológica y químicamente. El deterioro biológico de los alimentos se debe a la proliferación de microorganismos que estropean la comida o lo hace no apto para el consumo (Quintavalla y Vicini, 2002). El crecimiento microbiano puede reducir significativamente la seguridad de los alimentos y dañar la calidad. El deterioro microbiano es debido a bacterias, levaduras y mohos resultando una calidad degradada, vida útil acortada y cambios en la microflora que pueden inducir a problemas con patógenos (Rupika, 2010).

2.6.1. Hongos de alta importancia económica

La contaminación de los alimentos por microorganismos patógenos puede provocar graves problemas de seguridad alimentaria y graves enfermedades transmitidas por los alimentos (Rupika, 2010). Además, en la agricultura mundial los hongos patógenos son causantes de enfermedades de pre y pos cosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo éstos responsables de pérdidas económicas cuantiosas; el daño que ocasionan no solo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

Los patógenos más importantes que causan elevadas pérdidas de frutas y hortalizas son normalmente las bacterias y hongos, sin embargo, con mayor frecuencia son especies de hongos las causantes del deterioro patológico de frutas, hojas, tallos y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cormos, etc.). Algunas fuentes estiman que dichas pérdidas son del orden de 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo. Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en una variedad de productos, siendo los más comunes especies de *Alternaria*, ***Botrytis***, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, ***Colletotrichum***, *Phomopsis*, ***Fusarium***, *Rhizopus* y *Mucor* (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

2.6.1.1. *Botrytis*

Botrytis cinerea y otros tipos de *Botrytis* son patógenos importantes en hortalizas, cultivos de huerta almacenados y transportados, plantas de vivero, ornamentales, etc. Un esfuerzo considerable se invierte en la protección de la producción agrícola contra *Botrytis* antes y

después de la cosecha, dando como consecuencia un tamaño de mercado de productos anti-Botrytis de 15-20 millones de dólares en los últimos años (Holz *et al.*, 2008)

Este hongo es uno de los agentes causales común de moho gris en productos agrícolas, la cual se ve particularmente afectada por este hongo que ataca el producto en pre y post-cosecha bajo una amplia gama de condiciones ambientales y sobre una gran área geográfica. La infección, causada durante condiciones posteriores a la cosecha disminuye la vida útil y afecta negativamente el valor del mercado de estos productos (Tripathi *et al.*, 2008).

2.6.1.2. *Colletotrichum*

La “antracnosis”, también conocida como “quema” o “chasparria”, es una enfermedad generalista muy común en las regiones tropicales, de gran importancia en viveros, cultivos agrícolas y plantaciones arbóreas. El género más común de los hongos que causan la antracnosis es *Colletotrichum* (Arguedas-Gamboa y Cots-Ibiza, 2012). El hongo *Colletotrichum* es uno de los géneros patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales (Pérez *et al.*, 2003).

Los hospedantes de este hongo incluyen una gran diversidad de cultivos anuales como leguminosas (frijol, soya, chícharo) gramíneas (maíz y sorgo), solanáceas (tomate chile y papa) cucurbitáceas (melón, sandía y pepino) y rosáceas (fresa). Así mismo se ha reportado un gran número de cultivos perenes como aguacate, plátano, cítricos, café, mango, papaya, pasiflora, guayaba, guanábana, cacao, hule, manzana, durazno y almendro (Núñez, 2012).

Esta enfermedad es una de las enfermedades de mayor importancia en los cultivos y es la responsable de la reducción del 10 al 80% a nivel comercial, afectando el rendimiento y producción de los cultivos, de países en desarrollo, como Tailandia, Pakistán, Turquía y México (Intra *et al.*, 2011).

2.6.1.3. *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su ocurrencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Muchas especies del género *Fusarium* tienen una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas (Arbeláez, 2000).

Las enfermedades de las plantas causadas por especies del género *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y de tallos, pudrición de frutos, granos y semillas (Arbeláez, 2000).

En México, el marchitamiento o secadera es después de la virosis, la enfermedad de mayor importancia. La cual puede ocasionar la pérdida de la cosecha hasta un 100% en las áreas productoras. La presencia de esta enfermedad en nuestro país, ha sido reportada en Sinaloa, San Luis Potosí, Baja California y Michoacán (Castillo, 2011).

Métodos tradicionales de conservación de los alimentos con efecto en el crecimiento microbiano incluyen, tratamientos térmicos, secado, congelación, refrigeración, irradiación, envase en atmósfera modificada y adición de agentes antimicrobianos o sales. Desafortunadamente, algunas de estas técnicas no pueden aplicarse a productos alimenticios como la carne fresca o productos listos para comer (Quintavalla y Vicini, 2002). Y, en el caso de los agentes antimicrobianos (principalmente sintéticos), el método tiene muchas desventajas: i) Los consumidores prefieren los alimentos sin aditivos sintéticos debido a las preocupaciones sobre los efectos secundarios, ii) el deterioro de los alimentos se produce principalmente en la superficie, la incorporación de cantidades relativamente grandes de los agentes en la mayor parte de la comida no se justifica, iii) algunos de los agentes sintéticos poseen un sabor distinto al sabor de los alimentos, y iv) los aditivos sintéticos tienen que ser declarados en el envase (Kuorwel *et al.*, 2011).

Los envases activos antimicrobianos son prometedores principalmente para productos cárnicos y mínimamente procesados, donde la contaminación microbiana ocurre principalmente en la superficie, debido al manejo post-proceso. Este envasado antimicrobiano de alimentos actúa para reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos que pueden estar presentes en el alimento envasado o material de embalaje en sí. Este envase puede tomar varias formas, incluyendo (Appendini y Hotchkiss, 2002):

- i. Adición de bolsitas/almojadillas que contiene el agente antimicrobiano volátil dentro del envase.
- ii. Incorporación de agentes microbianos volátiles y no volátiles directamente en polímeros.
- iii. Revestimiento en la superficie de los polímeros.
- iv. La inmovilización de los antimicrobianos en los polímeros por iones o enlaces covalente.
- v. El uso de polímeros que son inherentemente antimicrobianos.

La Tabla 3 enumera una serie de sustancias que se pueden utilizar en los envases para impartir propiedades antimicrobianas. Tales sustancias se pueden utilizar en las películas, contenedores y utensilios (Suppakul *et al.*, 2003).

Tabla 3. Ejemplos de agentes antimicrobianos con uso potencial en los materiales de envasado de alimentos.

Clase	Ejemplos
Ácido anhídrido	Anhídrido benzoico Anhídrido sórbico
Alcohol	Etanol
Aminas	Hexametilentetramina (HMT)
Compuestos de amonio	Sal de amonio cuaternario de silicona
Antibióticos	Natamicina
Péptidos antimicrobiales	Cecropina Defensina
Antioxidantes fenólicos	Hidroxianisol butilado (BHA) Hidroxitolueno butilado (BHT)
Bacteriocina	Lacticina, Nisina
Quelante	Citrato Conalbúmina
Enzima	Etanol oxidasa Lisozima
Ácido graso	Ácido laúrico Ácido palmitoleico
Ester de ácido graso	Monolaurina (lauricidin®)
Fungicida	Dióxido de sulfuro Benomil
Ácido inorgánico	Ácido fosfórico
Metal	Cobre Plata
Varios	Reuterina
Fenol natural	<i>p</i> -Cresol Hidroquinonas
Oligosacáridos	Quito-oligosacáridos
Ácidos orgánicos	Ácido acético Ácido cítrico
Parabeno	Etil parabeno Metil parabeno
Compuestos de plantas volátiles	Carvacrol Cineol
Polisacáridos	Quitosan Glucomanano Konjac

Fuente: Suppakul *et al.* (2003).

Los materiales antimicrobianos se han conocido durante muchos años. Sin embargo, los envases antimicrobianos han tenido relativamente poco éxito comercial, excepto en Japón (Suppakul *et al.*, 2003). La Tabla 4 resume algunos de los sistemas antimicrobianos comerciales.

Tabla 4. Nombres comerciales y fabricantes de materiales antimicrobianos comerciales

Formato	Nombre comercial	Fabricante
Concentrado	AgION ^{RM} Apacider-A [®] MicroFree ^{RM} Microban [®] Novaron [®] Sanitized [®] Surfacine [®] Ultra-Fresh [®] Zeomic [®]	AgION Technologies LLC (EE. UU) Sangi Co. (Japón) DuPont (EE. UU) Microban Products (EE. UU) Milliken Co. (EE. UU) Sanitized AG / Clariant (Suiza) Surfacine Development Co. (EE.UU) Thonson Research Associates (Canada) Shinanen New Ceramics Co. (Japón)
Extracto	Citrex ^{RM} (Semillas de toronja) Nisaplin [®] (Nisina) Take Guard (Bambú) WasaOuro [®] (Moztaza)	Química Natural Brasileira Ltd. (Brasil) Integrated Ingredients (EE.UU) Takex Co. (Japón) Green Cross Co. (Japón)
Película	MicroGard ^{RM} Piatech	Rhone-Poulenc (EE.UU) Daikoku Kasei Co. (Japón)

Fuente: Suppakul *et al.* (2003)

El interés mostrado en los últimos años en reconocer la importancia de los hongos fitopatógenos y la dificultad para lograr un buen control de los mismos, así como el aumento en la resistencia a los antifúngicos, ha incrementado la investigación de alternativas basadas en productos naturales (Barrera-Necha y García-Barrera, 2008).

2.6.2. Agentes antimicrobianos naturales

En los últimos años, los agentes antimicrobianos naturales han atraído mucho la atención en las industrias de alimentos y envasado como un reemplazo para los sintéticos en la conservación de alimentos (Kuorwel *et al.*, 2011), el creciente interés por el uso de extractos naturales antimicrobianos que puedan sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos, resulta una alternativa prometedora para la prevención y tratamiento de enfermedades producidas por compuestos sintéticos (Acevedo *et al.*, 2013).

Los agentes antimicrobianos naturales se clasifican por sus fuentes en: agentes antimicrobianos liberados por los aceites esenciales de plantas (por ejemplo, la albahaca, el tomillo, el orégano, entre otros); fuentes animales (por ejemplo, la lisozima, lactoferrina); fuentes microbianas (nisina, natamicina), y polímeros de origen natural (quitosano) (Kuorwel *et al.*, 2011).

Hoy en día, alrededor de 3,000 aceites esenciales se han producido mediante el uso de al menos 2,000 especies de plantas, de los cuales 300 son importantes desde el punto de vista comercial. 40,000-60,000 toneladas por año de producción con valor de mercado estimado de 700 millones de dólares, indican que la producción y el consumo de aceites esenciales está aumentando en todo el mundo (Djilani y Dicko, 2012).

El uso de los aceites esenciales en los sistemas tradicionales de la medicina ha sido practicado desde la antigüedad en la historia humana, poseen diversas aplicaciones, principalmente en materia de salud, agricultura, industria cosmética y alimentaria. Los investigadores de todo el mundo están tratando de caracterizar una gama de propiedades biológicas de los aceites esenciales, que incluyen propiedades antimicrobianas, antivirales, antimutagénicas, anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y actividades antiprotozoarios (Bakkali *et al.*, 2008) y la mayoría de ellos están clasificados como GRAS por las siglas en inglés <<Generally Recognized As Safe>> (Lambert *et al.*, 2001). Estos son mezclas complejas de líquidos que presentan alta volatilidad, evaporándose al contacto con el aire (Avecedo *et al.*, 2013) y por lo general poseen olores relativamente fuertes (Kuorwel *et al.*, 2011). Son obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, frutos y raíces (Burt, 2007) y se consideran producto del metabolismo secundario de las plantas al igual que algunos alcaloides, flavonoides, taninos, y saponinas (Avecedo *et al.*, 2013).

La extracción de estos se realiza por métodos convencionales como la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos, aunque actualmente se utiliza la extracción supercrítica con dióxido de carbono como solvente, de acuerdo con las propiedades de este gas, su uso facilita la separación de los productos extraídos (Avecedo *et al.*, 2013). En ambos casos, debe tenerse especial cuidado en su manejo y almacenamiento dado que los aceites esenciales son líquidos viscosos, altamente volátiles y sensibles a altas temperaturas (Reyes-Jurado *et al.*, 2012).

La composición de los aceites esenciales varía de acuerdo a las diferentes partes de la planta de las cuales se extrae (Burt, 2004), y puesto que los compuestos volátiles son los que presentan el efecto antimicrobiano, la determinación de su composición es importante;

para ello, diversos investigadores emplean cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Reyes-Jurado *et al.*, 2012).

2.6.3. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Se ha demostrado que los principales componentes volátiles de estos aceites derivan de un grupo de terpenoides, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos, los cuales a su vez contienen diferentes grupos de hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres y cetonas (Reyes- Jurado *et al.*, 2012), sustancias azufradas y nitrogenadas (Avecedo *et al.*, 2013). Por lo tanto, de acuerdo al grupo químico funcional de cada aceite esencial, se derivan sus componentes principales. En la Tabla 5 se pueden apreciar algunos de los diferentes componentes dependiendo del grupo químico funcional al que pertenecen (Reyes- Jurado *et al.*, 2012).

Tabla 5. Componentes volátiles de acuerdo al grupo funcional mayoritario del aceite esencial.

Grupo químico funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol, eugenol, timol
Aldehídos	Citral, citronela, benzaldehído, perilaldehído, cinamalaldehído
Alcoholes	Borneol, mentol, geraniol, linalol, feniletanol
Alcoholes sesquiterpenos	Ferneol, cedrol
Cetonas	Alcanfor, carvona, α -tujona
Ésteres	Acetato de linalilo, salicilato de metilo, etil acetato, anetol
Ésteres y óxidos	Metil timol, cineol
Hidrocarburos	Careno, β -cariofileno, α -pineno, limoneno

Fuente: Reyes-Jurado (2012).

Se ha reportado que los componentes mayoritarios pueden alcanzar hasta un 85% de la composición total del aceite esencial, por lo tanto se les atribuye el efecto antimicrobiano en gran parte, mientras que los demás pueden estar presentes en trazas (Burt, 2004), lo cual puede observarse en la Tabla 6, así como las fórmulas estructurales de algunos componentes antibacterianos que se presentan en la Figura 2. El valor económico de los aceites esenciales y su aplicación a nivel industrial están directamente relacionados con su composición química y con la actividad biológica (Avecedo *et al.*, 2013).

Tabla 6. Componentes mayoritarios de aceites esenciales que exhiben propiedades antibacterianas

Nombre común del aceite esencial	Componente mayoritario	Composición aproximada (%)
Canela	Trans-cinnamaldeído	65
Orégano	Carvacrol Timol Y-terpineno p-cimeno	80 64 2-52 Trazas-52
Romero	α -pineno 1-8 cineol Alcanfor	2-25 3-89 2-14
Clavo	Eugenol Eugenyl acetato	75-85 8-15
Tomillo	Timol Carvacrol Y-terpineno p-cimeno	10-64 2-11 2-31 10-56

Fuente: Burt (2004)

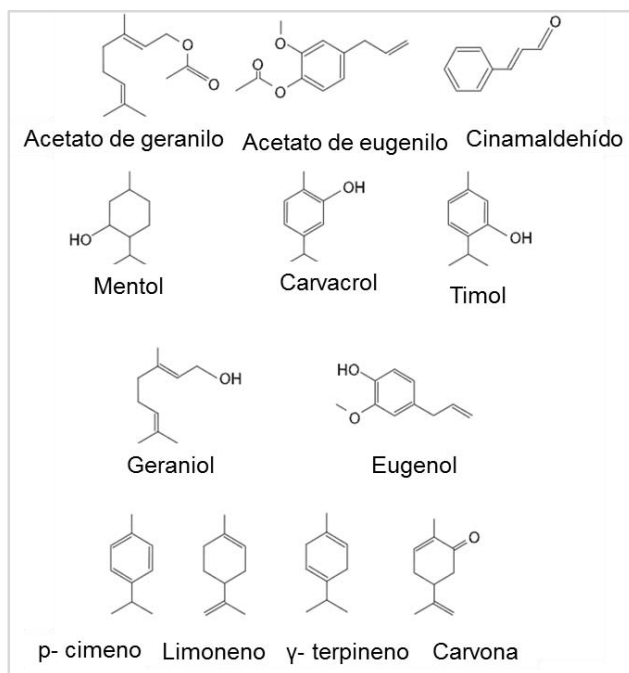


Figura 2. Estructura química de algunos componentes mayoritarios de los aceites esenciales.

Fuente: Burt (2004).

Los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales (Burt, 2004). Sin embargo, hay pruebas de que los aceites esenciales ejercen una eficacia antimicrobiana más fuerte que se puede atribuir a los efectos aditivos de sus principales componentes antimicrobianos (Burt y Reinders, 2003; Friedman *et al.*, 2004.). Por ejemplo, el 96% de la inhibición del crecimiento de *Ps. aeruginosa* se observó con el aceite esencial de orégano, el cual se le puede atribuir al efecto aditivo de timol y carvacrol, con el 4% restante atribuido a los otros componentes (Lambert *et al.*, 2001). Por lo tanto, hay una posibilidad de que los componentes menores poseen algún poder antimicrobiano (Burt y Reinders, 2003; Cosentino *et al.*, 1999; Friedman *et al.*, 2004).

Se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características: su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de organismo que debe atacar (Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2012).

El modo de acción de los aceites esenciales en cuestión a su carácter (hidrófilo o hidrófobo) se debe a la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular, perturbando estructuras celulares, lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplásmicas, lisis celular y eventualmente la muerte. Respecto a sus componentes. Ellos también pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y fosforilización del ATP (Fisher y Phillips, 2008; Kalemba y Kunicka 2003).

Delanquis *et al.* (2002) mencionan que los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. En el mismo sentido, en la investigación realizada por Fisher y Phillips (2008), reportan al carvacrol como el responsable de aumentar la fluidez de la membrana y causar fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de la membrana en la inhibición de la síntesis del ATP. Por otra parte, la citronela interfiere con los procesos de fotosíntesis, lo que sugiere que los aceites esenciales no solo pueden estar actuando en la pared celular, sino que además pueden tener un efecto mayor sobre los sistemas metabólicos. Del mismo modo, refieren que el mentol tiene un efecto “antiplasmid” (secuencia extracromosómica de ADN que no puede ser compartida entre los patógenos) lo que hace interrumpir la eficiencia de la célula.

2.6.4. Efecto antimicrobiano de vapores de aceites esenciales

Aunque los aceites esenciales obtenidos de las distintas plantas y especias tienen efectos antimicrobianos y muchos de ellos son considerados como GRAS, su aplicación como aditivos en alimentos está limitada principalmente por las alteraciones que causan en las características sensoriales (López-Malo *et al.*, 2005). En este mismo sentido, y con el fin de reducir estos efectos, Suhr y Nielsen (2003) y Goñi *et al.* (2009) proponen una serie de soluciones, dentro de las cuales destacan la utilización de bajas concentraciones de aceites esenciales, mezclas sinérgicas de aceites o la utilización de los aceites esenciales en fase vapor.

2.6.5. Generación de vapores

La generación de vapores de aceites esenciales se basa en la creación de una atmósfera a una cierta temperatura, o un microambiente dado por los propios aceites. 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, como (Reyes-Jurado *et al.*, 2012):

- a) Uso de cajas invertidas, lo cual consiste en colocar los agares inoculados con el microorganismo prueba de forma separada (aproximadamente 5 mm) de los aceites esenciales (previamente disueltos en acetato de etilo, o en algún otro solvente) sobre el papel filtro y manteniendo la 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 comparación con los mohos
- b) Creación de una atmósfera a partir de aceites esenciales, lo cual consiste en utilizar cámaras de plástico con tapa transparente y selladas herméticamente: en su interior se coloca cierta concentración de aceite esencial y sobre una rejilla se colocan los agares inoculados; las cámaras se mantienen a temperatura controlada en condiciones estándar para mohos a 25 °C por 72 horas y 37 °C por 18-24 horas para bacterias. De tal manera que los vapores generados por los aceites esenciales entran en contacto con los microorganismos, y consecuentemente su evaporación puede generar zonas de inhibición. Este método se usa principalmente para mohos, ya que su velocidad de crecimiento es lenta.

2.6.6. Actividad antimicrobiana en fase vapor

Algunas investigaciones han reportado que el uso de los vapores generados por los aceites esenciales tiene mayor efecto antimicrobiano, en comparación con el contacto directo (forma líquida). Esto ha tenido especial impacto contra mohos, ya que debido a su crecimiento superficial, ellos son más susceptibles a los vapores de los aceites esenciales (Fisher y Phillips, 2008; Edris y Farrag, 2003).

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

En la misma línea, en un estudio realizado por López *et al.* (2005), se comparó la efectividad en fase vapor y en fase líquida (contacto directo) de aceites esenciales de canela, clavo, albahaca, romero, eneldo y jengibre contra cuatro bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*), 4 bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis* y *Pseudomonas aeruginosa*) y 3 hongos (1 levadura, *Candida albicans*, y 2, *Penicillium islandicum* y *Aspergillus flavus*); los resultados obtenidos demostraron que los aceites esenciales tuvieron mayor efectividad contra mohos que contra bacterias. Además, los aceites esenciales de canela y clavo mostraron mayor actividad en ambos métodos, y los aceites esenciales de romero y albahaca no mostraron actividad antimicrobiana en fase vapor, pero sí en contacto directo.

2.7. Orégano, eucalipto como agentes antimicrobianos

En diferentes países existe una gran variedad de plantas y especias, las cuales tienen usos conforme a la cultura y costumbre de cada región. Muchas de estas plantas y especias se han relacionado con propiedades antimicrobianas (Reyes-Jurado *et al.*, 2012). De acuerdo a Tajkarimi *et al.* (2010), se han encontrado alrededor de 1,340 plantas a las que se les han atribuido propiedades antimicrobianas y en las cuales se ha identificado alrededor de 30,000 componentes activos.

2.7.1. Orégano

2.7.1.1. Clasificación botánica y sinónimos

EL nombre orégano proviene del griego “oros” (montaña) y “ganos” (ornamento), la decoración o la belleza de las montañas (Muñoz, 2002). Es una de las riquezas florísticas con las que cuenta el territorio mexicano, se conoce su utilización desde tiempos ancestrales como planta medicinal y como condimento de platillos regionales (Meléndez *et al.*, 2009). Actualmente, México es uno de los países con mayor producción y exportación de orégano en el mundo, superado solo por Turquía (SAGARPA, 2013a; Corella-Bernal y Ortega-Nieblas, 2013).

Con el nombre de orégano se conocen en la República Mexicana aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas: *Asteraceae* (Compositae), *Lamiaceae* (Labiatae), *Fabaceae* (Leguminosae) y *Verbenaceae*. Las plantas de las diferentes familias de orégano mexicano se encuentran en estado silvestre, en regiones áridas y semiáridas de, al menos, 24 estados (Huerta, 1997; Granados-Sánchez *et al.*, 2013).

La familia Verbenaceae se considera de mayor importancia de acuerdo a su distribución y a sus características aromáticas (Granados-Sánchez *et al.*, 2013). A ella pertenece el género *Lippia*, con las especies; *Lippia palmeri* Wat y *L. graveolens* H.B.K., estas dos especies tienen características semejantes al orégano europeo (*Origanum vulgare* L.) por lo cual se le considera como sustituto de este (González *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio comparativo entre el orégano proveniente de Grecia y de Turquía con el orégano mexicano (referido a la especie *Lippia graveolens* H.B.K), se pudo comprobar que la calidad del orégano mexicano es superior, referido a la composición química de sus aceites esenciales (Huerta, 1997). Esta especie es la más utilizada y se le conoce como “orégano mexicano verdadero” (Ríos, 2010). La Tabla 7 resume la clasificación taxonómica de *Lippia graveolens* H. B. K.

Los sinónimos que recibe la especie *Lippia graveolens* son: *Lantana origanoides* Martens & Galeotti, *Lippia berlandieri* Schauer, *Goniostachyum graveolens* (H. B. & K.), *Lippia graveolens* H.B.K. f. *macrophylla* Moldenk, *Lippia graveolens* H.B.K. f. *loeseneriana* Moldenke (Villavicencio *et al.*, 2010).

2.7.1.2. Descripción botánica

Esta especie se describe como un arbusto de 2 a 3 m de alto, aromático al estrujarse; ramas estrigoso-pubérulas o a veces pilosas, las principales a menudo con corteza exfoliante; hojas opuestas, lamina angostamente ovalada a oblonga o elíptica de 1 a 6 cm de largo, de 0.4 a 3.5 cm de ancho, margen más o menos regularmente crenado, de textura cartácea, inflorescencias en forma de espigas cortas, cónicas a cilíndricas de 4 a 12-15 mm de largo, por lo general agrupadas en fascículos de 2 a 4 en las axilas de las hojas, brácteas comúnmente ordenadas de 4 hileras, persistentes, ovaladas a suborbiculares, de 2 a 3 mm de largo, conduplicado-aquilladas, agudas a acuminadas, cáliz apenas 4-dentado de 1 a 2 mm de largo, piloso-viloso; corola blanca a amarilla (Rzedowski y Calderón, 2002) (ver Figura 3).



Figura 3. Orégano

2.7.1.3. Composición química

La composición química del orégano es compleja y depende de la época de colecta, la fenología de la planta y la altitud del lugar de crecimiento. En comparación con el orégano europeo, el orégano mexicano posee hojas más oscuras, además de un olor y un sabor más fuerte. Asimismo, se sabe que la concentración del timol y el carvacrol es mayor en plantas jóvenes, aunque dicho valor no se afecta por la cantidad de agua que recibe la planta durante su desarrollo (Meléndez *et al.*, 2009).

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, β -cariofileno, r-cimeno, canfor, linalol, α -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-p-coumaroil

y 6'-O-cafeoil. También contiene flavonoides como naringenina y pinocebrina, lapachenol e icterogenina (Arcila-Lozano, 2004).

Las sustancias químicas son fáciles de obtener y analizar en el aceite esencial del orégano, mientras que su concentración es una de las variables utilizadas para la clasificación genética entre especies. En su gran mayoría, los compuestos más abundantes son los monoterpenos y los ácidos fenólicos. Los monoterpenos son compuestos volátiles con olores intensamente pungentivos, responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas; estructural y biológicamente son muy diferentes, llegándose a clasificárseles hasta en 35 grupos. Los principales quimiotipos de la especie *L. berlandieri* son el carvacrol y el timol, cada uno con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (*L. berlandieri* es la que contiene más concentración de carvacrol, entre las diversas especies conocidas y estudiadas de orégano) (Meléndez *et al.*, 2009).

De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides γ -terpineno y *p*-cimeno (precursores del timol y el carvacrol, respectivamente) están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de timol y carvacrol (Arcila- Lozano, 2004).

2.7.1.4. *Actividad antimicrobiana timol y carvacrol*

Estos compuestos, carvacrol y timol, son altamente activos contra microorganismos a pesar de su relativa baja capacidad de disolver en agua (Dorman y Deans, 2000). La actividad antimicrobiana de estos compuestos se le atribuye al anillo de fenol aromático y al grupo hidroxilo en la estructura fenólica. Se sabe que el grupo OH es muy reactivo y puede formar fácilmente enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas, posiblemente a través de una reacción con grupos sulfídrico o a través de interacciones no específicas con las proteínas (Rupika,2010).

Dorman y Deans (2000) confirmaron la importancia del grupo hidroxilo en la estructura fenólica mediante la comparación de la actividad de carvacrol con su forma metil éter. Además, la posición relativa del grupo hidroxilo influye en la eficacia de los terpenos como los dos isómeros, timol y carvacrol, pues estos mostraron diferentes actividades contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, la importancia del anillo fenólico se demostró mediante la comparación de la actividad de timol a *p*-cimeno, un hidrocarburo monoterpeno cíclico. La actividad de *p*-cimeno se encontró que era muy débil. Se cree que la posición y el número de grupos hidroxilo en el grupo fenol están relacionado con su

toxicidad relativa a los microorganismos, con la creciente evidencia de que el aumento en la hidroxilación da como resultado un aumento en la toxicidad (Rupika, 2010).

2.7.2. Eucalipto

2.7.2.1. Clasificación botánica y sinónimos

El nombre del género *Eucalyptus* deriva del griego eucalypts que significa bien cubierto, se refiere al operaculo (tapa) que cierra el cáliz de la flor (Fonnegra y Jiménez 2007).

El género eucalipto pertenece a la familia *Myrtaceae*, subfamilia *Leptospermoideae* y posee más de 600 especies, pero las más conocidas en México son la *E. globulus* y la *E. camaldulensis*, o alcanfor (Kiwanja, 2007).

Tal vez no exista en el mundo ningún otro árbol que se haya propagado tan ampliamente como el eucalipto. Originario de Australia, este árbol crece hoy en la mayoría de las regiones templadas del planeta gracias a su alta capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas (Kiwanja, 2007). Los extractos de hojas de *Eucalyptus* también han sido aprobados como aditivos alimentarios (Elaiissi *et al.*, 2011), además presentan diversos efectos biológicos, tales como antibacterianos, antifúngicos y actividad antioxidante. De hecho, durante muchos años, los aceites esenciales han implicado interés como una fuente de productos naturales (Tyagi y Malik, 2011).

Estos aceites esenciales han sido examinados para sus posibles usos como remedios alternativos para el tratamiento de muchas infecciones y como conservante de alimentos naturales. Un número de estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales de las especies de eucalipto contra una amplia gama de microorganismos. Los más estudiados son *E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* y *E. citriodora*. Sin embargo, solo unos pocos estudios reportan su actividad en contra las bacterias patógenas causales de deterioro en alimentos (Elaiissi *et al.*, 2011).

Los sinónimos que recibe en México son: eucalipto, gomífero (Fonnegra y Jiménez, 2007) Ocalipto o Alcanfor (SAGARPA, 2013b).

2.7.2.2. Descripción botánica

Árbol muy aromático, hasta de 50 m de altura y 3 m de diámetro a la altura del pecho, en los lugares de donde es nativo puede alcanzar más de 100 m de altura. Tallo erguido liso, corteza azul grisácea, segrega una sustancia resinosa de color azul; el tallo joven es cuadrangular; retidoma fácilmente separable en láminas. Hojas enteras aromáticas,

recubiertas de una capa cerosa blanca; las hojas jóvenes son sésiles, ovales, opuestas, glaucas y las adultas son alternas, verde claras, pendulares, con peciolo largo y grueso, lanceoladas, ligeramente curvas como una hoz, base simétrica, ápice agudo, margen ligeramente crenada (ver Figura 4). Flores aromáticas, color amarillo claro o blancuzcas, de forma cónica, solitarias, axilares, apétalas, cáliz leñoso, verde con excreción cerosa, cerrado con opérculo que se desprende al abrir la flor. Frutos aromáticos tipo capsula coriácea con forma de copón o cáliz, con compartimentos que encierran numerosas semillas diminutas (Fonnegra y Jiménez 2007).



Figura 4. Eucalipto (*eucaliptus*).

2.7.2.3. Composición química

El tallo, el fruto y las hojas contienen aceites esenciales, glicosídeos saponinicos, flavonoides, taninos, triterpenos y sesquiterpenlactonas. Las hojas contienen de 1 a 3% de aceite esencial (Flores *et al.*, 2004). En la Tabla 7 se describen los componentes mayoritarios del aceite esencial de *E. globulus*.

Tabla 7. Componentes mayoritarios de aceite esencial de *E. globulus*

Componente	%
1,8-cineol o eucaliptol	82.27
Limoneno	3.7
α-Pino	3.16
Guaiol	2.76
Terpinen-4-ol	1.4
Linalol	1.3
α-Terpineol	1.2
β-Mirceno	1.12
α-Terpineno	1.1

Fuente: Yáñez *et al.* (2011).

2.8. Modo de acción antibacteriana de aceites esenciales

Aunque las propiedades antimicrobianas del aceite esencial y sus componentes han sido revisados anteriormente, el mecanismo de acción no ha sido estudiado en gran detalle. Teniendo en cuenta el gran número de diferentes grupos de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, lo más probable es que su actividad antibacteriana no es atribuible a un mecanismo específico, pues hay varios objetivos en la célula (Burt, 2004).

Los lugares o mecanismos en la célula bacteriana que se cree que son los sitios de acción para los componentes de aceites esenciales se indica en la Figura 5. En resumen, degradación de la pared celular, daños en la membrana citoplasmática, daños a proteínas de membranas, fuga de contenido de la célula, coagulación de citoplasma y agotamiento de la fuerza motriz de los protones. No todos estos mecanismos son objetivos independientes, algunos son afectados como consecuencia de otro mecanismo como objetivo (Burt, 2004).

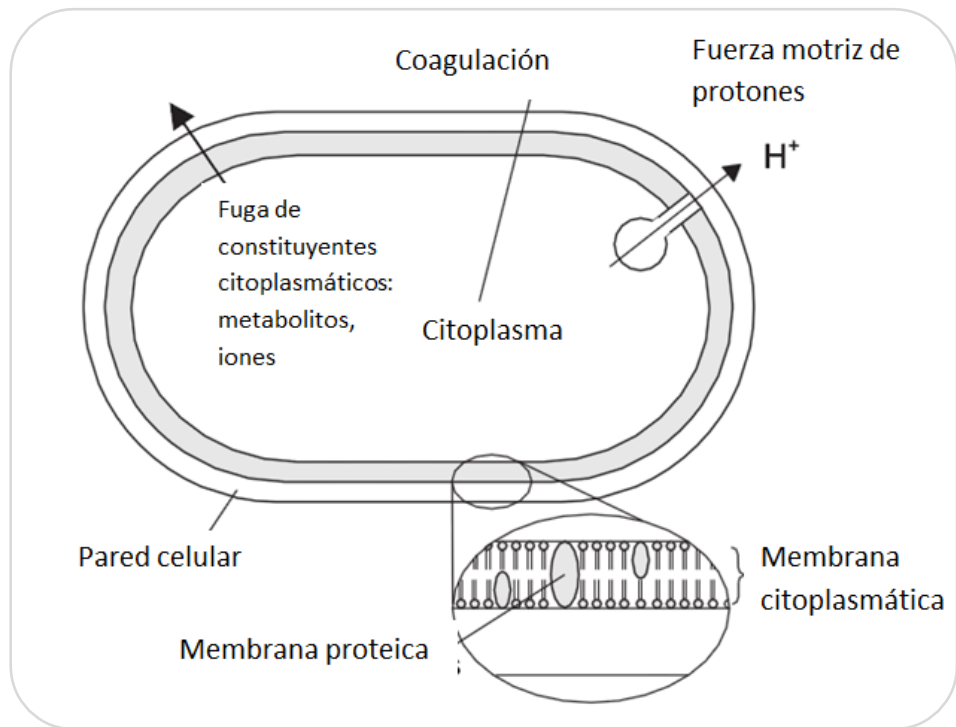


Figura 5. Ubicaciones y mecanismos en la célula bacteriana que se cree que son los sitios de acción de los componentes de los aceites esenciales.

Fuente: Burt (2004).

Una característica importante de los aceites esenciales y de sus componentes es su hidrofobicidad, lo que les permite entrar en los lípidos de la membrana celular bacteriana y mitocondrias, distorsionando las estructuras y haciéndolas más permeables. La fuga de iones y otros contenidos celulares ocurren. Aunque una cierta cantidad de fugas desde la célula bacteriana se pueden tolerar sin pérdida de viabilidad, la extensa pérdida de contenido de la célula o la salida de moléculas críticas e iones conducirán a la muerte (Burt, 2004).

En general, los aceites esenciales que poseen propiedades antibacterianas fuertes contra los patógenos transmitidos por los alimentos contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos. Parece razonable que su mecanismo de acción sería similar a otros compuestos fenólicos, generalmente se considera que es la perturbación de la membrana citoplasmática, lo que altera la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, transporte activo y la coagulación de contenido de la célula (Burt, 2004).

La estructura química de los componentes individuales de los aceites esenciales afecta su modo preciso de acción y la actividad antibacteriana. La posición relativa del grupo hidroxilo en el anillo fenólico no aparece influir fuertemente en el grado de actividad antibacteriana; por ejemplo, la acción de timol contra *B. cereus*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* parece ser comparable a la del carvacrol. Sin embargo, en un estudio carvacrol y timol se encontraron que pueden actuar de forma diferente contra bacterias gram positivas y gram negativas. La importancia del anillo fenólico en sí (los electrones desestabilizados) se demuestra por la falta de actividad del mentol en comparación con carvacrol (Burt, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar un envase activo que permita la liberación controlada de agentes antifúngicos contenidos en los extractos naturales para el control de hongos causantes de enfermedades en frutos y hortalizas durante su almacenamiento.

3.2. Objetivos particulares

Objetivo particular 1

Evaluar el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de orégano, gobernadora, eucalipto y aceites esenciales de orégano y eucalipto por medio de pruebas *in-vitro* para conocer la concentración que inhiba el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp* y *Colletotrichum sp.*, causantes de enfermedades en frutos y hortalizas para seleccionar el extracto natural que muestre mayor actividad antifúngica.

Objetivo particular 2

Realizar pruebas *in-vitro* utilizando matrices poliméricas (gelana/alginato) con los extractos naturales que presentaron la mayor actividad antifúngica en pruebas *in-vitro* que permitan establecer el control de *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*

Objetivo particular 3

Efectuar la cinética de liberación de los compuestos bioactivos mediante cromatografía de gases, estableciendo la estabilidad de los compuestos presentes en los extractos naturales a temperatura de refrigeración (4°C).

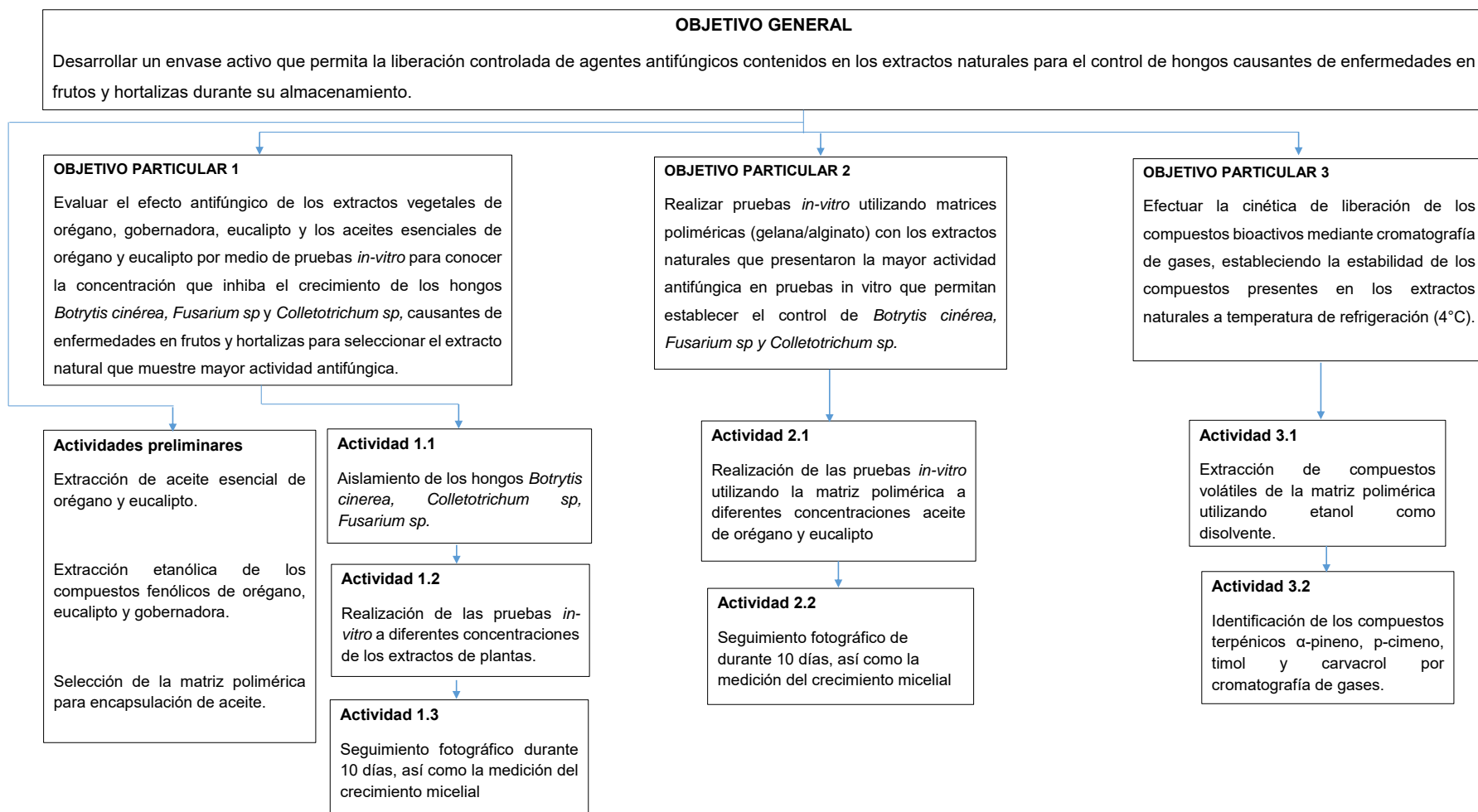
MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro metodológico

- Cuadro metodológico

4. MATERIALES Y MÉTODOS



- **Material biológico**

Se utilizaron plantas de orégano (*Lippia graveolens*) adquirido en la Central de Abastos de Atizapán, eucalipto (*Eucalyptus*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) adquiridos en el mercado del Carmen de Cuautitlán Izcalli, Estado de México y llevadas al laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales del Centro de Asimilación Tecnológica (CAT) de la UNAM, en donde fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su estudio. Las plantas utilizadas fueron secas y de buen estado (Figura 6).



Figura 6. Plantas utilizadas: A) Eucalipto, B) Orégano, C) Gobernadora.

- **Obtención del extracto etanólico**

Las diferentes plantas se separaron de materiales extraños, se pulverizaron en un molino (marca KRUBS), una vez obtenido el polvo, se tamizó en malla 40. El polvo obtenido de cada una de las plantas se almacenó en frascos de vidrio a temperatura ambiente y sin contacto con la luz.

Por cada 10 g del polvo obtenido se mezclaron con 50 ml de disolvente etanol al 70% en un matraz Erlenmeyer, y fueron sometidas a una extracción asistida por ultrasonido en un baño ultrasónico (Cole Parmer 8891) durante 90 min con ciclos de 30 min y pausas de 10 min. Al término de la extracción se filtró el contenido del matraz Erlenmeyer sobre papel filtro y se cuantificó el extracto etanólico obtenido (Figura 7). Se realizó la cuantificación de fenoles totales a cada extracto para determinar la concentración de los compuestos bioactivos presentes, este método se describe en el apartado 4.5.1.

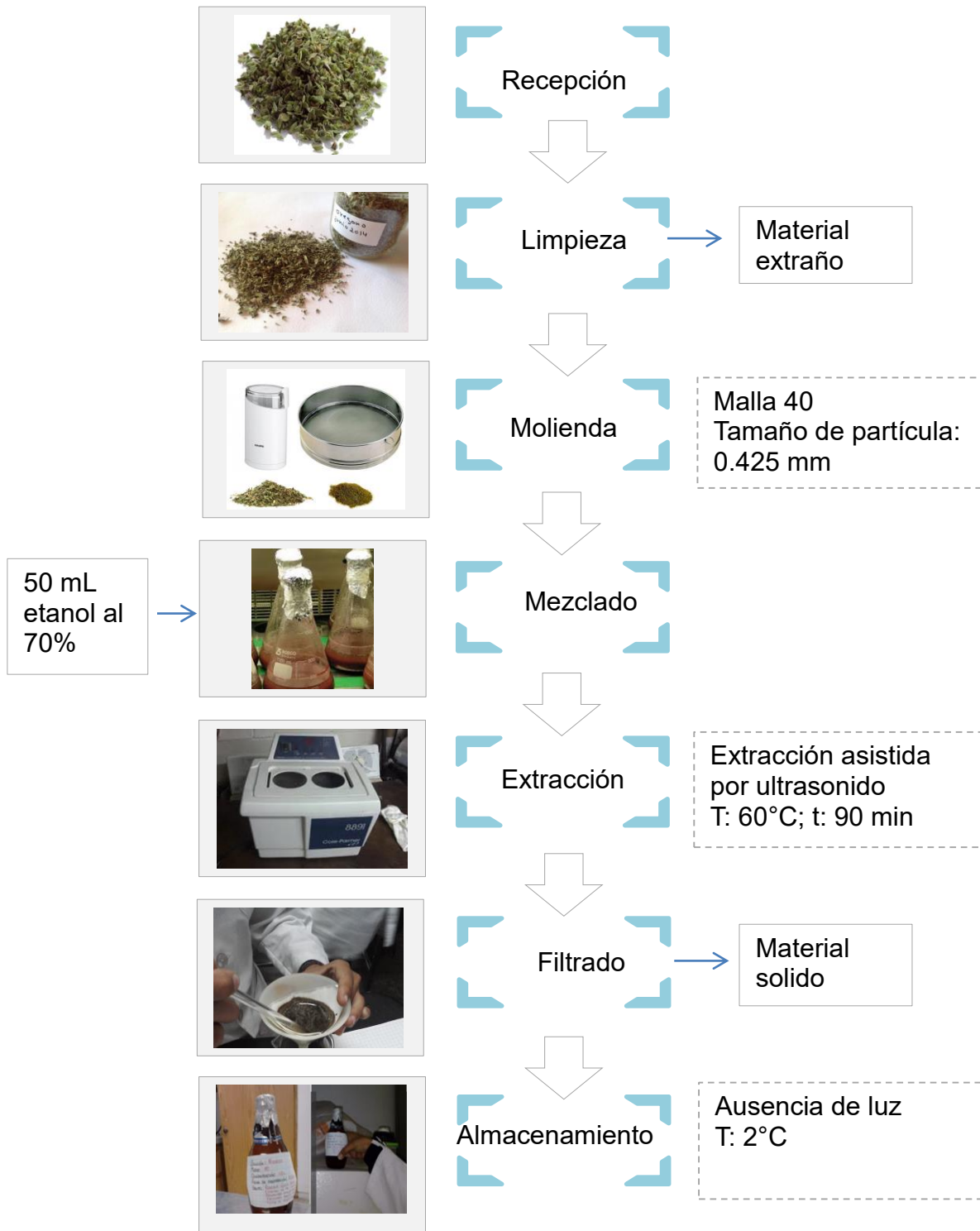


Figura 7. Diagrama de proceso para obtener los extractos etanólicos.

○ **Extracción de aceites esenciales**

Las hojas secas de órgano y eucalipto se trataron como se indica en la sección 4.3 de este trabajo. Una vez obtenido el polvo se mezclaron 50 g de material biológico con 1 L de agua en un hidroddestilador de 2 L de capacidad (relación 1:20). Se realizó la hidroddestilación durante 2 horas con 30 min a 250 °C con agitación continua. El aceite obtenido se recolectó en viales ámbar y se almacenó en congelación hasta su utilización (Figura 8).

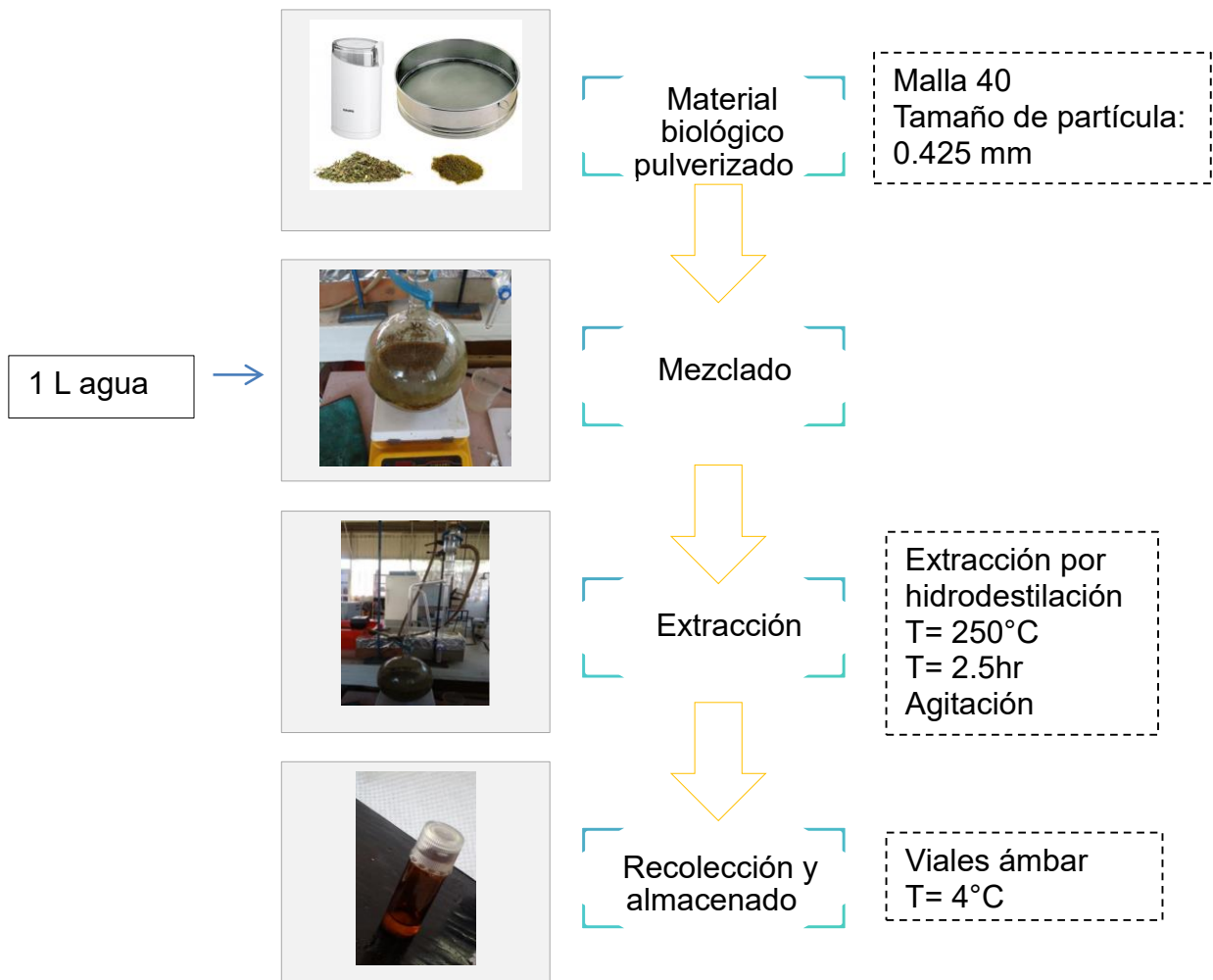


Figura 8. Diagrama para obtener los aceites esenciales

- **Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos por medio de las pruebas *in-vitro***

4.1. Desarrollo de las pruebas *in-vitro* en hongos

Para realizar las pruebas *in-vitro* se llevó a cabo un crecimiento masivo de los hongos *B. cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* anteriormente purificados e identificados macro y microscópicamente.

La siembra de los hongos de estudio se realizó en cajas Petri con agar-papa dextrosa, donde se realizó una picadura en 3 cajas por cada hongo y posteriormente se incubaron a 25°C durante 10 días.

Para conocer el potencial inhibitorio de los extractos etanólicos de orégano, eucalipto y gobernadora sobre el crecimiento micelial de los hongos *B. cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* se empleó la técnica de volatilización de disco, reportada por Tyagi *et al.* (2011), en ella se realizó un siembra de los hongos en agar-papa dextrosa, se utilizó un disco de papel filtro (10 cm de diámetro) el cual se impregnó del extracto etanólico para posteriormente colocarlo en la superficie interior de la tapa superior. La caja Petri inoculada con el hongo se invierte inmediatamente en la parte superior de la tapa y se sella con parafilm para evitar fugas de vapor (Figura 9). Estas se incubaron a 25°C durante 10 días y se midió el diámetro del crecimiento del microorganismo por cada día. Las concentraciones utilizadas contra cada uno de los hongos estudiados se enlistan en la Tabla 8.

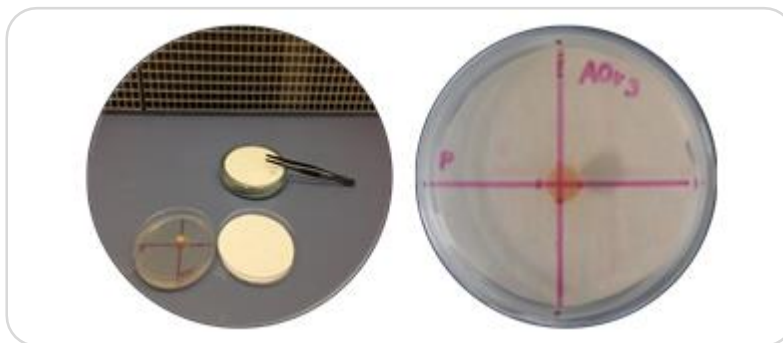


Figura 9. Disposición de la caja Petri en la técnica de volatilización de disco

Tabla 8. Concentraciones utilizadas de extracto etanólico contra cada uno de los hongos estudiados

Hongo	Extracto (ppm)			Aceite (ppm)	
	Orégano	Gobernadora	Eucalipto	Orégano	Eucalipto
<i>Botrytis cinerea</i>	3000	3000	3000	2000	2000
	4000	4000	4000	4000	4000
	5000	5000	4000	6000	6000
<i>Fusarium sp.</i>	3000	3000	4000	2000	2000
	4000	4000	5000	4000	4000
	5000	5000		6000	6000
<i>Colletotrichum sp.</i>	3000	3000	4000	2000	2000
	4000	4000	5000	4000	4000
	5000	5000			6000

- **Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales por medio de las pruebas *in-vitro* utilizando una matriz polimérica**

4.2. Desarrollo de matriz polimérica

Las polímeros utilizados para la realización de la matriz polimérica fueron, Gelana y Alginato de sodio (1:1) al 2 % y Tween 80 como emulsificante al 1%. La dispersión de los polímeros se realizó a una temperatura de 50 °C, una vez dispersados los polímeros, se agregó Tween 80 y el volumen de aceite esencial según la concentración requerida en cada prueba *in-vitro* mezclando durante 30 segundos.

La formación de esferas de la dispersión se realizó con una jeringa sin aguja de 5 mL en una solución de 3 % de cloruro de calcio (Figura 10a). La formación de cada esfera se realizó mediante la propiedad de gelificación que presenta el alginato de sodio en presencia de iones de calcio, únicamente se dejaron caer pequeñas gotas de la dispersión con ayuda de la jeringa en la dispersión de cloruro de calcio, la esfera formada permaneció en reposo en la dispersión de cloruro de calcio durante 30 minutos para asegurar la completa gelificación de la misma.

Una vez gelificadas, las esferas se dejaron reposar sobre una gasa de algodón para retirar el exceso de solución de cloruro de calcio durante 5 minutos (Figura 10b).

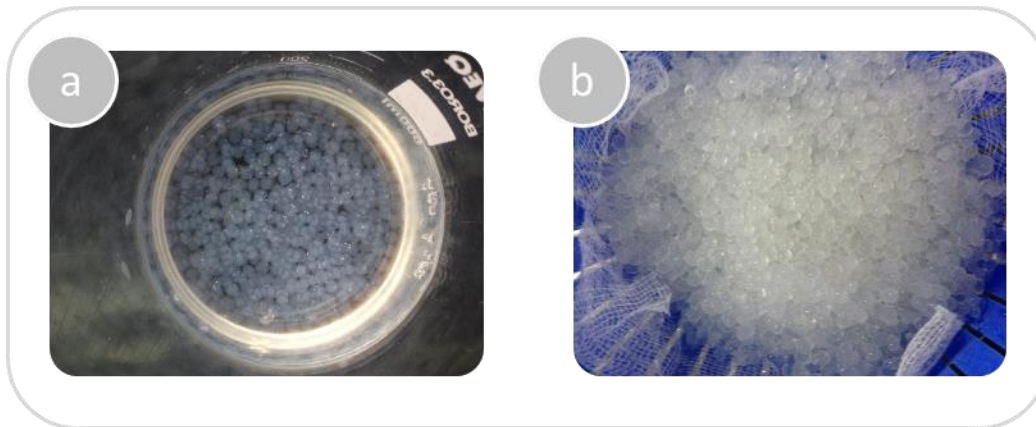


Figura 10. Gelificación de esferas en solución de cloruro de calcio.

4.3. Desarrollo de pruebas *in-vitro* utilizando la matriz polimérica

50 gr de esferas fueron agregadas a cada caja Petri en la parte superior de las placas y el disco con el hongo fue colocado sobre el agar-papa dextrosa en la placa inferior (Figura 11a), de esta manera las cajas Petri se mantuvieron con la placa superior hacia abajo y la placa inferior hacia arriba mantenía el agar y el disco con el hongo, como se observa en la Figura 11b.

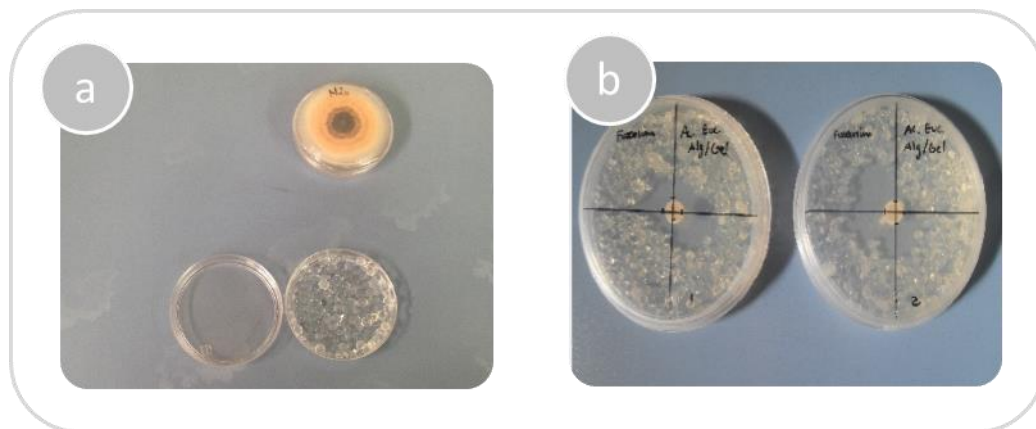


Figura 11. Disposición de la caja Petri en pruebas *in-vitro*.

○ Evaluación de la los compuestos volátiles de aceite de orégano

4.4. 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 de orégano se realizó colocando la matriz polimérica en refrigeración (4°C) en envases de polietileno durante 10 días realizando un 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 de la marca Thermo Scientific, modelo Trace GC, con un detector de ionización de flama y una columna de sílice fundida de 30 m x 0.32 mm con 0.25 μm de espesor 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), *p*-cimeno (W235601), timol (T0501) y carvacrol (22051) todos de Sigma-Aldrich. Los resultados de concentración se expresaron en μL terpeno/g matriz polimérica y μL terpeno/ μL de aceite esencial.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó con el método de espectrofotométrico descrito por Slinkard y Singleton (1997). En tubos de ensaye, se colocaron 1.5 ml de agua destilada, 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 200 μL de Na_2CO_3 y 100 μL del extracto resuspendido en metanol de acuerdo al factor de dilución. Se realizó un curva patrón utilizando ácido gálico como estándar expresando los resultado en mg de ácido gálico/g de peso fresco. Los resultados fueron leídos en un espectrofotómetro (GENESYS 10UV, ThermoSpectronic) a una longitud de onda de 765 nm.

4.6. Análisis estadísticos

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias con la prueba Duncan con un nivel de significancia de 0.05 empleando el programa estadístico SPSS versión 22, para determinar si existen diferencias significativas entre los extractos vegetales a estudiar.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto antifúngico de los extractos etanólicos de orégano, gobernadora, eucalipto y los aceites esenciales de orégano y eucalipto por medio de pruebas *in-vitro*.

A fin de evaluar la eficacia antimicrobiana de los extractos etanólicos y aceites esenciales utilizados, se examinó el porcentaje de inhibición que estos mostraron ante el crecimiento micelial de los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* a diferentes concentraciones durante 10 días de estudio.

5.1.1. Pruebas *in-vitro* utilizando extractos etanólicos etanólicos para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*.

En porcentaje de inhibición que presentaron los extractos etanólicos utilizados en este estudio (orégano, eucalipto y gobernadora) contra el hongo *Botrytis cinerea* se muestran en la Figura 12.

El extracto de orégano (Figura 12A) presentó 100% de inhibición desde el primer día de estudio en las 3 concentraciones utilizadas y es hasta el día 5 cuando se observó un ligero crecimiento del hongo en la concentración de 4000 ppm, mientras el control alcanza su máximo crecimiento a partir del día 6. Al finalizar los 10 días de estudio, las concentraciones de 4000 y 5000 ppm inhibieron 88 y 95%, respectivamente, en comparación con el control, estas 2 concentraciones presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el día 10 con respecto a la concentración de 3000 ppm, la cual permaneció sin crecimiento micelial. Los resultados no muestran relación entre el crecimiento micelial y la concentración utilizada.

El extracto de eucalipto presentó 100% de inhibición en las dos concentraciones utilizadas, 3000 y 4000 ppm, desde el día 1 hasta finalizar el estudio (Figura 12B).

Los estudios de Oh *et al.* (2008) demuestran que los extractos de eucalipto presentan una fuerte actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diaporthe actinidiae*, sin embargo esta actividad depende de la especie de eucalipto de la que se obtenga el extracto. Concretamente del extracto de Eucalipto *dalrympleana* Maiden se ha aislado el ácido gálico, un compuesto fenólico, que inhibió significativamente el crecimiento aéreo de micelio de *B. cinerea* más del 54 y 85% a una concentración de 1000 mg/L y 5000 mg/L, respectivamente, comparado con el control. Además este compuesto fenólico

también inhibió el crecimiento de esporas de igual manera que el crecimiento aéreo de micelio de *Botrytis cinerea*.

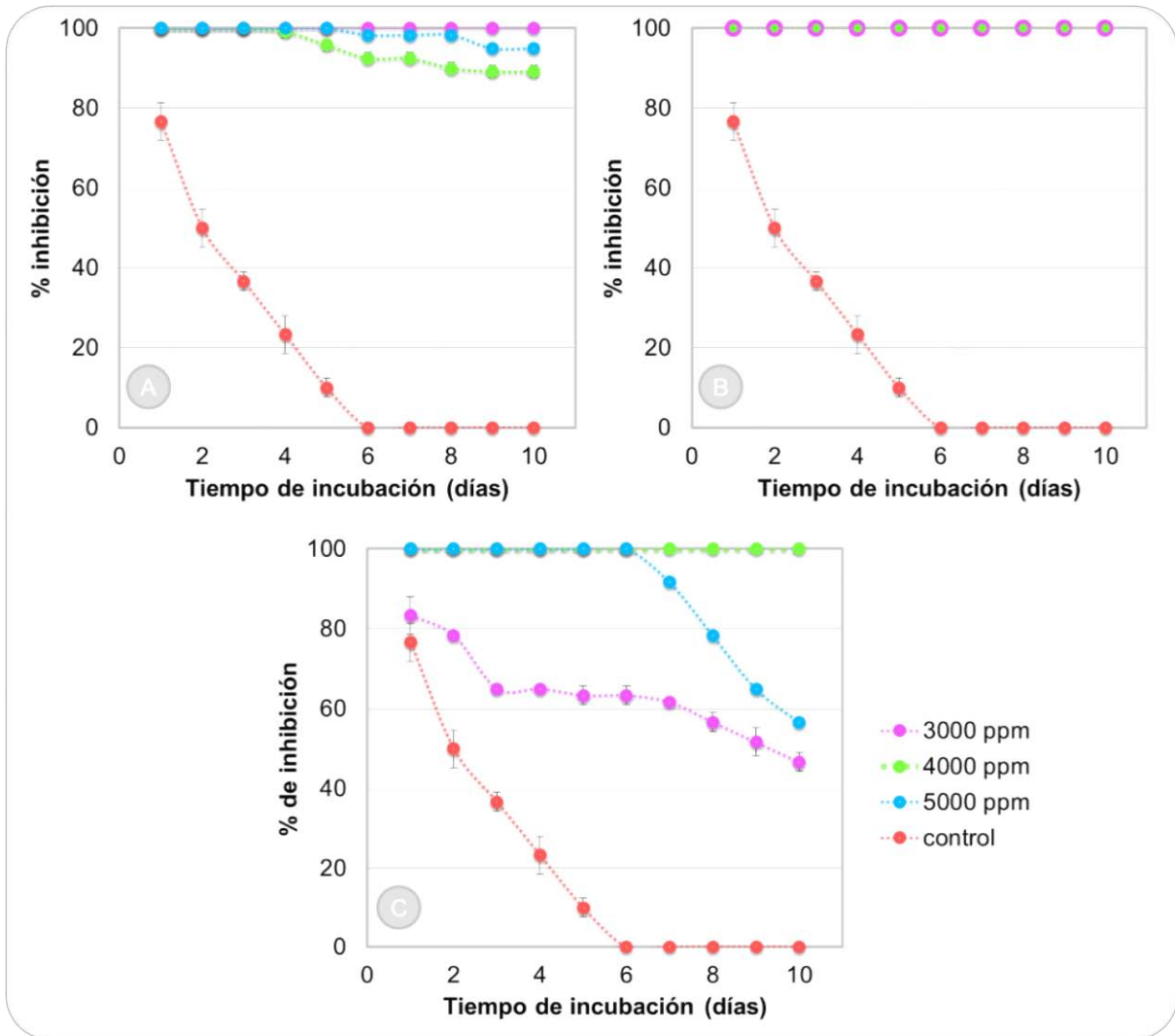


Figura 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Botrytis cinerea* en presencia de los extractos etanólicos de A) orégano, B) eucalipto y C) gobernadora, a diferentes concentraciones durante 10 días.

Díaz (2013), obtiene resultados reportados en halos de inhibición de extracto alcohólico de eucalipto y crisantemo, así como varias mezclas entre ellos. En los cuales el extracto de eucalipto obtiene el segundo mejor resultado para la inhibición de *Botrytis cinerea*, solo por debajo de la mezcla en conjunto con extracto de crisantemo. Además,

realizó cromatografía de capa fina para los extractos de eucalipto, revelando la presencia de eucaliptol en los extractos alcohólicos.

En general, los extractos vegetales que poseen propiedades antimicrobianas fuertes contra los patógenos transmitidos por los alimentos contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos. Parece razonable que su mecanismo de acción, por lo tanto, sería similar a otros compuestos fenólicos, generalmente se considera que es la perturbación de la membrana citoplasmática, lo que altera la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, transporte activo y la coagulación del contenido de la célula (Burt, 2004). Sin embargo, hay pruebas de que los extractos naturales ejerzan una eficacia antimicrobiana más fuerte que la ejercida por los compuestos fenólicos, que se puede atribuir a los efectos aditivos de sus principales compuestos antimicrobianos (Burt y Reinders, 2003; Friedman *et al.*, 2004).

La inhibición que presenta el extracto de gobernadora se muestra en el la Figura 12C. En el día 1 de este estudio se observó como las concentraciones que exhiben un porcentaje mayor son, 4000 y 5000 ppm; en el día 5 se sigue observando a estas dos concentraciones con un porcentaje de inhibición similar, 88 y 95%. Es hasta el día 7 cuando la concentración de 5000 ppm dista su porcentaje y finaliza el estudio solo con un 53% de inhibición, muy similar a la inhibición presentada por la concentración de 3000 ppm, 46%, estas dos concentraciones en el día 10, no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$). La concentración de 4000 ppm obtuvo, al finalizar el estudio, el mayor porcentaje de inhibición con un 90%, con diferencias significativas ($p \geq 0.05$) con respecto a 3000 y 5000ppm.

Los resultados concuerdan con los estudios realizados por Lira-Saldivar *et al.* (2006), quienes demuestran la actividad antifúngica *in-vitro* del extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) y soluciones de quitosán, solos y combinados, contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes* y *Fusarium oxysporum*. En este estudio la esporulación de *Botrytis* no muestra diferencias significativas entre las combinaciones de extracto de gobernadora-quitosano en comparación con el control químico estudiado (Clorotalonil y Prozycal) ya que todos los tratamientos tuvieron el mismo efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo. De la misma manera el extracto de gobernadora individual muestra una total inhibición en presencia de *Botrytis cinerea* y sobre la producción de esporas. Igualmente Hernández-Suarez *et al.* (2013), demuestran el efecto antifúngico del extracto etanólico de gobernadora en una concentración de 8000 ppm, al inhibir al 100% el crecimiento de *B. cinerea*, el cual se comportó igual que uno de los fungicidas sintéticos utilizados (Mancozeb). Además

denota como este extracto etanólico inhibe al hongo en un 80.9% a una concentración de 1000 ppm, teniendo una efectividad superior al fungicida sintético.

La diferencia de concentraciones entre los diferentes estudios que han inhibido el crecimiento de *B. cinerea* puede deberse a la técnica *in-vitro* utilizada para su evaluación, pues en este estudio la inhibición se llevó a cabo por los vapores del extracto que inhiben el crecimiento micelial, no por contacto como lo hacen en los estudios con los que se compara, a pesar de esta diferencia, los resultados son muy similares. Sin embargo, algunas investigaciones han reportado que el uso de los vapores generados por los extractos vegetales tiene mayor efecto antimicrobiano, en comparación con el contacto directo (forma líquida). Esto ha tenido especial impacto entre mohos, ya que debido a su crecimiento superficial, ellos son más susceptibles a los vapores de los extractos vegetales (Fisher y Phillips, 2008; Edris y Farrag, 2003).

Los resultados indican actividad antimicrobiana en los tres extractos utilizados contra el crecimiento de *Botrytis cinerea*, pero en general, la mostrada por el extracto de eucalipto es más contundente que la mostrada por los extractos de orégano y gobernadora. Las imágenes relacionadas con el seguimiento *in-vitro* de *Botrytis cinerea*, están presentadas en la Tabla 9 y 10, en donde se resume el seguimiento del crecimiento micelial durante los 10 días de incubación.

En la Tabla 9, el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en presencia de extracto de orégano se aprecia en la caja Petri a partir del día 5, la única concentración con un pequeño aro de micelio del hongo fue a la concentración de 4000 ppm y finalmente en el día 10 el aro se aprecia marcadamente de color grisáceo, de la misma manera en la concentración de 5000 ppm se aprecia este aro grisáceo, pero de tamaño menor. En la Tabla 9 para el extracto de eucalipto, no hay crecimiento visible de micelio en ninguna de las cajas Petri con las concentraciones utilizadas.

La Tabla 10, con el seguimiento fotográfico de *Botrytis cinerea* en presencia de extracto de gobernadora, el micelio observado a una concentración de 4000 ppm permanece inalterable durante los 10 días de estudio. En la concentración de 3000 ppm se observa un pequeño aro de micelio en el día 1 aumentando de tamaño hasta el día 2 y a partir del día 4 se nota como el crecimiento del hongo se ha esparcido en pequeñas colonias por toda la superficie, creciendo gradualmente durante todo el estudio hasta cubrir más del 50% de la superficie de la caja Petri. El crecimiento de micelio de *Botrytis cinerea* en el control, Tabla 10, fue continuo a partir del día 1 alcanzando su máximo crecimiento en el día 6, donde se observa una cobertura total de la superficie.

Tabla 9. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de los extractos de orégano y eucalipto en presencia de *B. cinerea* a diferentes concentraciones

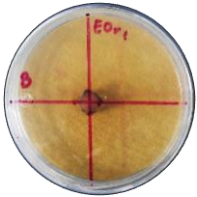

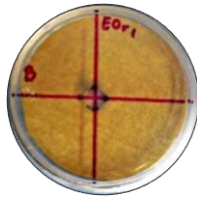
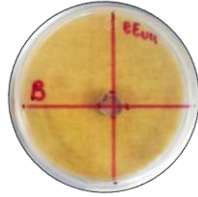
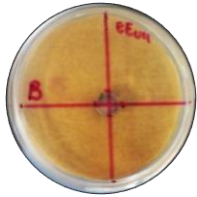
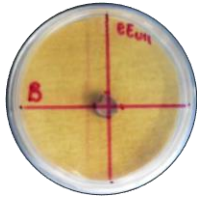
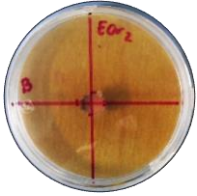
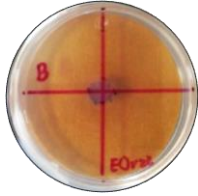
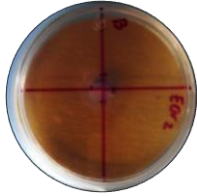
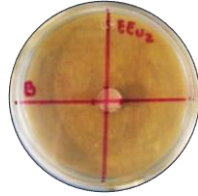
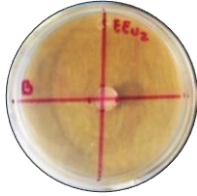
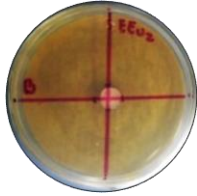
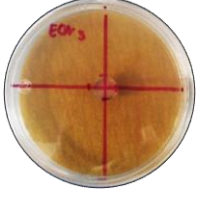
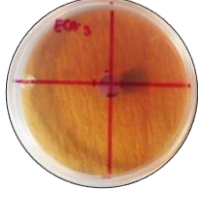
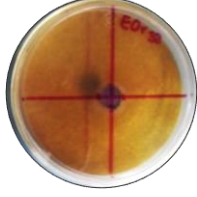
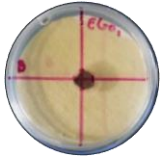
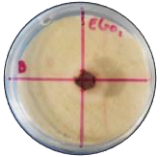
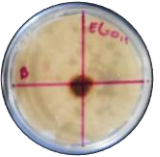
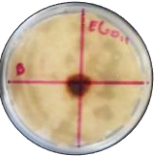
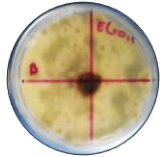
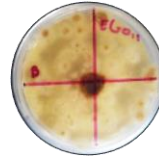
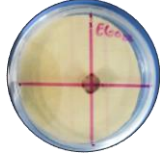
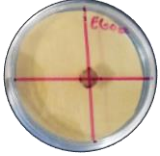
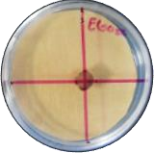
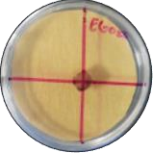
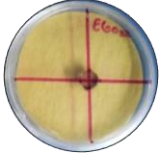
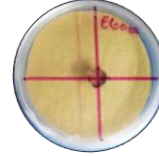




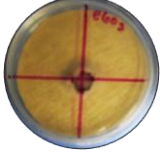
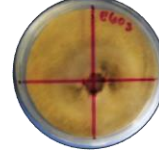
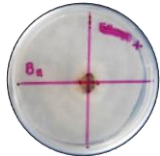
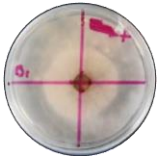
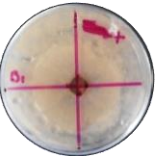
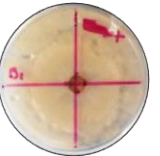
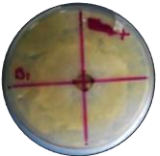
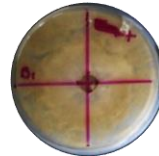
Extracto de orégano				Extracto de eucalipto		
(ppm)	Día 1	Día 5	Día 10	Día 1	Día 5	Día 10
3000						
4000						
5000						

Tabla 10. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de extracto de gobernadora en presencia de *B. cinerea* a diferentes concentraciones

Extracto de gobernadora						
(ppm)	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
3000						
4000						
5000						
Control						
Control						

5.1.2. Pruebas *in-vitro* utilizando aceites esenciales para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*.

Utilizando aceites esenciales de orégano y eucalipto en las pruebas *in-vitro* a diferentes concentraciones, estos inhibieron el crecimiento micelial del hongo durante los días de estudio en cualquiera de las concentraciones utilizadas. El porcentaje de inhibición que muestran los aceites esenciales contra el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* están presentados en la Figura 13.

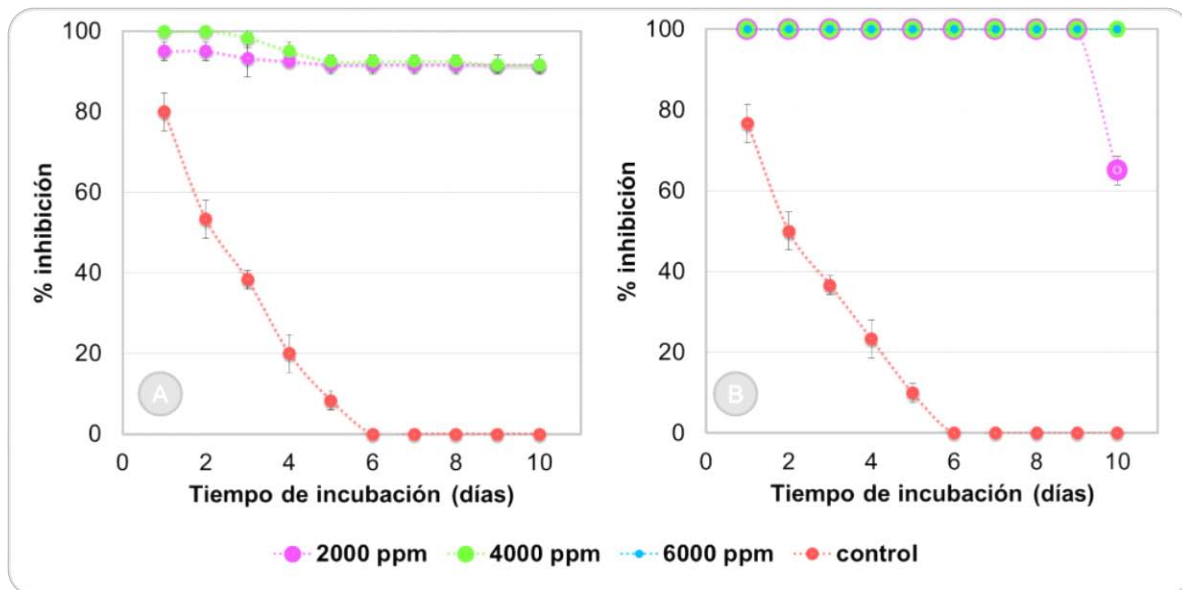


Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Botrytis cinerea* en presencia de aceites esenciales de A) orégano y B) eucalipto, a diferentes concentraciones durante 10 días.

Los resultados del porcentaje de inhibición del aceite de orégano se muestran en la Figura 13A. Al inicio del estudio (día 1) el control creció un 20% del total y en ambas concentraciones, el aceite de orégano limitó el crecimiento del hongo un 96% a la concentración de 2000 ppm y 100% a la concentración de 4000 ppm. En el día 6 de estudio se observa como el control alcanzó su máximo crecimiento, mientras que en esta prueba, el aceite de orégano inhibió el crecimiento en un 92 y 93% para las concentraciones de 2000 y 4000 ppm, respectivamente. Estas dos concentraciones siguen el mismo comportamiento trascurrido el estudio, teniendo un desempeño final de 91% de inhibición con respecto al control para ambas concentraciones.

El aceite de orégano exhibe una gran actividad antimicrobiana, análogo a los estudios realizados por Daferera *et al.* (2003), quienes analizaron aceites de orégano, tomillo, mejorana, lavanda y menta, encontrando una fuerte actividad antimicrobiana en el crecimiento de *Botrytis cinerea*, además de una inhibición dependiente de la dosis utilizada. *B. cinerea* fue totalmente inhibido por este aceite esencial en 200 µg/mL.

De la misma manera Vitoratos *et al.* (2013) indicaron al aceite de orégano como uno de los aceites más activos para la inhibición de *Botrytis cinerea*. En este estudio *B. cinerea* no muestra ningún crecimiento de micelio en presencia de aceite de orégano a la concentración de 0.02 µL/mL. Por otra parte, de acuerdo a Ozkan *et al.* (2010) los principales componentes del aceite de orégano fueron carvacrol, timol, γ -terpineno, p -cimeno, α -terpineno y α -pineno. Camele *et al.* (2012) observaron que el carvacrol a 250 ppm y timol en 150 y 250 ppm detuvieron el crecimiento de *B. cinerea*. En este sentido, carvacrol ha sido reconocido como uno de los monoterpenos más potentes con actividad antifúngica contra *B. cinerea* (Tsao y Zhou, 2000).


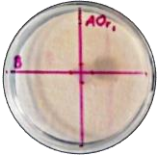
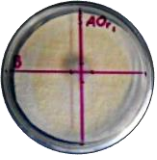
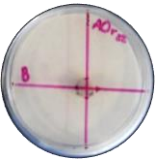
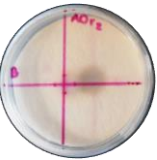
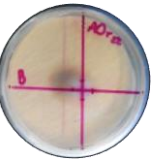
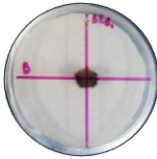
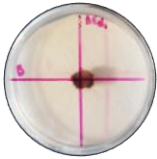
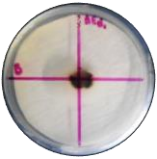
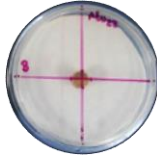
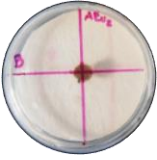
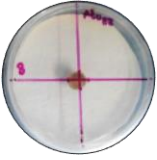
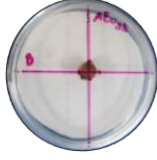
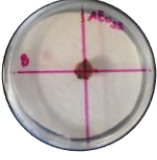
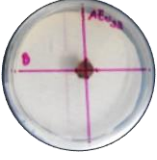
En el caso de aceite de eucalipto, resultados mostrados en la Figura 13B, se observa como las concentraciones de 4000 y 6000 ppm presentaron una inhibición total desde el primer día hasta finalizar el estudio. La concentración de 2000 ppm finaliza con un 65% de inhibición, sin embargo este crecimiento se observó solo en el día 10, pues fue inhibido en su totalidad durante los 9 días anteriores.

El aceite de eucalipto mostró 100% de inhibición en la prueba antifúngica contra *Botrytis cinerea* a 500 ppm reportado por Tripathi *et al.* (2008), de la misma manera Sun *et al.* (2007), quienes ponen a prueba cinco aceites esenciales de plantas como fumigantes contra hongos patógenos indicando al aceite esencial de eucalipto obtenido de *Eucalyptus citriodora*, como un fuerte antimicrobiano contra *B. cinerea* inhibiendo el crecimiento fúngico con un 91%. Si bien la inhibición de este hongo se ha reportado en muchos estudios, recordemos que esta actividad depende de la especie de eucalipto de la que se obtenga el extracto Satish *et al.* (2019).

Ambos aceites esenciales muestran inhibición contra *Botrytis cinerea*, sin embargo el aceite de eucalipto muestra resultados consistentes y certeros al inhibir en un 100%

El seguimiento fotográfico del crecimiento de *Botrytis cinerea* en presencia de aceite esencial de orégano y eucalipto se muestra en la Tabla 11, en la cual se presentan de manera visual lo descrito anteriormente.

Tabla 11. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de aceite de orégano y eucalipto en presencia de *B. cinerea* a diferentes concentraciones

Aceite orégano			
(ppm)	Día 1	Día 5	Día 10
2000			
4000			
Aceite eucalipto			
2000			
4000			
6000			

En la Tabla 11, el crecimiento en el día 5 de *B. cinerea* en las cajas Petri adicionadas con aceite esencial de orégano, se observa como un aro grisáceo, el cual es muy parecido al aro en el día 10, que como se discutió anteriormente solo varió de 2-3% de crecimiento. Las cajas Petri adicionadas con aceite de eucalipto a 4000 y 6000 ppm permanecen inalterables. A la concentración de 2000 ppm, es hasta el día 10 cuando se observa un pequeño crecimiento micelial del 35%.

Las 2 concentraciones utilizadas de aceite esencial de orégano en presencia de *Botrytis cinerea*, demuestran una eficacia similar sin diferencias significativas al finalizar el estudio, por lo tanto la concentración utilizada para la realización del objetivo 2 fue la menor,

2000 ppm. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron del crecimiento de *B. cinerea* en presencia de aceite esencial de eucalipto, la concentración seleccionada para su aplicación en el objetivo 2 es, 4000 ppm.

5.1.3. Pruebas *in-vitro* utilizando extractos etanólicos para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.*

El porcentaje de inhibición que presentan los extractos etanólicos utilizados en este estudio (extracto de orégano, eucalipto y gobernadora) contra el hongo *Colletotrichum sp.* están dados en la Figura 14.

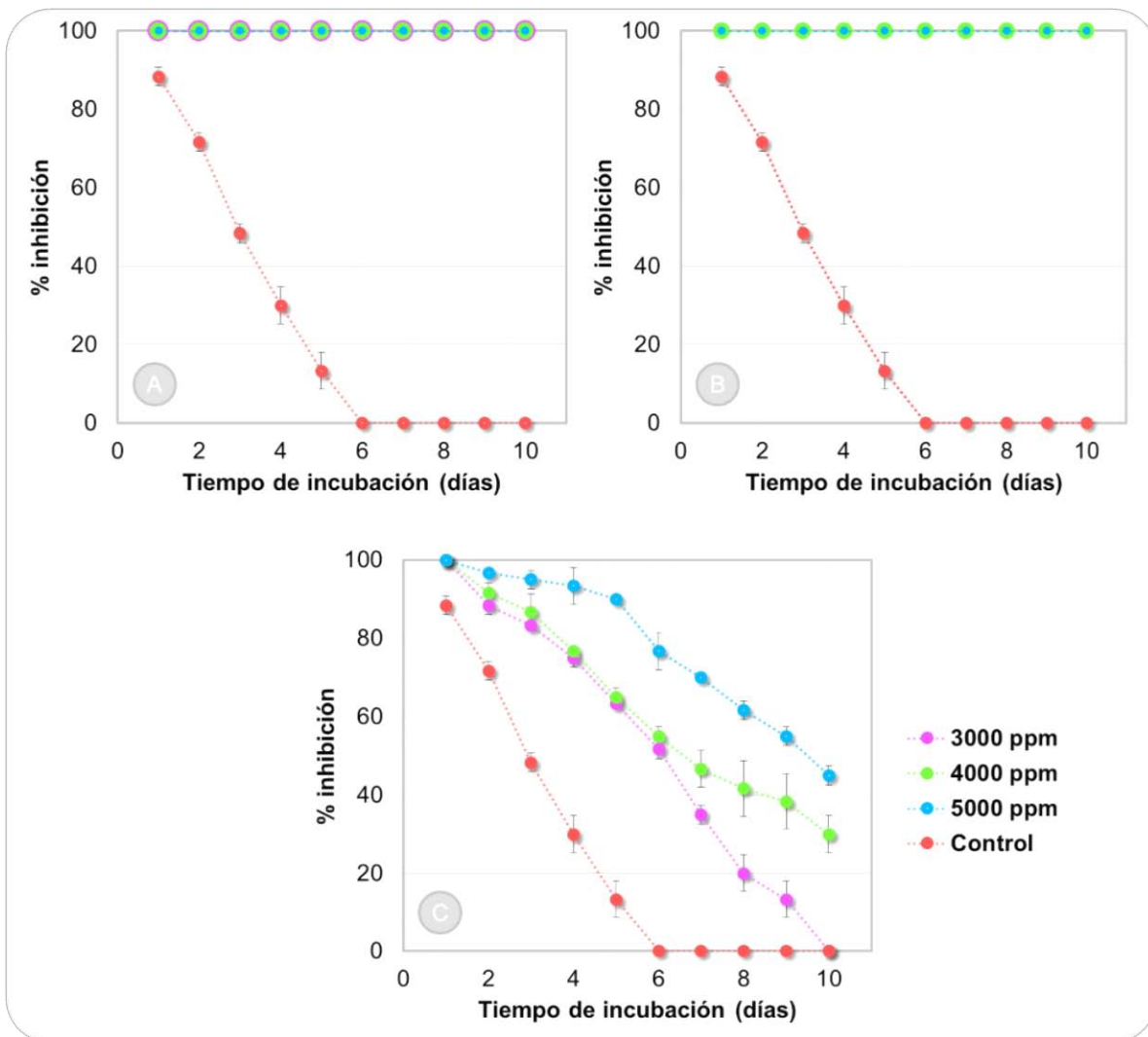


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum sp.* en presencia de los extractos etanólico de A) Orégano, B) Eucalipto y C) Gobernadora, a diferentes concentraciones durante 10 días.

De acuerdo a la Figura 14, *Colletotrichum sp.* presentó su máximo crecimiento micelial a partir del día 7, sin embargo también presentó inhibición del crecimiento en presencia de los extractos etanólicos de orégano, eucalipto y gobernadora durante todo el tiempo de estudio en cualquiera de las concentraciones utilizadas.

Los extractos de orégano y eucalipto (Figura 14 A y B) presentaron una inhibición al 100% en todas las concentraciones utilizadas desde el día 1, hasta finalizar el estudio. Avila-Sosa *et al.* (2011) reportaron la actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* para extractos etanólicos de orégano mexicano a 400 mg/L. En el mismo sentido, Bolivar *et al.* (2009) reportaron al extracto de orégano silvestre como el extracto más significativo para el control *in-vitro* e *in-vivo* de *C. gloeosporioides* indicando que en dosis bajas podría ser utilizado para prevenir la enfermedad causada por este hongo. El extracto de eucalipto, por otra parte, fue considerado como uno de los extractos con mayor potencial de inhibición en el crecimiento de este hongo *in-vitro* según Baños *et al.* (2004). Otros estudios como el de Hernández-Albíter *et al.* (2007), encontraron reducciones significativas sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* con extractos de ajo (*Allium sativum L.*), acuyo (*Piper auritum HBK.*), guayaba (*Psidium guajava L.*) y eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus Labill.*), evidenciando un efecto fungistático selectivo que dependió de la especie de la planta y del patógeno.

Caso contrario, el extracto de gobernadora, el cual aunque muestra inhibición del hongo *Colletotrichum sp.*, ésta no es al 100%. Sin embargo se muestra un efecto en el crecimiento del hongo con respecto a la concentración utilizada. En esta prueba (Figura 14C) la concentración de 5000 ppm fue la más efectiva a partir del día 2, con un 96% de inhibición conservando este alto valor hasta el día 5 donde escasamente disminuye hasta un 90%, a partir de este día el porcentaje disminuyó considerablemente para finalizar con un 45%. Al finalizar el estudio, la concentración de 3000 y 4000 ppm, finalizan con 0 y 30% de inhibición, respectivamente.

Los resultados indican actividad antimicrobiana en los tres extractos utilizados contra el crecimiento de *Colletotrichum sp.*, pero en particular, la mostrada por los extractos de orégano y eucalipto es más efectiva, que la mostrada por el extracto de gobernadora.

El seguimiento fotográfico se muestra en la Tabla 12 y 13, donde se muestra nulo crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.* en presencia del extracto de orégano y del extracto de eucalipto en todas las concentraciones utilizadas.

Tabla 12. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de los extractos de orégano y eucalipto en presencia de *Colletotrichum sp.* a diferentes concentraciones

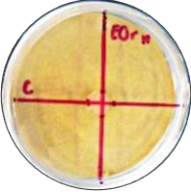
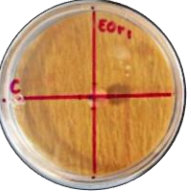
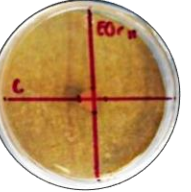
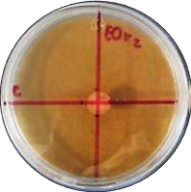
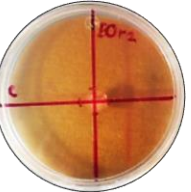
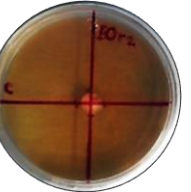
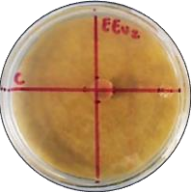
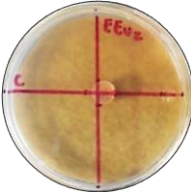
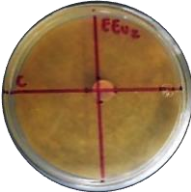
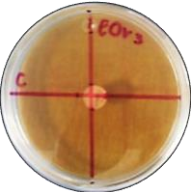
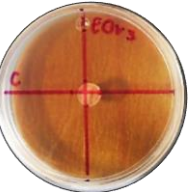
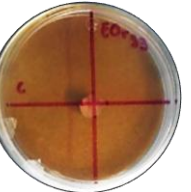
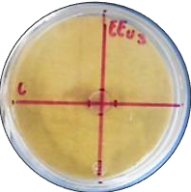
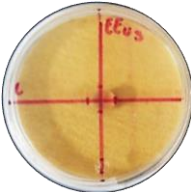
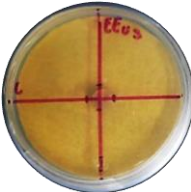
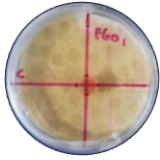
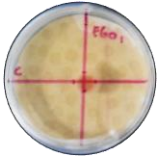
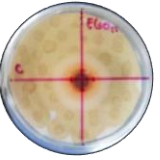
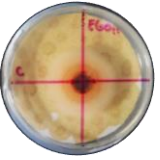
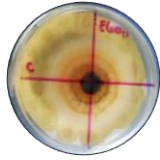
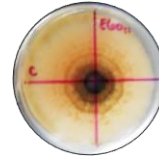
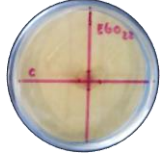

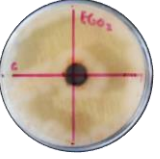
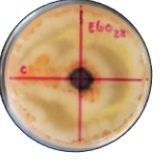
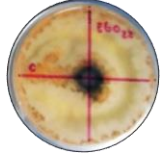
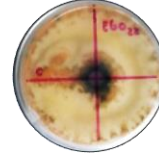

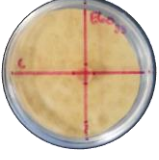



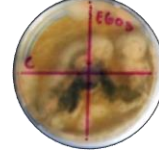
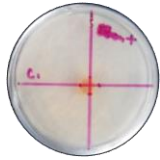
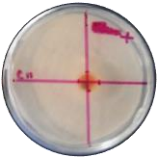
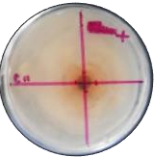
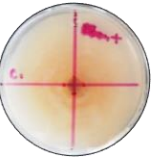
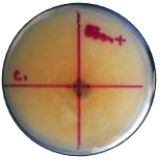
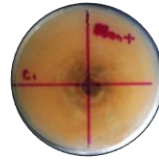
Extracto orégano				Extracto de eucalipto		
(ppm)	Día 1	Día 5	Día 10	Día 1	Día 5	Día 10
3000				--	--	--
4000						
5000						

Tabla 13. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de extracto de gobernadora en presencia de *Colletotrichum sp.* a diferentes concentraciones

Extracto de gobernadora						
(ppm)	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
3000						
4000						
5000						
Control						
Control						

El seguimiento fotográfico en Tabla 13 de *Colletotrichum sp.* en presencia de extracto de gobernadora, refleja la relación entre el crecimiento micelial y las concentraciones utilizadas. El crecimiento observado en el día 2 para las 3 concentraciones fue muy similar, pues en los 3 casos se observó un pequeño aro de micelio alrededor del disco central, el cual va creciendo gradualmente en cada una de las concentraciones. La concentración menor utilizada (3000 ppm), alcanzó un máximo de crecimiento en el día 10, mismo que el control mostró desde el día 6 de estudio, ganando un margen de 4 días en retrasar el crecimiento de este hongo.

5.1.4. Pruebas *in-vitro* utilizando aceites esenciales para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.*

El porcentaje de inhibición que muestran los aceites esenciales de orégano y eucalipto contra el crecimiento del hongo *Colletotrichum sp.* están representados en la Figura 15.

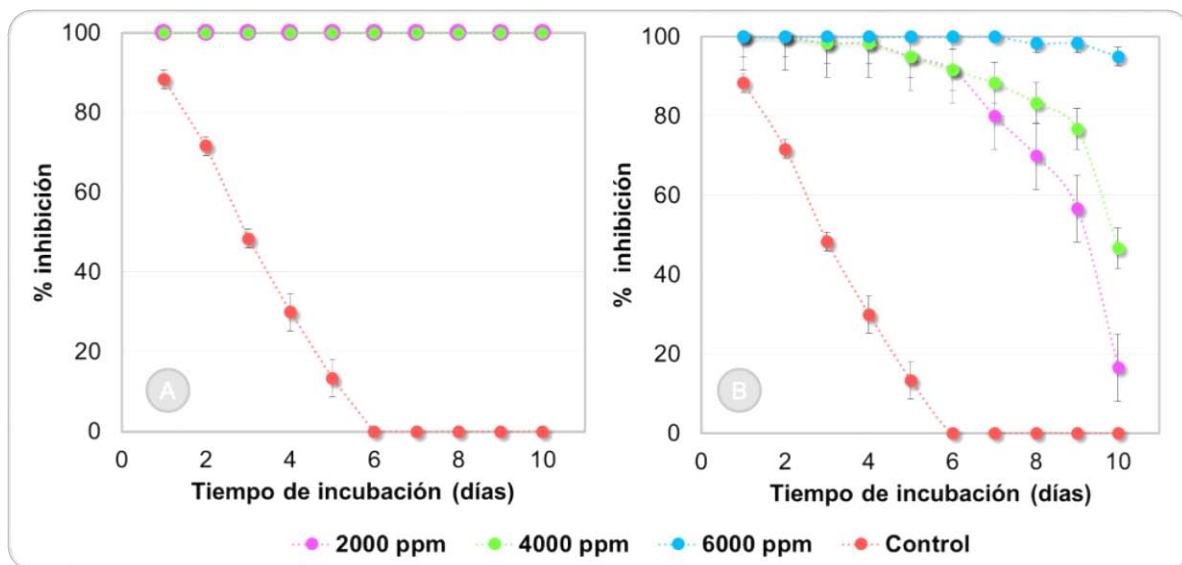


Figura 15, Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.* en presencia de aceites esenciales de A) Orégano y B) Eucalipto, a diferentes concentraciones durante 10 días.

La inhibición del crecimiento de *Colletotrichum sp.*, se observa en todas las concentraciones utilizadas en los dos aceites esenciales, aunque en menor medida en el aceite esencial de eucalipto.

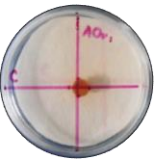
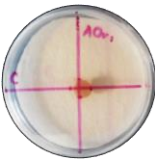
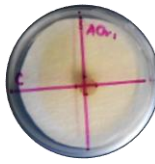
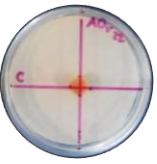
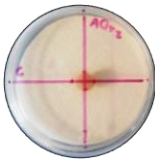
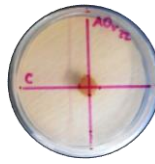
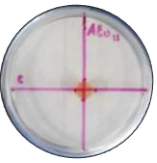
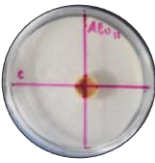
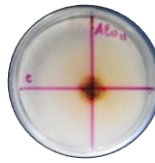
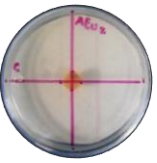
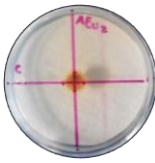
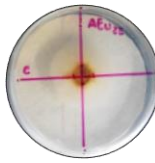
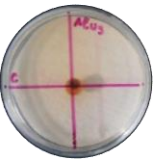
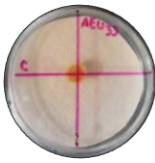
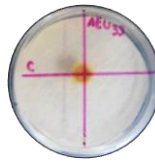
De acuerdo a la Figura 15A, el aceite esencial de orégano en presencia de *Colletotrichum sp* lo inhibe al 100% utilizando, 2000 y 4000 ppm. Si bien el aceite esencial de orégano muestra un amplio espectro contra hongos que afectan productos agrícolas, la actividad antimicrobiana demostrada en la literatura contra el género *Colletotrichum sp*. se encuentra bastante reducida.

Por otra parte, Barrera-Necha y García-Barrera (2008) encuentran al aceite esencial de eucalipto como un agente no antifúngico en el crecimiento de *Colletotrichum gloesporioides*, pues éste no presenta inhibición significativa contra el hongo, contrario a lo observado en este estudio. De la misma manera Mora *et al.* (2001) quienes describen a los aceites esenciales de las especies de eucalipto como los causantes de solo una pequeña inhibición contra *Colletotrichum gloesporioides*.

Si bien los resultados no concuerdan con lo reportado en los estudios citados, recordemos que, de acuerdo a Meléndez *et al.* (2009) la composición química de las plantas es compleja y depende de la época de colecta, la fenología de la planta y la altitud del lugar de crecimiento.

El seguimiento fotográfico de las pruebas *in-vitro* de *Colletotrichum sp*. adicionadas con los aceites esenciales de orégano y eucalipto se dan a conocer en la Tabla 14. De acuerdo a ésta, las pruebas *in-vitro* adicionadas con aceite esencial de orégano no manifiestan ningún crecimiento visible durante los 10 días de incubación. En las pruebas *in-vitro* adicionadas con aceite de eucalipto hay una relación entre la concentración utilizada y el crecimiento de micelio, se observa un crecimiento micelial menor en la concentración de 6000 ppm, en donde solo alcanzó un 5% de crecimiento al finalizar el estudio, mientras que las concentraciones menores (2000 y 4000 ppm) se observaron aros blancos con centro naranja y negro desde el día 5, los cuales crecieron gradualmente dando como resultado micelio de *Colletotrichum sp*. hasta un 85% de toda la superficie de la caja Petri en la concentración de 2000 ppm.

Tabla 14. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de aceite de orégano y eucalipto en presencia de *Colletotrichum sp.* a diferentes concentraciones.

Aceite orégano			
(ppm)	Día 1	Día 5	Día 10
2000			
4000			
Aceite eucalipto			
2000			
4000			
6000			

Las 2 concentraciones utilizadas de aceite esencial de orégano en presencia de *Colletotrichum sp.* demuestran una eficacia similar sin diferencias significativas, por lo tanto la concentración seleccionada para la realización del objetivo 2 fue la menor, 2000 ppm. La concentración elegida de aceite de eucalipto para la aplicación en el objetivo 2 fue de 6000 ppm, pues los resultados demuestran el mejor desempeño en la inhibición de *Colletotrichum sp.* durante todo el estudio y con diferencias significativas a partir del día 7 con la concentración de 4000 ppm.

5.1.5. Pruebas *in-vitro* utilizando extractos etanólicos para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de *Fusarium sp.*

El porcentaje de inhibición que presentaron los extractos etanólicos contra el hongo *Fusarium sp.* en este estudio, se muestran en la Figura 16, en ella se observa como los extractos de orégano, eucalipto y gobernadora mostraron inhibición en los 10 días de monitoreo, aunque en menor medida el extracto de gobernadora.

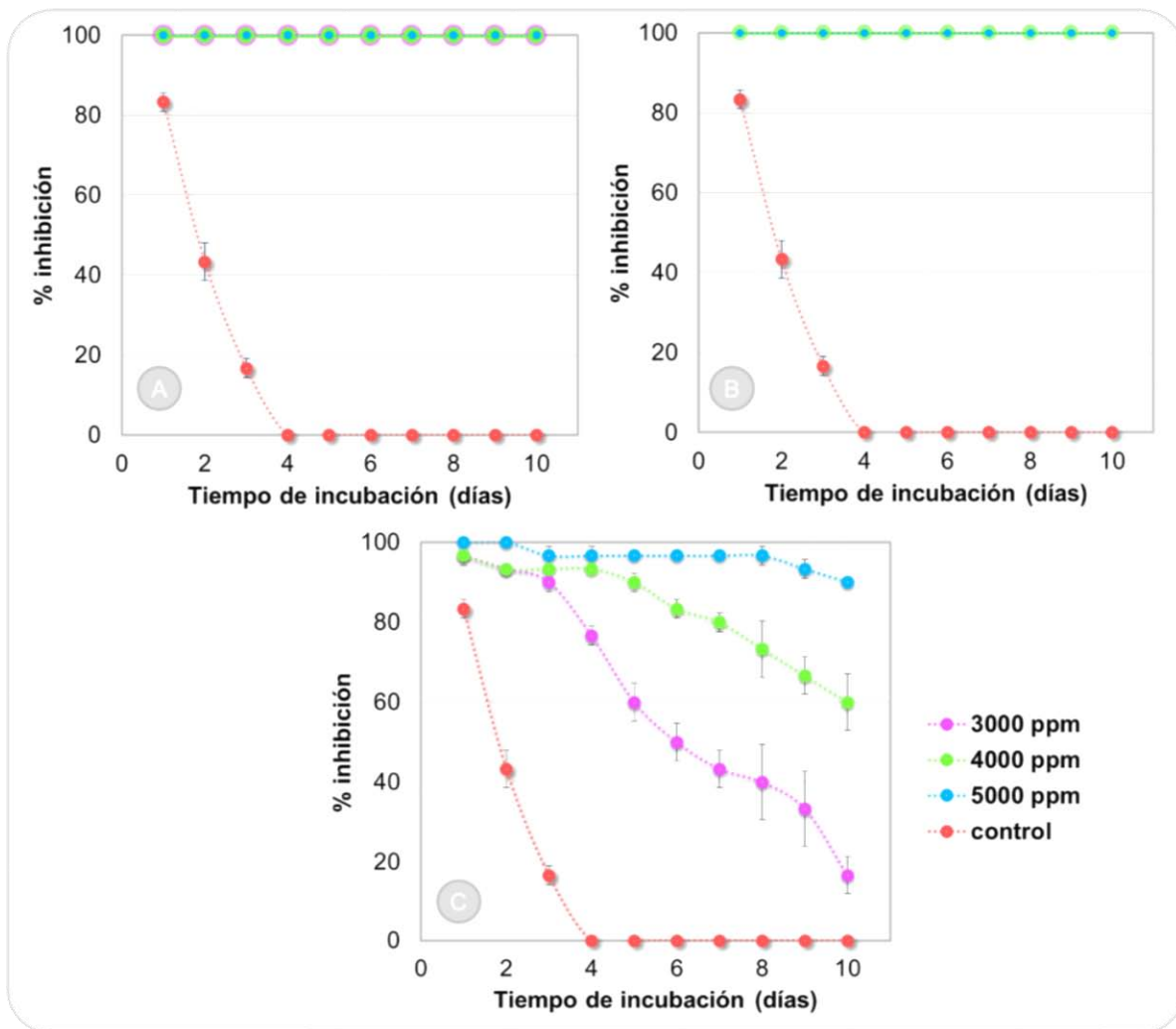


Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Fusarium sp.* en presencia de los extractos etanólicos de A) orégano, B) eucalipto y C) gobernadora, a diferentes concentraciones durante 10 días.

El extracto de orégano en conjunto con el extracto de eucalipto (Figura 16 A y B) presentan inhibición total en todas las concentraciones utilizadas desde el día 1 hasta finalizar el estudio.

Sanabria *et al.* (2006), reporta porcentajes de inhibición para dos especies de *Fusarium* obteniendo diferencias significativas entre ellos alcanzando un máximo de 90% para *Fusarium oxysporum f sp. cubense* y del 70% para *Fusarium oxysporum f sp. Lycopersici* utilizando extracto etanólico de orégano (*Lippia organoides H.B.K.*) a una concentración de 2.5%. Además Kocić-Tanackov *et al.* (2012), hace notar como el efecto inhibitor del extracto aumenta proporcionalmente con la concentración y también se ve afectada por la duración del tratamiento. Los resultados demuestran reducción de la colonia en un 81,71% para *F. proliferatum*, 85,84% en *F. oxysporum*, 86,50% en *F. verticillioides* y 88,85% en *F. subglutinans* a los 14 días de evaluación.

En diferentes estudios se demuestra el poder de inhibición que el extracto de orégano presenta en presencia de *Fusarium sp.*, sin embargo esta actividad inhibitoria depende totalmente de la especie de *Fusarium*, esta misma tendencia la presenta el extracto de eucalipto pues, Satish *et al.* (2009), evaluó el extracto de eucalipto en diferentes tipos de *Fusarium*, reportando porcentajes de inhibición considerablemente heterogéneos, pues para *F. proliferatum* se reporta un 81% de inhibición, mientras que para *F. semitectum* solo un 22%.

En discrepancia, el extracto de gobernadora exhibe inhibición contra el crecimiento de este hongo en las concentraciones de 5000, 4000 y 3000 ppm, pero ninguna muestra inhibición al 100% durante todo el estudio. Al iniciar el estudio (día 1) se presenta un elevado porcentaje de inhibición para las 3 concentraciones utilizadas (5000, 4000 y 3000 ppm), con valores de 100, 96 y 95%, respectivamente. A partir del día 5 las dos concentraciones más altas muestran un valor semejante con 96 y 91% siendo la concentración superior (5000 ppm) la que muestra el porcentaje superior. En contraste, la concentración de 3000 ppm ha separado sus valores y decreció desde el día 1 hasta finalizar el estudio con un porcentaje de inhibición con respecto al control solo de 16%. La concentración media utilizada (4000 ppm) finaliza el estudio con un porcentaje de inhibición solo del 55% con respecto al control, sin embargo ha mostrado buen desempeño, pues fue hasta el día 6 cuando se apreciaron diferencias significativas con respecto a la concentración mayor 5000 ppm. Por otra parte la concentración mayor (5000 ppm) conservó un alto porcentaje de inhibición desde el día 1 con un 100% y terminó el estudio solo diez unidades abajo (90%).

Coincidiendo con Suárez-Jiménez *et al.* (2007), quienes analizaron la actividad antifúngica de extractos metanólicos de plantas contra *Fusarium verticillioides*, los resultados mostraron que el extracto de gobernadora en todas las concentraciones

utilizadas, fue uno de los 2 extractos que mostraron la mayor efectividad controlando la germinación de esporas y el crecimiento micelial de este hongo.

Más tarde Mojica-Marin *et al.* (2011), indican al extracto de gobernadora con importante acción inhibitoria en el crecimiento de este hongo, pero además hace notar una marcada diferencia del efecto inhibitorio en relación a la región geográfica donde la planta de gobernadora es recolectada, obteniendo un porcentaje de inhibición de hasta un 90.3%.

El seguimiento fotográfico se muestra en la Tabla 15 para extracto de orégano y extracto de eucalipto con ninguno crecimiento visible en el disco central de la caja Petri durante los 10 días de estudio.

En la Tabla 16, el crecimiento de *Fusarium sp.* en presencia de extracto de gobernadora, se aprecia el efecto de la concentración en el crecimiento del hongo. En el día 4, las 3 concentraciones presentaron un comportamiento semejante, sin embargo es a partir de este día cuando el efecto de la concentración empieza a ser manifiesto, pues en la concentración más baja (3000 ppm) se observó como el crecimiento fue gradual a partir de este día mientras que el resto de las concentraciones el crecimiento se vio fuertemente inhibido por la presencia de los vapores del extracto de gobernadora dando lugar a un escaso crecimiento micelial de *Fusarium sp.* De las concentraciones utilizadas de extracto de gobernadora contra *Fusarium sp.* si bien ninguna mostró 100% de inhibición en los 10 días de estudio, el control mostrado en la Tabla 16, alcanzó su máximo crecimiento a partir del día 4, retrasando 6 días el crecimiento de este hongo.

Tabla 15. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de los extractos de orégano y eucalipto en presencia de *Fusarium sp.* a diferentes concentraciones.

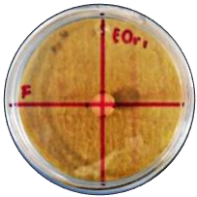
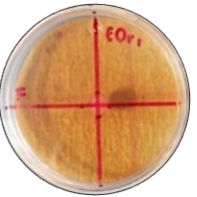
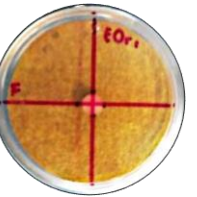
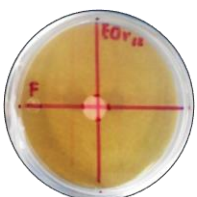
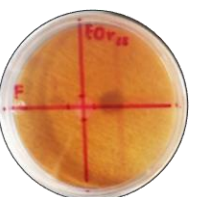
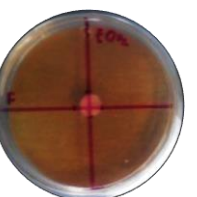
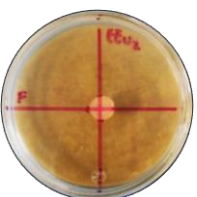
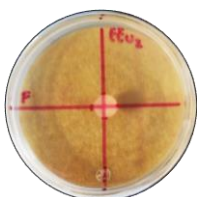
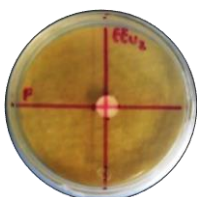
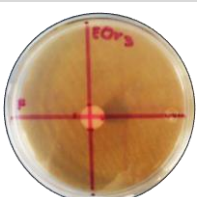
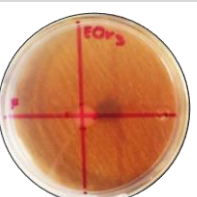
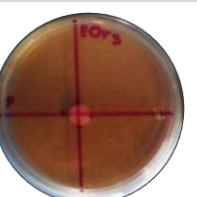
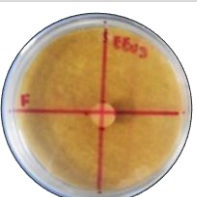
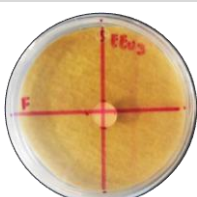
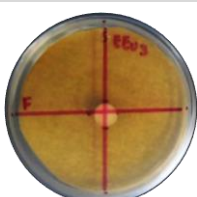
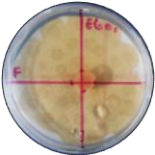
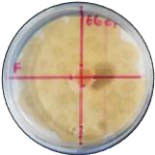
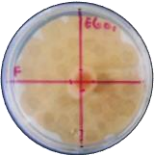
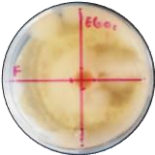
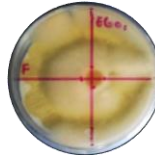
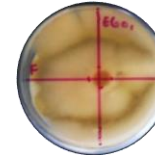




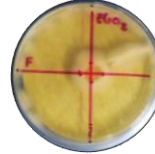
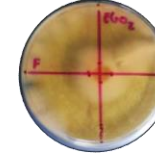
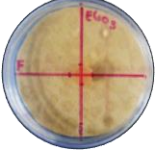



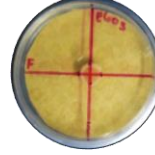
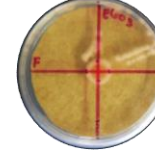
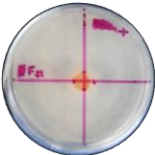
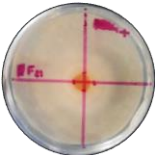
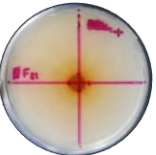
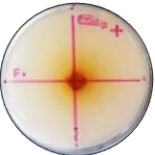
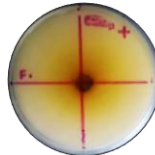
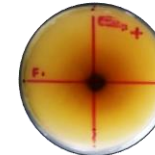
Extracto de orégano				Extracto de eucalipto		
(ppm)	Día 1	Día 5	Día 10	Día 1	Día 5	Día 10
3000						
4000						
5000						

Tabla 16. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de extracto de gobernadora en presencia de *Fusarium sp.* a diferentes concentraciones

Extracto de gobernadora						
(ppm)	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
3000						
4000						
5000						
Control						
Control						

5.1.6. Pruebas *in-vitro* utilizando aceites esenciales para establecer la concentración que inhiba el crecimiento micelial de *Fusarium sp.*

Los porcentajes de inhibición que muestran los aceites esenciales contra el crecimiento del hongo *Fusarium sp.* están presentados en la Figura 17.

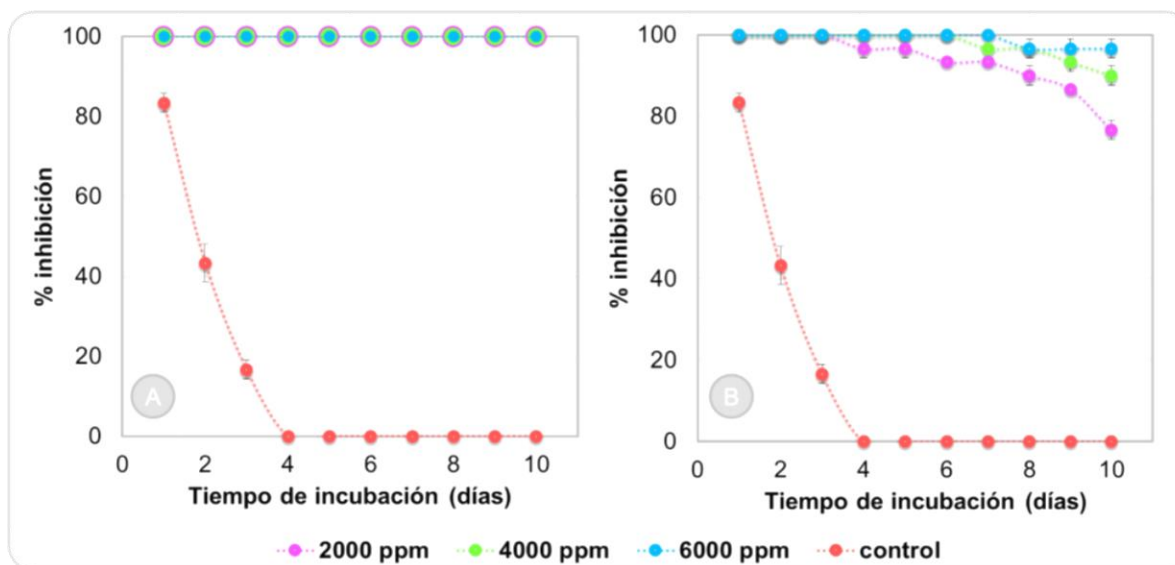


Figura 17. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Fusarium sp.* en presencia de aceites esenciales de A) Orégano y B) Eucalipto, a diferentes concentraciones durante 10 días.

La aplicación de aceites esenciales de orégano y eucalipto en las pruebas *in-vitro* a diferentes concentraciones inhibió el crecimiento micelial del hongo durante los 10 días de estudio en cualquiera de las concentraciones utilizadas. Siendo el aceite esencial de orégano (Figura 17A) el que muestra una inhibición absoluta en las tres concentraciones utilizadas, 2000, 4000 y 6000 ppm.

Con respecto a la actividad antimicrobiana del aceite de orégano, los resultados que presentan Cueto-Wong *et al.* (2010) en su estudio, demostraron claramente que el aceite esencial de orégano mexicano inhibió notablemente el desarrollo de *F. oxysporum*. Además se evaluó la diferencia entre los dos métodos de tratamiento, contacto directo y fase vapor del aceite esencial con respecto al crecimiento micelial de *F. oxysporum*. Se encontró a la inhibición dada por los volátiles de la fase vapor del aceite esencial, mayor que el método directo, donde la concentración mínima de aceite esencial requerida para la inhibición total

de crecimiento del micelio fue de 0,15 μL de aceite esencial/ mL aire, mientras que para el caso del método directo fue de 0,2 μL / mL de medio.

Los porcentajes de inhibición de las pruebas *in-vitro* de aceite esencial de eucalipto están mostrados en la Figura 17B, los cuales tienen una tendencia a aumentar conforme aumenta la concentración y mantienen similitud de valores a lo largo del estudio. Al día 1, las 3 concentraciones muestran 100 % de inhibición, en el día 4 la concentración más baja (2000 ppm) dista valores del resto, mientras las concentraciones de 4000 y 6000 ppm mantienen un comportamiento similar a lo largo del estudio. Al finalizar el estudio la concentración de 6000 ppm es la que muestra mayor inhibición con 98% con respecto al control. En esta prueba es hasta el día 10 cuando las 3 concentraciones muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$), antes de esto son estadísticamente iguales.

Resultados similares fueron reportados por Alzate *et al.* (2009), quienes evaluaron la actividad fúngica de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) sobre algunos hongos filamentosos, en los que figura *Fusarium oxysporum*, siendo este microorganismo el hongo que se vio menos afectado por los componentes del este aceite, pues fue inhibido a la concentración más alta propuesta (3000 ppm).

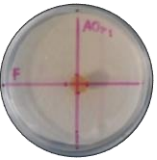
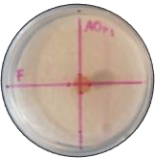
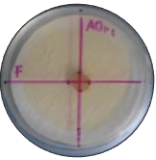
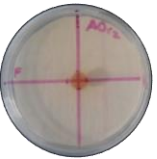
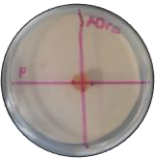
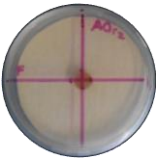
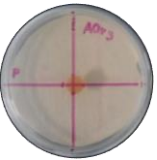
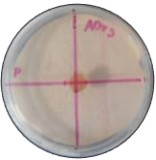
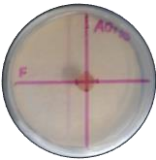
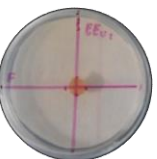
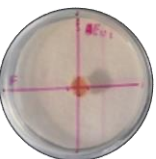
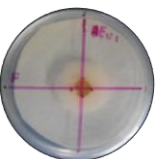
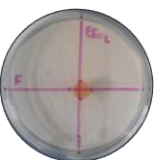
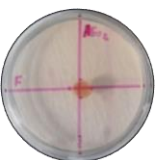
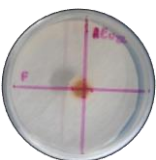
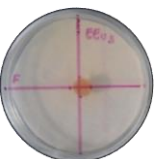
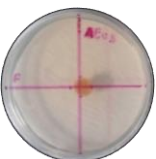
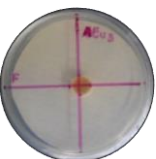
Por otro lado, Barrera-Necha y García-Barrera (2008), quienes evaluaron la actividad antifúngica de 9 aceites esenciales de plantas, entre ellos *Eucalyptus globulus*, así como diez compuestos de dichos aceites esenciales, frente a *Fusarium sp.* durante 8 días, en este estudio los resultados muestran una relación entre el aceite esencial de eucalipto y sus constituyentes, pues en ambos casos se presenta una baja actividad antifúngica sobre *Fusarium sp.*, pues no redujeron significativamente el crecimiento de micelio con respecto al control utilizando concentraciones de hasta 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en el caso del aceite esencial.

Es importante mencionar que aunque las cantidades utilizadas varíen en cada estudio, los autores reportan baja actividad antifúngica, pues se inhibe al hongo *Fusarium*, pero a grandes concentraciones. De la misma manera en este estudio, el aceite esencial de eucalipto muestra una baja actividad antifúngica, pues los porcentajes de inhibición aumentan conforme se aumenta la concentración.

De acuerdo a la Tabla 17, las pruebas *in-vitro* adicionadas con aceite esencial de orégano no muestran ningún crecimiento micelial visible durante los 10 días de incubación. En las pruebas *in-vitro* adicionadas con aceite de eucalipto se observa un pequeño aro micelial a una concentración de 2000 ppm en el día 5, creciendo gradualmente hasta alcanzar un 24% de la superficie al finalizar el estudio, mientras que en las concentraciones de 4000 y 6000 ppm se observó el mismo aro de color blanco, pero hasta el día 10.

Las dos concentraciones utilizadas de aceite esencial de orégano en presencia de *Fusarium sp.*, demuestran una eficacia similar sin diferencias significativas, por lo tanto la concentración utilizada para la realización del objetivo 2 fue la menor, 2000 ppm. La concentración de aceite esencial de eucalipto en presencia de *Fusarium sp.* elegida para la aplicación en el objetivo 2, fue de 6000 ppm, pues aunque las 3 concentraciones utilizadas tienen un comportamiento similar, es hasta el día 10 cuando las 3 concentraciones muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Tabla 17. Seguimiento fotográfico de pruebas *in-vitro* de aceite de orégano y eucalipto en presencia de *Fusarium sp.* a diferentes concentraciones.

Aceite orégano			
(ppm)	Día 1	Día 5	Día 10
2000			
4000			
6000			
Aceite eucalipto			
2000			
4000			
6000			

5.2. Realizar pruebas *in-vitro* utilizando matrices poliméricas (gelana y alginato) con los extractos naturales que presentaron la mayor actividad antifúngica en pruebas *in-vitro* que permitan establecer el control de *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*

La Figura 18, muestra la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenida en las pruebas *in-vitro* utilizando la matriz polimérica contra *B. cinerea* (Figura 18A), *Fusarium sp.* (Figura 18B) y *Colletotrichum sp.* (Figura 18C).

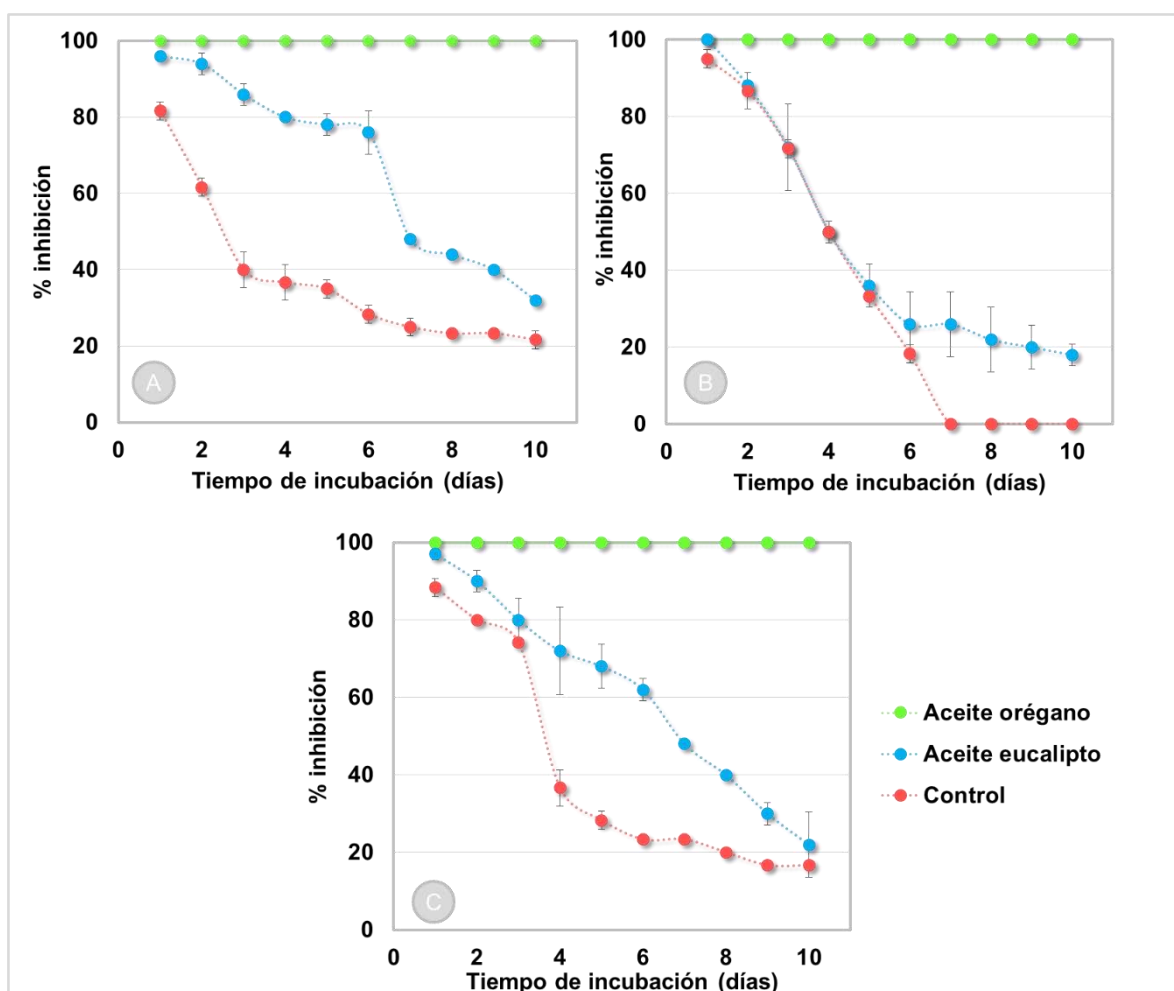


Figura 18. Porcentaje de inhibición mostrada por el aceite esencial de orégano y eucalipto contra *Fusarium sp.* (A), *Colletotrichum sp.* (B) y *B. cinerea* (C), durante 10 días de estudio.

En esta prueba se aprecia al aceite de orégano como el máximo inhibidor en los 3 hongos examinados, utilizando una concentración de 2000 ppm. Mientras el aceite de

eucalipto no resulto efectivo en la inhibición de los 3 hongos. 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 se han hecho estudios en fase vapor del aceite de tomillo contra *Eurotium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Pencillium sp.* sobre un simulador de pastel esponjoso (Guynot *et al.*, 2003) y contra *E. repens*, *A. flavus* sobre pan Pan Rye (Suhr y Nielsen, 2003), ambos estudios obtuvieron reducción significativa en el crecimiento microbiano. Años más tarde y siguiendo con la misma línea, López *et al.* (2007a, 2007b) realizó estudios de aceite de orégano, carvacrol, timol, entre otros, en una matriz de polipropileno, polietileno/etilen-vinil-alcohol en agar y difusión en vapor contra diferentes microorganismos como *L. monocytogenes*, *Sal. choleraesuis*, *A. flavus*, *C. albicans*, donde el aceite de orégano y los dos componentes estudiados mostraron inhibición total en todos los microorganismos.

El seguimiento fotográfico de *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* en presencia de aceite de orégano y aceite de eucalipto se muestra en las Tablas 18, 19 y 20, respectivamente.

Las pruebas *in-vitro* de *Botrytis cinerea* adicionadas con aceite esencial de orégano no muestra ningún crecimiento de micelio a lo largo de los 10 días de estudio, tal como se muestra en el seguimiento fotográfico. En discrepancia, las prueba *in-vitro* adicionadas de aceite esencial de eucalipto, el aro de micelio de *Botrytis cinerea* aparece desde el día 2, creciendo gradualmente y esparciéndose en pequeñas colonias en la superficie al terminar el estudio. El control no alcanza el 100% de crecimiento durante los 10 días de estudio, sin embargo el crecimiento que presenta en el día 6 es el mismo que el presentado por el aceite de eucalipto en el día 10, retrasando de esta manera 4 días el crecimiento de micelio de *Botrytis cinerea*.

En la Tabla 19, las pruebas *in-vitro* de *Fusarium sp.* adicionadas con aceite esencial de orégano no muestra ninguna crecimiento de micelio a lo largo de los 10 días de estudio, se observa en el seguimiento fotográfico como el disco central permanece inalterable. Mientras las pruebas *in-vitro* adicionadas con aceite esencial de eucalipto muestra el aro de micelio desde el día 2 creciendo gradualmente hasta obtener un crecimiento del 72%, parecido al crecimiento que muestra el control con un 79%.

Tabla 18. Seguimiento fotográfico del crecimiento de *Botrytis cinerea* en presencia de aceite de orégano (A) y eucalipto (B) encapsulados en la matriz polimérica

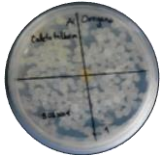
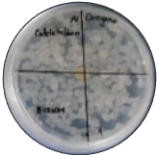
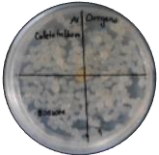
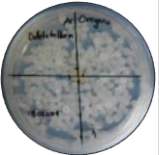
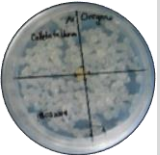
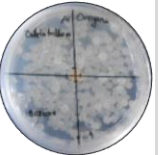
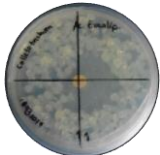
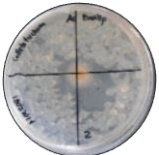
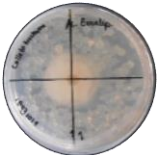
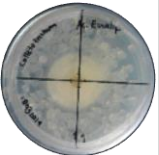
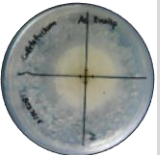

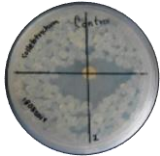
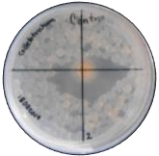
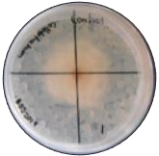
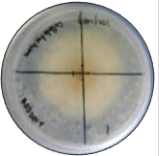
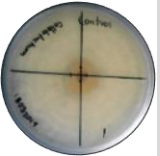
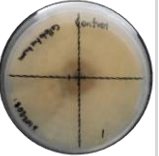
	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
(A) Aceite de orégano (2000 ppm)						
(B) Aceite de eucalipto (4000 ppm)						
Control						

Tabla 19. Seguimiento fotográfico del crecimiento de *Fusarium sp.* en presencia de aceite de orégano (A) y eucalipto (B) encapsulados en la matriz polimérica

	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
(A) Aceite de orégano (2000 ppm)						
(B) Aceite de eucalipto (6000 ppm)						
Control						

En Tabla 20, las pruebas *in-vitro* de *Colletotrichum sp.* adicionadas con aceite esencial de orégano al igual que los 2 hongos anteriores, permanece sin crecimiento. Mientras tanto el control alcanza su máximo crecimiento en la caja Petri desde el día 7. *Colletotrichum sp.* en presencia de aceite de eucalipto mantiene un crecimiento constante durante los 10 días de evaluación, alcanzando un máximo de 80% de crecimiento en la caja Petri, el micelio observado, si bien no es un aro definido en la circunferencia exterior, se observa como el micelio está avanzando porque la transparencia de la caja Petri disminuye.

Tabla 20. Seguimiento fotográfico del crecimiento de *Colletotrichum sp.* en presencia de aceite de orégano (A) y eucalipto (B) encapsulados en la matriz polimérica

	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
(A) Aceite de orégano (2000 ppm)						
(B) Aceite de eucalipto (6000 ppm)						
Control						

5.3. Cinética de degradación de los compuestos bioactivos de extractos naturales.

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 19, aceite esencial de orégano en el interior de la matriz polimérica (Figura 19A) y del aceite esencial de orégano sin encapsular (Figura 19B).

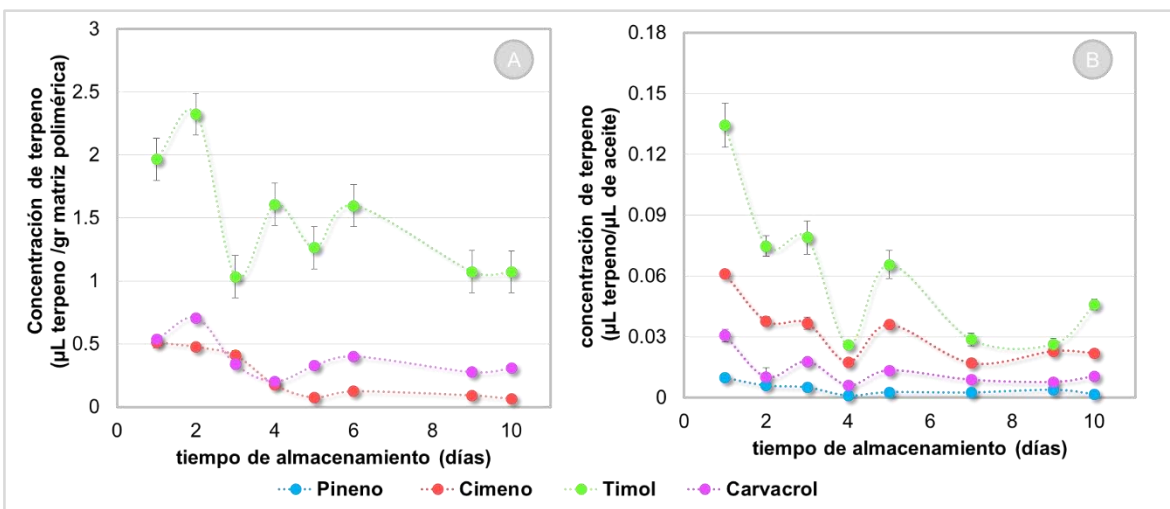


Figura 19. Cinética de degradación de los principales componentes del aceite de orégano en la matriz polimérica (A) y del aceite de orégano solo (B), durante 10 días de estudio.

Timol y cimeno son los componentes mayoritarios estudiados en el aceite esencial de orégano (Figura 19B) sin encapsular, sin embargo en la liberación de los compuestos en la matriz polimérica (Figura 19A) timol y carvacrol son los componentes mayoritarios, lo que indica una interacción del cimeno con los componentes de esta matriz (alginato/gelana), al igual que el pineno, pues esta sustancia solo figura en el aceite esencial sin encapsular.

No hay estudios relacionados con aceite esencial de orégano encapsulado en una matriz polimérica como la descrita en este estudio, por otra parte los resultados obtenidos de aceite sin encapsular son similares al estudio realizado por Espinosa (2012), quien elaboró un análisis de 14 componentes de aceite de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) por cromatografía de gases-masas, obteniendo como componentes mayoritarios al carvacrol (50.54%), cimeno (38.96%) y timol (3.02%), Si bien, se trata de orégano mexicano, recordemos que, la composición química del orégano es compleja y depende de la época de colecta, la fenología de la planta y la altitud del lugar de crecimiento. Asimismo, se sabe que la concentración del timol y el carvacrol es mayor en plantas jóvenes, aunque dicho valor no se afecta por la cantidad de agua que recibe la planta durante su desarrollo (Meléndez *et al.*, 2009).

La permanencia de los componentes tales como carvacrol y timol del aceite esencial de orégano en la matriz polimérica se presenta en mayor 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 fueron de tan solo 46 y 43% respectivamente. Consecuentemente hay 20-23% menos pérdida de los componentes contenidos en la matriz polimérica, dando como resultado una retención de estos componentes en la matriz permitiendo una liberación prologada y acción antimicrobiana controlada a lo largo del estudio. Estos compuestos tienen un amplio espectro antimicrobiano contra diferentes patógenos y microorganismos causales del deterioro de los alimentos, incluidas las especies Gram-negativas tal como *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, y *Sal.choleraesuis*; las bacterias Gram-positivas tales como *L. monocytogenes*, *estafilococos Aureus*; levaduras tales como *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*; y mohos tales como *Alternaria*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *A. flavus*, *penicillium roqueforti* (Kuorwel *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados anteriores, se concluye:

- El extracto etanólico y aceite esencial de orégano muestran un potente poder antifúngico contra los hongos *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* a 2000 ppm, inhibiendo totalmente el crecimiento micelial de estos hongos; sin embargo para el control de *B. cinerea* se necesitaron emplear concentraciones más altas (5000 ppm) de extracto etanólico para obtener resultados similares. Indicando que este hongo es más resistente a los extractos obtenidos.
- Las pruebas *in-vitro* de los extractos etanólicos provenientes de orégano, eucalipto y gobernadora no tienen seguimiento en el objetivo 2 dada la disposición física de la técnica utilizada, pues esta no permite la cuantificación del poder inhibitorio de los vapores de fenoles contenidos en las plantas, pues también cuantifica el poder inhibitorio de los vapores de etanol.
- El aceite de eucalipto encapsulado en la matriz polimérica alginato/gelana disminuye su capacidad antifúngica ante *Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp* y *B. cinerea*, lo que indica interacciones entre los componentes de este aceite esencial y los polímeros utilizados.
- En el aceite esencial de orégano se cuantificaron los siguientes componentes: timol, carvacrol, cimeno y pineno, de los cuales el timol fue el compuesto de mayor concentración.
- La matriz polimérica presenta 20-23% menos pérdida de carvacrol y timol en comparación a la pérdida de compuestos bioactivos en el aceite esencial sin encapsular, dando como resultado una liberación controlada manteniendo activos por más tiempo estos compuestos y reduciendo el crecimiento de *Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp.* y *B. cinerea* de manera constante durante todo el estudio.
- El aceite esencial de orégano es la mejor opción para el desarrollo de un envase activo utilizando la matriz polimérica de gelana/alginato pues a pesar de que algunos de sus componentes como el *p*-cimeno y α -pineno presenten una posible interacción con la matriz polimérica, la actividad del aceite esencial de orégano mantuvo su efectividad durante los 10 días de estudio.

7. RECOMENDACIONES

- Estudiar la sinergia de los vapores de etanol y los vapores de los compuestos fenólicos contenidos en los extractos etanólicos.
- Realizar pruebas *in-vitro* de los hongos *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* con concentraciones más bajas de extractos vegetales de orégano propuestas en este trabajo.
- Estudiar el sinergismo entre el aceite esencial de orégano y eucalipto, así como otras plantas.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano encapsulado en la matriz polimérica gelana/alginato contra otros hongos o bacterias importantes en los alimentos como *E. coli* y *Salmonella*.
- Evaluar la liberación del aceite esencial de eucalipto en diferentes matrices poliméricas.

8. REFERENCIAS

- Acevedo, D.; Navarro M. y Monroy L. (2013). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). Información Tecnológica. 24 (4): 43-48.
- AIMPLAS. (2014) ¿Qué son los envases activos? Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://www.aimplas.es/blog/que-son-los-envases-activos>
- Alzate, N.; López, V.; Marín, H. y Murillo, A. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Revista Tumbaga. 4: 59-71.
- Appendini, P. y Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 3 (2): 113-126.
- Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana. 17: 11-22.
- Arcila-Lozano C. C.; Loarca-Piña G.; Lecona-Uribe S. y González E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54 (1): 100-111.
- Arenaza, A. (2013). La industria del empaque y las IMMEX en México. Desarrollo Económico del Norte 1. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://expo-packing.mx/wp-content/uploads/2013/12/La-industria-del-empaque-y-las-IMMEX-en-M%C3%A9xico.pdf>
- Arguedas-Gamboa, M.; Cots-Ibiza, J. (2012). La “antracnosis” (*Colletotrichum spp.*) en viveros forestales. Revista Forestal Mesoamericana Kurú. 9 (22): 2215-2504.
- Avila-Sosa, R.; Gastélum-Reynoso, G.; García-Juárez, M.; De la Cruz Meneses-Sánchez, M.; Navarro-Cruz, A. R. y Dávila-Márquez, R. M. (2011). Evaluation of Different Mexican Plant Extracts to Control Anthracnose. Food and Bioprocess Technology. 4 (4): 655-659.
- Bakkali, F.; Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. Food and Chemical Toxicology. 46: 446–475.
- Baños, P. E.; Zavaleta, E.; Colinas, M. T.; Luna, I.; Gutiérrez, J. G. (2004). Control Biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en Papaya Maradol Roja (*Carica papaya L.*) y Fisiología Postcosecha de Frutos Infectados. Revista Mexicana de Fitopatología. 22 (2): 198-205.

- Barrera-Necha, L. L. y García-Barrera, L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista UDO Agrícola. 8 (1): 33-41.
- Bolívar, K.; Sanabria, M. E.; Rodríguez, D.; De Camacaro, M.; Ulacio, D.; Cumana, L. J. y Crescente, O. (2009). Revista UDO Agrícola. 9 (1): 175-181.
- Brown, W. E. (1992). Plastics in Food Packaging. Properties, Design, and Fabrication. Nueva York, EUA. Marcel Dekker Inc.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (3): 223-253.
- Burt, S.A. Fledderman, M.J.; Haagsman, H.P.; Knapen, F.V. y Veldhuizen E.J. A. (2007). Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. International Journal of Food Microbiology. 119: 346-350.
- Burt, S.A. y Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology. 36:162-167.
- Camele, I.; Altieri, L.; De Martino, L.; De Feo, V.; Mancini, E. y Rana, G.L. (2012). *In-vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oils components. International Journal of Molecular Sciences. 13: 2290- 2300.
- Camo, J. B. y Roncales, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. Meat Science. 80 (40): 1365-1370.
- Castillo, O. (2011) Nutrición y *Bacillus subtilis* en el control de marchitamiento por *Fusarium spp.* en tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.) en Sinaloa. Tesis para obtener el Grado de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Coles, R.; McDowell, D.; Kirwan, M.J. (2004). Manual del envasado de alimentos y bebidas. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa.
- Corella-Bernal, R. A. y Ortega-Nieblas, M. M. (2013). Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 15 (1): 57-64.
- Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E. y Palmas, F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology 29:130-135.
- Cueto–Wong, M. C.; Rivas–Morales, C.; Alanís–Guzmán, M. G.; Oranday–Cárdenas, A.; Amaya–Guerra, C. A.; Núñez–González, A.; Samaniego–Gaxiola, J. A. y Cano–Ríos,

- P. (2010). Propiedades antifúngicas del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Revista Mexicana de Micología. 31: 29-35.
- Daferera, D. M.; Ziogasb, B. N. y Polissioua, 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.
- Dainelli, D.; Gontard, N.; Spyropoulos, D.; Zondervan-van den Beuken, E.; Tobback P. (2008). Active and Intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. Food Science and Technology. 19: S103-S112.
- Dao, T.; Bensoussan, M.; Gervais, P. y Dantigny, P. (2008). Inactivation of conidia of *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum* and *P. italicum* by ethanol solutions and vapors. International Journal of Food Microbiology. 122 (1-2): 68-73.
- Delanquis, P.; Stanich, K.; Girard, B. y Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology. 74 (2): 101-109.
- Díaz, N. A. (2013). Obtención y evaluación *in-vitro* de la eficiencia de extractos con principios activos de eucalipto (*Eucalyptus Globulus*), ajo (*Allium Sativum*) y crisantemo (*Chrysanthemum Cinerariaefolium*) como fungicidas naturales para el control de *Botrytis cinerea*, *Phragmidium Mucronatum* y *Sphaerotheca Pannosa* presentes en el cultivo de rosas orgánicas. Tesis para obtener el Grado de Ingeniería en Biotecnología. Centro de Educación Superior ESPE. Sede Sangolquí. Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador.
- Djilani, A. y Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. En J. Bouayed y T. Bohn (Ed.), Nutrition, Well-being and Health (pp. 179-203). Rijeka, Croacia. InTech.
- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88: 308-316.
- 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 Research. 47 (2): 117-121.
- Elaissi, A.; Salah, K. H.; Mabrouk, S.; Larbi, M. K.; Chemli, R. y Harzallah-Skiri, F. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species essential oils. Food Chemistry. 129: 1427-1434.
- ELIKA (2012). Envases inteligentes para alimentos nuevas tecnologías para la industria alimentaria. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. BEREZI@ 16.

- Espinosa, F. J. (2012). Análisis por cromatografía de gases-masas del aceite de orégano marca "Ore". Centro de Investigaciones en Ecosistemas Unidad Michoacán, UNAM. México.
- Fernández, M. A. (2000). Revisión: Envasado activo de alimentos. *Food Science and Technology International*. 3: 97-108.
- Fisher, K. y Phillips C. (2008). Potencial antimicrobial uses of essential oils in food; is citrus the answer? *Food Science and Technology*. 19 (3): 156-164.
- Flores, A. L.; Hernández, A. L.; Valladares, M. G. (2004). Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *Lippia graveolens* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto) en *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*. Trabajo para obtener el Grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Fonnegra, R.; Jiménez S. (2007). Plantas medicinales en Colombia. Medellín, Colombia. Departamento de Publicaciones, Universidad de Antioquia.
- Friedman, M.; Buick, R. y Elliot, C.T. (2004). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*. 67: 1774-1778.
- Gemili, S. Y. y Altunkana, S. A. (2009). Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging material for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*. 90: 453-462.
- González, M. C.; Soto, M.; Kite, G.; Martínez, M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri Schauer*). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30 (1): 43-49.
- Goñi, P.; Sánchez, C.; Gómez-Luis, R.; Becerril, R. y Nerín C. (2009). Antimicrobial activity in the vapor phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 116 (14): 982-989.
- Granados-Sánchez, D.; Martínez, M.; López, G. F.; Borja, A.; Rodríguez, G. A. (2013). Ecología, aprovechamiento y comercialización del orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.). *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 19 (2): 305-321.
- Guynot, M. E.; Ramos, A. J.; Setó, L.; Purroy, P.; Sanchis, V. y Marín, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly

- causing deterioration of bakery products. *Journal Applied Microbiology*. 94 (5): 893–9.
- Hernández-Albíter, R. C.; Barrera-Necha, L. L.; Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna, L. (2007). Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum Gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. *Mexican Journal of Phytopathology*. 25 (1): 86-89.
- Hernández-Suárez, M.; Lira-Saldivar, R. H. y Lucio-Ángeles, M. (2013). Quitosán y extractos de *Larrea tridentata* como antifúngicos orgánicos contra *Botrytis cinerea*. Consultado: Agosto 2015. Disponible en: http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/5/2013/trimestrales/anexo_1070-5-2013-11-2.pdf
- Hispack. (2012). El envase inteligente en nuestros días. Consultado: Agosto 2015. Disponible en: <http://www.packaging.enfasis.com/articulos/65647-el-envase-inteligente-nuestros-dias>
- Holz, G.; Coertze, S. y Williamson, B. (2007). The ecology of Botrytis on plant surfaces. En Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P.; Delen, N. (Ed.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 9-27). Países Bajos: Springer Netherlands.
- Huerta, C. (1997). Orégano Mexicano: oro vegetal. *CONABIO. Biodiversitas*. 15: 8-13.
- Intra, B.; Mungsuntisuk, I.; Nihira, T.; Igarachi, Y. y Panbangred, W. (2011) Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum spp*, the causative agent of anthracnose disease. *BMC Research Notes*. 4:1-9.
- Juárez-Becerra, G. P; Sosa- Morales, M. E. y López-Malo, A. Hongos patógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Consultado: Julio 2015. Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medical Chemistry*. 10 (10): 813-829.
- Kiwanja (2007). El eucalipto, una especie polémica. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://www.iberomx.com/web/files/22kiwanja%20.pdf>
- Kocić-Tanackov, S. D.; Dimić, G. R.; Tanackov, I. J.; Pejin, D. J.; Mojović, L. V. y Pejin, J. D. (2012). Antifungal activity of Oregano (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. *Hemijaska Industrija*. 66 (1): 33–41.

- Kuorwel, K.; Cran, M.; Sonneveld, K.; Miltz, J. y Bigger, S. (2011). Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *Journal of Food Science*. 76 (9): R164-R177.
- 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.
- Lee, D.S.; Yam. K. L. y Piergiovanni, L. (2008). *Food packaging science and technology*. EUA. CRC Press Book.
- Lira-Saldivar, R. H.; Hernández-Suárez, M.; Hernández-Castillo, F. D. (2006). Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 12 (2): 211-216.
- López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R. y Nerín, C. (2005) Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (17): 4348-4356.
- López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R. y 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. y Nerín, C. 2007b. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (21):8814–24.
- López-Malo, A.; Palou, E.; Leon-Cruz, R. y Alzamora, S. (2005). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Advances on Food Mycology*. 571 (4): 261-286.
- López-Rubio, A.; Almenar, E.; Hernández-Muñoz, P.; Lagaron, J.M.; Catala, R., Gavara, R. (2004). Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Reviews International*. 20(4): 357–87.
- Meléndez, N. P.; Rodríguez, R.; Aguilar, C. N.; Silva, R.; Nevarez, G. V. (2009). El orégano mexicano. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC20/CC20oregano.html>
- Meyer, A. S.; Suhr, K. L.; Nielsen, P.; Lyngby, H. F. (2002). Natural food preservatives. En T. Ohlsson y N. Bengtsson (Ed.), *Minimal processing technologies in the food industry* (pp. 124-161). Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited.
- Mojica-Marín, L. V.; Luna-Olvera, H. A.; Sandoval-Coronado, C. F.; Morales-Ramos, L. H.; González-Aguilar, N. A.; Pereyra-Alfárez, B.; Ruiz-Baca, E. y Elías-Santos, M. (2011).

- In-vitro* antifungal activity of “Gobernadora” (*Larrea tridentata* (D.C.) Coville) against *Phytophthora capsici*. African Journal of Agricultural Research. 6 (5): 1058-1066.
- Mora, A. L.; Torres, R.; Afanador, L.; Hernández, C. L.; Hoyos, R. A. (2001). Actividad antifúngica de aceites esenciales contra el hongo *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz), Penz & Sacc. XXII Congreso de la Asociación Colombiana De Fitopatología Y Ciencias Afines (ASCOLFI). Julio 11-13. Colombia.
- Muñoz, L. M. (2002). Plantas medicinales españolas *Origanum Vulgare* L. (*Laminaceae*) (OREGANO). Acta Botanica Malacita. 27: 273- 280.
- Núñez, V. (2012). Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en: Producción Agrícola Sustentable. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Oh, S.; Kim, J. A.; Jeon, H.; Park, J. C.; Koh, Y. J.; Hur, H. y Hur, J. (2008). Antifungal activity of eucalyptus-derived phenolics against postharvest pathogens of kiwifruits. Plant Pathology Journal. 24 (3): 322-327.
- Ozkan, G.; Baydar, H. y Erbas, S. (2010). The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture. 90: 205-209.
- Padgett, T.; Han, I.Y. y Dawson, P.L. (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. Journal Food Protection. 61 (10): 1330-1335.
- Pérez L. M.; Saquero, M. J.; Beltrán, J. D. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. 5 (1): 24-35.
- Quintavalla, S. y Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat Science. 62: 373-380.
- Reyes-Jurado, F.; Palou, E. y López-Malo, A. (2012). Vapores de aceites esenciales: Alternativa de antimicrobianos naturales. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Fundación Universidad de las Américas Puebla. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 6 (1): 29-39.
- Ríos, R. (2010). Comparación de perfiles de flavonoides de orégano (*Lippia graveolens* HBK. s.l.) de varias poblaciones del Estado de Durango. Tesis para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental. Centro Interdisciplinario de

- Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Rubio, S.O. (2013). Revisión de los avances en el desarrollo de polímeros biodegradables, su producción y comercialización en México para su uso en envase y embalaje (Packaging). Tesis para obtener el Grado de Licenciatura en Diseño Industrial. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Rupika, L. A. (2010). Development and evaluation of density polyethylene-based antimicrobial food packaging films containing natural agents. Tesis para obtener el Grado de <<Doctor of Philosophy>>. Unit Faculty of Health, Engineering and Science. Universidad Victoria. Melbourne, Australia.
- Rzedowski, J.; Calderón, G. (2002). VERBENACEAE. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOBA/Flora%20100.pdf>
- SAGARPA, (2013a). Crea INIFAP nueva tecnología para la producción de orégano resistente a fenómenos climáticos. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2013B033.aspx>
- SAGARPA, (2013b). Monografía Eucalipto. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Especias/Eucalipto.html>
- Sanabria, M. E.; Rodríguez, D. y Rodríguez, J. L. (2006). Inhibición de hongos fitopatógenos con extractos de *Phyllanthus niruri* L. y *Lippia organoides* (H.B.K.). Consultado: Agosto 2015. Disponible en: <http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2006/CD%20Congreso%20Zaragoza/Ponencias/77%20Sanabria%20Com-%20Inhibici%C3%B3n.pdf>
- Satish, S.; Raghavendra, M. P. y Raveesha, K. A. (2009). Antifungal potentiality of some plant extracts against *Fusarium* sp. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 42 (7): 618-625.
- Slinkard, K. y Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viniculture. 28: 49-55.
- Solórzano-Santos, F. y Miranda-Navales, M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. 23 (2): 136-141.
- Suárez-Jiménez, G. M.; Cortez-Rocha, M. O.; Rosas-Burgos, E. C.; Burgos-Hernández, A.; Plascencia-Jatomea, M. y Cinco-Moroyoqui, F. J. (2007). Antifungal activity of

- plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B₁ production. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 134–142.
- Suhr, K.I. y Nielsen, P.V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 665-674.
- Sun, O. L.; Gyung, J. C.; Kyoung, S. J.; He, K. L.; Kwang, Y. C. y Jin-Cheol, K. (2007). Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*. 23 (2): 97-102.
- Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K. y Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal Food Science*. 68 (2): 408-420.
- Tajkarimi, M.; Ibrahim, S. y Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21 (19): 1199-1218.
- Tripathi, P.; Dubey, N. K. y Shukla, A. K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 39-46.
- Tsao, R. y Zhou, T. (2000) Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research*. 12 (1): 113-121.
- Tyagi, A. K. y Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 126: 228-235.
- Vermeiren, L.; Devlieghere, F. y Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants*. 19: 163–71.
- Villavicencio, E. E.; Cano, A.; García, X. (2010). Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente Coahuila. Consultado: Julio 2015. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2704/850.pdf?sequence=1>
- Vitoratos, A.; Bilalis, D.; Karkanis, A.; Efthimiadou, A. (2013). Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 41 (1): 86-92.
- Yáñez, X.; Mogollón, C.; Fernando O. (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 10 (1): 52-61.

ANEXOS

9. ANEXO

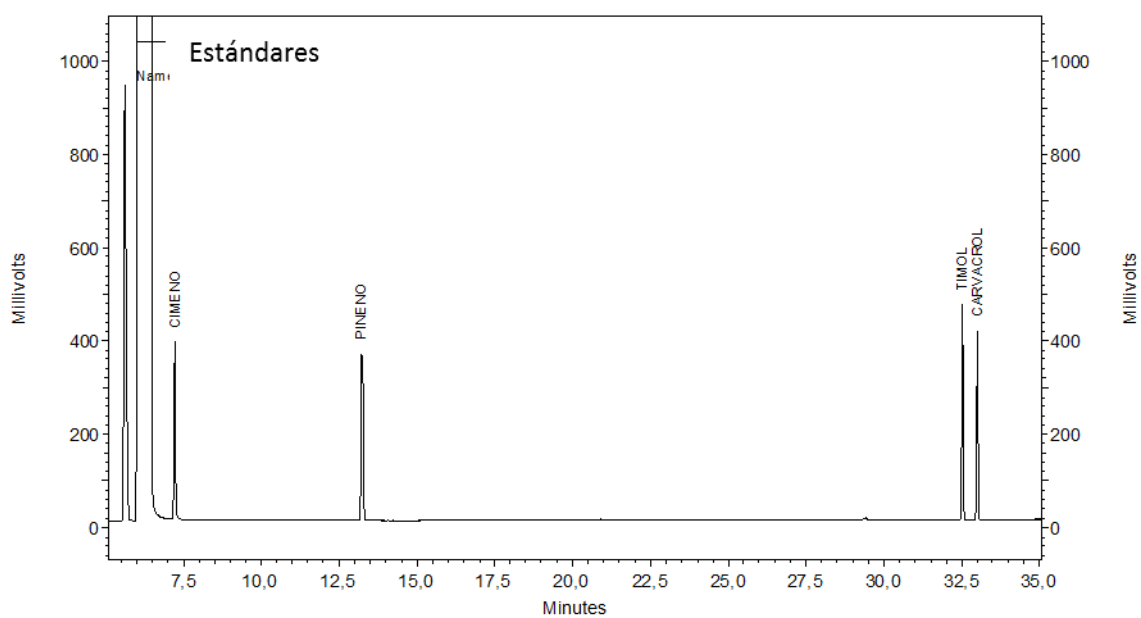


Figura 20. Cromatograma de terpenos presentes en el aceite esencial de orégano utilizados como estándares.

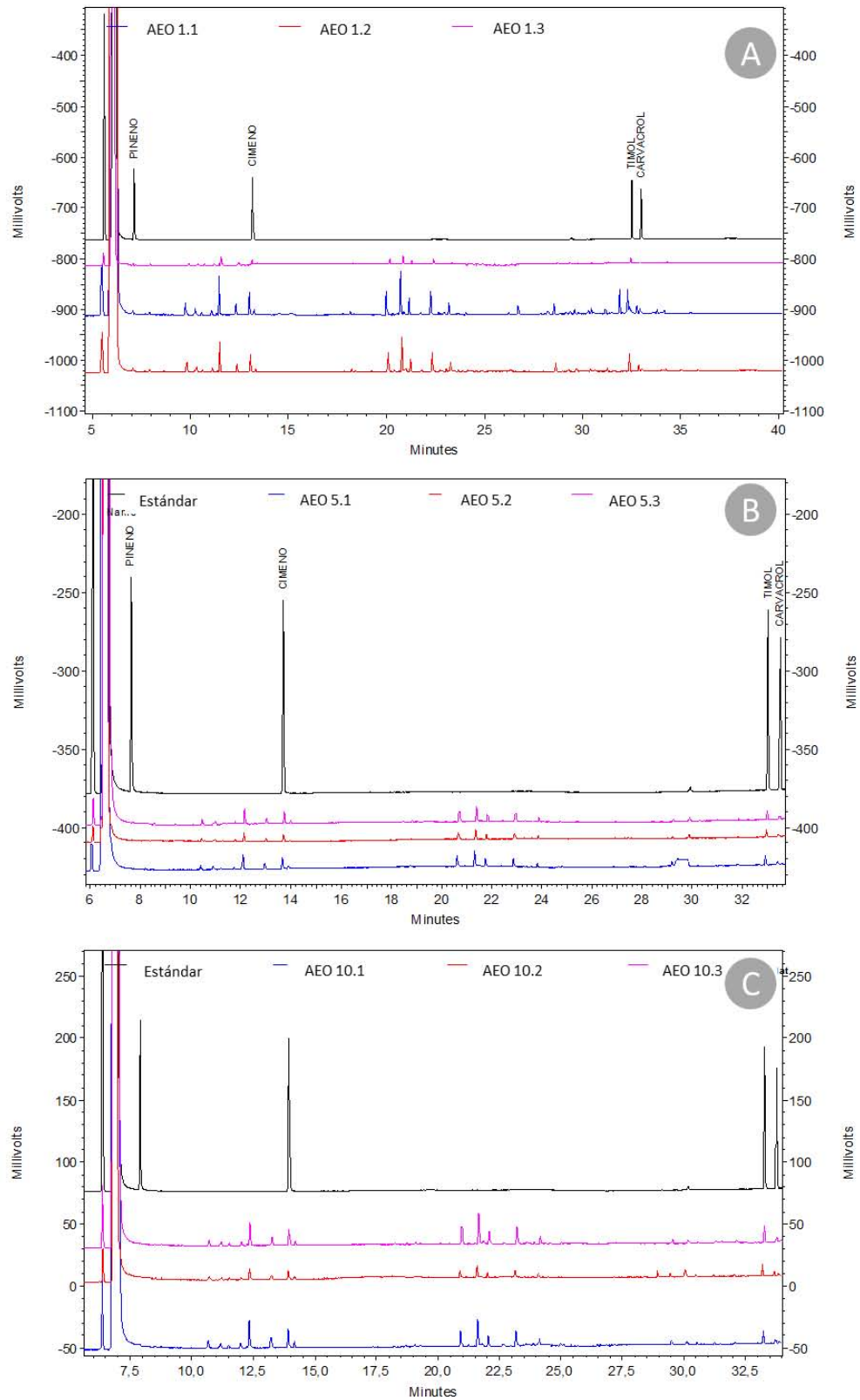


Figura 21. Seguimiento de terpenos de aceite esencial de orégano (AEO) durante los días 1 (A), 5 (B) y 10 (C), cada uno con sus respectivas replicas.

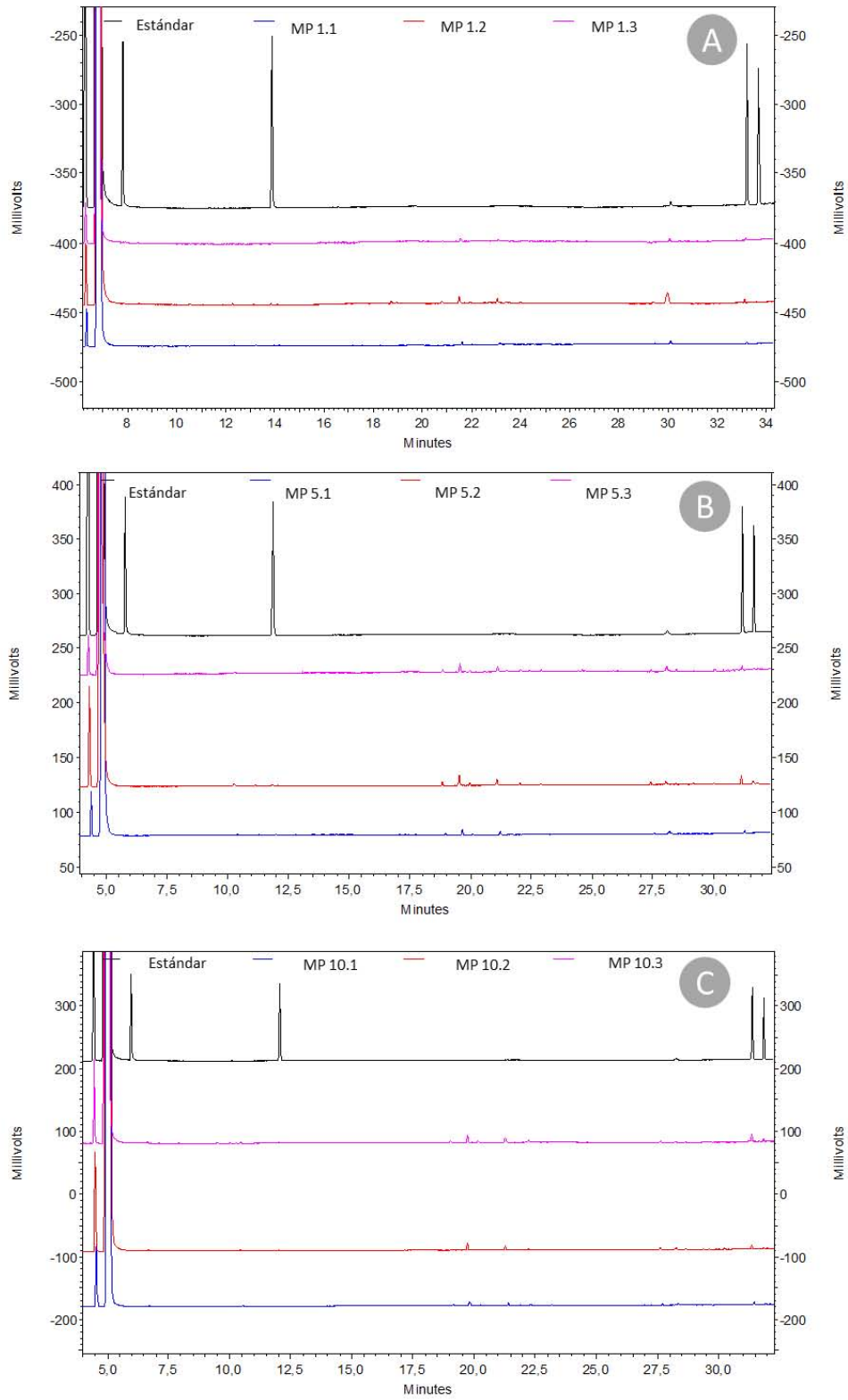


Figura 22. Seguimiento de terpenos de aceite esencial de orégano encapsulado en la matriz polimérica (MP) durante los días 1 (A), 5 (B) y 10 (C).