

Sofía Manso Nerín

Combinación de técnicas  
analíticas y microbiológicas para el  
estudio de un envase activo  
antifúngico frente a mohos  
alterantes de alimentos

Departamento  
Química Analítica

Director/es  
Nerín de la Puerta, Cristina  
Gómez-Lus Lafita, Rafael

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

COMBINACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS Y  
MICROBIOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE UN  
ENVASE ACTIVO ANTIFÚNGICO FRENTE A  
MOHOS ALTERANTES DE ALIMENTOS

Autor

Sofía Manso Nerín

Director/es

Nerín de la Puerta, M.C. Cristina  
Gómez-Lus Lafita, Rafael

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Química Analítica

2014





**Universidad**  
Zaragoza

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Departamento de Química Analítica

**Combinación de técnicas analíticas y  
microbiológicas  
para el estudio de un envase activo antifúngico  
frente a mohos alterantes de alimentos**

SOFÍA MANSO NERÍN

TESIS DOCTORAL

**2014**





**Universidad**  
Zaragoza

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Departamento de Química Analítica

**Combinación de técnicas analíticas y  
microbiológicas  
para el estudio de un envase activo antifúngico  
frente a mohos alterantes de alimentos**

Memoria presentada por

SOFÍA MANSO NERÍN

Para optar al título de Doctor Internacional

Dirigida por

Dra. D<sup>a</sup>. CRISTINA NERÍN DE LA PUERTA

Dr. D. RAFAEL GÓMEZ-LUS

**2014**





Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza



La **Dra. Cristina Nerín de La Puerta**, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y el **Dr. Rafael Gómez-Lus**, catedrático emérito del Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada: **“Combinación de técnicas analíticas y microbiológicas para el estudio de un envase activo antifúngico frente a mohos alterantes de alimentos”** presentada por **Dña. Sofía Manso Nerín** para optar al grado de Doctor Internacional, ha sido realizada bajo nuestra codirección en el Centro Politécnico Superior de la Universidad de Zaragoza, de acuerdo con los objetivos presentados en el Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica. Por tanto, autorizamos su presentación para proseguir con los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

En Zaragoza, a 17 de Septiembre de 2014

Dra. Cristina Nerín de la Puerta

Dr. Rafael Gómez-Lus





Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, (BES - 2009-022061) a través del proyecto AGL2008-04363: “Interacciones positivas y negativas entre el envase y el alimento: Envases activos, envases inteligentes y estudios de migración”, así como dentro del marco de los siguientes proyectos:

Proyecto Europeo NAFISPACK, “Natural antimicrobials for innovative and safe packaging”. VII FRAME PROGRAM 2008/2011.

Proyecto AGL2012-37886: “Seguridad alimentaria de envases con nanopartículas y envases multicapa para alimentos”.

La realización del trabajo también se ha llevado a cabo gracias al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



A lo largo de esta tesis he revivido más de una vez, alguna de las excursiones en las que cuando echaba el primer pie a primera hora de la mañana, sabía que no iba a ser el día. Entonces se hacía más cuesta arriba, nunca mejor dicho, y paradójicamente cuanto más avanzaba más lejos me parecía que estaba la montaña. La tesis ha sido sin duda mi excursión más larga, en la que he tenido “pájaras”, pero gracias a la cual he vuelto a revivir la segunda cara de esos momentos tan duros, y que no es otra que la enorme satisfacción personal de haber llegado. Si bien es cierto que la tesis es un trabajo de desarrollo personal, es un largo proceso donde toda la ayuda que te brindan se agradece. Por ello, creo que es motivo más que suficiente para tener en cuenta a todas aquellas personas que han colaborado de manera tan cercana.

En primer lugar, quiero agradecer a Cristina Nerín, por haberme ofrecido esta línea de investigación, ya que fue una gran oportunidad de volver al laboratorio y redescubrir un mundo que me ha fascinado, el de la microbiología. Además, quiero agradecer también que haya no sólo compartido sino también respetado y entendido, el hecho de que para mí siempre haya sido Cristina, dentro y fuera del laboratorio. Fue una decisión vital que no necesité meditar, y que además no hubo jamás necesidad de aclarar ni de explicar.

En segundo lugar, quiero transmitirle a mi codirector de tesis, Don Rafael Gómez-Lus, no sólo mi más sincero agradecimiento sino también toda mi admiración. Don Rafael está inexorablemente unido a mis inicios de tesis en el laboratorio de microbiología de la facultad de medicina, a aquellos primeros trabajos experimentales que te hacen sonreír al recordar el paso del tiempo. Fue además el que nos abrió la puerta hace ya algunos años, a todos aquellos que tuvimos la enorme suerte de pasar por allí. A pesar de que como todos podrán imaginar a estas alturas, sus lecciones de microbiología fueron un tesoro, lo más valioso que me llevo de él, sin embargo, es la enorme pasión que transmitía trabajando.

De aquellos años en medicina evidentemente también guardo un especial recuerdo y agradecimiento a mis compañeras de entonces. Por ello quiero agradecer a Patricia, a Silvia, por su enorme capacidad y disposición para ayudar aun sin pedirlo, a Alicia, por trabajar siempre con una enorme sonrisa y vitalidad, y a Lucía, que aunque le perdí la pista, aún me acuerdo de aquellas salidas cuando íbamos a correr juntas. En ese mismo tiempo conocí a Tais, que se convirtió sin duda en una persona muy especial, no sólo para mí, sino para todo el mundo que tuvo la suerte de coincidir en algún momento con ella. No me olvido por supuesto del Dr. Clavel (Antonio), por su amabilidad y corrección en todo momento y de la Dra. Goñi, que para mí siempre será “Pili”, por todo lo que me ayudó en aquellos primeros años.

La segunda parte en el CPS tuvimos un contacto más directo con el resto de nuestro grupo GUIA. Aunque son muchos y no voy a poder extenderme de manera individual tanto como me gustaría, todos y cada uno de ellos han colaborado de manera positiva para que esto salga adelante. Gracias a Jorge (entre otras, por las múltiples gestiones administrativas), a Jesús, a Celia, a Marga, a

Pilar (por la ayuda con los equipos), a María (por los días de ayuda en micro), a Daniel, a Yolanda, a Araceli (a ver si algún día vuelven a poner nuestra clase extinguida de inglés), a Berta y a Ester. A mis compañeras de despacho, Elena y Paula, mil gracias por hacerme más llevaderos los últimos meses y por animarme tanto con la escritura. A Magda por su simpatía, y a Marta, por su dinamismo y por ser la alegría personificada. Además, aunque unos cuantos de vosotros ya no forméis parte del grupo, vuestra ayuda fue muy valiosa. Isabel Mendiara, muchas gracias por todas aquellos momentos que compartimos cuando estuve en el último año de experimental y por tu ayuda. Ángel y Laura, os he tenido muy presente en vuestros artículos que tantos datos me han aportado. Igual que Patricia López, que a pesar de que no la conocí, ha sido un referente para todos aquellos que hemos trabajado con envase antimicrobiano. Davis, por ayudarme con el UHPLC, Karim, por los debates tan interesantes de ciencia que llegamos a tener. También quiero recordar a todos aquellos que vinieron de fuera y dejaron una gran huella: Pablo, Milton, Éder y Juliana, muchas gracias por ayudar a enriquecer el grupo de tantas maneras. Quería aprovechar la ocasión para recordar de manera muy especial a una compañera, Elena Mateos, que siempre destacó por su dulzura y a la que todos recordamos con un inmenso cariño.

Por supuesto, gran parte se lo debo a mis compañeras/os de micro. Isabel Clemente, aunque hemos coincidido poco, gracias por la colaboración. Riccardo, porque haber sido el compañero ideal para todas nosotras (espero que uses la taza que te regalamos con tanto cariño). ¿Seguro que no quieres volver? A Raquel, la compañera con la que más tiempo he pasado en el laboratorio. Gracias por la inestimable ayuda que me llegó de mil maneras, la sensatez que me aportó muchas veces, su compañerismo, su tiempo. Ha sido un auténtico placer trabajar a su lado. Por último a Filomena, que aunque lleve pocos meses me da la sensación de que siempre ha estado. Muchas gracias por haber llegado en el momento que más ayuda necesitaba, tanto yo como el grupo en sí, por echarme un cable tantas veces, y sobre todo, por hacer tan fácil el trabajo en micro.

Además del grupo, me gustaría agradecer brevemente a los que formaron parte de esa gran facultad que es veterinaria, ya que fue el inicio de mi formación. Quiero mencionar especialmente a Patricia, Sara, Elena, Isa y Paula. Sara. No quiero olvidarme de mi gran amigo también veterinario, Alberto, por haber estado siempre allí, sobre todo en mi etapa en Francia. Y por último, a mi gran amiga Leyre, que conocí gracias al máster de C.T.A.

Quiero aprovechar la ocasión para expresar mi admiración al grupo INA ("Instituto de Nanociencia de Aragón") por los servicios prestados de Espectroscopía de Infrarrojo y de microscopía electrónica de barrido (SEM), donde destaca la dedicación de Iñigo Echániz y muy especialmente el tiempo invertido de Carlos Cuestas.

Me gustaría también agradecer al responsable de mi estancia predoctoral en Stuttgart (Dr. Fischer), así como a su gran compañera la Dra. Weidner, porque con ellos aprendí muchísimo sobre la identificación de mohos.

Evidentemente, también me acuerdo enormemente de todos los amigos que habéis estado allí, por vuestro apoyo y ánimo constante. Aunque sois muchos, quiero mencionar el especial cariño de Ana, así como los que se han convertido en personas tan importantes gracias a Jorge, entre los que quiero destacar especialmente a Paola, Carmen, Álvaro y Dani, por haber mostrado siempre tanto interés en lo que hacía. A Mariano, por la gran amistad que me has mostrado en estos últimos años y por hacer mucho más llevaderas las clases de alemán. También quiero mandar mi más sincero agradecimiento a Carmen Maza y a Salvador. Ambos saben que su constante ayuda tiene mucho que ver con esto.

Como no podía ser de otra manera, agradezco a mi familia todo el apoyo que me han dado. A mis padres, por haber colaborado tan férreamente en la formación de todos los hijos, y habernos dejado libertad para tomar nuestras propias decisiones. Como es lógico, sin eso esta tesis no habría tenido lugar. A mis hermanos, Quique, Juan, Inés y Marta, así como a mis cuñadas Sara y Mónica y a mi cuñado Óscar, muchas gracias por vuestros ánimos constantes y por “presumir” de hermana investigadora. También porque sé que todos deseabais que llegara tanto este día como yo. Agradezco el apoyo del resto de familia tan numerosa, primos y tíos por ambas partes, y muy especialmente a mis padrinos, Montse y Santiago, con los que he compartido conversaciones tan gratificantes en los últimos años. Quiero aprovechar también para agradecer de corazón a la familia de Jorge, por la inmensa acogida con la que me recibieron desde el principio y por haberse convertido también en mi familia.

Antes de finalizar, quiero dedicar unas líneas a tres personas, que aunque ya no están, para mí en realidad nunca se fueron, y que son un constante impulso en mi vida. A mi madre, porque aunque no conoció los inicios de mi tesis, sé que habría visto con muy buenos ojos esta decisión y porque además siendo bióloga, habría disfrutado muchísimo. A mi abuelo Enrique, por la manera tan especial de quererme y por sentirse tan orgulloso siempre de mí, y cómo no, por ser tan grande y humilde a la vez. Gracias de corazón por haber sido siempre mi mayor admirador. A mi abuela Chelo, porque estuvo muy presente hasta casi el final, por ser tan fuerte y tener tan buen corazón, por arrancarme tantas risas, y porque sé que deseaba con toda el alma ver el final de este trabajo.

Por último, y como no podría ser de otra manera, a Jorge. Por comprender los sacrificios que he tenido que hacer, por su infinita paciencia, por su cariño, por apoyarme incansablemente, por hacer que esto fuera más fácil, por respetar mis horarios e incluso adaptarse a ellos y por esforzarse siempre en intentar entender lo que hacía...Sin embargo, como todo lo que pueda decir es poco, Jorge, a ti te dedico también cada línea de esta tesis.

Gracias a todos de corazón



*A Jorge*

*A mi abuela Chelo*





*La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante*

*Miguel de Unamuno*



# INDICE

ACRÓNIMOS .....	1
Lista de tablas .....	5
Lista de figuras .....	7
<b>PRESENTACIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>SECTION I. General Introduction</b> .....	<b>13</b>
1. ESSENTIAL OILS .....	15
1.1. Definition, properties and history .....	15
1.2. Anatomy and chemotaxonomy .....	16
1.3. Extraction methods .....	18
1.4. Factors that have an influence on the essential oil composition .....	18
1.5. Composition.....	20
1.6. Regulation.....	22
2. ACTIVE PACKAGING .....	24
2.1. Packaging and the origin of active packaging.....	24
2.2. Active packaging: classification and legislation .....	25
2.3. Active packaging: nowadays.....	26
2.4. Biodegradability and their environmental impact.....	31
3. Fungi .....	32
3.1. Main principles .....	32
3.2. Classification.....	33
3.3. Fungi structure, with an emphasis on the cell wall .....	35
3.4. Reproduction and mould growth .....	40
4. FOODBORNE MOULDS.....	44
4.1. Mould spoilage .....	44
4.2. Factors affecting the growth of filamentous fungi.....	47
4.3. Isolation and enumeration of mould spoilage from food products .....	51
4.4. Macroscopic and microscopic observation .....	52
5. Antifungal active packaging .....	57
<b>SECCIÓN II: Objetivos</b> .....	<b>59</b>
<b>SECCIÓN III. Desarrollo Experimental</b> .....	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 1: Determinación de la concentración inicial de inóculo de moho</b> .....	<b>65</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	67
1.1. Maneras de cuantificar el inóculo inicial de un moho.....	67
1.2. Recogida de esporas.....	68
1.3. Cuantificación de la concentración del inóculo por espectrofotometría .....	69
2. OBJETIVOS y ESQUEMA DE TRABAJO .....	72
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	73
3.1. Instrumentos y otros materiales .....	73
3.2. Cepas de mohos y medios de cultivo .....	73
3.3. Relación entre turbidez de la suspensión de inóculo, CFU/mL y sp/mL.....	74
3.3.1. Extracción del inóculo .....	75
3.3.2. Determinación de la absorbancia .....	75

3.3.3. Contaje del número de esporas por mL (sp/mL).....	75
3.3.4. Contaje del número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL).....	77
3.4. Contaje de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL), dentro del mismo rango de absorbancia .....	77
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
4.1. Relación entre turbidez de la suspensión de inóculo, CFU/mL y sp/mL.....	79
4.2. Contaje de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL), dentro del mismo rango de absorbancia .....	81
4.2.1. <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2949.....	82
4.2.2. <i>Aspergillus</i> .....	84
4.2.3. <i>Penicillium</i> .....	85
4.2.4. <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Galactomyces geotrichum</i> .....	85
5. CONCLUSIONES.....	88
<b>CAPÍTULO 2: Actividad antifúngica de los aceites esenciales de canela, orégano y clavo, y sus compuestos mayoritarios .....</b>	<b>89</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	91
1.1. Importancia del método utilizado .....	92
1.1.1. Método de dilución en agar .....	92
1.1.2. Método de difusión en disco.....	93
1.1.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC) .....	96
1.2. Variables que pueden afectar a la actividad de los aceites esenciales.....	98
1.3. Utilización de los aceites esenciales en la tesis en el grupo GUIA .....	100
2. OBJETIVOS y ESQUEMA DE TRABAJO.....	101
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	103
3.1. Instrumentos .....	103
3.2. Agentes antifúngicos .....	103
3.3. Composición de los aceites esenciales: canela, orégano y clavo.....	104
3.4. Cepas de mohos y medios de cultivo.....	105
3.5. Primera caracterización. Método de difusión: contacto directo y fase vapor .....	107
3.5.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	107
3.5.2. Extracción de los inóculos y siembra de las placas.....	107
3.5.3. Placas activas: contacto directo y fase vapor.....	108
3.5.4. Análisis estadístico: diferencias obtenidas entre los métodos de contacto directo y fase vapor.....	109
3.6. Primera caracterización. Método de dilución en agar: diámetro de la colonia del moho .....	110
3.6.1. Preparación del activo.....	110
3.6.2. Siembra de <i>A. flavus</i> .....	111
3.6.3. Análisis estadístico: actividad de los agentes activos.....	111
3.7. Evaluación del tiempo de exposición en la actividad del aceite esencial de canela y orégano en fase vapor .....	112
3.7.1. Halo de inhibición de <i>A. flavus</i> tras diferentes tiempos de exposición de canela y orégano .....	112
3.7.2. Crecimiento de <i>A. flavus</i> , en relación al momento de aplicación del aceite esencial de canela en fase vapor.....	113
3.8. Segunda caracterización. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC o CIM) y Concentración Mínima Fungicida (MFC o CFM) .....	114
3.8.1. Formación de los tubos de muestra.....	114
3.9. Estudio de las variables pH y temperatura: MIC y MFC de canela y orégano .....	115
3.10. Estudio de las variables pH y temperatura: diámetro de la colonia del moho.....	116
3.10.1. Preparación de los medios de cultivo a diferente pH .....	116
3.10.2. Siembra e incubación .....	117
3.10.3. Análisis estadístico .....	117

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	119
4.1. Primera caracterización. Método de difusión: contacto directo y fase vapor .....	119
4.1.1. Actividad antifúngica de los aceites esenciales y sus respectivos compuestos mayoritarios .....	119
4.1.2. Análisis estadístico: diferencias obtenidas entre los métodos de contacto directo y fase vapor .....	122
4.1.3. Diferencias observadas entre las cepas evaluadas .....	123
4.1.4. Diferencias observadas entre las seis sustancias empleadas .....	124
4.1.5. Importancia del método utilizado.....	124
4.2. Primera caracterización. Método de dilución en agar: diámetro de la colonia del moho .....	125
4.2.1. Análisis estadístico .....	127
4.2.2. Discusión de los resultados de otros autores .....	130
4.3. Evaluación del tiempo de exposición en la actividad del aceite esencial de canela y orégano en fase vapor .....	132
4.3.1. Halo de inhibición de <i>A. flavus</i> tras diferentes tiempos de exposición de canela y orégano .....	132
4.3.2. Crecimiento de <i>A. flavus</i> , en relación al momento de aplicación del aceite esencial de canela en fase vapor .....	136
4.4. Segunda caracterización. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC o CIM) y Concentración Mínima Fungicida (MFC o CFM) .....	138
4.4.1. Relación de la actividad mostrada entre los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios .....	139
4.4.2. Orden de magnitud de la actividad mostrada .....	140
4.4.3. Discusión de los resultados de otros autores .....	141
4.5. Estudio de las variables pH y temperatura: MIC y MFC de canela y orégano .....	142
4.5.1. Discusión de los resultados de otros autores .....	144
4.6. Estudio de las variables pH y temperatura: diámetro de la colonia del moho .....	145
4.6.1. Modificación del pH del medio de cultivo: optimización.....	145
4.6.2. Influencia del pH y la temperatura, en el diámetro de colonia de las cepas control. ....	146
4.6.3. Análisis estadístico .....	149
4.6.4. Discusión de los resultados de otros autores .....	150
5. CONCLUSIONES.....	151
<b>CAPÍTULO 3: Evaluación antifúngica de un envase activo con aceite esencial de canela .....</b>	<b>153</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	155
1.1. Importancia de la concentración de inóculo y de la concentración de activo en el envase.....	155
1.1.1. Influencia de la concentración de aceite esencial .....	155
1.1.2. Influencia de la concentración del inóculo .....	156
1.2. Liberación de los compuestos volátiles desde el material .....	156
1.3. Propiedades mecánicas y permeabilidad de los materiales de envase.....	158
1.4. Otras variables que pueden afectar al envase .....	158
2. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO .....	160
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	162
3.1. Instrumentos .....	162
3.2. Agentes antifúngicos .....	162
3.3. Cepas de mohos y medios de cultivo .....	162
3.4. Materiales activos .....	164
3.4.1. Films de PET (Polietileno Tereftalato) .....	164
3.4.2. Films de PP (Polipropileno) .....	164
3.5. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Concentración Mínima Inhibitoria (MIC ó CIM) y Concentración Mínima Fungicida (MFC ó CFM) de seis sustancias .....	164

3.6. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Método de difusión en disco en fase vapor .....	166
3.6.1. Análisis estadístico .....	166
3.7. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: envase de PET activo con canela en fase vapor .....	168
3.8. Estudio de un envase activo con canela, a diferente pH y temperatura .....	171
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	173
4.1. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC) de seis sustancias .....	173
4.1.1. Discusión de los resultados de otros autores: la concentración de inóculo en medio líquido .....	175
4.1.2. Relación entre el tamaño del inóculo y el mecanismo de acción .....	175
4.2. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Método de difusión en disco en fase vapor .....	176
4.2.1. Análisis estadístico .....	177
4.3. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: envase de PET activo con canela en fase vapor .....	178
4.3.1. "Short-term evaluation" o evaluación a corto plazo .....	178
4.3.2. "Long-term evaluation" o evaluación a largo plazo .....	179
4.3.3. Determinación de la actividad "fungicida" o "fungiestática" .....	180
4.3.4. Influencia de la concentración de inóculo y de aceite esencial .....	180
4.4. Estudio de un envase activo con canela, a diferente pH y temperatura .....	181
4.4.1. Influencia de la temperatura en la actividad de PP con canela en fase vapor .....	182
4.4.2. Influencia de la temperatura y del pH en la actividad de PP con canela en fase vapor .....	184
4.4.3. Determinación de la actividad "fungicida" o "fungiestática" .....	185
4.5. Discusión de los resultados de otros autores: actividad del envase activo .....	185
4.5.1. Comparación de la actividad antifúngica de los polímeros sintéticos .....	186
4.5.2. Papel parafinado .....	188
4.6. Discusión de los resultados de otros autores: durabilidad y estabilidad de la acción antimicrobiana del envase activo .....	189
4.6.2. Permeabilidad de los polímeros sintéticos y modificación de su estructura tras la adición de activo .....	190
5. CONCLUSIONES .....	193
<b>CAPÍTULO 4: Mecanismo de acción de los aceites esenciales .....</b>	<b>195</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	197
1.1. Los antifúngicos clínicos y su mecanismo de acción .....	197
1.2. La resistencia a los azoles: un problema emergente .....	200
1.3. Los aceites esenciales como alternativa .....	201
1.4. Algunas de las técnicas empleadas .....	201
1.4.1. Microscopía .....	201
1.4.2. Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	203
2. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO .....	205
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	207
3.1. Instrumentos .....	207
3.2. Aceites esenciales (EOs) .....	207
3.3. Cepas de mohos y medios de cultivo .....	207
3.4. Reactivos .....	208
3.5. Curvas de muerte .....	209
3.6. Microscopía Óptica: Daño celular causado por los compuestos volátiles de cinamaldehído, carvacrol y eugenol .....	211
3.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	212

3.7.1. Daño ultraestructural causado por el aceite esencial de canela en fase vapor .....	212
3.7.2. Daño ultraestructural causado por los aceites esenciales de canela, orégano y clavo en contacto directo.....	214
3.8. Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR) .....	215
3.8.1. Primer experimento de FTIR .....	216
3.8.2. Segundo experimento de FTIR .....	217
3.8.3. Procesamiento de datos .....	218
3.9. Influencia del crecimiento del moho en la difusión de los compuestos volátiles de los aceites esenciales .....	218
3.9.1. Formación de las muestras inoculadas y sin inocular .....	219
3.9.2. Extracción de las muestras.....	219
3.9.3. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS) .....	222
3.9.4. Análisis estadístico .....	223
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	224
4.1. Curvas de muerte .....	224
4.2. Microscopía Óptica: Daño celular causado por los compuestos volátiles de cinamaldehído, carvacrol y eugenol.....	225
4.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	234
4.3.1. Daño ultraestructural provocado por el aceite esencial de canela en fase vapor .....	234
4.3.2. Daño ultraestructural causado por los aceites esenciales de canela, orégano y clavo en contacto directo.....	237
4.3.3. Discusión de los resultados de otros autores .....	240
4.4. Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR) .....	243
4.4.1. Primer experimento de FTIR .....	243
4.4.2. Segundo experimento de FTIR .....	245
4.5. Influencia del crecimiento del moho en la difusión de los compuestos volátiles de los aceites esenciales .....	250
4.5.1. Compuestos obtenidos en las placas inoculadas y sin inocular .....	253
4.5.2. Difusión de los compuestos volátiles en las diferentes zonas de la placa Petri.....	258
4.5.3. Influencia del crecimiento del moho en la distribución de los compuestos en las diferentes zonas.....	260
4.5.4. Discusión de los resultados con otros autores.....	261
5. CONCLUSIONES .....	264
<b>CHAPTER 5: Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil .....</b>	<b>267</b>
1. INTRODUCTION.....	269
1.1. The main features responsible for the mycotoxin production.....	269
1.2. Presence and geographical distribution of the main mycotoxins .....	270
1.3. Foodborne mycotoxins, focusing on Aflatoxins .....	271
1.3.1. The pathogenicity of Aflatoxins and current legislation .....	271
1.3.2. Aflatoxins in food commodities .....	273
1.4. Essential oils (EOs) to control the aflatoxin / mycotoxin levels in food products .....	276
2. OBJECTIVES and EXPERIMENTAL PLAN .....	278
3. MATERIALS AND METHODS .....	280
3.1. Microbial culture .....	280
3.2. Cinnamon essential oil (CIN EO) .....	280
3.3. Reagents and aflatoxin extraction.....	280
3.4. Antifungal materials .....	281
3.5. Chromatographic conditions .....	281
3.6. Diffusion disc experiment.....	282
3.6.1. Experimental plan .....	282
3.6.2. Influence of the CIN exposure time .....	282
3.6.3. Influence of the closure of the Petri dish.....	282



3.6.4. Influence of the culture media .....	283
3.7. PP experiment .....	283
3.7.1. Experimental plan .....	283
3.7.2. Influence of the closure of the Petri dish .....	283
3.7.3. Influence of the CIN concentration .....	284
3.8. Aflatoxin B1.....	284
3.8.1. Collecting sample from the agar .....	284
3.8.2. Aflatoxin B1 extraction.....	284
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	286
4.1. Chromatographic separation and analytical characteristics .....	286
4.2. Diffusion disc experiment.....	287
4.2.2. Influence of the culture media and the CIN exposure time .....	291
4.3. PP experiment .....	293
4.3.1. Influence of the closure of the Petri dish .....	295
4.4. Mechanism of action: antifungal and antioxidant activity of CIN vapor phase on the aflatoxin production .....	298
5. CONCLUSIONS.....	300
<b>SECTION IV: CONCLUSIONS.....</b>	<b>301</b>
<b>SECCIÓN V: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>307</b>
<b>SECCIÓN VI: PUBLICACIONES .....</b>	<b>333</b>

# ACRÓNIMOS

**ABS:** Absorbancia

**ACN:** Acetonitrilo (*acetonitrile*)

**AFB1:** aflatoxina B1 (*aflatoxin B1*)

**AFB2:** aflatoxina B2 (*aflatoxin B2*)

**AFG1:** aflatoxina G1 (*aflatoxin G1*)

**AFG2:** aflatoxina G2 (*aflatoxin G2*)

**AFM1:** aflatoxina M1 (*aflatoxin M1*)

**Anova:** Analysis of Variance

**CARV:** carvacrol

**CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo

**CFM:** Concentración Fungicida Mínima

**CFU/mL:** Colony Forming Unit

**CIN:** aceite esencial de canela (*cinnamon essential oil*)

**CINAM:** cinamaldehído (*cinnamaldehyde*)

**CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima

**CLO:** clavo (*clove*)

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CYA:** Czapek Yeast Autolysate Agar

**CZP:** Czapek Dox-Agar

**DCM:** diclorometano (*Dichloromethane*)

**DON:** Deoxinivalenol (*Deoxynivalenol*)

**ECDC:** European Centre for Disease Prevention and Control

**EFSA:** European Food Safety Authority

**EOs:** Essential Oils (aceites esenciales)

**e-SEM:** SEM ambiental (*Environmental Scanning Electron Microscopy*)

**EUG:** eugenol

**FAO:** Food and Agricultural Organization

**FTIR:** Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

**GC:** Cromatografía de Gases (*Gas Chromatography*)

**GR:** Growth Rate (velocidad de crecimiento)

**GRAS:** Generally Recognised As Safe

**H.I.:** Halo de Inhibición (*inhibition area*)

**H.R.:** Halo de Retardo (*retard area*)

**LAE:** Etil Lauroil Arginato (*Ethyl Lauroyl Arginate*)

**LOD:** Límite de Detección (*Detection Limit*)

**LOQ:** Límite de Cuantificación (*Quantification Limit*)

**MEA:** Malt Extract Agar

**MEB:** Malt Extract Broth

**MeOH:** metanol (*metanol*)

**MIC:** Minimal Inhibitory Concentration

**MFC:** Minimal Fungicidal Concentration

**MS:** Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*)

**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards

**OR:** oregano

**OTA:** Ocratoxina A (*Ochratoxin A*)

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PDB:** Potato Dextrose Broth

**PET:** Polietileno de Tereftalato (*Polyethylene Terephthalate*)

**PP:** Polipropileno (*Polypropylene*)

**PPM:** partes por millón (*parts per million*)

**PPB:** partes por billón (*parts per billion*)

**RASFF:** Rapid Alert System for Food and Feed

**rmp:** revoluciones por minuto (revolutions per minute)

**SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy)

**SPME:** Microextracción en Fase Sólida (Solid Phase Micro-Extraction)

**STY:** estireno (styrene)

**sp/mL:** esporas por mL (spores per mL)

**TEM:** Microscopía Electrónica de Transmisión (Transmission Electronic Microscopy)

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**UHPLC:** Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography*)

**YEB:** Yest Extract Broth

**YES:** Yeast Extract Agar

**ZEA:** Zearalenona (Zearalenone)



## LISTA DE TABLAS

<b>Table 0.1</b>	Chemotaxonomy of some important families of EOs.....	17
<b>Table 0.2</b>	Types of active packaging regarding their functionality and mechanism of action .....	26
<b>Table 0.3</b>	Summary of some biodegradable active packaging published in the last years .....	29
<b>Table 0.4</b>	Keys to the main groups found in food and/or indoor environments .....	34
<b>Table 0.5</b>	Chemical composition of the cell wall of some fungi.....	36
<b>Table 0.6</b>	Examples of mould spoilage in different food products .....	45
<b>Table 0.7</b>	pH, water, protein and sugar contents of some fruits and vegetables .....	48
<b>Tabla 1.1</b>	Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 1.....	74
<b>Tabla 1.2</b>	Comparación de los contajes en Lg sp/mL y Lg CFU/mL .....	80
<b>Tabla 1.3</b>	CFU/mL según el valor de absorbancia (ABS) de diferentes inóculos de <i>A. flavus</i> . .....	83
<b>Tabla 2.1</b>	Agentes activos utilizados en este capítulo 2.....	103
<b>Tabla 2.2</b>	Composición química de los aceites esenciales de canela, orégano y clavo .....	105
	determinado por cromatografía de gases.....	105
<b>Tabla 2.3</b>	Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 2.....	106
<b>Tabla 2.4</b>	Concentraciones de los aceites esenciales y de LAE. ....	110
<b>Tabla 2.5</b>	GR bajo diferentes concentraciones de LAE, orégano y clavo.....	128
<b>Tabla 2.6</b>	T2 de Tamhane de los diámetros de colonia bajo 1 %, 2 % y 3 % de orégano. ....	130
<b>Tabla 2.7</b>	Porcentaje del halo de inhibición (H.I.) de <i>A. flavus</i> , tras 24h, 48 h, 72 h y 96 h .....	134
<b>Tabla 2.8</b>	MIC y MFC de los aceites esenciales: canela (CIN), orégano (OR) y clavo (CLO). ....	139
<b>Tabla 2.9</b>	MIC y MFC de los compuestos mayoritarios. ....	139
<b>Tabla 2.10</b>	MIC y MFC de canela a diferente pH y temperatura. ....	143
<b>Tabla 2.11</b>	MIC y MFC de orégano a diferente pH y temperatura. ....	144
<b>Tabla 2.12</b>	Velocidad de crecimiento (GR) bajo diferente pH y temperatura.....	149
<b>Tabla 3.1</b>	Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 3.....	163
<b>Tabla 3.2</b>	MIC y MFC de canela (CIN), orégano (OR) y clavo (CLO) a diferente inóculo.....	174
<b>Tabla 3.3</b>	MIC y MFC de los compuestos mayoritarios a diferente inóculo:.....	174
<b>Tabla 4.1</b>	Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 4.....	208
<b>Tabla 4.2</b>	Parámetros utilizados para la extracción por SPME (GC-MS) .....	222
<b>Tabla 4.3</b>	Datos de los compuestos analizados en su difusión. ....	252
<b>Table 5.1</b>	FAO (2014). Cereal production, supply and utilization (2004-2014). ....	274
<b>Table 5.2</b>	Number of mycotoxins notifications in the last decade, by RASFF. ....	274

<b>Table 5.3</b> AFB1 data in active samples (disc with cinnamon and sealed with parafilm).....	288
<b>Table 5.4</b> AFB1 data in control 1 (without parafilm) and control 2 (with parafilm) samples.....	289
<b>Table 5.5</b> Inhibition (H.I.) and retard area (H.R.) in the active plates. Sets of 4 and 7 days.....	292
<b>Table 5.6</b> Inhibition (H.I.) and retard area (H.R.) in the active plates. Sets of 10 and 15 days.....	293
<b>Table 5.7</b> PP (Polypropylene) experiment.....	294

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 0.1</b>	Anatomical structures of a fresh leaf of <i>Mandevilla guanabarica</i> .....	17
<b>Fig. 0.2</b>	Influence of the season and the part plant on the EO concentration .....	20
<b>Fig. 0.3</b>	Examples of three different non-terpenes .....	21
<b>Fig. 0.4</b>	Isoprene (left), and the precursors GDP (middle) and Farnesol (right) .....	21
<b>Fig. 0.5</b>	Some monoterpenes and sesquiterpenes in relation to their functional groups .....	22
<b>Fig. 0.6</b>	Desired properties for food packaging materials .....	27
<b>Fig. 0.7</b>	Aerial mycelium of <i>Aspergillus flavus</i> .....	33
<b>Fig. 0.8</b>	Yeast cell wall of <i>S. cerevisiae</i> and <i>C. albicans</i> .....	36
<b>Fig. 0.9</b>	Biosynthesis (left) and drawing of the fungal cell wall (right) .....	39
<b>Fig. 0.10</b>	Asexual cycle of <i>A. nidulans</i> .....	41
<b>Fig. 0.11</b>	Growth of <i>Aspergillus flavus</i> , showing different phases of growth.....	42
<b>Fig. 0.12</b>	Distribution of different structures in the apical apex of the hypha .....	43
<b>Fig. 0.13</b>	Example of black sclerotia in <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 .....	49
<b>Fig. 0.14</b>	Mycelium of <i>Fusarium poae</i> CECT 20165 .....	49
<b>Fig. 0.15</b>	Growth comparison between bacteria and fungi, regarding $a_w$ .....	50
<b>Fig. 0.16</b>	Macroscopic growth of different species on different culture media.....	53
<b>Fig. 0.17</b>	The choice of the culture media influences on the sporulation rate .....	54
<b>Fig. 0.18</b>	Microscopic growth of <i>E. chevalieri</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. flavus</i> and <i>A. niger</i> .....	55
<b>Fig. 0.19</b>	Microscopic growth of <i>P. expansum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>B. fuckeliana</i> , <i>A. alternata</i> and <i>R. stolonifer</i> .....	56
<b>Fig. 1.1</b>	Turbidimetría de una disolución microbiana mediante espectrofotómetro.....	70
<b>Fig. 1.2</b>	Diseño experimental del capítulo 1. ....	72
<b>Fig. 1.3</b>	Extracción de un inóculo de <i>A. niger</i> . ....	75
<b>Fig. 1.4</b>	Cámara de Neubauer mejorada. ....	76
<b>Fig. 1.5</b>	Lg sp/mL y Lg CFU/mL, en función de la absorbancia .....	79
<b>Fig. 1.6</b>	Recuentos de <i>A. flavus</i> en CFU/mL, en función de la ABS.....	84
<b>Fig. 1.7</b>	Recuentos de <i>Aspergillus</i> en CFU/mL entre 0.2 y 0.34 de ABS,.....	84
<b>Fig. 1.8</b>	Recuentos de <i>Penicillium</i> en CFU/mL entre 0.2 y 0.34 de ABS.....	85
<b>Fig. 1.9</b>	Recuentos de <i>F. oxysporum</i> y <i>G. geotrichum</i> en CFU/mL en función de la ABS.....	86
<b>Fig. 2.1</b>	Diámetro de colonia de <i>Penicillium expansum</i> en el tiempo. ....	93
<b>Fig. 2.2</b>	Zonas de crecimiento producidas por el aceite esencial de canela en fase vapor .....	95
<b>Fig. 2.3</b>	Zonas de crecimiento producidas por el aceite esencial de orégano en contacto directo ...	96



<b>Fig. 2.4</b>	Zonas de crecimiento producidas por el aceite esencial de canela en contacto directo .....	96
<b>Fig. 2.5</b>	Ejemplo visual de MIC por macrodilución en caldo.....	97
<b>Fig. 2.6</b>	Diseño experimental del capítulo 2.....	102
<b>Fig. 2.7</b>	Método de difusión (contacto directo): .....	108
	aplicación del disco activo en contacto directo con el medio de cultivo. ....	108
<b>Fig. 2.8</b>	Método de difusión (fase vapor): .....	108
	aplicación del disco activo en fase vapor, en la tapa de la placa Petri.....	108
<b>Fig. 2.9</b>	Esquema de la formación de muestras para la determinación de MIC y MFC.....	115
<b>Fig. 2.10</b>	(a-f) Halos de inhibición (mm) en contacto directo y fase vapor, de los seis compuestos	120
<b>Fig. 2.10</b>	(g-l) Halos de inhibición (mm) en contacto directo y fase vapor, de los seis compuestos	121
<b>Fig. 2.11</b>	Diámetro de colonia (mm) de <i>A. flavus</i> 2949. ....	126
<b>Fig. 2.12</b>	H.I. a diferentes tiempos de exposición de CIN y OR en fase vapor. ....	133
<b>Fig. 2.13</b>	Imágenes del H.I. de CIN y OR durante 24 h (1), 48 h (2) y 72 h (3). ....	135
<b>Fig. 2.14</b>	Crecimiento de <i>A. flavus</i> en función del momento de la aplicación del aceite esencial de canela en fase vapor.....	137
<b>Fig. 2.15</b>	Optimización para la modificación del pH del medio de cultivo. ....	146
<b>Fig. 2.16</b>	Diámetro de colonia (mm) a diferente pH y temperatura.....	147
<b>Fig. 2.17</b>	Influencia de la temperatura en el crecimiento del moho.	
<b>Fig. 3.1</b>	Diseño experimental del capítulo 3. ....	161
<b>Fig. 3.2</b>	Diagrama de trabajo del experimento con los films activos de PET con canela.....	168
<b>Fig. 3.3</b>	Colocación del PET para su evaluación en fase vapor. ....	169
<b>Fig. 3.4</b>	Escala cualitativa en función del crecimiento del moho:.....	170
<b>Fig. 3.5</b>	Diagrama de trabajo del experimento con los films activos de PP con canela.....	172
<b>Fig. 3.6</b>	H.I. (mm) creado por canela en fase vapor a diferente concentración .....	176
<b>Fig. 3.7</b>	PET activo con canela en fase vapor frente a <i>A. flavus</i> .....	178
<b>Fig. 3.8</b>	PP activo con canela en fase vapor a diferente temperatura y pH 5.6.....	183
<b>Fig. 3.9</b>	PP activo con canela en fase vapor a diferente temperatura y pH 3.....	184
<b>Fig. 4.1</b>	Posibles dianas de los antifúngicos.....	198
<b>Fig. 4.2</b>	Diseño experimental del capítulo 4. ....	206
<b>Fig. 4.3</b>	Esquema de la formación de las muestras para las curvas de muerte de los tres EOs. ....	209
<b>Fig. 4.4</b>	Dibujo esquemático de las tres zonas creadas por el gradiente de concentración del EO .	212
<b>Fig. 4.5</b>	Preparación y extracción del halo de retardo de una muestra activa, para SEM.....	213
<b>Fig. 4.6</b>	Preparación de las muestras para el segundo experimento de SEM. ....	214
<b>Fig. 4.7</b>	Preparación de las muestras para el primer experimento de FTIR.....	216

<b>Fig. 4.8</b>	Preparación de las muestras para el segundo experimento de FTIR. ....	217
<b>Fig. 4.9</b>	Marcaje de los halos de inhibición, en placas activas inoculadas y sin inocular. ....	220
<b>Fig. 4.10</b>	Extracción de las muestras de las diferentes zonas. ....	221
<b>Fig. 4.11</b>	Curvas de muerte de los aceites esenciales de canela (a,b), orégano (c,d) y clavo (e,f)....	224
<b>Fig. 4.12</b>	Distribución de las esporas de <i>A. flavus</i> en el H.I. de las placas activas .....	226
<b>Fig. 4.13</b>	Daño celular en <i>A. flavus</i> tras 24 horas (m.óptica).....	227
<b>Fig. 4.14</b>	Daño celular en <i>A. flavus</i> tras 48 horas (m.óptica).....	228
<b>Fig. 4.15</b>	Daño celular en <i>A. flavus</i> tras 72 horas por cinamaldehído (m.óptica).....	229
<b>Fig. 4.16</b>	Daño celular en <i>A. flavus</i> tras 72 horas por carvacrol (m.óptica).....	230
<b>Fig. 4.17</b>	Daño celular en <i>A. flavus</i> tras 72 horas por eugenol (m.óptica). ....	231
<b>Fig. 4.18</b>	Resultados de SEM de las muestras control.....	235
<b>Fig. 4.19</b>	Resultados de SEM de las muestras activas. ....	236
<b>Fig. 4.20</b>	Resultados de SEM de esporas control .....	238
<b>Fig. 4.21</b>	Resultados de SEM de esporas tratadas con canela. ....	238
<b>Fig. 4.22</b>	Resultados de SEM de esporas tratadas con orégano.....	239
<b>Fig. 4.23</b>	Resultados de SEM de esporas tratadas con clavo.....	239
<b>Fig. 4.24</b>	Depósito de muestra en el soporte de ZnSe: .....	244
<b>Fig. 4.25</b>	Primera derivada de algunos espectros de muestras control y activas. ....	245
<b>Fig. 4.26</b>	Espectro de FTIR de una de las muestras de <i>A. flavus</i> .....	246
<b>Fig. 4.27</b>	Depósito de muestra en el soporte de ZnSe de una de las réplicas activas de 6 días:.....	246
<b>Fig. 4.28</b>	Filtro aplicado para análisis por FTIR. ....	247
<b>Fig. 4.29</b>	Imágenes de halos de inhibición y retardo de <i>A. flavus</i> tras 4 días.....	251
<b>Fig. 4.30</b>	Cromatogramas de las muestras de cinamaldehído. ....	254
<b>Fig. 4.31</b>	Cromatogramas obtenidos en las muestras de carvacrol. ....	257
<b>Fig. 4.32</b>	Cromatogramas obtenidos en las muestras de eugenol.....	258
<b>Fig. 4.33</b>	Distribución de cinamaldehído (a,b) y estireno (c,d) en distintas zonas de la placa. ....	259
<b>Fig. 4.34</b>	Distribución de carvacrol (a,b) y eugenol (c,d) en distintas zonas de la placa. ....	260
<b>Fig. 5.1</b>	Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain.....	270
<b>Fig. 5.2</b>	Molecular structure of aflatoxins B1, B2, M1, G1 and G2.....	272
<b>Fig. 5.3</b>	Experimental plan of chapter 5. ....	279
<b>Fig. 5.4</b>	Chromatographic optimization of method B.....	287
<b>Fig. 5.5</b>	Reduction of AFB1 concentration in the disc experiment.....	290
<b>Fig. 5.6</b>	Reduction of AFB1 concentration in the PP experiment. ....	295
<b>Fig. 5.7</b>	Examples of mould development in two culture media (YES, CYA), in PP experiment. ....	296



## PRESENTACIÓN

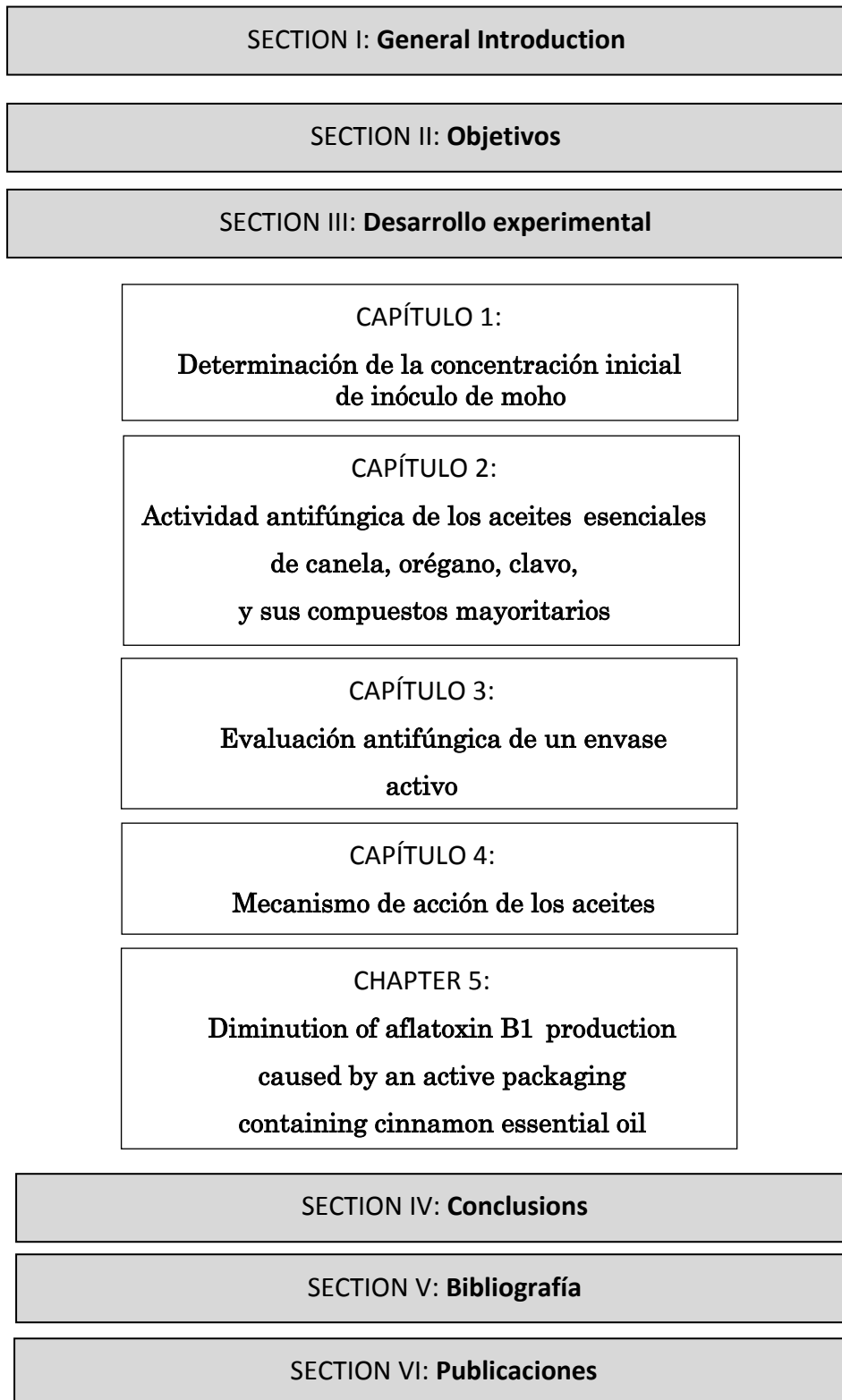
La presente Tesis Doctoral nace con el reto principal de profundizar en el estudio del mecanismo de acción de un envase activo antifúngico, lo cual permite mejorar su diseño y convertirlo en un sistema fiable, seguro y eficaz frente a los mohos que puedan crecer en cada uno de los alimentos a los cuales va orientado el envase.

A continuación se exponen las cinco secciones en las cuales se ha dividido el trabajo desarrollado. La primera de ellas está constituida por una introducción general donde se tratan los aspectos fundamentales de los aceites esenciales, el nacimiento del envase activo y por último, nociones importantes sobre la morfología y crecimiento de los mohos alterantes de alimentos. A continuación, en la sección II, se exponen los objetivos planteados, los cuales se van resolviendo a lo largo de la sección III. Esta última parte es la más amplia de la tesis, ya que contiene el desarrollo experimental llevado a cabo, el cual se ha esquematizado a su vez en cinco capítulos autocontenidos (esto es, cada uno de ellos engloba una pequeña introducción, materiales y métodos, resultados y conclusiones).

El primer capítulo constituyó la base de partida de la tesis, ya que permitió asegurar la reproducibilidad a la hora de extraer y cuantificar el resto de inóculos empleados en la tesis. A continuación, en el segundo capítulo se llevó a cabo un amplio barrido de la actividad antifúngica de diferentes aceites esenciales sobre varias cepas, por medio de diferentes ensayos de micología, tanto en contacto directo como en fase vapor. Tras esto, el capítulo 3 se centró en el estudio del envase activo con canela, para lo cual todos los experimentos con el material se realizaron en fase vapor, y sobre varias cepas de moho. Dichos estudios se evaluaron a diferente pH y temperaturas, las cuales variaron según la cepa en cuestión. El capítulo 4 recoge los datos obtenidos del estudio de mecanismo de acción de los aceites esenciales, llevado a cabo por diferentes técnicas como son las curvas de muerte, infrarrojo de alta resolución (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Por último, el capítulo 5 trata sobre el efecto de los compuestos volátiles del aceite esencial de canela, en la producción de una de las micotoxinas más importantes, la aflatoxina B1.

La memoria cierra con las secciones IV, V y VI, las cuales recogen las conclusiones extraídas del trabajo, la bibliografía consultada a lo largo del proceso, y las publicaciones derivadas de todo ello respectivamente.

A continuación se muestra un diagrama con la estructura de la Tesis Doctoral.



## **SECTION I. General Introduction**

- 1. Essential oils*
- 2. Active packaging*
- 3. Fungi*
- 4. Foodborne moulds*
- 5. Antifungal active packaging*



# 1. ESSENTIAL OILS

## 1.1. Definition, properties and history

Essential oils (EOs) are natural aromatic substances obtained from plant materials. Their origin is very diverse as they proceed from flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits and roots (Burt S., 2004). They are liposolubles and therefore, with a low water solubility and high solubility in alcohol and organic solvents such as ether or chloroform. They are liquids at room temperature, and colorless or slightly yellowish after distillation. They can be found in nature (wild type) or after plant breeding (domestication cultivation).

They have been used along History due to their recognized preservative properties, being applied for embalming in ancient Egypt (Lang G., et al. , 2012). However, it was not until the 16<sup>th</sup> century that the term “essential oil” was introduced by the alchemist, doctor and astrologer Paracelsus von Hohenheim, who referred as “Quinta essentia” to the active component of the drugs he used (Edris A. E., 2007). Hence, plants have been used since ancient times, with the aim of treating infectious illness even before any knowledge about microorganisms (Lang G., et al., 2012). Their pharmacological effects were described since the 13<sup>th</sup> century, but they were not used in Europe until the 16<sup>th</sup> century. Later, pharmacies from 17<sup>th</sup> century were able to stock about 15-20 different oils. However, despite the first experimental work about the vapor phase antibacterial properties of EOs dates from 1881, their medical use in the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> centuries were pushed into the background in relation to their application as flavor and aroma (Burt S., 2004).

Nowadays, the properties of EOs, as bactericidal, fungicidal, insecticidal and virucidal are well known (Bakkali F., et al. , 2008). Besides, they can act as antioxidant, immunomodulant, psychotropic, acaricide, expectorant, antiphlogistic, spasmolytic and antinociceptive agents. Moreover, antidiabetic and cancer suppressive activities have been also reported (Lang G., et al., 2012). The excellent previous review published by Lang G., et al. (2012) compiles the results concerning the antimicrobial and antifungal activities between the years 2008-2010. As the authors say, volatile oils constitute an interesting alternative due to the increasing resistance of microorganisms against synthetic agents. Besides, currently their fragrance is still highly appreciated, being part of most of the cosmetic and hygienic products in the trade.

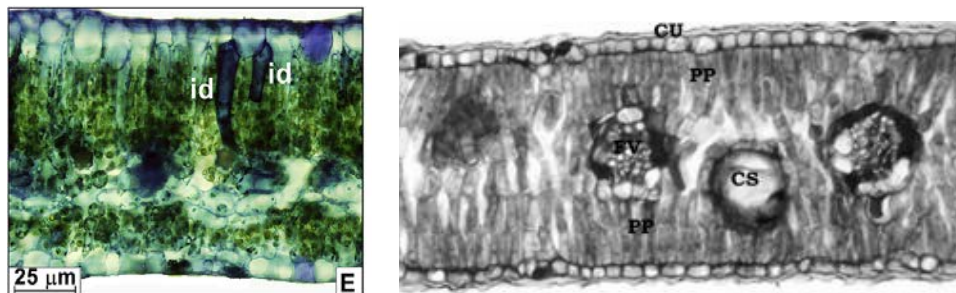


Spices can be also regarded as functional foods. Besides the mentioned antibacterial, antiviral and antioxidant activities, they can also work as anti-inflammatory, anti-thrombosis, anticarcinogenic, anti-ulcerous, digestive stimulants and anti-diabetic substances. The presence of flavonoids inhibits the inflammation process and the platelet aggregation, and they also seem to increase the prostaglandins, thus reducing the acid secretion and preventing the ulcer formation. Several works have pointed out the anticarcinogenic action of some aromatic herbs and spices, as rosemary and its principal components (ursolic acid, carnosol), turmeric and its principal component curcumin and pepper (capsaicin as main component). Basically, rosemary and carnosol have demonstrated to suppress the oxidative stress and to prevent the DNA damage, meanwhile capsaicin seems to promote the apoptosis of the carcinogenic cells. Among the anti-diabetic properties, cinnamon has been by far the most evaluated spice, which its hypoglycemic action has been proved by different authors (Viuda-Martos M., et al. , 2011).

As we will discuss along this work, their antimicrobial activity degree depends mainly on the essential oil composition, the methodology applied, the food ingredients or substrate used, and the microorganism target.

## **1.2. Anatomy and chemotaxonomy**

All plants are able to produce volatile compounds, sometimes only in traces. In the case of delivering essential oil of commercial interest, then the plant is considered as “essential oil plant”. Flowers of some plants as for example rose (*Rosa* spp.), jasmine (*Jasminum sambac*) or tuberose (*Polyanthes tuberosa*) produce and emit immediately the volatiles by the epidermal layers of their petals. In that case, besides distillation an “enflourage” should be applied in order to recover the fragrance compounds. Meanwhile, in other plants the secretion and accumulation of volatiles take place in specialized anatomical structures such as secretory idioblasts, cavities or ducts, or glandular trichomes (figure 0.1). Hence, the type of secretory containers and the biosynthetically specific group of substances are important aspects from the taxonomical and systematic point of view.



**Fig. 0.1** Anatomical structures of a fresh leaf of *Mandevilla guanabaria*  
 Left: transversal section showing the idioblasts (id) in dark blue, which contain fatty acids (Cordeiro S. Z., et al. , 2012). Right: transversal section of a leaf of *Eucalyptus benthamii*, highlighting the secretory cavities (CS) (Doell-Boscardin P. M., et al. , 2010)

The extensive number of plant families are scattered throughout all plant classes: gymnosperms, within Cupressaceae and Pinaceae as the main families, and the angiosperms. The large group of angiosperms includes families of dicots and monocots, where we can find the most famous essential oils (table 0.1). Some genus, as for example sage and oregano (both from Lamiaceae), contains a great number of worldwide different species, about 900 species in the case of sage and more than 60 for oregano (Başer H. C. K., et al. , 2010c).

**Table 0.1** Chemotaxonomy of some important families of EOs

	Family	Essential oil (EO)
<b>Dicots</b>	Apiaceae	Fennel, coriander, other aromatic seed/root oils
	Asteraceae	Chamomile
	Geraniaceae	Geranium oil
	Illiciaceae	Star anise oil
	Lamiaceae	Mint, patchouli, lavender, oregano, sage, etc.
	Lauraceae	Cinnamon, litsea, camphor, sassafras oil, etc.
	Myristicaceae	Nutmeg, mace
	Myrtaceae	Myrtle, cloves, allspice
	Oleaceae	Jasmine oil
	Rosaceae	Rose oil
	Santalaceae	Sandalwood oil
<b>Monocots</b> (Liliopsida)	Acoraceae	Calamus
	Poaceae	Vetiver and aromatic grass oils
	Zingiberaceae	Ginger, cardamon

However, essential oils can be also classified in relation to their consistency (essences, balsams, and resins), origin (naturals, artificial and synthetics), and their chemical nature (Arraiza Bermúdez-Cañete M. P.).

### **1.3. Extraction methods**

Despite the process of steam distillation is the most frequent method for the production of essential oils on a large scale (Bakkali F., et al., 2008; Başer H. C. K., et al. , 2010b), there are others as water or hydrodistillation, expression or cold pressing and the supercritical fluid extraction (SFE). Besides, the essential oils from some flowers are extracted by the mentioned enfleurage, where the petals are placed over a fat film which retains the essential oil, following the extraction by alcohol 70 °C. This is often used for flowers containing appreciated essential oils but present at low concentrations as orange blossom, rose, jasmine and violet. Also, when dealing with high molecular weight and low volatile compounds, it is possible to extract them by organic solvents, being the solvent selection the hardest task (Arraiza Bermúdez-Cañete M. P.). On the other hand, cold pressing is commonly used for citrus fruits, where the oil glands within the peels are mechanically crushed to release their content. In the hydrodistillation process the plant material is submerged and therefore in direct contact with boiling water, meanwhile in the steam distillation the plant rests on the bottom of the still, connected to a pipe which transports the steam produced in a separated boiler. The distillate is separated in a Florentine task, including two layers (water and oil) that can be separately withdrawn. Finally, despite the extracts obtained by solvent extraction (by different organic solvents, by liquid carbon dioxide or by SFE) may not be regarded as true essential oils, their quality is very high, due to the close aroma profiles to the raw material (Başer H. C. K., et al., 2010b). More advantages about the SFE extraction are that it avoids alterations of the essential oils components thanks to the lower temperature used in comparison with the previous methods, and represents an eco-friendly technique.

### **1.4. Factors that have an influence on the essential oil composition**

There is no doubt that the environmental conditions affect in a strong manner to the production of the essential oil by plants. Among them we can point out the day length, irradiance, temperature and the mentioned water supply (Başer H. C. K., et al., 2010c). However, there are more aspects that should be taken into account. Thus, in a recent work,

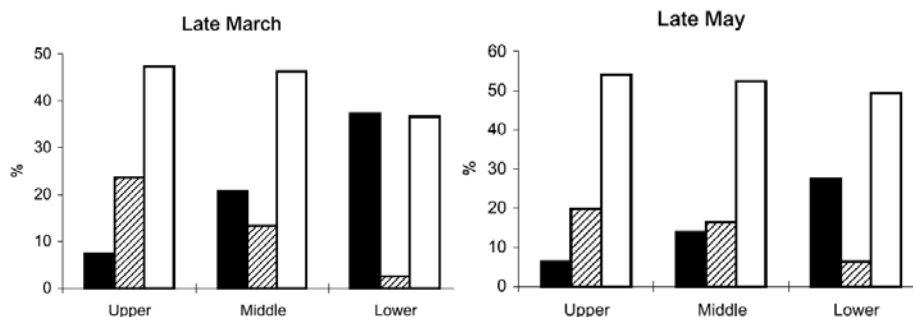
samples of *Mandevilla guanabarica* collected in the same month from three different areas in Brazil with similar annual temperature and precipitation, provided different qualitative and quantitative chemical profiles (Cordeiro S. Z., et al., 2012).

Due to the fact that plant material is the product of a predominantly biological process, there are some aspects that clearly influence their composition and therefore their properties. Besides the environmental conditions mentioned, we could highlight the intraindividual variation between the plant parts and their stage of development and the human influence by cultivation measures as fertilizing, water supply and pest management.

As we have already discussed, **the part of the plant** clearly affects the essential oil concentration, and numerous examples are found. In the case of cinnamon essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*), only the stem bark contains up to 70 % cinnamaldehyde, meanwhile the root bark consists mainly of camphor and linalool, and the leaves have eugenol as main compound (Başer H. C. K., et al., 2010c). However, this is frequent in many other plants. The leaves of parsley contained in general a higher essential oil concentration as the root, finding the same chemical composition in the two kinds of samples but with variable proportions of compounds (Kurowska A., et al. , 2006).

Moreover, **the stage of development** of the plant and its organs also influence directly on the essential oil composition, since its formation is phase dependent. In general, the concentration increases during the vegetative development of the plant. Remarkable changes on the oil composition can be observed in the generative phase between flower bud formation and full flowering, or until fruit or seed setting (Başer H. C. K., et al., 2010c). Furthermore, there is a notable difference between the tropical species, which follow in their vegetative cycle the dry and rainy season and those species from temperate zones as peppermint, more limited by the day length.

Besides, **the ontogenesis and seasonal variation** clearly play an important role on the essential oil composition. Hence, both influences of the season and the plant development stage on the volatile content of *Origanum vulgare* essential oil is shown in figure 0.2. We can appreciate the difference on the composition in relation to the younger leaves (indicated in the figure as “upper”) and older (“lower”), and also, the influence of the season when the plant is collected (Johnson C. B., et al. , 2004).



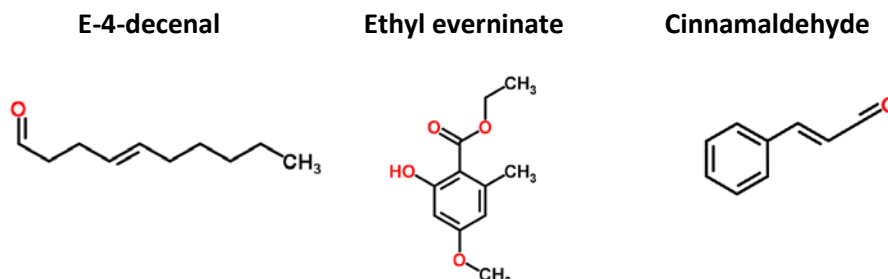
**Fig. 0.2** Influence of the season and the part plant on the EO concentration  
Average percentages of p-cymene (solid bars),  $\gamma$ -terpinene (shaded bars) and carvacrol (open bars) in upper, middle and lower leaves, sampled in March and in May (Johnson C. B., et al., 2004)

In conclusion, as we have seen, the resulting product can vary in quality, quantity and in composition depending on the climate, soil composition, part of the plant, age and vegetative state among others. Because of that, those conditions should be maintained invariables in order to obtain essential oils of constant composition. In order to ensure their quality, most of the commercialized essential oils are chemotyped by gas chromatography and mass spectrometry analysis (GC-MS) (Bakkali F., et al., 2008).

## 1.5. Composition

The compounds present in the essential oils are mainly derived from three biosynthetic pathways: the mevalonate pathway (leading to sesquiterpenes), the methyl-erithrytol pathway (mono and diterpenes) and the shikimic acid pathway (phenylpropenes) (Başer H. C. K., et al., 2010a). However, the number of single substances is almost uncountable and, as explained before, there is a huge variation in the composition of essential oils. One essential oil can contain more than 60 different compounds, some of them at higher concentrations and the rest at traces (Burt S., 2004).

Basically, the components of the essential oils can be gathered in two main groups: **terpenes** and the **non-terpenes**. Within the non-terpenes compounds we can distinguish three types of molecules: 1) lipids, as the (E)-4 decenal from the orange essential oil, 2) polyketides, that can be produced by bacteria, fungi, animals and plants, as the ethyl everninate presented in the lichen *Evernia prunastri* and 3) derivatives from the shikimic acid, an essential precursor of flavonoids and lignin, as well as cinnamic acid and therefore cinnamaldehyde (Becerril R., 2011).

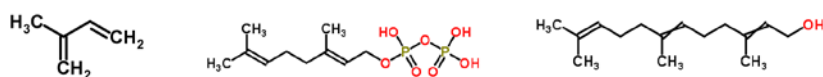


**Fig. 0.3** Examples of three different non-terpenes  
Lipids (left), polyketides (middle), and shikimic acid derivatives (right)

## Terpenes

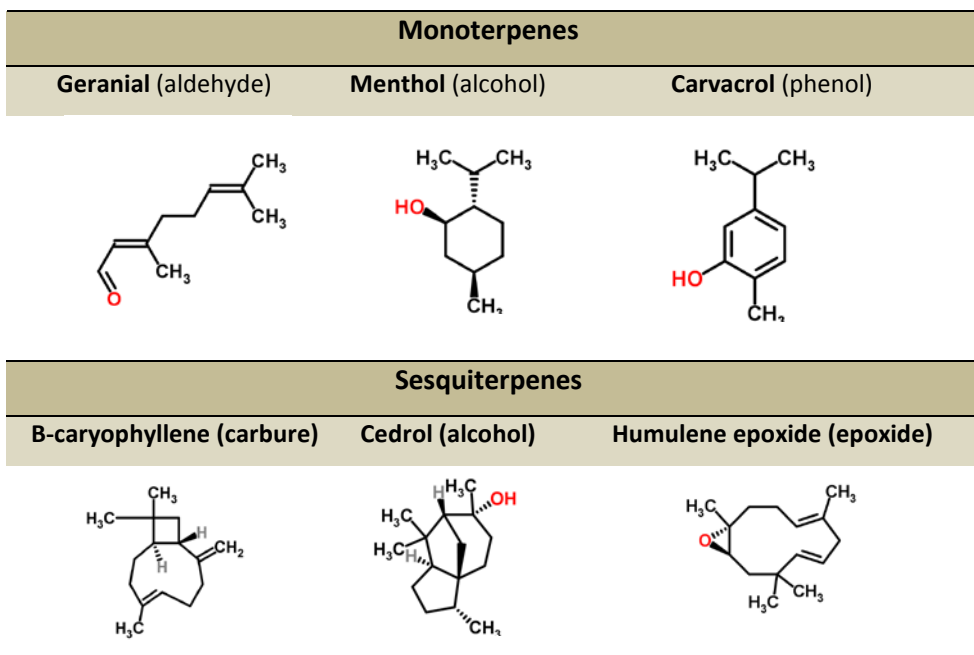
They are the biggest group of the essential oils components. They are constituted by different numbers of a 5-carbon ( $C_5$ )-base unit called isoprene (figure 0.4). The biosynthesis of the terpenes consists of synthesis of the isopentenyl diphosphate (IPP) precursor, repetitive addition of IPPs to form the prenyldiphosphate precursor of various classes of terpenes, modification of the allylic prenyldiphosphate by terpene specific synthetases to form the terpene skeleton and finally, secondary enzymatic modification of the skeleton to attribute functional properties (Bakkali F., et al., 2008).

Terpenes are classified in relation to their number of isoprene molecules, and due to the isoprene structure, they are multiples of 5 carbons. Monoterpenes, also called terpenoids, contain 10 carbons ( $C_{10}$ ) and they are derived from the GPP (Geranyl pyrophosphate) also known as geranyl diphosphate (GDP). They are the most representative group, constituting sometimes the 90 % of the essential oil. Due to the lower molecular weight, they possess lower boiling points and are more volatile than the sesquiterpenes, which contain 15 carbons ( $C_{15}$ ) and are derived from farnesol (Becerril R., 2011).



**Fig. 0.4** Isoprene (left), and the precursors GDP (middle) and Farnesol (right)  
The structures are collected from "chemspider"

Regarding their functional group (figure 0.5), monoterpenes can be divided as: carbures, alcohols, aldehydes, ketones, esters, ethers, peroxides and phenols. Similarly, sesquiterpenes are constituted by carbures, alcohols, ketones and epoxides (Bakkali F., et al., 2008).



**Fig. 0.5** Some monoterpenes and sesquiterpenes in relation to their functional groups  
The structures are collected from “chemspider”

Despite essential oils have been studied since decades, there is still a lack of knowledge about their specific mechanism of action. The main reason is based on the complexity of their chemical composition. Most of the theories concerning their antibacterial and antifungal activities point to a multi-target action against the cell. Moreover, the mechanisms proceed from the different components which could interact with them (Burt S., 2004).

Due to the large amount of different studies in relation to this subject, the antifungal activity achieved by the essential oils will be discussed in chapter 2 of the present work, meanwhile their mechanism of action will be included in chapter 4.

## 1.6. Regulation

In general, natural substances are better accepted by the consumers as the synthetic ones. Probably this is due to the association between natural products and their beneficial effects. Nevertheless, sometimes we forget that many poisons are also natural substances, derived from plants or animals, with a great potential to produce a serious harm and even death. Therefore, according to a recent review there are about 1000 plants that can produce 750 known of poisonous substances (Ndhala A. R., et al. , 2013).

However, this is not the case of the essential oils. As we have already discussed, they are able to produce a great number of beneficial effects. As we will see along this work, they have demonstrated to be a reliable alternative against food contamination. Besides, their volatile behavior permits to include them into the food packaging instead of adding them into the food product. Hence, the extensive use of the essential oils in the food field has promoted new regulations in the last decade.

Together with food additives and food enzymes, food flavouring shares a common authorization *Regulation (EC) n° 1331/2008* . However, it is the specific *Regulation (CE) n° 1334/2008* which classifies essential oils and chemical compounds into two different categories. Hence, essential oils are “flavouring preparations” which do not need to undergo an evaluation, unless the cases where it exists any doubt about their safety (*1334/2008*). Besides, essential oils are considered as GRAS (Generally Recognised As Safe) by FDA (Food and Drug Administration). On the other hand, the chemical compounds are considered as “flavouring substances”, which have been evaluated since the *Regulation (EC) n ° 2232/96* . As a result, *Commission implementing regulation (EU) n° 872/2012* introduces the new list of flavouring substances provided by *Regulation (EC) n° 2232/96* , into the Annex I from the *Regulation (EC) n° 1334/2008* . After the date of application of this *Regulation (EU) n° 872/2012* , the EU food industry will only be able to use flavouring substances that are on the EU list.

Thus, it is important to highlight that among many other authorized flavouring substances, we can find in the list the major components of the essential oils used in this work. That is, cinnamaldehyde (in the case of cinnamon essential oil), carvacrol and thymol (oregano essential oil) and eugenol (clove essential oil).

Among the natural compounds, only the extract of rosemary is listed as food additive with the claim of antioxidant by EFSA (European Food Safety Authority) and in the EU list of Food Additives. In the next years, some modifications are expected concerning food additives. For instance, those permitted before 20 January 2009 must go through a new risk assessment. In particular, the dead-line for re-evaluation of preservatives and antioxidants should be 2015-2016. However, the complete re-evaluation of food additives will not be completed until 2020 (EFSA information).



## 2. ACTIVE PACKAGING

### 2.1. Packaging and the origin of active packaging

The packaging material has been firstly designed to protect the food products from the external agents as the hit, torsion, fall, or environmental factors as dust, solar radiation, oxygen and also microorganisms. Therefore, we could define a food packaging as a container used to package food products from the production step until distribution and sell for the public. Besides, the packaging serves as an information portal system (Rodríguez Á., 2009).

Moreover, the globalization trade has exercised a direct effect on the food consumption. Nowadays we demand products that are produced from around the world, which explains the need of improving the package in order to protect the product along this process. Besides, since the implantation of the internet in developing countries, the society awareness of the quality and safety food products have been clearly raised. Therefore, more and more costumers demand products with longer shelf-life period, which in many cases is directly influenced by the microbiological contamination. Despite the food industry faces every year a great waste of money due to food contamination, the hardest situation is to avoid the food-borne infections. We have still fresh in the memory, the outbreak reported by German authorities in May 2011, caused by sprouted seeds coming from Egypt (fenugreek seeds) contaminated by a Shiga-toxin producing *Escherichia coli* serotype O104:H4 (STEC O104:H4). Among the 46 deaths caused in EU (most of them in Germany), 29 were associated to HUS (Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS) (EFSA, 2011). However, at the beginning Germany pointed the Spanish cucumbers coming from Andalucía, as the responsible focus for the contamination, which caused important economic losses in the agricultural field, and in particular in Spain. Recently, more food concern alerts have been published in local news papers, among them we could mention: oysters contaminated by *Norovirus* (in “Norma Restaurant” in Copenhagen) affecting 67 people (February 2013); the decision of IKEA to remove from the market the chocolate and caramel cakes due to a possible contamination by coliform (March 2013); the decision of supermarket chain “Dia” to remove from the market meat hamburgers contaminated by *E. coli* (October 2013).

Microbiological food contamination may produce an important health risk that must be seriously controlled. Besides, whenever there is a food alert, consumer mistrust increases,

generating fear and reluctance to the consumption of the type of product affected. As happened in the outbreak of Germany in 2011, the food industry may take time to recover, leading to devastating economic losses. Hence, active packaging is regarded as an interesting option to protect the product during the different phases of the food industry, avoiding the microbiological proliferation.

## **2.2. Active packaging: classification and legislation**

There are several possible ways to classify the packaging. One of them, considering the direct contact with the product, distinguishes between primary, secondary and tertiary. However, only the primary would be considered, being the secondary focus on boxes, and tertiary on pallets (Institute of Food Science and Technology). Regarding the substrate used, food packaging can also be divided into: plastic, paper and board, metal and glass, being the most common plastics, both flexible and rigid (Rodríguez Á., 2009)

A more extensive classification can be found in the *Regulation (EC) n° 1935/2004*. Hence, within the Annex I the materials are classified as follows: 1) Active and intelligent materials and articles, 2) Adhesives, 3) Ceramics, 4) Cork, 5) Rubbers, 6) Glass, 7) Ion-exchange resins, 8) Metals and alloys, 9) Paper and board, 10) Plastics, 11) Printing inks, 12) Regenerated cellulose, 13) Silicones, 14) Textiles, 15) Varnishes and coatings, 16) Waxes and 17) wood.

However, this classification does not include some kind of packaging as for example the multilayer materials and the paraffined paper. Due to the advancing technologies in the last decade, food packaging could also be divided into: packaging for high temperature (as the ones used for some ready-made foods), biodegradables and biopolymers materials, nanomaterials, modified atmosphere, active and intelligent packaging (Rodríguez Á., 2009).

Active packaging was mentioned for the first time by the *Regulation (EC) n° 1935/2004* showed above. Thus, according to this “active food contact materials and articles means materials and articles that are intended to extend the shelf-life or to maintain or improve the condition of packaged food. They are designed to deliberately incorporate components that would release or absorb substances into or from the packaged food or the environment surrounding the food”. However, it was not until 2009 that the first specific document appeared. The *Regulation (EC) n° 450/2009* includes the definitions of “component”,

“functional barrier”, “releasing active materials and articles” and “released active substances”.

Active packaging has been widely studied since many years, however, its development and application in the market have been always behind countries as Japan and USA. Some authors have blamed the legislative restrictions, the fear and lack of knowledge from consumers, as the potential reasons for this slowdown (Vermeiren L., et al. , 1999).

Among the several active packaging classifications available, we have chosen the Appendini P., et al. (2002) regarding their functionality, and Suppakul P., et al. (2003) considering their mechanism of action (table 0.2).

**Table 0.2** Types of active packaging regarding their functionality and mechanism of action

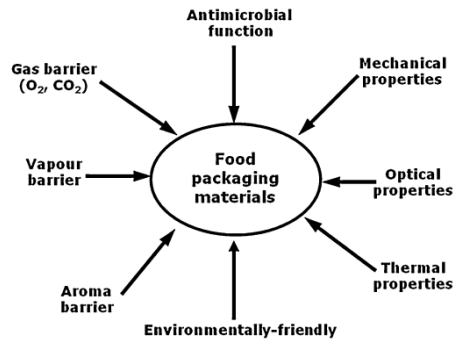
Classification	Types of active packaging
<b>Functionality</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Sachets containing volatile antimicrobial substances.</li> <li>2) Direct addition of the antimicrobial substances (volatile or non volatile) directly into polymers.</li> <li>3) Coating or adsorbing antimicrobials onto polymer surfaces.</li> <li>4) Immobilization of antimicrobials to polymers (by ion or covalent linkages).</li> <li>5) Use of polymers that are inherently antimicrobial.</li> </ol>
<b>Mechanism of action</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Oxygen Scavenging Systems</li> <li>2) Moisture-Absorbing and Controlling Systems</li> <li>3) Carbon Dioxide Generating Systems</li> <li>4) Ethanol Generating Systems</li> <li><b>5) <i>Antimicrobial Migrating and Non-migrating</i></b></li> <li>6) Antioxidants Systems* (added to the Suppakul classification)</li> </ol>

We highlight the antimicrobial active packaging because it constitutes the goal of the work presented here. Moreover, in particular the antifungal activity of an active packaging has been evaluated along the work.

### **2.3. Active packaging: nowadays**

As we have seen, the concept of food packaging has clearly changed in the last decade. Hence, in order to extend the food shelf-life, packaging should protect the product against physical aggressions, chemical contaminants, and microbiological proliferation. Herein lays the origin of the concept of active packaging. In order to prevent the failure, the package

should act as barrier against permeation of water vapor, oxygen, carbon dioxide and also flavours and taints. Moreover, packaging must guarantee mechanical, optical and thermal properties, as shown in figure 0.6 (Rhim J.-W., et al. , 2013).



**Fig. 0.6** Desired properties for food packaging materials (Rhim J.-W., et al., 2013)

There are four kinds of materials included into the basic group: paper and paperboard, plastic, glass and metal. Among them, plastics derived from petroleum have been by far the most used since the middle of the 20<sup>th</sup> century due to their technical advantages. Hence, more than 40 % of the plastics are destined for packaging and within this percentage, almost half of them are focus for food packaging, performed into films, sheets, bottles, cups, tubs, trays, etc. (Rhim J.-W., et al., 2013).

However, the research on biomaterials has been clearly increased in order to find out more sustainable materials. The excellent review from Gu J. D. (2003) explains in detail the different aspects about the polymer biodegradation, highlighting the following important considerations: a) Because of their chemical structure, biomaterials are in general considered as readily biodegradable in natural environments, meanwhile the synthetic polymers are less degradable or the degradation step occurs very slowly; b) Besides, molecular weight, cristallinity and physical forms also influence on the polymer biodegradation; c) Microorganisms are able to deteriorate and degrade both synthetic and natural polymers, due to their extracellular and intracellular depolymerases. For that, the substrate needs to cross the cellular membrane in order to be degraded by the enzymes, explaining why monomers, dimers and oligomers of a polymer's repeating unit are more suitable to degradation than polymers of higher molecular weight. In general, the process may be summed up into two steps: depolymerization, where the exoenzymes from microorganisms

cause a breakdown of the polymer into shorter chains and the degradation or mineralization, if the end product is constituted by inorganic species. However, among the environmental conditions not only aerobic situations are possible, but also anaerobic. The main differences between them concern the different microorganisms responsible for that and the products formed after degradation, being frequent organic acids, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O in the case of anaerobic conditions. Also, the author mentioned that the biodeterioration and degradation rarely reach the 100 %, due to the inclusion of small portion of the polymer into microbial biomass, humus and other natural products (Gu J. D., 2003). Apart from the materials discussed here, it is important to note that there are also biopolymers produced by renewable sources such as the B-PET (bio-based Polyethylene Terephthalate), which results in a recyclable PET but it is not a biodegradable polymer.

In the last few years, part of the investigation of active packaging is focused on assessing the properties of biomaterials, with the intent to implement them in the food industry as an eco-friendly alternative to petrochemical polymers. Considering the different sustainability levels, biodegradable and/or compostable packaging would be placed at the final step, with the role of reducing the municipal waste problem.

Biomaterials could be classified as follows: i) Bioplastics, ii) Nanocomposites and iii) other materials. Bioplastics are in turn subdivided into PLA (Polyactide), PHA (Polyhydroxyalkanoates), starch and cellulose (Mahalik N. P., et al. , 2010; Peelman N., et al. , 2013). As we can see in the next works, bioplastics have been widely studied (Hottle T. A., et al. , 2013; Landis A. E., et al. , 2007; Mahalik N. P., et al., 2010; Peelman N., et al., 2013; Scaffaro R., et al. , 2011; Yates M. R., et al. , 2013).

### ***Other materials***

Besides the bioplastics above discussed, most of the studies carried out in the recent moment are focused on evaluate other biodegradable materials as chitosan, starch, whey protein, etc. Some of these works are summarized in table 0.3, together with one example of nanomaterials (the rest have been not taken into account in this revision). As it is well known, biodegradable materials have in general poor mechanical and barrier properties when comparing to the petrochemical polymers. That is the reason why most of the studies shown in table 0.3 were focused on the evaluation of these properties and the intention to improve them in order to implement them as active packaging. Hence, the main conclusions

about optical and mechanical properties as well as permeability are shown if they were evaluated. Besides, as we can see, some of the active packaging have been applied *in vivo*.

**Table 0.3** Summary of some biodegradable active packaging published in the last years

Reference	Material	Active	Target	Mechanical properties, permeability, variables
Seydim A. C., et al. (2006)	whey protein films	oregano, rosemary, garlic	bacteria	Not evaluated.
Chalier P., et al. (2009)	soy protein coated paper	carvacrol	antimicrobial test not performed	Relative Humidity (RH) and temperature influenced the release of carvacrol.
Ojagh S. M., et al. (2010a) Ojagh (2010a)	Chitosan coating	cinnamon	rainbow trout	Active packaging reduced lipid peroxidation and microbial growth.
Ojagh S. M., et al. (2010b)	chitosan film	cinnamon	bacteria	Cinnamon acts as a cross-linked agent, reducing the moisture content, water solubility, WVP and elongation at break.
Zinoviadou K. G., et al. (2010)	whey protein films	sodium lactate (NaL) and $\epsilon$ -polylysine ( $\epsilon$ -PL)	beef	Sorbitol was necessary to overcome the brittleness of WPI films. Better results with $\epsilon$ -PL. NaL addition increased WVP and did not produced antibacterial action.
Mascheroni E., et al. (2011)	wheat/gluten montmorillonite (MMT) paper	carvacrol	bacteria	RH increased carvacrol diffusivity, and high amount of MMT ( $\geq 5$ wt%) accentuated the RH induced effect.
Balaguer M. P., et al. (2011)	wheat gliadin films	cinnamaldehyde	No evaluated	Cinnamaldehyde acts as a cross-linker, improving the mechanical properties (increasing TS, elasticity and decreasing elongation at break).
Fernández-Pan I., et al. (2012)	whey protein edible films	oregano, clove, tea tree, coriander, thyme, laurel, rosemary, sage	bacteria	The concentration limit of EO for the stability of the films was 10 %. Active agent produced films with color intensified and less transparent.

Table 0.3 Continued

Souza A. C., et al. (2013)	cassava	cinnamon	fungi	Further research is needed to improve their mechanical and barrier properties. Glycerol and emulsifier applied increased WVP, while cinnamon decreased the TS.
Higuera L., et al. (2013)	chitosan	LAE	bacteria (fresh chicken)	All films were plasticized with glycerol. Active films were transparent and uniform.
Ruiz-Navajas Y., et al. (2013)	chitosan	thymus	bacteria	Despite the good antibacterial and antioxidant activities, further studies are necessary to consider.
Balaguer M. P., et al. (2013b)	wheat gliadin films	cinnamaldehyde	No evaluated	An increase of temperature and/or RH caused a remarkable loss of barrier properties. However, cinnamaldehyde as a cross-linker, decreased WVP and O <sub>2</sub> permeability.
Kanmani P., et al. (2014)	Gelatin films	Silver nanoparticles (AgNPs)	bacteria	After adding AgNPs, a change from colourless to yellowish-brown was observed. AgNPs reduced the TS and elasticity meanwhile WVP was slightly decreased. Further studies about nanomaterials migration are needed.
Chen G., et al. (2014)	Cellulose sulfate (CS) with glycerol		banana (physical appearance)	CS films were transparent, homogeneous, flexible, water soluble and resistant to oil. Decreasing of WVP may be achieved by glycerol and increased CS molecular weight; however glycerol caused diminution of TS. The aspect of bananas was improved by coating with starch and CS.

## 2.4. Biodegradability and their environmental impact

The LCA (Life Cycle Assessment) may be used to evaluate the environmental impact of a product through the different steps, including the life beginning from the extraction of raw materials from the earth, until the waste of the products. For that, LCA evaluation requires complete information on the inputs and outputs, such as emissions, waste and resources of the process. After that, the environmental consequences must be translated, such as contribution to climate change, smog formation, eutrophication, acidification and finally, human and ecosystem toxicity.

Some authors have underlined that in some cases, the environmental benefits of biodegradation remains questionable. Therefore, after an exhaustive review of data about the LCAs on PLA, PHA and starch, they demonstrated that reductions in NREU (non renewable energy use) and GWP (global warming potential) can be achieved. On the other hand, higher impacts in other categories have been frequently reported. Due to that, it is difficult to conclude which materials are less detrimental to the environment. Moreover, the discrepancies found between different studies, as for example geographical differences, climate, the product specific requirement, variability in agricultural practices, or methodologies applied, clearly burdens the LCAs assessment. Moreover, they concluded that despite the environmental profile of biopolymers is improving and it is expected to continue in the future, at this time they may not be necessarily more eco-friendly than the petrochemical polymers that they could replace (Yates M. R., et al., 2013).

Finally, a recent published work demonstrated the antifungal activity achieved by extruding recycled PET (Junqueira-Gonçalves M. P., et al. , 2013). Despite active films gave poorer mechanical and optical properties than the controls, in that case the active agent incorporated was potassium sorbate. Besides, the results concerning the specific migration guaranteed the active packaging safety. Hence, it may be interesting to perform similar studies with the incorporation of the essential oils.



## 3. FUNGI

### 3.1. Main principles

Basically, fungi present two forms: multicellular (or filamentous) and unicellular (yeast). Yeasts are generally defined as unicellular fungi which (with few exceptions) reproduce by budding and being part to the Ascomycetes or Basidiomycetes (Samson R. A., et al. , 2010). Filamentous fungi are often called “moulds” or “molds” in UK and USA respectively.

Fungi are one of the least explored biodiversity resources of our planet. They possess some characteristics regarding their lifestyle (Webster J., et al. , 2007) among them we highlight the following:

1. **Nutrition:** Being heterotrophic, they feed mostly by absorption rather than ingestion.
2. **Vegetative state:** Despite motile reproductive states can be taken place, usually it consists of non-motile mycelium, where hyphae show internal protoplasmic streaming or movement.
3. **Cell wall:** Variable depending on the fungi. It is usually based on glucans and chitin, and rarely on cellulose instead chitin (Oomycota).
4. **Nuclear status:** Unlike bacteria (Prokaryotic cells), fungi are Eukaryotic microorganisms, being uni- or multi-nucleate.
5. **Life cycle:** Simple or more usually, complex.
6. **Reproduction:** As we will see later, usually they can be reproduced by sexual and/or asexual form.
7. **Propagules:** Most of the genera produce a high number of spores
8. **Sporocarp:** They can be macroscopic or microscopic and from different structures depending on the fungi. They are also called “fruit body” because it is where the spores are formed.
9. **Habitat:** They are ubiquitous in terrestrial and freshwater habitats, but less in the marine environment.
10. **Ecology:** They have important roles as saprotrophs, symbionts or parasites.
11. **Distribution:** Cosmopolitan.

Fungi, in particular filamentous moulds, achieve the invasion of new substrates by spores and the development of the hypha. Thus, the conquest of new often patchy resources is facilitated by the small spores. However, in the case of a food product the invasion is obtained more efficiently by growth of the hyphae, which are branching tubes that form the mycelium (Webster J., et al., 2007). Hence, during the growth of filamentous fungi it can usually be distinguished between a vegetative mycelium that roots into the substrate for the nutrient uptake and an aerial mycelium, which produces the reproductive structures containing the spores (figure 0.7).



**Fig. 0.7** Aerial mycelium of *Aspergillus flavus* rising from the culture medium. Image collected by optical microscopy (NIKON EKLIPSE E 200) by Manso S.

### 3.2. Classification

Taxonomy is the science of classification, which has three main functions: to provide a framework of recognizable features which facilitates the recognition of an organism under study; to gather organism related; and to collect the information about the identified organism, contributing to a list or catalogue (Webster J., et al., 2007). The total number of existing species is unknown, but it is estimated to be about 1.5 million (Hawksworth D. L., 1991). However, the total number of the most frequent species found in food and indoor environments is situated around 175. Despite fungi possess a cell wall, after starting to study the nuclei acids, fungi were determined to be more related to animals than to plants. As Samson R. A., et al. (2010) propose, fungi are traditionally divided into six main divisions or phyla, differentiated by reproduction mode and ultrastructural an biochemical characters into:

- 1) Myxomycetes (now considered protists)
- 2) Oomycetes (now in the Kingdom Straminipila)
- 3) Chytridis
- 4) Zygomycetes

- 5) Ascomycetes
- 6) Basidiomycetes. Within this group we find the “homobasidiomycetes” (mushrooms).
- 7) Deuteromycetes (pseudodivision), also named Fungi Imperfecti or anamorphic fungi. This group includes asexually reproducing fungi, being most of them related to the Ascomycetes or Basidiomycetes in a lower degree.

Besides their ability to contaminate animals, humans, plants, and also to spoilage food producing in some cases mycotoxins, fungi are also widely employed by many biotechnological applications. The best known examples are the production of bread and spirits (by yeast), the penicillin and the cyclosporine produced by *Tolypocladium inflatum*, an immunosuppressive drug employed in the organ transplants (Samson R. A., et al., 2010). Table 0.4 shows a summary provided by Samson R. A., et al. (2010) with the keys for the main groups of fungi commonly present in food and/or indoor environments. Only a few examples of some genera from each group have been added.

**Table 0.4** Keys to the main groups found in food and/or indoor environments (Samson R. A., et al., 2010)

GROUP	Morphological structures	Genera Examples
YEASTS	Colonies consisting of loose budding cells, pseudomycelium sometimes present but true vegetative mycelium usually absent	<i>Saccharomyces</i> <i>Yarrowia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Candida</i>
ZYGOMYCETES	Mycelium without or with a few septa, often broad; asexual spores mostly formed	<i>Rhizopus</i> <i>Absidia</i> <i>Mucor</i>
DEUTEROMYCETES	Asexual spores (conidia) produced from special cells (conidiogenous cells)	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Geotrichum</i> <i>Botrytis</i> <i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i>
ASCOMYCETES	Sexual pores formed in asci	<i>Eurotium</i> <i>Talaromyces</i> <i>Emericella</i> <i>Monascus</i> <i>Chaetomium</i>
BASIDIOMYCETES	Sexual spores formed in basidia	<i>Serpula</i> <i>Schizophyllum</i>

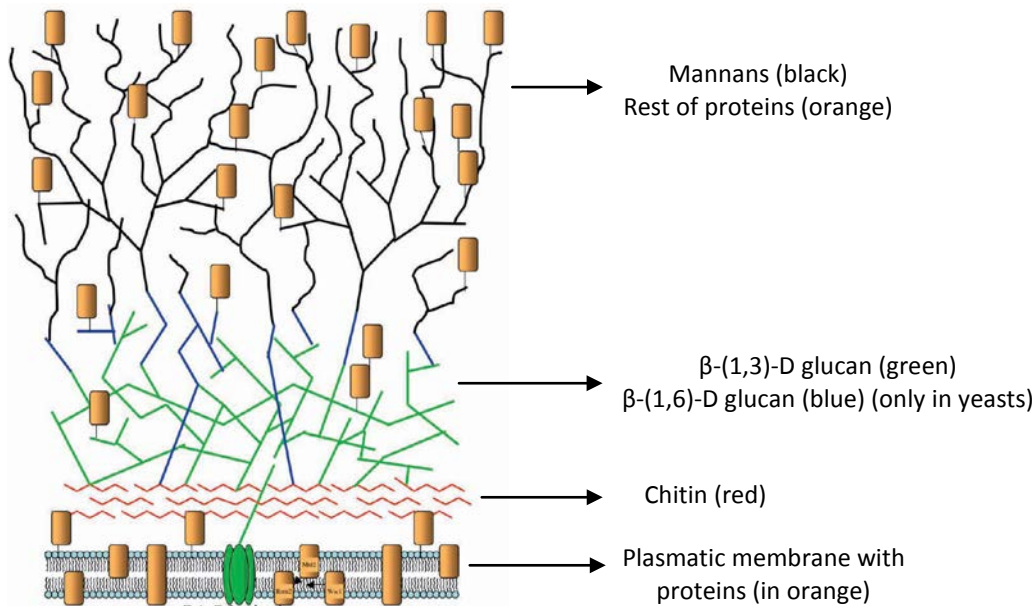
In general hyphae are very similar between different groups of fungi. However, they can be septated or aseptated. One characteristic of the Zygomycetes group (and Oomycetes) is their aseptated hyphae, also called “coenocytic”, where the nuclei lie in a common mass of cytoplasm. However, groups as Ascomycetes or Basidiomycetes (and also their asexual associated states) generally present septated hyphae, where each segment contains one, two or more nuclei. When the mycelium derived from a single uninucleate spore, the resulting nuclei are genetically identical (being called homokaryotic mycelium). On the other hand, the fusion of genetically different hyphae (anastomosis) form a mycelium with nuclei of different genotype or heterokaryotic mycelium (Webster J., et al., 2007).

### **3.3. Fungi structure, with an emphasis on the cell wall**

As an eukaryotic cell, besides the nucleus, fungi possess important organelles as mitochondria, responsible for the cell respiration, endoplasmic reticulum, ribosome 80 S, vacuoles, and Golgi apparatus.

The cell wall is a plasticity structure that protects the fungi towards different stress situations, as the osmotic changes. It is responsible for the shape of the cell, and it controls the cell permeability. Besides, because some proteins are adhesions and receptors, the cell wall interacts with other cells, the fungal cell and its environment. Within its components, some of them are highly immunogenic (Ponton J., 2008). As will be treated in chapter 4, disruptions on the cell wall have a deep effect on the growth and viability of the fungal cell, being able to cause the lysis and death. Hence, its vital role explains why fungal cell wall has been considered as an important target of the anti-fungal therapy.

Cell walls from ascomycetous yeast have been studied in detail, which explains why they have created an almost generally accepted model of the fungal cell wall (de Groot P. W. J., et al. , 2009; Ruiz-Herrera J., et al. , 2010). Figure 0.8 shows an image about the distribution of the different components of the yeast cell wall. However, the model of the cell wall structure of ascomycete yeasts should not be extended to the walls of the rest of the fungal taxa (Ruiz-Herrera J., et al., 2010).



**Fig. 0.8** Yeast cell wall of *S. cerevisiae* and *C. albicans*  
 The green structure embedded into the plasmatic membrane makes reference to the  $\beta$ -(1,3)-D-glucan synthetase (Ponton J., 2008)

As we have seen, fungal wall is essential for the viability and pathogenicity of fungi. It represents a considerable portion of the dry weight of fungal cells (Cantu D., et al., 2009), about 20 % of the cellular biomass in some cases (de Groot P. W. J., et al., 2009). However, as we can see in table 0.5, despite they have a similar chemical profile, the fungal cell wall differs between different genera and species, mainly in the concentration of the different components. Furthermore, besides the variations between different species, its chemical composition also depends on the morphological stage of the cell as a result of ageing (Cantu D., et al., 2009).

**Table 0.5** Chemical composition of the cell wall of some fungi  
 Data as percentage of the dry weight of total cell wall fraction (Webster J., et al., 2007)

Group	Genera	Chitin	Glucans	Protein	Lipid	Cellulose
<b>Oomycota</b>	<i>Phytophthora</i>	0	65	4	2	25
<b>Chytridiomycota</b>	<i>Allomyces</i>	58	16	10	?	0
<b>Zygomycota</b>	<i>Mucor</i>	9	44	6	8	0
<b>Ascomycota</b>	<i>Saccharomyces</i>	1	60	13	8	0
	<i>Fusarium</i>	39	29	7	6	0
<b>Basidiomycota</b>	<i>Schizophyllum</i>	5	81	2	?	0
	<i>Coprinus</i>	33	50	10	?	0

Among all the components that can be found into the fungal cell wall, we will only discuss the three major ones: chitin, glucans and glycoproteins.

### ***Chitin***

The synthesis of chitin is produced by chitosomes, specialized organelles, described as vesicles about 40-70 nm in diameter containing the enzyme chitin synthetase in inactive form, becoming active only when they are delivered to the apical plasma membrane and therefore in contact with the lipid bilayer (Bartnicki-García S., 2006).

Chitin is a long linear homopolymer of beta-1,4-linked N-acetylglucosamine, being 1-2 % of the yeast cell wall meanwhile in filamentous fungi as *Neurospora* and *Aspergillus* are about 10-20 %. In both yeast and filamentous fungi, chains of chitin microfibrils are connected by hydrogen bonding, forming a crystalline polymer of an enormous tensile strength which contributes to the cell wall integrity (Bowman S. M., et al. , 2006). Despite three forms of chitin exist depending on the orientation of the chains,  $\beta$  (parallel chains),  $\alpha$  ( antiparallel chains) and  $\gamma$  (two parallel adjacent to one antiparallel chain), the  $\alpha$ -chitin is the most frequent in nature and present in the fungal cell walls (Ruiz-Herrera J., et al., 2010). In some fungi as the zygomycetes, the chitins fibres are modified after their synthesis to produce poly- $\beta$ -(1,4)-glucosamine or chitosan (Webster J., et al., 2007). A characteristic of fungi is that they possess more than one chitin synthetase (Ruiz-Herrera J., et al., 2010).

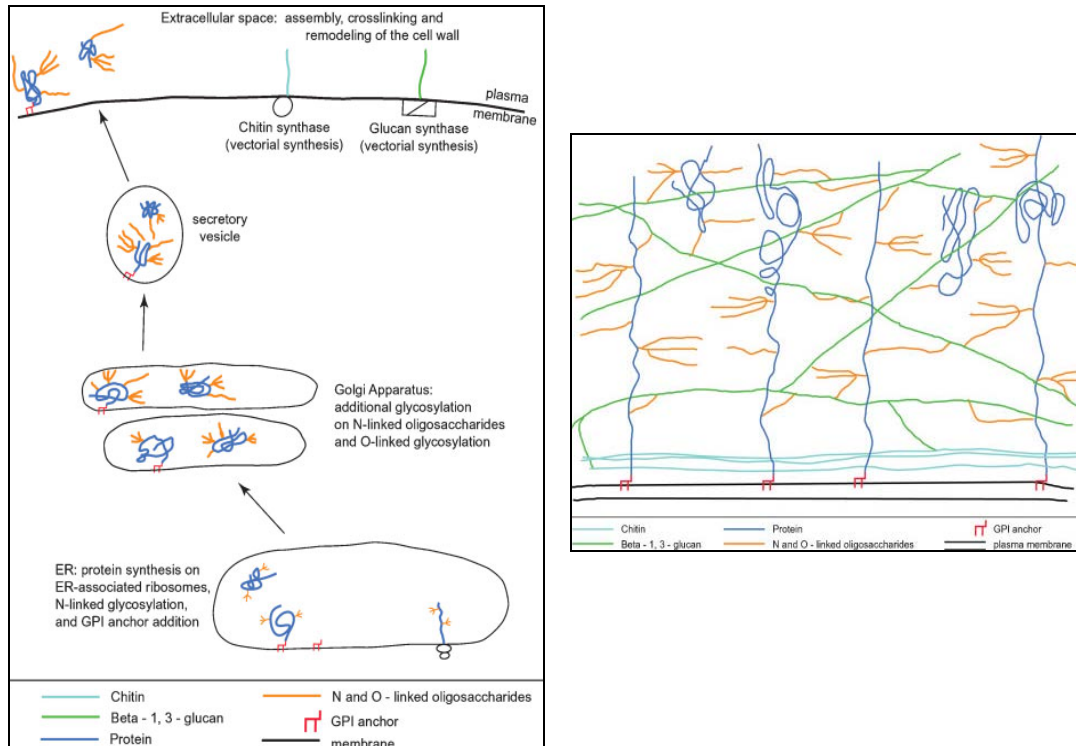
### ***Glucans***

Approximately 50-60 % of the cell wall corresponds to the glucan content. They are formed by repeated units of glucose bounded by different chemical linkages. Despite the 65-90 % of the glucans are  $\beta$ -1,3-glucan, there are also others in the cell wall as:  $\beta$ -1,6-glucan,  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,4, however,  $\beta$ -1,6 does not appear in many filamentous fungi as showed the works with *N. crassa* (Borkovich K. A., et al. , 2004), and *A. fumigatus* (Fontaine T., et al. , 2000). The other components of the cell wall are covalently bonded to the  $\beta$ -1,3-glucan, which acts as the main structural constituent (Bowman S. M., et al., 2006).

## ***Glycoproteins***

Proteins are the third important chemical constituent of the fungal cell wall. Besides the enzymes are responsible for the synthesis or lysis of the wall, or the extracellular digestion, there are also structural proteins (Webster J., et al., 2007). In yeasts as *S. cerevisiae* and *C. albicans* 30-50 % of the dry weight correspond to proteins, meanwhile in filamentous fungi they represent the 20- 30 % (Bowman S. M., et al., 2006). Most cell wall proteins are glycosilated, where there are two main types of glycosilation in eukaryotic cells: *O*-glycosilation, with a short chain of sugars attached to serine or threonine residues, and *N*-glycosilation, where they are bonded to asparagine (Ruiz-Herrera J., et al., 2010).

The degree of glycosilation also varies. In the case of *S. cerevisiae* the 90 % of the molecular weight of an extracellular protein is due to its glycosilation chains (Webster J., et al., 2007). Due to the fact that in yeasts the cell wall proteins are glycosilated with chains of mannoproteins, they are generally called “mannans”. However, in filamentous fungi such as *Neurospora crassa* and *Aspergillus fumigatus* they present galactomannan structures, consisting of both mannose and galactose residues. Besides, in all fungal phyla GPI proteins exist, which are glycoproteins that contain a GPI anchor, that is, a structure containing lipid and oligosaccharide, bounded to select proteins that possess a C-terminal signal sequence (Bowman S. M., et al., 2006). The GPI anchor is attached to the cell membrane, being its polypeptide bond addressed into the periplasmic space (Ruiz-Herrera J., et al., 2010).



**Fig. 0.9** Biosynthesis (left) and drawing of the fungal cell wall (right)

Chitin (pale blue), glycoproteins (dark blue with orange N- and O-oligosaccharides),  $\beta$ -1,3-glucan (green) and GPI anchor in the cell membrane (red) are shown. Both images come from the work of Bowman S. M., et al. (2006)

As can be seen in figure 0.9, the glucan and chitin are synthesized on the plasma membrane and released into the cell wall space. On the other hand, the *N*-contralation glycosylation starts in the ER (Endoplasmic Reticulum), where also GPI anchors are bounded to GPI-anchored proteins. After that, in the Golgi apparatus the *O*-glycosilation takes place as well as the elongation of *N*-linked oligosaccharides. Then, the secretory vesicles transport the glycoproteins towards the cell wall space and they are integrated into the cell wall structure. Hence, GPI anchor not only localize the protein to the plasma membrane and/or the cell wall, but it is also needed for protein stability and function (Bowman S. M., et al., 2006).

Similarly to the cell wall of ascomycetous yeasts, the hyphal wall of *Aspergillus nidulans* revealed a bilayered structure with a thick electron-transparent inner layer (composed by chitin and glucan) and an electron-dense outer smooth layer consisting of glycoproteins (Cantu D., et al., 2009; de Groot P. W. J., et al., 2009; Jeong H. Y., et al., 2004). To sum up, on one hand the inner layer would serve as the scaffold structure, consisting of a cross-linking between the chitin microfibrils and the glucans, which confers rigidity but also plasticity to



the wall. On the other hand, the wall matrix will be formed by the glycoproteins in the outer layer, which determines the pore size (permeability) of the wall matrix. Also, surface proteins conferring adhesion and recognition to the cell are placed at the cell wall surface (Webster J., et al., 2007).

Finally, ergosterol is a characteristic sterol present not into the cell wall, but in the plasma membrane of fungal cells, and as will be discussed in chapter 4, together with the wall components, it constitutes a target for the antifungal therapy.

### **3.4. Reproduction and mould growth**

#### ***Reproduction***

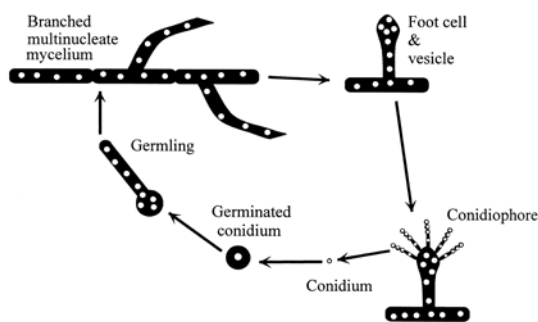
Obviously, reproduction is part of the fungal growth. Due to the extensive number of works dealing with this subject, we will try to resume the main points to draw a general view of the fungal mechanisms.

Mould reproduction is not an easy task. Since many years, biologists have studied both forms, sexual and asexual reproduction of fungi (Fiddy C., et al. , 1976; Momany M., et al. , 2000; Osherov N., et al. , 2001; Riquelme M., et al. , 2003), dealing also with the molecular mechanisms involved in the fungal development (Krijgsheld P., et al. , 2013) and also the phenomenon of reproductive competence (Noble L. M., et al. , 2013). As we have already seen, we can mainly distinguish two forms: sexual or asexual reproduction. The sexual state is called “teleomorph” (also called meiotic or perfect state) and the asexual “anamorph” (mitotic or imperfect state). Most of the fungi found in food and indoor environments belong to the Ascomycetes (within the pseudodivision of the Deuteromycetes) and are asexually reproduced. However, ascomycetous or basidiomycetous teleomorphs (sexual, meiotic or perfect states) have been associated and therefore connected with several of these anamorphic species. One example would be the case of *Botrytis cinerea* and its associated teleomorph specie *Botryotinia fuckeliana*. However, there are still many species where only the anamorph state is known (Samson R. A., et al., 2010). Conidia makes reference to the asexual spores of Zygomycota, Ascomycota and Basidiomycota, meanwhile their sexual spores are named zygosporangia, ascospores and basidiospores respectively.

Due to the fact that all the species evaluated in this work belong to the Deuteromycetes group, we will pay more attention to the asexual reproduction.

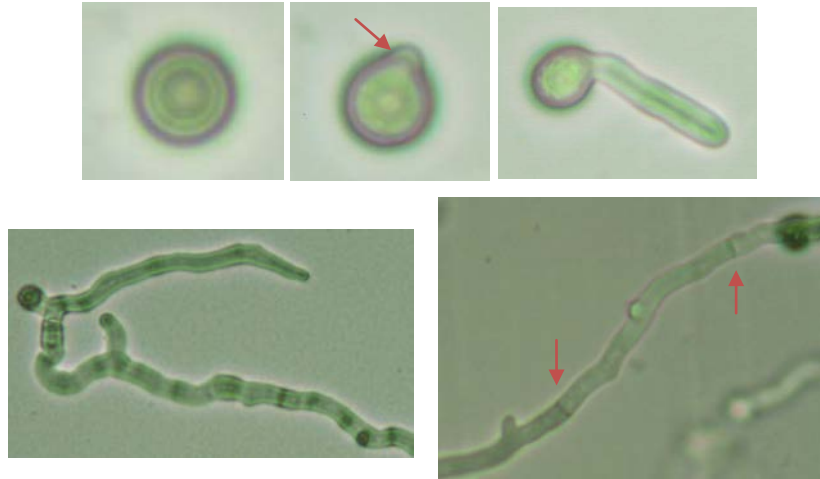
### ***Conidia cell wall and germination***

As mentioned, conidia are the asexual spores or anamorphic propagules, which germinate under favourable nutritional conditions to colonise new environments. Many changes in cell wall composition have been observed during the fungi growth, but also when comparing hypha and fungal spores (Cantu D., et al., 2009). The germination of conidia produces new hypha, but this is not a simple process, therefore it could be divided into four steps: 1) the breaking of the dormancy (or vegetative rest period), 2) the isotropic swelling, 3) the establishment of cell polarity and 4) the formation of the germ tube (Dague E., et al., 2008). Figure 0.10 shows a draw of the general path followed during the asexual mould reproduction. Besides, the spore germination and elongation can be observed in figure 0.11.



**Fig. 0.10** Asexual cycle of *A. nidulans* (Osharov N., et al., 2001)

The conidial cell wall is also composed of two layers, but they differ from the hypha wall. Therefore, the conidia hydrophobic external layer is composed of melanin and proteinaceous microfibrils (called rodlets) meanwhile the electro-transparent internal contains polysaccharides (as  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans), chitin/chitosan, and galactomannan. Hence, for the swelling of conidia during germination, the cell wall needs to be remodeled (Fontaine T., et al., 2010). The septum formation takes place at the end of mitosis in order to achieve the cell separation.



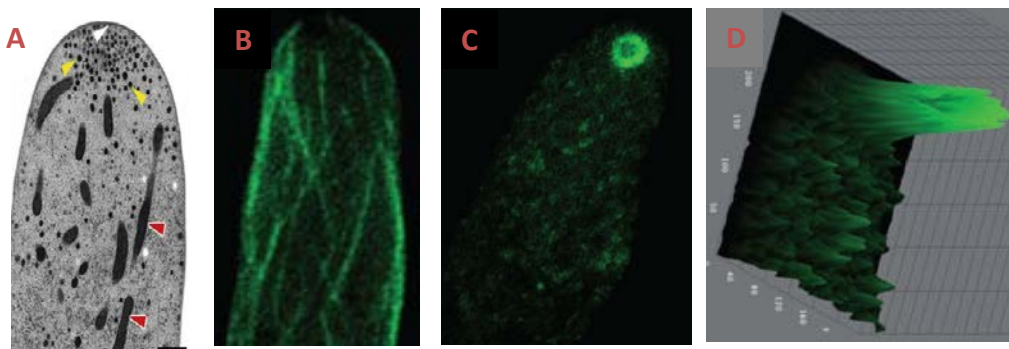
**Fig. 0.11** Growth of *Aspergillus flavus*, showing different phases of growth Above: spore in interphase (left), germination started (b) and hyphal elongation (c). Below: further elongation of the hyphae to form the mycelium (d) and detail of the septum formed (e, red arrows). Image collected by optical microscopy (NIKON EKLIPSE E 200) by Manso S.

In summary, the rodlet hydrophobic layer is lost by disruption and by changing into a layer of amorphous material that unmasks the polysaccharides of the inner spore wall (Dague E., et al., 2008).

### ***The polarized growth***

Fungal cytoskeleton plays a wide range of functions as: control of cell movements, intracellular transport of vesicles and organelles, cellular division, maintenance of cell shape, organization and support of cytoplasmic components among others. It is mainly composed of two protein filaments, the microtubules and the actin microfilaments. However, it is well known that it is a dynamic structure (Riquelme M., et al. , 2011). Since over a century, it is known that the vegetative fungal hypha possess two fundamental properties, polarity of both growth and secretion of degradative enzymes (Webster J., et al., 2007). Not only the biosynthesis of the cell wall has been studied for a long time (Farkas V., 1979), but also the morphogenesis and elongation of the hypha. Hence, we can find excellent works dealing with the growth kinetic (Trinci A. P. J., 1969), even achieving to model the growth and branching (Prosser J. I., et al. , 1979). However, the introduction of microscopic techniques played an important role, permitting to visualize the hypha growth and measuring their elongation at the same time (Trinci A. P. J., 1978). Despite some difference on the morphogenesis of the hyphal apex have been found between different genera, the mechanism for hyphal growth is

basically similar (Diéguez-Urbeondo J., et al. , 2004). All the studies performed with different species have concluded that the key of the hyphal growth lies in the apex. Hence, the ultrastructural examinations (as Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy) have demonstrated that the hyphae contain different regions within the organelles (Riquelme M., et al., 2003; Riquelme M., et al., 2011; Verdín J., et al. , 2009; Webster J., et al., 2007). In the extreme apex the cytoplasm contains almost exclusively secretory vesicles and microvesicles. The entire formation of the apical body is called “Spitzenkörper” in the higher fungi (Ascomycota and Basidiomycota), meanwhile in lower Eumycota as Zygomycota vesicles are more loosely distributed (Webster J., et al., 2007). Some results carried out in the fungi *Neurospora crassa* have allowed to visualize the localization of some important structures thanks to fluorescent tagging (fig. 0.12 a-d). Hence, in (a) we can see the major components of the apical apex as the macrovesicles (yellow arrows), some of them fused with the cell surface (white arrows), and the mitochondria (red arrows). The cytoskeleton microtubules are presented along the hypha (b), and finally, the GS-1 localization (a protein required for the glucan synthase activity in *N. crassa*) has been also found in the apical apex (c,d).



**Fig. 0.12** Distribution of different structures in the apical apex of the hypha TEM (Transmission Electron Microscopy) (a) and confocal fluorescence tagged microscopy (b-d). The images have been resized to follow the same proportion between them. Figure A and B-D have been taken from (Riquelme M., et al., 2011) and (Verdín J., et al., 2009) respectively

Regarding the reproduction state and the hyphal growth, a work carried out with *Aspergillus nidulans* demonstrated that both apical growth and mitosis are independent processes, being the nuclei closest to the apex which ended the mitosis first, and observing a wave of mitosis moved quickly along the hypha (Riquelme M., et al., 2003). Similarly, the polar growth of *Aspergillus fumigatus* was found to start before the mitosis (Momany M., et al., 2000). As told before, the septum formation takes place after the mitosis, in order to achieve the cell separation (Duran A., et al. , 2004). The complete growth is reached after

several days (depending on the strain, nutrients and the variable conditions), a slow process compared to bacteria where the normal cycle consists of 24 hours.

Through the quick overview presented in this section, the complexity of fungi has been demonstrated. Therefore, due to the great variability among them, the next sections of this introduction will be focused on the filamentous moulds evaluated in the present work, and the way to prevent their growth in the food products. Moreover, in parallel with the previous discussion regarding the structure and growth of fungi, we will also add some images about the reproductive structures of the main species of filamentous moulds treated.

## 4. **FOODBORNE MOULDS**

### 4.1. **Mould spoilage**

As we have seen, fungi are microorganisms clearly more complex than bacteria. Putting aside the clinical importance, where they can produce important mycosis (Prescott L. M., et al. , 2002), we will address the attention towards food contamination.

Despite fungal growth only occurs under favorable conditions, moulds have the capacity to contaminate all kind of foods, as meat, milk, fruit, vegetables, nuts, fats and derivatives. However, it is known that each kind of food is in general associated to a specific and limited range of moulds, which makes reference to the term “mycobiota” (Filtenborg O., et al. , 1996). This might be explained due to the species characteristics and the properties of the product. Also, in some cases this occurs because of a high contamination from ecological niches where the mould has been previously developed. As one example, the rotten matter in orchards cause the infection of the apples by *Penicillium expansum* (Samson R. A., et al. , 2004).

Among the several classifications of the most common genera and species in relation to the food product, we have selected a recent publication that collects the data of spoilage fungi in the period 1999-2012 (Dagnas S., et al. , 2013) (table 0.6). However, a more exhaustive list is available in the book from Samson R. A., et al. (2010).

**Table 0.6** Examples of mould spoilage in different food products

Product	Mould	Product	Mould
<b>Bread</b>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Endomyces fibuliger</i> <i>P. commune</i> <i>P. corylophilum</i> <i>P. palitans</i> <i>P. polonicum</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. solitum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. solitum</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. commune</i> <i>P. polonicum</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i>	<b>Pastry</b>	<i>A. candidus</i> <i>A. niger</i> <i>C. cladosporioides</i> <i>Eurotium herbariorum</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. digitatum</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>A. flavus</i> <i>C. cladosporioides</i> <i>Alternaria alternata</i>
<b>Pudding</b>	<i>E. chevalieri</i> <i>E. repens</i>	<b>Cheese</b>	<i>P. commune</i> <i>P. discolor</i> <i>P. roqueforti</i>
<b>Not specified</b>	<i>E. amstelodami</i> <i>E. chevalieri</i> <i>E. herbariorum</i> <i>E. repens</i> <i>P. brevicompactum</i>	<b>Yogurt</b>	<i>M. circinelloides</i> <i>A. niger</i> <i>P. spinulosum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. commune</i> <i>P. corylophilum</i> <i>P. purpurogenum</i> <i>A. flavus</i> <i>F. oxysporum</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>C. cladosporioides</i>
<b>Dairy caramel</b>	<i>Wallemia sebi</i>		
<b>Wine grapes</b>	<i>P. expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>		
<b>Jam</b>	<i>W. sebi</i>		
<b>Wheat flour</b>	<i>P. species</i> <i>A. flavus</i> <i>A. terreus</i> <i>P. citrinum</i>	<b>Satsumas</b>	<i>P. digitatum</i> <i>P. italicum</i>
<b>Grain</b>	<i>P. verrucosum</i>	<b>Cocoa Chocolate</b>	<i>P. chrysogenum</i> <i>A. flavus</i> ; <i>M. racemosus</i>
<b>Corn</b>	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>F. verticilliodes</i> <i>F. proliferatum</i>	<b>Apples</b>	<i>P. expansum</i>
		<b>Strawberries</b>	<i>B. cinerea</i>
		<b>Flavored water</b>	<i>P. glabrum</i>
<b>Peanuts</b>	<i>A. parasiticus</i>	<b>Coffee, cereal</b>	<i>A. ochraceus</i>

Moreover, besides the visual growth they can also contribute to other negative factors as the production of flavours, toxins, change of colour, rotting and formation of pathogenic or allergenic propagules (Filtenborg O., et al., 1996). Hence, during the mould growth a “primary” metabolic process take place, mainly as the result of the breakdown of

carbohydrates. Some of these derivative compounds are ethanol and organic acids as citric acid, fumaric acid, oxalic acid, gluconic acid and polyols as mannitol and arabitol. All these compounds, together with others as glycogen and lipids, can be accumulate into large concentrations under certain conditions (Samson R. A., et al., 2004). However, other metabolites are produced also during but especially at the end of the growth that are not essential for the mould development and for the energy supply required. These compounds are known as “secondary” metabolites and they can be classified as sterorids, carotenoids, alkaloids, cyclopeptides and coumarins. Despite they differ significantly from their biosynthesis route and their chemical structure, most of them begins with the condensation of acetyl and malonyl groups into polyketides or terpenes. The most important are the steroids (being ergosterol up 25 % of the cell weight) and carotenoids, responsible for the colony colour of many fungi. Due to their health risk potential, various alkaloids, cyclic peptides and coumarins belong to the mycotoxin group (Samson R. A., et al., 2004).

Also, we must take into account that fungi are able to produce exoenzymes (as lipases, proteases, carbohydrases (Bigelis R., 1992) that can act inside the food, even after removing the mycelium and therefore producing undesirable aroma or taste (Filtenborg O., et al., 1996). Fungal spoilage can contaminate the food product by the mycelium, spores and sclerotia. In general, mycelium contamination is a sign of an infection. On the other hand, germination of spores and sclerotia depend among other factors, on water and on the presence of nutrients (Doyle M. P., et al. , 2007).

Fungal growth is responsible for severe economic losses due to the consumer rejection of the food product spoilage. Besides, some filamentous moulds can produce mycotoxins, important secondary metabolites, some of them with a potential risk for human health. Despite the presence of a mycotoxigenic specie does not mean the obligatory presence of the mycotoxin, the incubation factors can trigger the production. This subject will be detailed further in chapter 5.

In general, due to the size of the colony, fungal growth is visible to the naked eye on the surface of the food product. In many cases, mold spoilage is the result of spores that are able to germinate once contaminating the product, forming a visible mycelium before the end of the shelf life (ESL). Germination of a single spore consists of two different processes, that is, latency before germination and germination rate (Dagnas S., et al., 2013). The period without growth is also known as “quiescence”, that can result in a symptomless infection or in visible

growth but non-expanding symptoms as in the case of the ghost spot of tomato caused by *Botrytis cinerea*. The quiescent period can take place during the attachment of the fruit to the plant. For example, the initial infection of strawberry or grape is caused by gray mold contamination at blooming, which remains dormant until fruit formation or during postharvest storage (Doyle M. P., et al., 2007). On the other hand, proliferation is described by the hyphal elongation that starts without any delay after the spore germination. Thus, both spore germination and the posterior elongation are two successive and continuous processes (Dagnas S., et al., 2013).

#### **4.2. Factors affecting the growth of filamentous fungi**

The first limitation of the mould growth is the **source of nutrients**. Due to the fact that fungi are not able to synthesize carbohydrates, the substrate should contain them. However, in their absence they can use the amino acids as carbon source, which is why fungi grow well in products rich in proteins but not in carbohydrates as cheese. Nitrogen is the other important requirement. All fungi can assimilate organic nitrogen compounds, but inorganic compounds by only few species. Some vitamins should also be present in the substrate, and others are synthesized by the fungus itself (Samson R. A., et al., 2004). As we can see, almost all food products fulfill the minimum nutrient requirements for the growth of filamentous fungi, this is why they have the ability to contaminate almost any of them.

Usually, when the **pH** of a food product remains in the optimum (about 4.5-8), bacteria compete with moulds. In table 0.7 we can see the information from Dagnas S., et al. (2013) concerning pH values, as well as water, protein and sugar concentration of different fruits and vegetables. However, it is known that filamentous moulds are able to grow at more acid pH than bacteria, showing a higher acidic tolerance. This explains why the citric microbiological contamination is mainly due to moulds and yeasts and not to bacteria (Doyle M. P., et al., 2007). In general, pH of most food products permits both germination and mould proliferation (Dagnas S., et al., 2013).



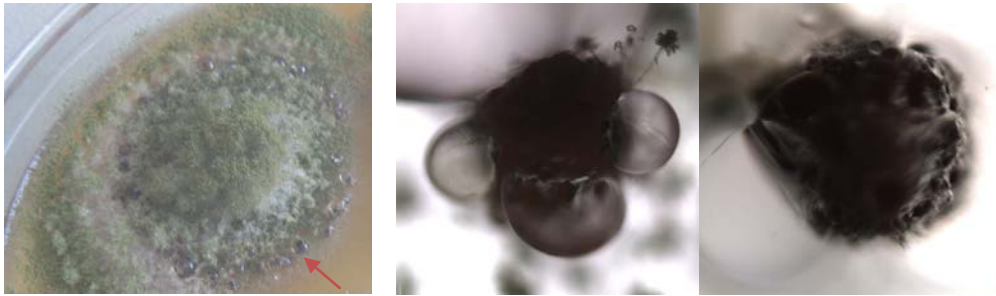
**Table 0.7** pH, water, protein and sugar contents of some fruits and vegetables

Fruit or vegetable	pH	Water (g/100 g)	Protein (g/100 g, fresh wt)	Sugars (g/100 g, fresh wt)
Asparagus	5.0-6.1	93.2	2.2	1.9
Beans (lima)	5.4-6.5	70.2	6.8	1.5
Broccoli	6.5	89.3	2.8	1.7
Carrot	4.9-6.3	88.3	0.93	4.5
Cauliflower	6.0-6.7	91.9	2.0	2.4
Corn (sweet)	5.9-7.3	76.0	3.2	3.2
Lettuce	6.0-6.4	95.6	0.9	1.7
Onion	5.0-5.8	88.5	0.9	4.3
Pepper (red)	5.3-5.8	92.0	1.0	4.2
Potato tuber	5.6-6.2	81.6	1.7	1.2
Spinach	5.1-6.8	91.4	2.9	0.4
Squash	5.0-5.4	94.6	1.2	2.2
Tomato (ripe)	3.4-4.7	94.5	0.88	2.6
Apple	2.9-3.3	85.6	0.26	10.4
Banana	4.5-5.2	74.9	1.1	2.4
Grape	3.4-4.5	80.5	0.72	15.0
Lime	1.8-2.0	88.3	0.70	1.7
Melon (cantaloupe)	6.2-6.5	90.2	0.84	7.8
orange	3.6-4.3	86.8	0.94	9.4

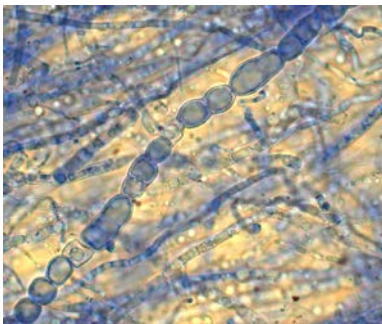
Another important limiting factor is the **temperature**. Some tolerable species are capable to grow at moderate and even at high temperatures. For example, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* present both a wide range of possible temperature, being the optimum close to 30 °C depending on the strain. They can be found in shelf-stable food, especially hot water (Dagnas S., et al., 2013). Other species are able to grow at fridge temperature due to a psychrophilic behavior. Others, such as for example some species of *Penicillium* (*P. expansum*, *P. roqueforti*), *Fusarium* (*F. oxysporum*) and *Rhizopus* (*R. stolonifer*), have the capacity to develop at 6°C, despite their growth rate is clearly retarded (Samson R. A., et al., 2010). Most *Penicillia* have a lower minimal temperature range than the *Aspergilli*, being in general the optimal for the first genera between 25 °C- 30 °C and 30 °C-40 °C for the second one. Also, the maximal temperature for the *Penicillia* is 28 °C-35 °C, and 37 °C-45 °C for most *Aspergilli* (Samson R. A., et al., 2004).

Besides, we have to take into account that there are moulds that are able to survive to heat treatments (75 °C for 30 minutes). Most of the resistant propagules are ascospores, but also other morphological structures such as sclerotia (figure 0.13), chlamydiospores and thick

walled hyphae can resist high temperatures. Some of these moulds that we can find frequently are species of *Talaromyces*, *Eupenicillium* and *Eurotium* among others. The identification of a possible heat resistant mould proceeding from a food sample should be carried out by avoiding any aerial contamination that could lead to false positive results (Samson R. A., et al., 2010).

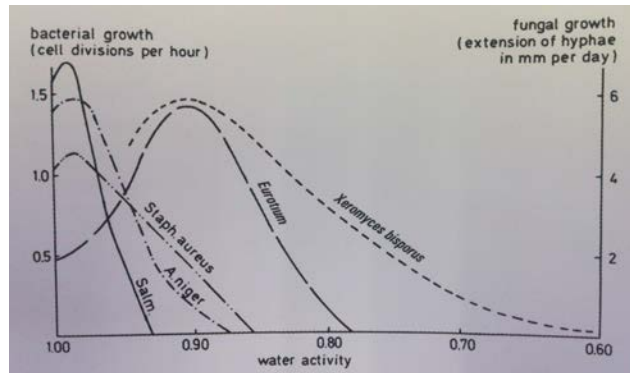


**Fig. 0.13** Example of black sclerotia in *Aspergillus flavus* CECT 2687  
 Left: macroscopic observation of sclerotia, showed as black points in PDA media (red arrow). Right: detail of one of the sclerotia spot, surrounded by water droplets. Images collected by confocal microscopy (ZEISS Stemi 2000-C) by Manso S.



**Fig. 0.14** Mycelium of *Fusarium poae* CECT 20165  
 This specie does not produce chlamydiospores, but contains swollen hyphae (central part of the figure). Image collected by optical microscopy (NIKON EKLIPSE E 200) by Manso S.

Finally, mould growth is clearly influenced by water activity ( $a_w$ ) that could be defined as a measure of the unbound water present in the product that is available for fungal growth. As shown in figure 0.15, in general bacteria need higher  $a_w$  than fungi for their growth. This explains why some dry products are almost exclusively contaminated by fungi (Samson R. A., et al., 2010). Hence, regarding  $a_w$  tolerance, fungi can be classified into xerophilic or xerotolerant, which are able to grow below 0.85, and non-xerophilic, with a range of 0.85-1. However, other authors consider fungi growing below 0.95 as xerophilic. As occurs with temperature and pH,  $a_w$  decrease causes a slowdown of both germination and proliferation. Some examples of xerophilic are *Eurotium*, *Wallemia* and *Chrysosporium* (Dagnas S., et al., 2013).



**Fig. 0.15** Growth comparison between bacteria and fungi, regarding  $a_w$  (Samson R. A., et al., 2010)

Hence, decreasing  $a_w$  of the product could be a way to avoid fungal spoilage, however, an inconstant temperature could trigger the  $a_w$  (Samson R. A., et al., 2010). Besides, fungal growth can be influenced by the three individual factors above discussed (pH, temperature and  $a_w$  and also by a combination of the three of them (Gock M. A., et al., 2003).

Considering the **oxygen** requirement, most fungi needs oxygen for their growth, however, some species are able to grow under anaerobic conditions, with the subsequent formation of ethanol and organic acids.

The control of temperature, relative humidity and composition of the gaseous atmosphere is commonly used to control fungal spoilage. Although fungi are able to grow out of their optimal conditions in some cases, the rate of development is reduced. In general, a reduction of  $O_2$  and  $CO_2$  retards or inhibits microbial growth, depending on the microorganism and on the gas combination. However, the main handicap of modified atmosphere is the possible change of the food product quality. In some products (Doyle M. P., et al., 2007) such as potato tubers, carrot and other root crops, modified atmosphere can increase the extent of diseases.

### **4.3. Isolation and enumeration of mould spoilage from food products**

Despite fungi can be isolated from air and building materials, here we will focus on food samples.

There are several manners to isolate fungi from food samples, being the choice dependent on the food matrix. For example, in products such as grains and nuts, it is recommendable to apply a previous surface disinfection in order to be able to enumerate fungi invading the food. In other cases as wheat grains, both surface disinfection and non-disinfection should be carried out (Samson R. A., et al., 2010).

Most of the times, a mould growing on the surface of the product is the responsible for the food spoilage (for example bread, fruits and vegetables). In this case, the first step should be the fungal isolation. For that, there are mainly two methods, the direct plating and the dilution plating. Within the direct plating, fungi can be sampled with the aid of a cello tape or the inoculate needle. After that, the mould must be streak inoculated onto an appropriate medium. Despite there are general media such as Malt Extract Agar (MEA), V8 juice agar (V8) and Dichloran 18 % Glycerol agar (DG18), in suspicion of xerophilic or proteinophilic fungi, other media are also highly recommended. All of them are usually of neutral pH and contain antibiotics such as chloramphenicol. Regardless of the sampling method, the isolation must be done by streak inoculation on the media (usually in 2 or 3 points). This is due to the high contamination (aerial or cross contamination) that can easily contribute to a false result (Samson R. A., et al., 2010).

In general, fungal quantitation from a food sample is carried out by dilution plating. In brief, an initial amount of sample (usually 5 g and 40 g for homogeneous and non-homogeneous food materials respectively) is diluted (1:10) in water with 0.1 % peptone, homogenized with the aid of a stomacher and further diluted (1:10) (usually between 2-4 dilution steps). Finally, 0.1 mL from the appropriate inocula is spread on the media by employing a steril Drigalsky spatula. After the incubation period, plates with up to 30-50 colonies are counted and the result is expressed as Colony Forming Unit (CFU) per gram of sample. Additionally, samples can be harvested and quantified by swab sampling, where surface is rubbed by a sterile swab, being the result in this case calculated as CFU/m<sup>2</sup> (Samson R. A., et al., 2010).

Despite the first dilution plating methodology is widely applied, it should be taken into account that unlike bacteria, fungal biomass consists of hyphae, spores and other propagules, and there are also some species that sporulate in a higher degree than others. For these reasons, fungal quantitation it is not easy and it provides usually a less accurate result than in bacteria (Samson R. A., et al., 2010).

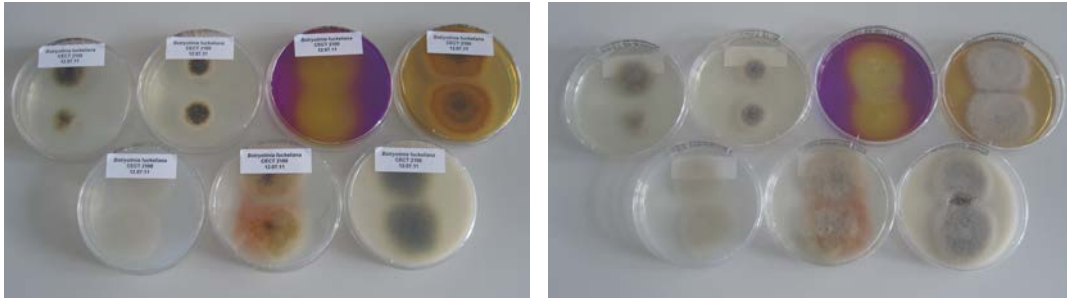
#### **4.4. Macroscopic and microscopic observation**

When working with filamentous moulds, we must take into account that their morphology differs in a considerable manner when using different culture media in the *in vitro* evaluation. As we will see later, despite this can be a handicap in some cases, it serves as an advantage when identifying a genera or specie, due to the specific growth characteristics experimented in each media.

In both direct plating and dilution plating, the final step is to try to identify the specie, which can be carried out mainly by morphological, molecular and/or chemical identification (Samson R. A., et al., 2010). The first one is carried out by microscopic observation, where the slide preparation is an essential step. The fungal sample is placed on a microscope slide, usually containing lactophenol blue, and the fungal tissue must be teased out to be able to identify the reproductive and characteristic structures with the aid of flame-sterile needles. After that, the slide is covered with a cover lid. In the case of species producing many dry conidia (as *Aspergillus* and *Penicillium*), a drop of alcohol can be added before the cover lid to wash away the hydrophobic conidia (Samson R. A., et al., 2010). DNA sequencing is the most used technique within the molecular methods, and TLC or HPLC permit the separation of secondary metabolites within the chemical taxonomy, which can be identified with the appropriate standards or specific detectors.

Despite morphological identification seems to be an easy method, a complete identification is often very difficult to achieve due to the complexity of fungal morphology. Hence, there are many microscopic details between different species that are often the key for identifying a certain species, that cannot be distinguished by a non-trained eye (for example a rough walled spore), needing because of this a well trained staff. However, in many cases it is possible to reach the genera with the aid of three main features: 1) culturing the mould on different media, 2) microscopic observation and 3) a basic knowledge of the main associated mycobiota for the particular food product.

As we can see in figure 0.16 and figure 0.17, the growth of a filamentous mould clearly differs between the different media. Therefore, the main aspects that should be appreciated in the macroscopic observation are, among others, color, texture, size and growth rate of the colony (or colonies). Usually, a dark incubation period of 7 days at 25 °C is required, varying the conditions in relation to the specie. All the strains showed in figures 0.16 and 0. 17 were incubated for 7 days at 25 °C.



***Botryotinia fuckeliana*** CECT 2100. Colonies on 7 media. Reverse (lef) and front side (right)  
Upper line: Czapek (CZP) / DG18 / CREA / MEA ; Lower line: PCA / PDA / Oatmeal (OA)



***P. expansum*** CECT 2278, front side.  
Upper line YES / DG18 / CZP  
Lower line: MEA / OA / CREA



***P. roqueforti*** CECT 2905, front side.  
Upper line YES / DG18 / CZP  
Lower line: MEA / OA / CREA

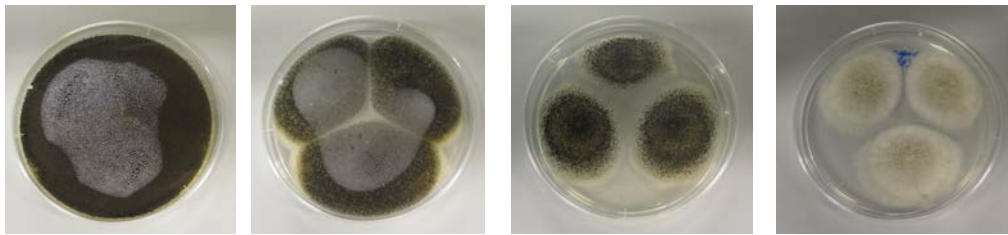


***A. clavatus*** CECT 2674, front side.  
Upper line YES / DG18 / CZP  
Lower line: MEA / OA / CREA

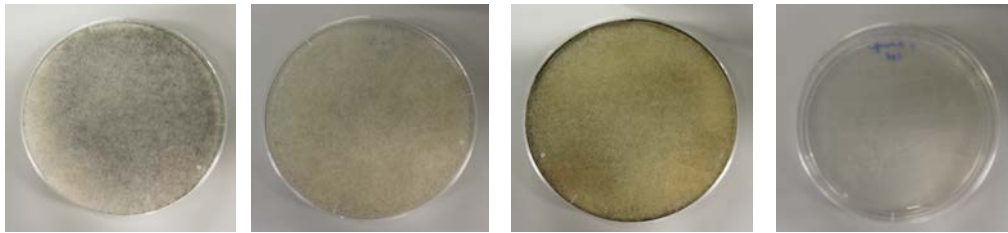


***A. flavus*** CECT 2687, front side.  
Upper line YES / DG18 / CZP  
Lower line: MEA / OA / CREA

**Fig. 0.16** Macroscopic growth of different species on different culture media  
Images collected by Manso S.



***A. niger*** CECT 2088, front side.  
From left to right: YES / CYA / PDA / CZP



***R. stolonifer*** CECT 2344, front side.  
From left to right: YES / CYA / PDA / CZP

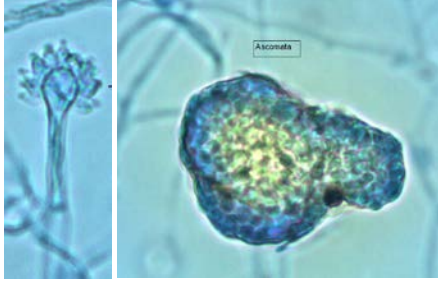
**Fig. 0.17** The choice of the culture media influences on the sporulation rate  
Macroscopic growth of the moulds *A. niger* and *R. stolonifer* on different media. Images collected by Manso S.

Firstly, macroscopic observation must be done on both sides (reverse and front side) of the Petri dish (see the example of *Botryotinia fuckeliana*). As can be observed, colonies from the same strain, grown on different media, appeared in some cases totally different. Besides, the sporulation rate obtained for each media also differs between different species. Hence, *A. niger* produces the highest sporulation on YES, meanwhile in the case of *R. stolonifer* the most appropriate media is PDA.

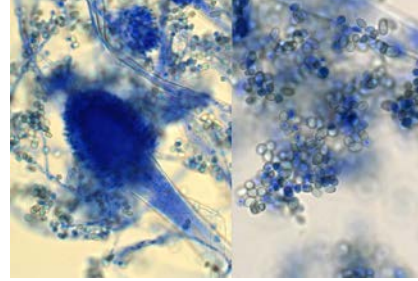
After the macroscopic growth, the microscopic observation has to be carefully performed, by the identification of the main keys such as: diameter and length of hyphae and spores; morphology of the fruiting bodies; presence or not of septum; ramifications; presence or not of resistant forms as chlamydiospores, sclerotia; spore size, coloration, etc. Some examples are illustrated in figures 0.18 and 0.19.

Hence, if we want to design an experimental plan by employing a fungal inoculum, it is important to know some few things before starting. Therefore, the knowledge about its growth on different culture is useful in order to perform the experiment in optimal conditions. Also, the identification of the main keys in both macroscopic and microscopic observation ensures the correct growth of the specie used and provides important data to take into account about the morphology and taxonomy of the specie under evaluation.

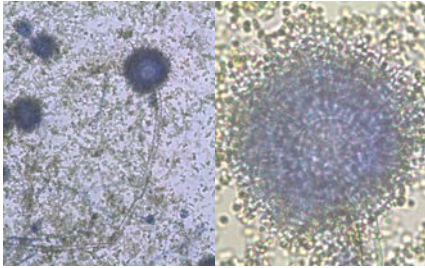
Finally, as will be discussed in the first chapter, the fungal suspension should be sampled from inocula with sufficient spore production, in order to achieve an homogeneous inoculum and therefore, to gain reproducibility among the different experiments performed.



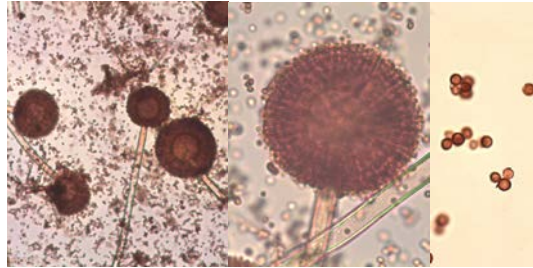
***Eurotium chevalieri***, the teleomorph specie of *Aspergillus chevalieri*. Conidiophore with subglobose vesicle, cylindrical phialides and conidia (left). Ascus containing the sexual spores ascospores (right).



***Aspergillus clavatus*** CECT 2674. Typical clavate conidiophore (left) and ellipsoide spores (right)



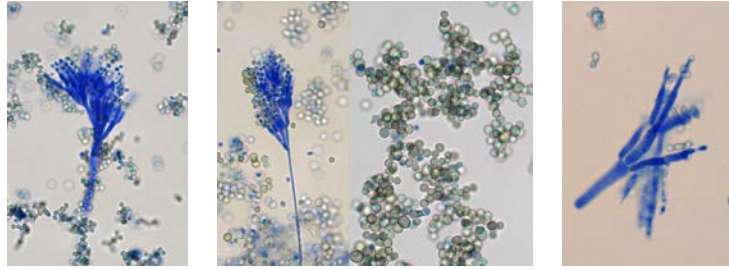
***Aspergillus flavus*** CECT 2687. Radiate conidiophores (left) and detail of vesicle, metula and phialide from a conidiophore (right).



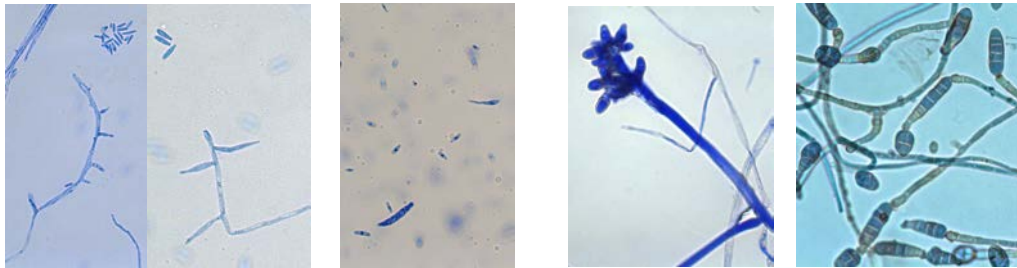
***Aspergillus niger*** CECT 2088. Radiate conidiophores (left) and detail of a globose vesicle, metula and phialide from a conidiophore (middle). Detail of black and rough-walled globose conidia (right).

**Fig. 0.18** Microscopic growth of *E. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. flavus* and *A. niger*  
Images collected by confocal microscopy (ZEISS Stemi 2000-C) by Manso S.



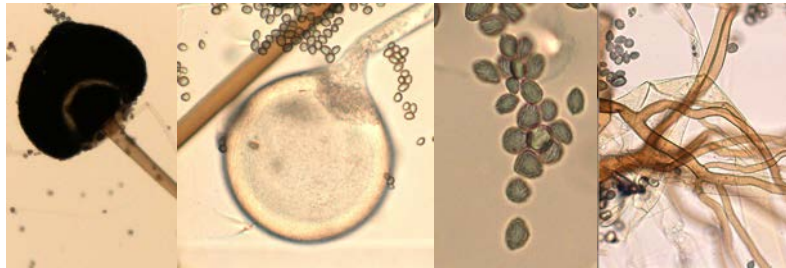


***Penicillium expansum*** CECT 2278 quaternary branched conidiophores (left) ; ***P.roqueforti*** CECT 2905 quaternary branched conidiophore with detail of globose and large spores (middle) ; ***P. digitatum*** CECT 2954 conidiophore with cylindrical and short neck phialides and ellipsoidal conidia (right).



***Fusarium poae*** CECT 20165 conidiophore with short mono-phialides and one-celled microconidia (left). ***F. proliferatum*** CECT 20569 macroconidia and microconidia (right).

***Botryotinia fuckeliana*** CECT 2100, related to the anamorph *Botrytis cinerea* (left); ***Alternaria alternata*** CECT 2662 conidiophores and conidia with transversal and longitudinal septa (right).



***Rhizopus stolonifer*** CECT 2344 (a-d). Big and dark blackish brown pigmented sporangium containing many spores (a); detail of a globose columellae with noticeable apophysis (b); detail of sporangiospores (c); typical rhizoids (d).

**Fig. 0.19** Microscopic growth of *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. digitatum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *B. fuckeliana*, *A. alternata* and *R. stolonifer*  
Images collected by confocal microscopy (ZEISS Stemi 2000-C) by Manso S.

## 5. ANTIFUNGAL ACTIVE PACKAGING

Mould spoilage is responsible for the alteration of many products, resulting in huge economic losses for the food industry. Besides, most of the species are able to produce mycotoxins with a recognizable health risk. For these reasons, the efforts to prevent fungal contamination have increased in the last decades.

Among the different options, we have seen that essential oils are natural substances with well-known antibacterial and antifungal activities, making them suitable for being incorporated into a food packaging. Moreover, most of them are active both in direct contact and in vapor phase. Therefore, the active packaging can be applied without needing a direct contact, and hence, reducing the aroma or taste that could be transferred into the food product. Besides the examples shown in table 0.3, other applications that could be mentioned are active packaging containing cinnamon essential oil to avoid fungal growth in bread (Gutiérrez L., et al. , 2009b), tomatoes cherry (Rodríguez-Lafuente A., et al. , 2010), and bread and cheese (Balaguer M. P., et al. , 2013c). Also, other works have been published using other substances as potassium sorbate in berries (Junqueira-Gonçalves M. P., et al., 2013) and nisin and natamycin in cheese (Hanusová K., et al. , 2010). In the case of antibacterial active packaging, among the latest publications we can find LAE to avoid contamination in fresh chicken (Higuera L., et al., 2013) and carvacrol in salmon (Cerisuelo J. P., et al. , 2013).

As we will further discuss along this work, cinnamon essential oil has been chosen as the best antifungal agent among the substances tested. Previous results made in our laboratory concluded that cinnamon is compatible with most of the aromas used in the food industry, which opens the possibility for their application (Gutiérrez L., 2010; Gutiérrez L., et al. , 2009a).

To sum up, the success of an antifungal packaging will mainly depend on: 1) the choice of the essential oil, 2) the material, 3) the fungal specie and 4) the composition of the substrate.

Firstly, the composition of the essential oil will determine its activity, while certain variables (such as pH, temperature,  $a_w$ , incubation time, food composition, etc) may also influence, as will be discussed more in detail in chapter 2. Once included into the material, the nature of the substrate will play also an important role, mainly due to the essential oil

retention into the matrix and controlled release to the package atmosphere. This point will be also discussed in chapter 3, and again, variables as pH,  $a_w$  and temperature will influence the performance. Finally, the antimycotoxigenic action of the essential oils will be treated in chapter 5

## **SECCIÓN II: Objetivos**



## OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el estudio de un envase activo antifúngico basado en la incorporación de aceites esenciales en el material de envase. Para ello, el desarrollo experimental se ha llevado a cabo para abarcar los siguientes objetivos generales:

1. Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de canela, oregano y clavo y sus compuestos mayoritarios (cinamaldehído, carvacrol y eugenol), tanto en contacto directo como en fase vapor, frente a diversas cepas de moho capaces de contaminar una amplia gama de productos alimenticios.
2. Actividad de un envase activo antifúngico con canela en fase vapor, estudiando su eficacia frente a variables externas como pH y temperatura.
3. Estudio del mecanismo de acción antifúngica de los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios, para poder optimizar el diseño del envase activo.
4. Comparación de la difusión en fase vapor de cinamaldehído, carvacrol y eugenol, aportando datos necesarios para el desarrollo del envase activo y para profundizar en el mecanismo de acción antifúngica de los mismos.
5. Evaluación de la actividad antimicotoxigénica, analizando la disminución de aflatoxina B1 por parte de un envase activo antifúngico con aceite esencial de canela en fase vapor.

Así mismo, en la parte experimental de esta Tesis Doctoral (sección III), se detallan los objetivos específicos planteados en cada caso.



## **SECCIÓN III. Desarrollo Experimental**





# CAPÍTULO 1

---

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE INÓCULO DE MOHO

- 1. Introducción*
- 2. Objetivos y esquema de trabajo*
- 3. Materiales y métodos*
- 4. Resultados y discusión*
- 5. Conclusiones*



## 1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha explicado en la sección primera, los mohos son microorganismos eucariotas de gran complejidad. La primera etapa de crecimiento la constituye el desarrollo del micelio vegetativo, el cual enraíza en el sustrato en busca de nutrientes. Conforme el moho prosigue se empieza a visualizar el moho aéreo, el cual contiene las estructuras reproductoras donde se encuentran las esporas. Por tanto, a diferencia de seres unicelulares como las bacterias, hay que tener en cuenta que cuando se recoge el inóculo de un moho, no sólo se arrastran esporas sino que se lleva consigo fragmentos de micelio.

Además de esto, como se abordará más extensamente en el capítulo 2, la compleja morfología de los mohos dificulta la estandarización de métodos, lo que lleva a cada investigador a utilizar las técnicas que considera más aptas o asequibles. Este problema se encuentra a todos los niveles, es decir, no sólo en cuanto a ensayos antifúngicos específicos u otras pruebas experimentales, sino también en el punto inicial de determinar la concentración de un inóculo.

### 1.1. Maneras de cuantificar el inóculo inicial de un moho

De esta manera, la primera pregunta antes de empezar cualquier trabajo con un moho, debería ser ¿cómo cuantifico el inóculo inicial que voy a utilizar? Cuando se parte de un inóculo extraído en una disolución acuosa, las maneras más comunes de representarlo o calcularlo es mediante el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL ó “CFU/mL” en inglés) (Inouye S., et al. , 2001; Matan N., et al. , 2008; Navarro D., et al. , 2011) y el número de esporas por mL (sp/mL) (Gómez-Ramírez C., et al. , 2013; Juglal S., et al. , 2002; Kocic-Tanackov S., et al. , 2012a; Li W.-R., et al. , 2013; Velázquez-Nuñez M. J., et al. , 2013; Xing Y., et al. , 2012). Sin embargo, en algunos trabajos no parten desde una disolución, sino que utilizan otras maneras de inocular el moho, ya sea por ejemplo mediante un “plug” o trozo de agar de un diámetro concreto (por ejemplo de 6 mm) desde un cultivo sólido de moho crecido (Wu F., et al. , 2011; Znini M., et al. , 2013) o utilizando agregados de micelio previamente liofilizados (Inouye S., et al. , 2000). A pesar de que si utilizamos cualquiera de las formas mencionadas conseguiremos el crecimiento del moho, esto no quiere decir que no haya unos métodos más apropiados que otros para cuantificar el inóculo con el que vamos a trabajar. Si bien es cierto que la determinación de CFU/mL

muchas veces implica la presencia tanto de micelio como de estructuras reproductoras (Doyle M. P., et al., 2007), una recogida óptima de inóculo, favorecerá la reproducibilidad a la hora de utilizar dicha disolución de partida.

Sin embargo, en el caso de los dos últimos métodos bibliográficos mencionados sí que existe claramente una limitación, ya que por ejemplo al depositar un “*plug*” de moho, se desconoce siquiera el margen de concentración empleado, de manera que hace muy difícil la reproducibilidad de ese estudio. Además, en ese caso en el crecimiento de dicho “*plug*” interferirán las condiciones de la placa del precultivo de donde se ha extraído, ya que éstas habrán afectado entre otras cosas, a la esporulación de dicho “*plug*”. Debido a esto, consideramos más apropiado la recogida del inóculo en una suspensión acuosa, ya que esto permite cuantificarlo de manera más precisa.

A la hora de elegir entre CFU/mL o sp/mL, habrá que considerar también la cepa con la que se trabaja. De esta manera en algunos mohos, como el conocido género *Rhizopus*, sería más apropiado calcular la concentración de inóculo mediante el número de esporas. Esto se explica debido a su extenso crecimiento, el cual no forma colonias individualizadas en la placa, sino un crecimiento en manta. Además en este caso concreto, ocurre con gran rapidez, ocupando antes de las 72 horas no sólo la superficie completa de la placa sino también el espacio de cabeza de la placa Petri debido a un micelio extremadamente aéreo. A pesar de ello, hay autores que realizan el recuento mediante CFU/mL, pero siempre a las 24 horas desde la siembra en vez de 72 horas (Espinelgroff A., et al. , 1991).

Debido a las razones expuestas, todos los inóculos de la presente tesis se extrajeron en disolución acuosa, para poder calcular así la concentración de los mismos y asegurar además la reproducibilidad de los experimentos. Sin embargo, resulta evidente que la primera condición necesaria para poder obtener precisión en dicha medida o recuento, pasa por obtener una disolución lo más homogénea posible, lo cual implica una recogida de inóculo apropiada.

## **1.2. Recogida de esporas**

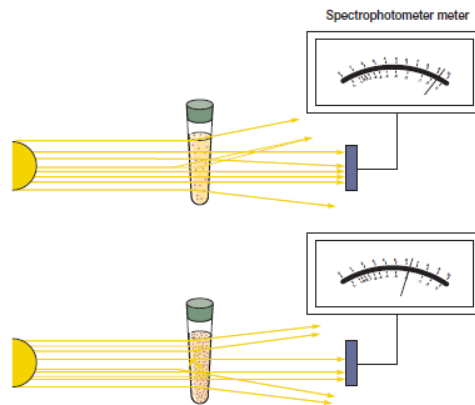
A pesar de que el micelio también tiene capacidad reproductora, ya que un fragmento del mismo vuelve a iniciar de nuevo el ciclo reproductivo del moho, la extracción del mismo crea un cúmulo de fragmentos de diferente tamaño. Por este motivo las esporas, siendo

células individualizadas de un tamaño homogéneo dentro de la misma especie, resulta la mejor opción de recogida de un inóculo para preparar una disolución homogénea fácil de cuantificar.

En primer lugar, lo más conveniente es partir desde un cultivo que facilite el desarrollo del moho y su esporulación. El medio de cultivo de elección varía según la especie, mientras que el tiempo de incubación suele ser alrededor de siete días para la mayoría de cepas, lo cual asegura una tasa suficiente de esporas. La recogida más idónea se lleva a cabo por medio de un hisopo estéril, el cual se pasa por la superficie del cultivo, girando a la vez el hisopo para que las esporas se vayan adhiriendo al mismo. Tras haber depositado las esporas de la primera recogida en un tubo de ensayo conteniendo una solución salina, se repite la operación dependiendo de lo concentrada que interese obtener la muestra. Para ello se utiliza el mismo hisopo, el cual además, al estar humedecido facilitará la adhesión de las siguientes esporas. La metodología se explicará con más detalle en la parte correspondiente del capítulo.

### **1.3. Cuantificación de la concentración del inóculo por espectrofotometría**

Una vez que tenemos la suspensión del inóculo recogido, el siguiente paso sería la cuantificación del mismo. La turbidimetría es una técnica sensible que se basa en el principio de dispersión del haz de luz que atraviesa una disolución microbiana. Cuando la concentración de inóculo aumenta, la turbidez de la muestra es mayor, por lo que la cantidad de luz transmitida a través del medio es menor. La cuantificación se lleva a cabo utilizando el espectrofotómetro, el cual mide la luz absorbida por la muestra, que como se sabe, será inversamente proporcional a la luz transmitida (figura 1.1).



**Fig. 1.1** Turbidimetría de una disolución microbiana mediante espectrofotómetro. Arriba se indica la medición en porcentaje de transmitancia y abajo en porcentaje de absorbancia. Imagen tomada de Prescott L. M., et al. (2002).

La turbidimetría se emplea tradicionalmente en bacteriología, gracias a la cual se desarrolló la escala de McFarland, que permite relacionar la turbidez del inóculo con su concentración. De esta manera, un inóculo medido a 625 nm y con una densidad óptica entre 0.08-0.1, equivaldrá a 0.5 en la escala de McFarland y se corresponderá con una concentración entre  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL (NCCLS, 2003). De manera similar, también la NCCLS ( "National Committee for Clinical Laboratory Standards" o "CLSI" en inglés) dispone desde hace unos años de un método similar para levaduras y otro para mohos filamentosos, aunque la aplicación de estos se enfoca hacia cepas clínicas y la determinación de los antifúngicos clínicos sobre las mismas, y además sólo está disponible para algunas cepas (NCCLS, 2012). La razón por la cual estas normas están más presentes en el ámbito clínico que en el alimentario, puede deberse a la menor variabilidad en las condiciones de cultivo en el primer caso, siendo raro por tanto adaptar dicha metodología en microbiología alimentaria, porque generalmente, los medios de cultivo se adecúan según las necesidades de la cepa e incluso del trabajo de investigación en sí.

El inconveniente que puede presentar la medición de la turbidez de una muestra para su cuantificación, reside en el hecho de que la medida implicará tanto células vivas, como las dañadas o muertas. Este mismo problema ocurre en el conteo de las esporas por medio de cámara de Neubauer, método del que hablaremos durante el desarrollo experimental. Sin embargo en nuestro caso esto no supondría problema alguno, ya que hay que tener en cuenta que los inóculos recogidos provinieron siempre de cultivos incubados en las condiciones apropiadas, es decir, vivos y por tanto, con capacidad plena de reproducción. Es

evidente matizar por tanto, que no será lo mismo cuantificar los microorganismos presentes en una muestra dada (por ejemplo, un alimento), donde ahí sí que influirá la presencia de vivos y muertos, que el desarrollar un experimento en el cual se parte de un cultivo idóneo. El método más sencillo para estudiar la viabilidad celular, sería el recuento de número de colonias (CFU/mL) en placa.

Como hemos visto, la ventaja de la medición de absorbancia radica fundamentalmente en la sencillez y rapidez del método. El contaje de esporas, debido a que se realiza por cámara de Neubauer en el microscopio óptico, supone más tiempo y además, es un método manual en el que sólo intervienen los ojos del propio observador, pudiendo conllevar a errores considerables en el caso de falta de experiencia. La turbidometría se presenta por tanto, como una medida robusta y exenta de la necesidad de habilidad por parte del técnico. Por otra parte, el contaje de colonias (CFU/mL) se obtiene tras varios días de incubación del moho. Éste es un dato muy útil para confirmar la concentración de inóculo que se ha empleado, y también asegurar la comentada viabilidad del cultivo, pero no nos permite ajustar la concentración inicial a la deseada.

Por todo ello, se ha querido aprovechar las ventajas que supone la turbidometría para cuantificar los inóculos de moho de los trabajos desarrollados en la presente tesis, por medio en este caso, de una manera más simplificada que la propuesta por la NCCLS. De esta manera, este primer capítulo ha constituido la base para el desarrollo de la tesis, ya que no sólo ha facilitado el trabajo con las cepas evaluadas, sino que ha ayudado a asegurar la repetitibilidad y reproducibilidad de los diferentes ensayos llevados a cabo.

Por último, hay que tener en cuenta que para asegurar la reproducibilidad en dichas determinaciones, conviene trabajar siempre en las mismas condiciones de cultivo. Es decir, en la presente tesis los inóculos se pre-cultivaron siempre en los medios que resultaron más aptos para la esporulación de cada especie, teniendo especial cuidado en emplear las mismas condiciones (temperatura, pH, tiempo de incubación, etc) en los experimentos repetidos.

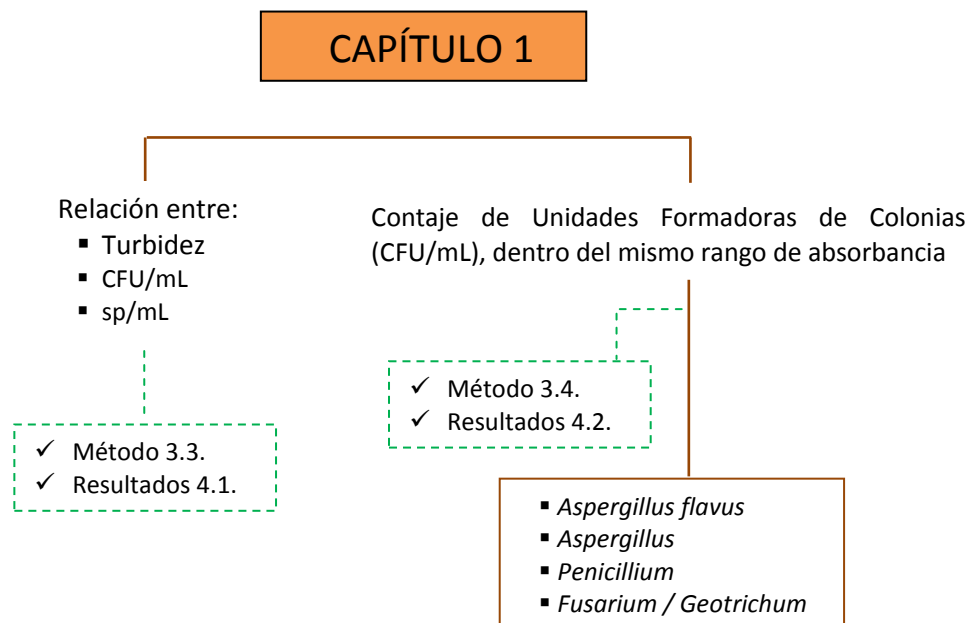


## 2. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO

A la hora de comenzar la tesis, la primera problemática que se presentó fue la manera de cuantificar una suspensión de inóculo con la mayor rapidez y precisión posible. Este punto era esencial a la hora de continuar con el resto de trabajos, debido a que no sólo se iba a ganar en tiempo, sino que se conseguiría garantizar una mínima reproducibilidad en todos los experimentos llevados a cabo.

Debido a esto, el objetivo principal de este primer capítulo fue establecer una relación entre la turbidez de un inóculo en suspensión acuosa con el recuento del mismo, ya sea mediante el número de colonias (CFU/mL) o de esporas (sp/mL) por mililitro de disolución. Esta etapa constituyó la primera parte del capítulo, gracias a la cual se consideró un rango de densidad óptica óptimo en el cual se extrajo la mayoría de inóculos de la tesis.

Por tanto, en la segunda parte del capítulo se evaluaron los recuentos de inóculos de varias cepas (mediante CFU/mL) extraídos en el rango de turbidez determinado previamente, para así evaluar la posible aplicación del método en diferentes cepas. La figura 1.2 muestra un esquema del trabajo realizado en este capítulo.



**Fig. 1.2** Diseño experimental del capítulo 1. Como puede observarse, cada experimento realizado se explica en su apartado de “métodos” y “resultados” correspondientes.

---

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Instrumentos y otros materiales

A continuación se muestra el listado de instrumentos básicos utilizados a lo largo de la tesis:

- ✓ Espectrofotómetro DU 730 (*Beckman Coulter*).
- ✓ Cabina de seguridad microbiológica MSC advance 12 (*Thermo Scientific*).
- ✓ Cabina de flujo laminar Helios C48, ME-2754 C (*HeraScientific*).
- ✓ Incubador "Peltier-Technology Model", IPP 500, desde 5° C a 70° C (*Memmert*).
- ✓ Autoclave presoclave II (*Selecta*).
- ✓ Congelador -80 °C, MDF-U53V (*Sanyo*).
- ✓ Cámara de Neubauer mejorada (*Assistent*).
- ✓ Vórtex (*OVAN*).
- ✓ Placa calefactora (*Selecta*).
- ✓ Agitador magnético, Modelo 680/6 (*Nahita*).
- ✓ Balanza analítica ABS/ABJ versión 1.3 (*Kern*).
- ✓ Granatario PL 1501 (*Mettler Toledo*).
- ✓ Dosificador de líquidos: Seripettor Dispensette (*Brand*).
- ✓ Microscopio óptico ECLIPSE E 200, con cámara ProgRes CT1 Jenoptik (*NIKON*).
- ✓ Placas de Petri 90 mm (*Scharlab*).
- ✓ Hisopos estériles: Collection Swab (*Deltalab*).
- ✓ Asas de Drigalsky estériles (*Scharlab*).
- ✓ Cubetas de plástico para espectrofotometría de 1.5mL (*Scharlab*).

### 3.2. Cepas de mohos y medios de cultivo

Todas las cepas empleadas pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (España), por lo que las condiciones de cultivo se llevaron a cabo según ésta. En la tabla 1.1 se muestra el listado de las cepas utilizadas en este primer capítulo experimental, así como los medios de cultivo empleados para cada una de ellas y los días de incubación. La temperatura de incubación fue en todos los casos de 25 °C.

**Tabla 1.1** Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 1.

Todos los códigos corresponden a la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Los días de incubación hacen referencia a la incubación previa para la utilización de dicha cepa, de manera que el tiempo de cada experimento varió según el objetivo.

Cepa (códigos CECT)	Abreviatura	Medio de cultivo	Incubación (días)
<i>Aspergillus flavus</i> 2949	<i>A. flavus</i> 2949	MEA (*PDA)	7
<i>Aspergillus flavus</i> 2687	<i>A. flavus</i> 2687	MEA	7
<i>Aspergillus niger</i> 2088	<i>A. niger</i>	PDA	7
<i>Penicillium roqueforti</i> 2905	<i>P. roqueforti</i>	PDA	7
<i>Penicillium expansum</i> 2278	<i>P. expansum</i>	PDA	7
<i>Fusarium oxysporum</i> 20201	<i>F. oxysporum</i>	PDA	14
<i>Galactomyces geotrichum</i> 1102	<i>G. geotrichum</i>	PDA	7

\* Los inóculos de esta cepa se extrajeron desde medio de cultivo PDA, ya que era más favorable para la recogida de esporas. Sin embargo, las posteriores siembras de los experimentos en medio sólido, se hicieron sobre MEA.

Ambos medios de cultivo empleados, PDA (Potato Dextrose Agar) y MEA (Malt Extract Agar nº 1) provenían de Scharlau (*Scharlab*). Además, para la suspensión de esporas y la dilución de las mismas, se utilizó NaCl al 0.9 % (*Panreac*).

Todos los caldos y medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones de cada uno de ellos y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, excepto en el caso de MEA, donde se recomienda su esterilización a 115 °C durante 15 minutos.

### **3.3. Relación entre turbidez de la suspensión de inóculo, CFU/mL y sp/mL**

Como se ha comentado en la introducción de este primer capítulo, la extracción de un inóculo en una suspensión acuosa resulta la manera más óptima para su cuantificación. A partir de ésta, se determinó la relación existente entre la absorbancia de dicha disolución de moho, el número de esporas por mL (sp/mL) y el número de Unidades Formadoras de Colonias por mL (CFU/mL). Sin embargo, para ello es necesario extraer previamente un inóculo de la manera más homogénea posible.

### 3.3.1. Extracción del inóculo

Este experimento se llevó a cabo con la cepa de *Penicillium roqueforti* CECT 2905 (*P. roqueforti*). Previamente a su uso, éste se sembró por pincho (asa de siembra terminada en punta) en tres puntos de una placa de PDA, tal y como se ha explicado anteriormente en la sección 1 de la tesis. Tras siete días de incubación a 25 °C, se extrajeron con cuidado las esporas de la superficie del moho, utilizando para ello un hisopo estéril. Éste se introdujo posteriormente en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de una solución de suero salino estéril (NaCl 0.9 %) para disolver las esporas recogidas (ejemplo en la figura 1.3). Esta operación se repitió varias veces de manera aleatoria, para obtener un total de 10 inóculos de diferente concentración.



**Fig. 1.3** Extracción de un inóculo de *A. niger*. (izquierda). Disolución del tubo de ensayo con una densidad óptica de 0.350 (derecha).

### 3.3.2. Determinación de la absorbancia

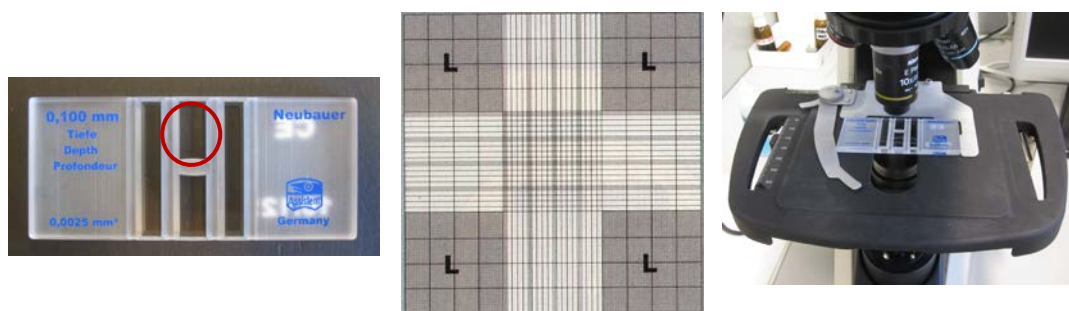
Tras hacer un blanco (NaCl 0.9 % sin inóculo), se fueron midiendo los 11 inóculos extraídos, cogiendo un mínimo de 500  $\mu$ L de cada uno de ellos en una cubeta de espectrofotometría de 1.5 mL. La turbidez de cada disolución se midió por medio de su absorbancia a 625 nm de longitud de onda.

### 3.3.3. Contaje del número de esporas por mL (*sp/mL*)

Tras la medida de absorbancia en el espectrofotómetro, se procedió a contar el número de esporas en cada caso por medio de la cámara de Neubauer. Para que el experimento ganara en reproducibilidad, se diluyó (factor 1/10) en suero cada una de las 11 suspensiones extraídas. El número de diluciones dependió de la concentración de la disolución de partida donde se había extraído el inóculo. De esta manera, se contaron las esporas en las diluciones (1/10) y (1/100) en el caso de estar muy concentrado, mientras

que en el caso contrario el conteo se realizó en la disolución sin diluir y en la (1/10). Además, en este punto hay que tener en cuenta que si la disolución es muy concentrada, se dificulta el conteo por cámara de Neubauer y las esporas tienden a agregarse, dando lugar a posibles errores de cuantificación considerables.

El uso de la cámara de Neubauer mejorada está ampliamente extendido para el recuento de leucocitos, de ahí las letras “L” que aparecen en la figura 1.4. Ésta consiste en una doble red de conteo, cada una de las cuales consta de 4 cuadrículas marginales de 1 mm (L), subdivididas a su vez en 16 cuadrículas de 0.25 mm (4 x 4).



**Fig. 1.4** Cámara de Neubauer mejorada.

El círculo rojo marca una de las redes de conteo (izquierdo) cuyo detalle se observa en la imagen del centro. El conteo se lleva a cabo mediante el microscopio óptico (derecha).

Previamente a la introducción de la muestra, hay que colocar un cubreobjetos sobre la parte central de la cámara. Una manera fácil de asegurar la adhesión del mismo, consiste en depositar sobre cada una de las esquinas una gota de agua estéril de unos 2  $\mu\text{L}$ . Tras esto, se introduce un pequeño volumen de muestra (máximo de 10  $\mu\text{L}$ ) y se procede a realizar el recuento en el microscopio óptico.

Para este experimento, se contaron los 4 cuadrantes enteros (L) de una de las redes de conteo. El volumen de muestra corresponde al volumen comprendido entre la superficie de la cuadrícula y del cubreobjetos, siendo éste de  $0.1 \text{ mm}^3$  (0.1  $\mu\text{L}$ ). Por tanto, el cálculo final de la concentración de esporas se hace de la manera siguiente:

$$\checkmark \quad N^{\circ} (\text{sp/mL}) = N^{\circ} \text{ esporas} / N^{\circ} \text{ cuadrantes} \times \text{volumen de muestra}$$

Teniendo en cuenta los valores numéricos y el cambio de unidades, quedaría así:

$$\checkmark \quad N^{\circ} (\text{sp/mL}) = N^{\circ} \text{ esporas} / 4 \times 0.1 \times 10^{-3}$$

El factor de la dilución también hay que tenerlo en cuenta, de manera que si por ejemplo hemos diluido (1/100) la disolución inicial para su contaje, la concentración final de ésta será el número de esporas obtenido, multiplicado por 100. En nuestro caso, interesaba determinar la concentración en la disolución inicial ya que fue en ésta donde se realizó la medición de absorbancia para la turbidometría de cada muestra.

#### **3.3.4. Contaje del número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL)**

Se realizó la siembra de cada una de las suspensiones originales, utilizando para ello un mayor número de diluciones, cuatro en el caso de mayor concentración y tres en el resto. En todas ellas se sembraron 100 µL de la dilución correspondiente en placas conteniendo 15 mL aproximadamente de PDA estéril por medio de un asa de Drigalsky estéril. La siembra se realizó nada más terminar la medida de absorbancia y antes del contaje en la cámara de Neubauer, para evitar una posible degradación de las esporas en el suero. Las placas sembradas se incubaron durante siete días a 25 °C, tiempo tras el cual se realizó el contaje de número de colonias de cada una de ellas.

#### **3.4. Contaje de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL), dentro del mismo rango de absorbancia**

La relación estudiada en el experimento anterior entre los tres parámetros (turbidez o absorbancia, CFU/mL y sp/mL), sirvió para poder establecer a continuación, un rango de absorbancia óptimo en el cual extraer los inóculos de las cepas empleadas en los experimentos de la tesis. En este caso, dichas concentraciones determinadas inicialmente fueron confirmadas por el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (CFU/mL) tras la siembra en el medio de cultivo. De esta manera, en este apartado se muestran los recuentos (CFU/mL) obtenidos de diferentes inóculos, todos ellos extraídos a diferentes valores de absorbancia pero dentro de un mismo rango de densidad óptico.

Se estudiaron las siguientes cepas, *Aspergillus flavus* 2949, *Aspergillus flavus* 2687, *Aspergillus niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*, ya que fueron las más utilizadas durante la tesis. A pesar de contar con menos datos, se incluyeron también dos cepas pertenecientes a otros géneros, como fueron *Fusarium* y *Geotrichum*, para poder evaluar el margen de aplicación del método. Cabe mencionar que a diferencia del resto de cepas, debido a una menor esporulación y a una mayor dificultad de separación de las esporas respecto al

micelio, los precultivos de *Fusarium oxysporum* se incubaron hasta un total de catorce días, extrayéndose los inóculos de ésta mediante un lavado de la placa con NaCl 0.9 % conteniendo 0.1 % del tensoactivo Tween 80.

De la misma manera que en el primer experimento (ver apartado 3.3), se sembraron las diluciones (1/1000) y (1/10000) de la suspensión inicial de los inóculos extraídos, siendo mayor el número de dilución de ésta cuanto mayor era su absorbancia inicial. Los medios utilizados fueron MEA para las dos cepas de *A. flavus* y PDA para el resto.

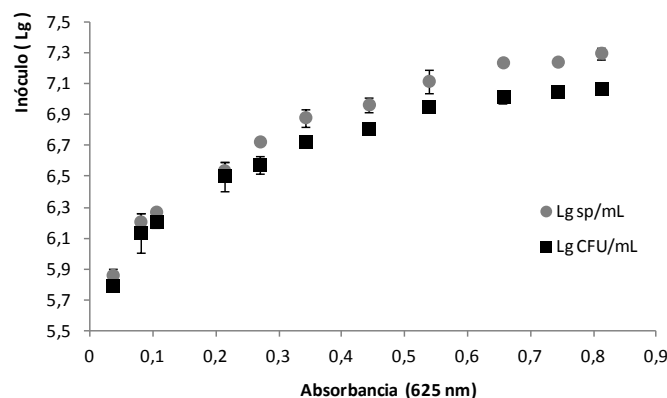
Como se verá más adelante en la sección 4.2 de los resultados, este experimento se dividió en cuatro partes diferentes.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Relación entre turbidez de la suspensión de inóculo, CFU/mL y sp/mL

El objetivo de este experimento fue el relacionar la turbidez de un inóculo extraído de moho, con sus contajes en CFU/mL y en sp/mL, llevándolo a cabo sobre la cepa *P. roqueforti*. Por un lado y como ya se explicó en la metodología, el contaje de esporas por cámara de Neubauer se llevó a cabo en dos diluciones diferentes, dependiendo el número de éstas de la concentración inicial de inóculo. Además de esto, por cada dilución se repitió el recuento dos veces. Por otra parte, se calculó el número de colonias por mililitro sembrando por duplicado las diluciones (1/1000) y (1/10000) partiendo de la suspensión inicial de inóculo. De esta manera, en cada método se contaron un total de cuatro muestras por cada valor de absorbancia, obteniendo para cada uno de ellos, un valor promedio y una desviación estándar relativa, el cual se expresó en porcentaje (RSD %). Todos los recuentos se transformaron previamente en logaritmo.

Además, aunque el número de colonias (CFU/mL) y de esporas (sp/mL) son dos formas de representación diferentes y por tanto no son directamente comparables entre sí, se quiso evaluar la diferencia obtenida por ambos recuentos, calculándola mediante el RDS %. En la figura 1.5 se representan los valores obtenidos, pudiéndose encontrar el resto de datos en la tabla 1.2.



**Fig. 1.5** Lg sp/mL y Lg CFU/mL, en función de la absorbancia en la cepa *P. roqueforti*.



**Tabla 1.2** Comparación de los contajes en Lg sp/mL y Lg CFU/mL de inóculos de *P. roqueforti* a diferentes valores de absorbancia (ABS).

ABS	Lg sp/mL		Lg CFU/mL		RSD % ambos métodos
	sp/mL	RSD %	CFU/mL	RSD %	
0	0	0	0	0	0.0000
0.036	5.86	0.7968	5.79	0.3422	0.8123
0.08	6.20	0.9870	6.13	2.0796	0.8216
0.105	6.27	0.0926	6.21	0.6135	0.6973
0.213	6.54	0.9567	6.50	1.4887	0.3883
0.27	6.72	0.2254	6.57	0.8748	1.5909
0.342	6.88	0.8647	6.72	0.1724	1.6037
0.443	6.96	0.6986	6.81	0.4233	1.5978
0.538	7.11	1.0081	6.95	0.4500	1.6781
0.656	7.23	0.1987	7.01	0.5962	2.1945
0.743	7.24	0.0123	7.04	0.5962	1.9415
0.812	7.29	0.5336	7.07	0.1119	2.2492

Ambos métodos describieron curvas muy parecidas, aumentando la determinación de la concentración de inóculo a medida que lo hizo la absorbancia de la disolución inicial extraída de moho. De esta manera, los resultados muestran una clara relación entre la determinación de ambos métodos, siendo ligeramente superiores los valores de número de esporas que de Unidades Formadoras de Colonias. Sin embargo, como puede observarse tanto en la tabla 1.2 como en la figura 1.5, al extraer inóculos con una absorbancia mayor de 0.5 disminuyó el grado de proximidad de ambos recuentos, lo cual puede observarse con el aumento del % RDS en los tres últimos datos.

Como se demuestra en los resultados, la medición de la absorbancia del inóculo inicial resulta un método válido para calcular la concentración de la misma. La ventaja fundamental, como bien se ha comentado en los objetivos de este capítulo, reside en la facilidad del método y en la obtención instantánea del resultado frente al contaje del número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL).

A pesar de que los dos métodos han demostrado una clara relación en todo el rango de absorbancia probado, y que ambos recuentos se encontraron dentro del mismo logaritmo 6 entre valores distantes de absorbancia como 0.08 y 0.44, se eligió el rango entre 0.2-0.3 como el óptimo para la extracción y cuantificación de inóculo. Esto se debe en primer lugar, a una mayor proximidad entre el recuento de esporas y de colonias y a una mayor facilidad para obtener suspensiones de esporas homogéneas entre esos valores. En este punto hay que tener en cuenta que al extraer inóculos de mayor concentración es habitual arrastrar pequeños fragmentos de micelio de diversos tamaños junto con las esporas, lo cual puede provocar errores en la cuantificación del inóculo.

Por lo tanto, los inóculos extraídos de todas las cepas empleadas a lo largo de toda la tesis se situaron en el rango de absorbancia de 0.2-0.3, debido a la buena correlación comprobada en la cuantificación y a la comentada facilidad de manejo en la extracción.

#### **4.2. Contaje de Unidades Formadoras de Colonias (CFU/mL), dentro del mismo rango de absorbancia**

Como se ha visto en el apartado anterior, el rango de absorbancia entre 0.2-0.3 resultó óptimo para la cuantificación del inóculo inicial de *Penicillium roqueforti*. Por este motivo y como ya se ha explicado anteriormente, a excepción de casos puntuales donde se necesitó una concentración inicial mayor de moho, el resto de inóculos fueron extraídos en su mayoría entre dicho rango.

Esta sección del capítulo muestra los resultados correspondientes al número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (CFU/mL) según diferentes niveles de absorbancia y para un total de siete cepas, para lo cual el experimento se dividió en cuatro partes.

En la primera de ellas se evaluó la distribución de los recuentos de CFU/mL de *A. flavus* 2949, agrupando los datos según tres niveles diferentes de absorbancia: 0.2, 0.3 y 1.

A continuación se compararon los recuentos de las tres cepas de *Aspergillus*: *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687 y *A. niger*. En este caso, se agruparon para cada cepa los recuentos de CFU/mL que coincidían con los dos primeros decimales del valor de absorbancia (o

turbidez), obteniendo para cada punto un valor promedio de los recuentos y una desviación estándar.

La tercera parte consistió en una comparación de las CFU/mL de las dos cepas de *Penicillium* empleadas, *P. roqueforti* y *P. expansum* agrupando los datos de la misma manera que en el caso anterior del género *Aspergillus*.

Por último, en la cuarta parte se muestran los datos correspondientes a las cepas *Fusarium oxysporum* y *Geotrichum*. Como se ha comentado anteriormente, debido a que se contó con una menor cantidad de datos, en este caso se mostró el resultado de todos los recuentos de CFU/mL a cada valor de absorbancia, sin hacer promedio de los valores.

#### **4.2.1. *Aspergillus flavus* CECT 2949**

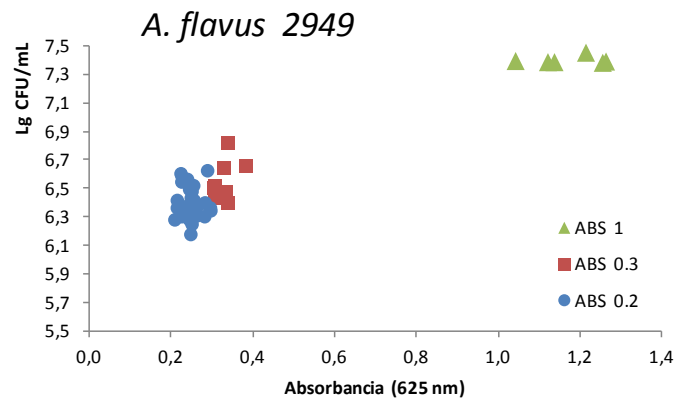
Este experimento se llevó a cabo con la cepa *Aspergillus flavus* 2949 ya que fue el moho más estudiado a lo largo de la tesis, por lo que se disponía de un elevado número de datos. Esto se aprovechó para poder evaluar la distribución del contaje de colonias en función de tres grupos principales de absorbancia: 0.2, 0.3 y 1. En la tabla 1.3 se recogen los resultados individuales de CFU/mL.

Como era de esperar tras los resultados anteriores (ver apartado 4.1), el número de colonias obtenido fue muy similar entre los valores cercanos de absorbancia, mientras que se observa un aumento gradual del mismo conforme ésta fue creciendo. A pesar de que en este caso no se disponen de datos entre 0.4-1 de absorbancia, se puede apreciar que los resultados se asemejan al caso anterior de *P. roqueforti*. De hecho, al igual que ocurría entonces, se vuelve a observar que los valores más altos de absorbancia (por encima de 1) pierden la linealidad del contaje de colonias, ya que entre 1.043 y 1.326 no hubo apenas variación.

**Tabla 1.3** CFU/mL según el valor de absorbancia (ABS) de diferentes inóculos de *A. flavus*.

ABS	Lg CFU/mL	ABS	Lg CFU/mL
0.21	6.28	0.268	6.38
0.216	6.36	0.283	6.30
0.216	6.41	0.284	6.40
0.225	6.60	0.29	6.62
0.227	6.54	0.297	6.36
0.227	6.30	0.298	6.34
0.228	6.58		
0.241	6.33	0.305	6.51
0.241	6.56	0.307	6.52
0.241	6.32	0.308	6.43
0.242	6.38	0.314	6.48
0.243	6.32	0.329	6.64
0.246	6.28	0.336	6.48
0.246	6.49	0.341	6.40
0.247	6.34	0.341	6.82
0.249	6.18	0.385	6.65
0.25	6.43		
0.25	6.36	1.043	7.39
0.251	6.39	1.122	7.38
0.252	6.25	1.138	7.38
0.252	6.48	1.142	7.51
0.253	6.41	1.215	7.45
0.256	6.52	1.256	7.38
0.257	6.41	1.264	7.39
0.259	6.38	1.326	7.53
0.263	6.31		

En la figura 1.6 se observa claramente la distribución de los datos, formando tres nubes de puntos. Como era esperable y tal y como ocurría en el experimento anterior, los puntos entre 0.2 y 0.3 se encontraron muy próximos, viéndose las mayores diferencias entre los valores menores de absorbancia de 0.2 y más elevados de 0.3. Esto demuestra una vez más, que la utilización de la absorbancia entre 0.2 y 0.3 proporciona valores muy próximos en la cuantificación del inóculo, siendo en todo caso de logaritmo 6.

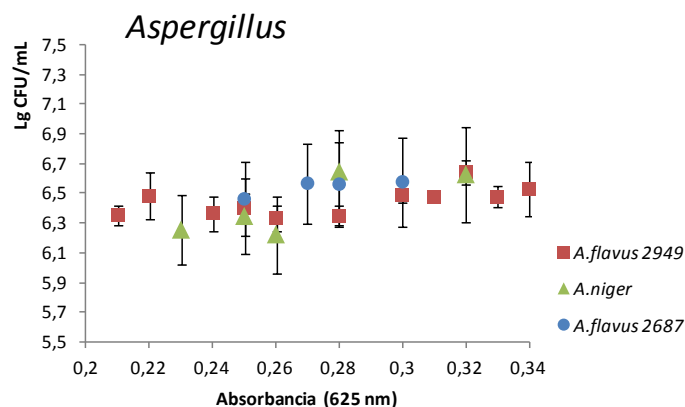


**Fig. 1.6** Recuentos de *A. flavus* en CFU/mL, en función de la ABS. Como se ve, los datos forman tres grupos diferenciados: absorbancia 1, absorbancia 0.3 y absorbancia 0.2.

#### 4.2.2. *Aspergillus*

Además de la cepa *A. flavus* CECT 2949, también se trabajó en la tesis con otra cepa de *A. flavus* productora de aflatoxina B1 (*A. flavus* CECT 2687) y con *A. niger*.

En este caso se eliminó el tercer decimal de absorbancia para poder comparar los valores de las CFU/mL de las tres cepas de una manera más clara y visual. Se hizo el promedio de aquellos contajes de colonias que coincidían con los dos primeros decimales de absorbancia. Los resultados se muestran en la figura 1.7, donde las barras de error marcan la desviación estándar de los recuentos para cada valor de absorbancia determinado.

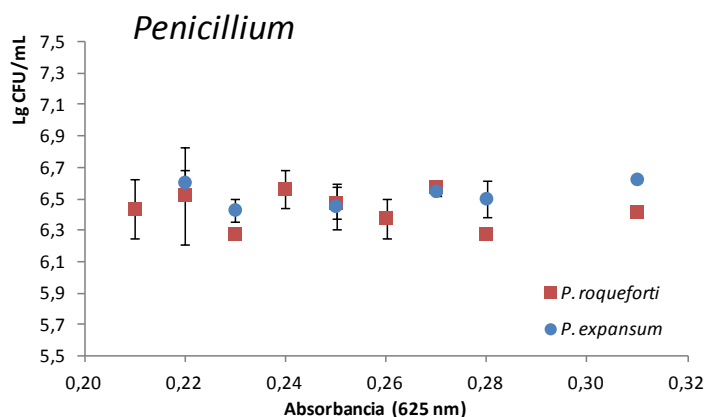


**Fig. 1.7** Recuentos de *Aspergillus* en CFU/mL entre 0.2 y 0.34 de ABS, Cepas: *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687 y *A. niger*.

Como se puede observar, se obtuvo un resultado muy parecido para las tres cepas del género *Aspergillus*, lo cual demuestra que la relación establecida entre la turbidez del inóculo y su concentración, se ha mantenido a pesar de tratarse de diferentes cepas.

#### 4.2.3. *Penicillium*

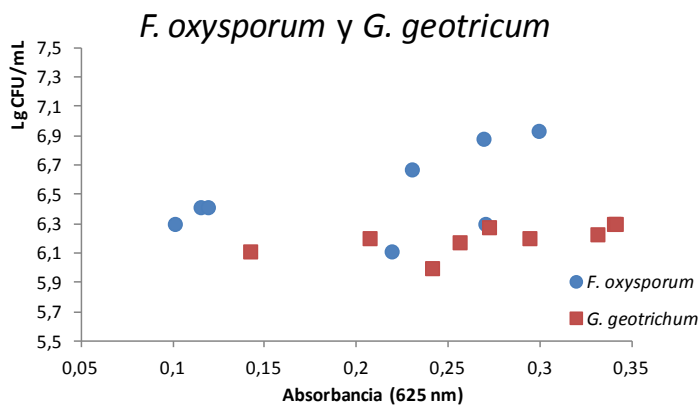
De la misma manera que en el caso anterior, en la figura 1.8 se muestra el resultado del conteo de las dos cepas de *Penicillium* empleadas en la tesis, *P. roqueforti* y *P. expansum*. Aunque los resultados de ambas cepas fueron muy similares, se puede apreciar que en el caso de *P. roqueforti* los recuentos fueron siempre iguales o menores a los de *P. expansum*. A pesar de no ser un resultado concluyente, podría deberse a que las esporas de *P. roqueforti* son ligeramente mayores, lo que coincidiría con los resultados de un trabajo con cepas clínicas, donde un mayor tamaño en las esporas se correspondió con porcentajes de transmisión y con recuentos de CFU/mL más bajos en comparación con las cepas de esporas más pequeñas (Espinelingroff A., et al. , 1995).



**Fig. 1.8** Recuentos de *Penicillium* en CFU/mL entre 0.2 y 0.34 de ABS. Cepas de: *P. roqueforti* y *P. expansum*.

#### 4.2.4. *Fusarium oxysporum* y *Galactomyces geotrichum*

Por último, se quiso comprobar el método de turbidimetría en dos cepas con una esporulación diferente a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Para ello, se recogieron los datos de *Fusarium oxysporum* y *Galactomyces geotrichum*. En este caso no se agruparon los datos como se hizo anteriormente en el 4.2.2 y 4.2.3, por lo que en la figura 1.9 se muestran los contajes individuales a cada nivel de absorbancia probada.



**Fig. 1.9** Recuentos de *F. oxysporum* y *G. geotrichum* en CFU/mL en función de la ABS.

Como puede observarse, en el caso de *G. geotrichum* los inóculos extraídos entre 0.142 y 0.341 de absorbancia dieron como resultado un recuento del número de CFU/mL entre logaritmo 6 y 6.3, demostrando así la utilidad del método de turbidometría en esta cepa.

Sin embargo, los resultados de *F. oxysporum* fueron más heterogéneos. Esto puede deberse principalmente a dos razones. La primera de ellas, a un crecimiento mucho más lento (en torno catorce días) respecto a las cepas anteriores (siete días) y a una tasa de esporulación también menor en comparación con las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* analizadas previamente. La segunda razón es la diferencia en la morfología de sus esporas, ya que *F. oxysporum* presenta dos tipos de esporas de tamaño muy diferente entre sí, las macroconidias y microconidias, siendo además todas en forma de huso, a diferencia de la forma globosa o subglobosa del resto de las especies evaluadas de *Aspergillus* y *Penicillium* y de un mayor tamaño.

Por consiguiente, es obvio que hay más factores que condicionan la extracción y cuantificación del inóculo. Para reducir el efecto de la diferencia de crecimiento, en nuestro caso los inóculos extraídos de *Fusarium*, se hizo mediante un lavado de la placa con NaCl 0.9 % incorporando 0.1 % de Tween 80 como surfactante, tal y como se explicó en la metodología (ver apartado 3.4).

A pesar de esto, se puede observar cierta irregularidad en los resultados obtenidos, concretamente en los tres puntos más elevados de densidad óptica. En nuestro caso, estos tres puntos se correspondieron con un menor desarrollo del moho, el cual a pesar de haberse incubado durante catorce días, se evidenció macroscópicamente con una menor

intensidad en el color rosáceo-violáceo en la placa Petri (en este caso en medio PDA). Este hecho provocó un aumento del número de fragmentos de micelio, ya que al recoger el inóculo en esos casos, se observó una disolución más heterogénea en el tubo de ensayo. De esta manera, en estos casos concretos y tal y como se ha mencionado durante este capítulo, se puede producir una lectura aberrante del valor de densidad óptica y/o un cálculo menos preciso del recuento de número de colonias en la placa. De esta manera, los resultados obtenidos en esta parte del capítulo sirvieron para prestar especial cuidado a la hora de extraer el resto de inóculos de *F. oxysporum* que se emplearon a lo largo de la tesis, habiéndose obtenido tras esto, resultados satisfactorios y dentro del rango esperado en todos los casos restantes.

En el único trabajo encontrado en relación a la densidad óptica de *Fusarium* medida por espectroscopía, el inóculo de *F. solani* se ajustó a un porcentaje de transmisión mucho más reducido que *A. flavus*, lo cual apoya las razones mencionadas previamente en relación a la diferencia en la esporulación de ambas especies (Gehrt A., et al. , 1995).

Sin embargo, a pesar de las diferencias comentadas entre *F. oxysporum* con el resto de cepas, los resultados fueron altamente satisfactorios, ya que los puntos de contaje que se desviaron se explicaron debido a un recogida de inóculo menos óptima, que se corrigió con los inóculos empleados en todos los experimentos de la tesis. De esta manera, el resto de valores se encontraron una vez más, dentro del logaritmo 6 en el recuento de CFU/mL. Esto demuestra, una vez más, que es posible aplicar el método de turbidometría también para esta cepa, siempre que se tengan en cuenta las consideraciones específicas comentadas.

Por último, otras cepas evaluadas a lo largo de la tesis (no descritas en este capítulo), como es el caso de *Rhizopus stolonifer*, han mostrado el mismo resultado que las estudiadas en el presente capítulo, donde los valores 0.1-0.3 de densidad óptica, dieron en todos los casos concentraciones de inóculo dentro del logaritmo 6, confirmados en este caso por medio del número de esporas por mL.



## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que la medida de la turbidez de los inóculos extraídos, proporciona cuantificaciones precisas y reproducibles. En este caso, se utilizó el mismo método para todas las cepas evaluadas, basándose en una simplificación de la normativa NCCLS, habiendo obtenido resultados muy similares en todas las especies estudiadas.

Como se ha podido demostrar, existe por tanto una clara relación entre la turbidez de los inóculos y los recuentos de estos. Una vez establecido cómo se comporta cada cepa respecto a su densidad óptica, es posible utilizar la misma sustituyendo así al contaje de esporas (sp/mL), que además de ser más costoso en tiempo, puede conllevar a errores en caso de poca experiencia del técnico o evaluador. Por su parte, el contaje del número de colonias (CFU/mL) sigue siendo un método necesario tanto para la confirmación de la determinación inicial de la concentración de ese inóculo, como para asegurar la viabilidad del cultivo empleado.

En conclusión, a pesar de que en microbiología alimentaria el uso de la turbidimetría se reduce casi exclusivamente a las bacterias, los buenos resultados confirman la posibilidad de utilizar ésta para poder ajustar el inóculo de los mohos evaluados. De esta manera, este experimento ha conllevado unas ventajas claras a la hora de llevar a cabo el resto de experimentos de la tesis, ya que no sólo ha aportado rapidez y precisión en la cuantificación, sino también ha facilitado el ajuste de los inóculos hasta la concentración deseada, asegurando por último reproducibilidad entre los diferentes experimentos realizado

## CAPÍTULO 2

---

### ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CANELA, ORÉGANO, CLAVO, Y SUS COMPUESTOS MAYORITARIOS

- 1. Introducción*
- 2. Objetivos*
- 3. Materiales y métodos*
- 4. Resultados y discusión*
- 5. Conclusiones*



## 1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado en la sección anterior, la elección del agente antimicrobiano resulta un paso esencial a la hora de empezar a diseñar un envase activo. Es esencial conocer la composición del aceite esencial, ya que como hemos visto, la composición de estos es altamente heterogénea y varía entre otros factores, en función de las condiciones de cultivo, recogida y extracción de la planta. Así mismo hay que tener en cuenta la enorme variabilidad en el crecimiento macroscópico del moho en función del medio de cultivo empleado. En el alimento ocurre de manera parecida, ya que las propiedades físico-químicas de éste, determinan la contaminación predominante en el mismo (Filtenborg O., et al., 1996). Por tanto, es evidente que el antifúngico de elección tendrá que demostrar en primer lugar, su actividad frente a las cepas de mohos concurrentes en dicho producto.

Además de esto, si hacemos una búsqueda bibliográfica sobre la actividad de los aceites esenciales nos encontramos con un problema añadido, que es la enorme variabilidad en la metodología empleada. Esto surge también a raíz del aumento del número de publicaciones sobre mohos alterantes o patógenos de alimentos en los últimos años. Como se ha explicado en la sección primera de la tesis, a pesar de que las bacterias siguen predominando en la investigación microbiológica, los mohos han ganado mucho terreno debido fundamentalmente a dos razones: la posible producción de metabolitos secundarios con elevada carcinogenicidad (micotoxinas), y las elevadas pérdidas económicas producidas por el continuo desecho de alimentos contaminados.

A diferencia de las bacterias, los mohos poseen un comportamiento claramente invasivo, el cual se ve reforzado además por la eficaz dispersión de esporas, provocando así una fácil contaminación desde un producto contaminado hasta otros situados en el mismo lote de almacenamiento. Esto último justifica de manera contundente la protección del producto desde la recogida hasta su consumo.

La primera etapa a la hora de diseñar un envase activo antifúngico consiste en determinar la actividad de las sustancias antifúngicas elegidas frente a las cepas de interés. La dificultad en la estandarización de métodos, debido entre otras cosas a la comentada complejidad de los mohos, su enorme variabilidad del crecimiento en los diferentes sustratos, y a la también mencionada enorme heterogeneidad de los aceites esenciales, se presenta como un hándicap considerable a la hora de establecer un método experimental.

## 1.1. Importancia del método utilizado

Como hemos visto, la falta de estandarización tanto por parte de los aceites esenciales como de los mohos, y el creciente interés en la contaminación fúngica de los alimentos, explica la gran variabilidad de métodos que existen para determinar la actividad antifúngica de los aceites esenciales.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la metodología empleada influye en los resultados obtenidos, dificultando en muchas ocasiones la comparación de resultados de diferentes publicaciones.

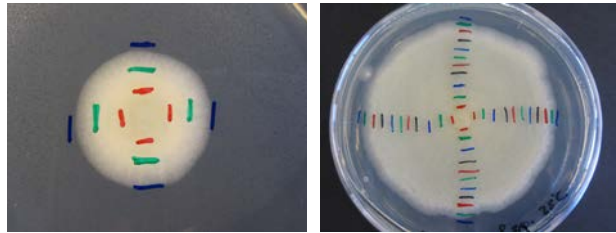
A continuación se expone una breve descripción de los métodos más ampliamente utilizados para la determinación antifúngica de los aceites esenciales.

### 1.1.1. Método de dilución en agar

Esta técnica consiste en diluir el aceite esencial directamente en el medio de cultivo. Debido a la falta de hidrosolubilidad de estos compuestos, en ocasiones se añaden tensioactivos como el tween 20 o tween 80 para facilitar la homogeneidad de la mezcla. El método de siembra más empleado es el llamado “**diámetro de la colonia**” o “**radio de la colonia**”. Éste consiste en depositar en el punto central de la placa sobre el medio de cultivo, una gota de inóculo de pequeño volumen (normalmente de 2, 5 ó 10  $\mu\text{L}$ ) de una suspensión fúngica previamente ajustada. La ventaja de esta manera de siembra es que permite la cuantificación del crecimiento, ya que el moho comienza a las pocas horas un crecimiento lineal que se mantiene hasta que el anillo más externo de la colonia se acerca al perímetro de la placa. Los coeficientes de correlación lineal ( $R^2$ ) suelen ser elevados, estando situados normalmente por encima del 90 %, y siendo muy frecuente encontrarlos más allá del 95 %. Dicha linealidad permite obtener la pendiente de la ecuación de la recta, representando así la velocidad de crecimiento de la colonia en cuestión. Así mismo, en muchos casos puede resultar interesante la obtención de la duración de la “fase Lag”, la cual hace referencia al tiempo que tarda en comenzar a crecer el moho. Dicho valor, tomado con un incremento mínimo del eje de abscisas, se obtendría de la intersección de la recta con el eje de ordenadas.

El crecimiento de la colonia se toma midiendo los dos diámetros opuestos de ésta y representando dicho valor frente al tiempo. Es muy útil para ello la utilización de un calibre

digital, ya que permite mediciones más precisas, cómodas y fiables. El tiempo establecido entre los diferentes puntos pueden ser horas o días, dependiendo del tamaño del inóculo inicial y de lo extenso que nos interese diseñar el experimento. En la figura 2.1 se ilustra como ejemplo el crecimiento del diámetro de una colonia de *Penicillium expansum*, tras 3 días y 11 días de experimento (figura 2.1).



**Fig. 2.1** Diámetro de colonia de *Penicillium expansum* en el tiempo. Incubación a 25 °C, tras 3 días (izquierda) y 11 días (derecha).

En el caso de las placas activas con aceite esencial, debido a que las colonias experimentan un desarrollo mucho más reducido (incluso es posible la inhibición total), el ensayo se da por finalizado cuando la colonia de las placas control (sin aceite esencial) termina su crecimiento. A pesar de utilizar un mínimo de tres réplicas por cada tratamiento aplicado, es frecuente ver en este tipo de ensayos gráficas con barras de desviación estándar elevadas. Esto se debe fundamentalmente, a la baja solubilidad ya comentada de los aceites esenciales en el agar, dando lugar en algunos casos a diferencias considerables entre las diferentes réplicas.

### **1.1.2. Método de difusión en disco**

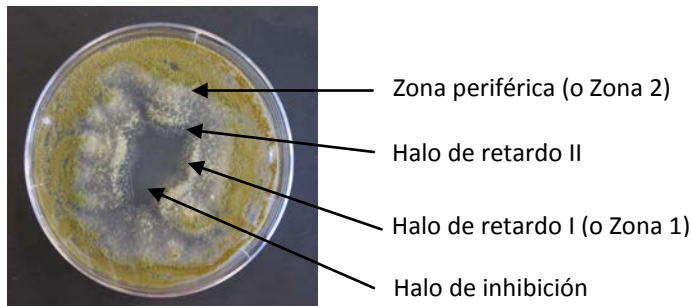
En este caso el aceite esencial, puro o diluido, se aplica en un disco de difusión, que se deposita en el centro de la placa Petri en contacto directo con el medio de cultivo o en la tapa de la placa en fase vapor. Este último caso se utiliza para comprobar y medir la actividad en fase vapor de los compuestos volátiles de la sustancia bajo estudio.

El moho suele sembrarse de dos maneras, bien por extensión, en cuyo caso suelen emplearse 100  $\mu$ L de suspensión, o bien por el depósito de una gota de inóculo en el centro del medio de cultivo, dando lugar al llamado “diámetro o radio de la colonia” explicado anteriormente.

En el caso de la siembra por extensión, el moho suele crecer de la misma manera tanto en el ensayo de contacto directo como en el de fase vapor. Es decir, la zona central, situada alrededor de donde se encuentra depositado el disco activo, es donde el aceite esencial se encuentra en una mayor concentración. Debido a esto, generalmente en esta zona se crea una inhibición del crecimiento del moho denominada “halo, zona o área de inhibición” (H.I.). Generalmente el aceite esencial es absorbido por el agar, comenzando entonces un gradiente de concentración desde el centro (punto de mayor concentración) hasta la periferia de la placa Petri. Debido a ello, junto a la zona de inhibición suele encontrarse otra de menor crecimiento llamada “halo, zona o área de retardo” (H.R.) en la cual predomina un crecimiento micelar con falta de esporulación. En este punto es posible también encontrar daños en la formación del micelio en función de la proximidad a la zona de inhibición, debido a la mayor o menor influencia del activo (Manso S., et al. , 2013). Por último, la zona más externa de la placa (referida a lo largo de esta tesis como “zona 2”) presenta una menor exposición al aceite esencial, siendo por ello la zona con mayor tasa de esporulación en el caso de que el moho haya llegado a hacerlo. Las tres zonas explicadas pueden observarse en la figura 2.2.

Lógicamente, el tamaño de cada una de las áreas mencionadas estará influenciado por muchas variables, entre ellas: la solubilidad del aceite esencial en el agar, el tamaño del inóculo, la capacidad antifúngica del aceite esencial, la concentración inicial de éste, la velocidad de liberación del mismo y la concentración alcanzada en el agar, y finalmente, del tiempo de exposición al mismo.

Además hay que considerar que cuando el moho consigue vencer a la acción del aceite esencial, debido a lo explicado anteriormente, éste suele comenzar su desarrollo desde la parte más periférica de la placa hasta que al llegar al punto central, ve dificultado su crecimiento por encontrarse justo debajo del foco principal de exposición. Sin embargo, en estos casos donde se observa dicho inicio del crecimiento, suele observarse un comportamiento fungiestático, es decir, conforme avanza el tiempo de exposición (altamente dependiente de la concentración de inóculo y de aceite esencial) el área de inhibición termina finalmente por desaparecer. A pesar de esto, incluso en esos casos se mantiene siempre la existencia de zonas diferentes de crecimiento, indicadoras del mencionado gradiente de concentración de aceite esencial en el agar.

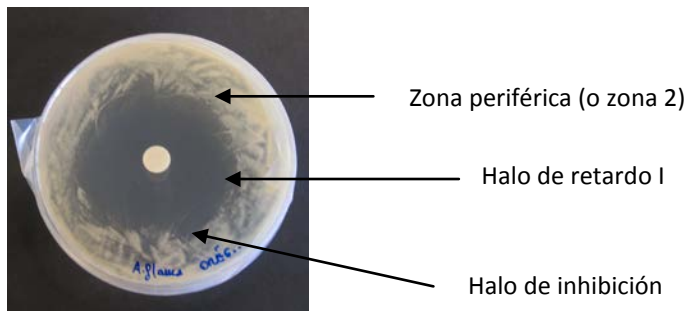


**Fig. 2.2** Zonas de crecimiento producidas por el aceite esencial de canela en fase vapor tras 10 días de incubación a 25 °C sobre el moho *Aspergillus flavus* en PDA. El disco no aparece ya que se retiró la tapa para hacer la fotografía.

Antes de continuar hay que recordar, como ya se ha comentado en la introducción de la sección I, que la coloración que presenta un moho se debe fundamentalmente a su esporulación, la cual va a depender en primer lugar del medio de cultivo en el cual esté creciendo el mismo. De esta manera, siempre que se hable de una diferencia de coloración se estará haciendo referencia al medio utilizado en ese experimento en cuestión.

Así mismo, también hay que considerar las diferencias notables en cuanto al aspecto de los halos de crecimiento en función de la cepa estudiada y del aceite esencial empleado. Un caso claro lo representa el crecimiento de una misma cepa de moho bajo la exposición de los aceites esenciales de canela y de orégano. Dichas diferencias se pueden apreciar entre la figura 2.2 y figura 2.3. En esta última, la exposición del moho *Aspergillus flavus* al aceite esencial de orégano crea un halo de retardo que consiste fundamentalmente en líneas de bajo crecimiento micelar o colonias de diámetro casi inapreciable (de pocos milímetros) alrededor del halo de inhibición. En el caso de haber más de un halo de retardo dentro de la misma placa, estos consistirán en zonas cuya única diferencia visible será la intensidad del crecimiento. Debido a esto, las áreas en este caso son más difíciles de marcar que en el caso de la canela, sobre todo en las fases iniciales de crecimiento ya que en ese momento el desarrollo que se crea en torno al halo de inhibición es tan sutil, que puede pasar inadvertido al ojo. Por tanto, conviene prestar mucha atención a la presencia de este mínimo crecimiento, teniendo siempre presente que el halo de inhibición seguirá siendo aquel bajo el cual no se aprecie crecimiento de ningún tipo.

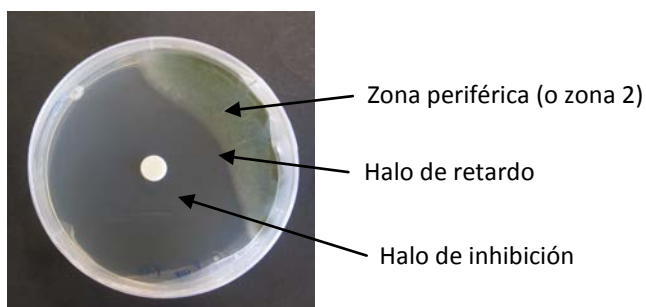




**Fig. 2.3** Zonas de crecimiento producidas por el aceite esencial de orégano en contacto directo tras 7 días de incubación a 25 °C sobre el moho *Aspergillus flavus*.

Por su parte, el aceite esencial de canela, presenta unas zonas claramente diferenciadas, no sólo en cuanto a la intensidad de crecimiento, sino también a la tasa de esporulación y a la coloración o la intensidad de la misma. Como se puede apreciar en la figura 2.2, la exposición a éste provoca en *Aspergillus flavus* la creación de dos halos de retardo diferentes. La limitación de las diferentes áreas, como vemos, es muy clara en contraste con el caso del orégano mencionado previamente (figura 2.3).

Pero, incluso empleando el mismo aceite esencial no todas las cepas presentan el mismo aspecto. Así, el género *Penicillium* suele presentar un halo de retardo finísimo, que consiste fundamentalmente en una reducción de la tasa de esporulación (figura 2.4.). En este caso, la gama de coloración entre las diferentes zonas no es tan amplia como por ejemplo, en el caso del comentado *Aspergillus flavus*.



**Fig. 2.4** Zonas de crecimiento producidas por el aceite esencial de canela en contacto directo tras 7 días de incubación a 25 °C sobre el *Penicillium roqueforti*.

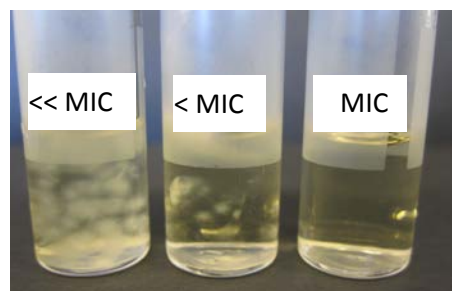
### ***1.1.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC)***

De la misma manera que ocurría en los casos anteriores, la determinación de ambas concentraciones puede llevarse a cabo de diferentes maneras. Una de ellas es por medio de

la dilución en agar, explicado anteriormente. En ese caso, se considerará la MIC a aquella primera concentración de aceite esencial que no haya producido desarrollo alguno en el medio de cultivo tratado. Sin embargo, debido a la ya mencionada limitada solubilidad de los mismos en el agar, en esta tesis se ha elegido como óptimo el **método de dilución en caldo**. Debido al amplio uso de dichas concentraciones en la bibliografía internacional, a lo largo de esta tesis se hará mención a éstas mediante sus siglas en inglés, es decir, MIC (“Minimal Inhibitory Concentration” y MFC (“Minimal Fungicidal Concentration”).

Este método permite cuantificar la actividad de los aceites esenciales de una manera más exacta y reproducible. Como bien apuntan diversos autores (Correa-Royero J., et al. , 2010; David J. R. D., et al. , 2013; Suppakul P., et al., 2003), las determinaciones en medio líquido proporcionan resultados más precisos a la hora de determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Esto se debe a la baja solubilidad de los mismos en el agar, provocando que métodos muy extendidos como la dilución en medio de cultivo sean menos adecuados a la hora de establecer su actividad.

Además de ello, la ventaja añadida de la dilución en caldo es que supone menor tiempo de incubación y por tanto, mayor rapidez en la obtención de resultados. Los detalles del método se describirán en la parte correspondiente del método. En la figura 2.5 se puede apreciar un ejemplo de la determinación visual de la MIC, denominada como tal a aquella primera concentración que no produce un crecimiento visual en el tubo de ensayo. Por otra parte, la MFC sería la concentración más baja que no produjera crecimiento en el medio de cultivo tras la siembra de las muestras.



**Fig. 2.5** Ejemplo visual de MIC por macrodilución en caldo del aceite esencial de canela frente a *A. flavus*, en macrodilución en caldo.

## 1.2. Variables que pueden afectar a la actividad de los aceites esenciales

Como se ha mencionado en la sección primera de la tesis, los factores de actividad de agua ( $a_w$ ), pH y temperatura, afectan en alto grado al crecimiento del moho, tanto en la germinación de esporas como en el desarrollo del micelio y en la producción de micotoxinas. Aunque cabe mencionar, que generalmente éstas se producen dentro de un rango más estrecho que el crecimiento del moho. Además de esto, no hay que olvidar la importancia del tiempo de incubación, ya que marcará el desarrollo del moho, de manera que es posible que una concentración de aceite esencial inicialmente inhibitoria, deje de serlo debido a un posterior crecimiento del moho.

De esta manera, estas variables condicionan la actividad de los aceites esenciales de manera indirecta, influyendo sobre el moho. Sin embargo, también pueden afectar de manera directa a la actividad de los aceites esenciales.

En relación al **pH**, como se verá a lo largo del capítulo, éste influye menos en la actividad de los aceites esenciales frente a otras sustancias como el sorbato de potasio y el benzoato sódico. Mientras que éstas presentan una mayor actividad a pH ácido debido a un aumento en la forma no disociada de las mismas, la influencia de éste en la actividad de los aceites esenciales es mucho menor (David J. R. D., et al., 2013; López-Malo A., et al. , 2002, 2005). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la mayoría de los casos, la acidificación de un medio provocará un aumento de la fase Lag del microorganismo y por tanto una disminución de la velocidad de crecimiento, pudiendo de esta manera reforzar la actividad del aceite esencial (Gutierrez J., et al. , 2009).

La **temperatura** y la **actividad de agua**, además de afectar al crecimiento del microorganismo, afectarán a la liberación de los compuestos volátiles de los aceites esenciales desde el material del envase activo, cuando estos actúen en fase vapor. Este punto se discutirá con más detalle en la introducción del capítulo 3, ya que guarda una relación directa con el éxito en la protección del envase.

Además, es evidente que el **tiempo de exposición** será también responsable de la actividad del aceite esencial. Por una parte, la velocidad de liberación del aceite esencial (sobre todo desde el material de envase en fase vapor) influirá en la concentración de éste

que llegue al medio de cultivo (o alimento) y al moho. Por otra parte, dicha concentración alcanzada de compuesto será especialmente crucial durante la fase Lag (o fase inicial) del moho, ya que como es evidente, cuanto más aumente éste, más costará inhibir su crecimiento.

Por último, en el caso de evaluar la actividad de estos *in vivo*, habrá que tener en cuenta que los aceites esenciales pueden interactuar con los **ingredientes alimentarios**. Así, se sabe que la grasa provoca una disminución de la actividad de los mismos (Becerril R., 2011; Burt S., 2004; Cava R., et al. , 2007; Davidson P. M., et al. , 2013; Gutierrez J., et al., 2009; Gutierrez J., et al. , 2008). Las dos hipótesis a las que apuntan esta reducción de la actividad se basan por un lado, en un posible efecto protector de la grasa al microorganismo, y por otro lado, a que los aceites esenciales podrían disolverse en la grasa alimentaria y estar por tanto menos disponibles para la acción antimicrobiana. Por otra parte, las proteínas y los azúcares simples han demostrado en algunos estudios provocar el efecto contrario, es decir, aumentar la actividad de los aceites esenciales, mientras que sí se han visto interacciones con hidrocarburos más complejos (Gutierrez J., et al., 2009). De esta manera, la eficacia de los aceites esenciales *in vivo* podría indicarse en este orden de actividad decreciente: bebidas a base de carbohidratos (como zumos y refrescos) ≥ productos de panadería ≥ frutas ≥ vegetales y productos frescos > productos lácteos > productos cárnicos y marisco. Se puede concluir, que a excepción de los lácteos y productos cárnicos, donde se han obtenido resultados muy variables en cuanto a la actividad de los aceites esenciales, el resto de productos presentan una composición compatible con los mismos (Davidson P. M., et al., 2013). Además de esto, cabe mencionar la posibilidad de recurrir a la encapsulación o emulsiones, de manera que por un lado, se reducirían dichas interacciones no deseadas y por otra parte, permitiría una liberación controlada del aceite esencial durante la vida útil del producto (Becerril R., 2011; Davidson P. M., et al., 2013; Weiss J., et al. , 2009).

En resumen, a la hora de determinar la actividad de un aceite esencial sobre un moho deberíamos considerar al menos, las variables que pueden afectar en torno a los siguientes aspectos: a) el método empleado, b) la cepa de moho, c) la composición del aceite esencial, d) el medio de cultivo o tipo de alimento y e) las condiciones de incubación (temperatura, pH, actividad de agua, tiempo de incubación, etc.).

Por todo ello, este capítulo 2 presenta una evaluación completa de diferentes aceites esenciales sobre varias cepas de mohos, llevado a cabo por medio de diferentes métodos, y

analizando también diversas variables como la concentración de aceite esencial, el tiempo de exposición, la temperatura y el pH.

### **1.3. Utilización de los aceites esenciales en la tesis en el grupo GUIA**

Como se ha explicado en la sección I de la introducción general, a lo largo de esta tesis se ha hecho una especial referencia a aquellos trabajos realizados previamente dentro del grupo GUIA. La principal razón radica precisamente, en el hecho de haber utilizado los mismos aceites esenciales que en la presente tesis, así como los compuestos mayoritarios indicados. Este aspecto ha sido esencial, ya que ha permitido reducir la comentada variabilidad en la composición entre diferentes lotes. Además, también los materiales evaluados como envase activo fueron utilizados con anterioridad en el grupo GUIA (ver capítulo 3).

Estas dos razones fundamentales explican el peso indiscutible que dicha investigación previa tiene sobre los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que han facilitado no sólo el poder continuar con la línea de investigación abierta desde hace años, sino que también ha permitido poder discutir los resultados obtenidos en el trabajo actual con los anteriores dentro del grupo GUIA.

## 2. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO

Este segundo capítulo se desarrolló en función de cuatro objetivos diferentes.

La base del capítulo consistió en una primera caracterización antifúngica, la cual se llevó a cabo por medio de dos metodologías diferentes, el método de dilución en disco y el método de dilución en agar. En esta primera parte se estudiaron tres aceites esenciales (canela, orégano y clavo) y sus compuestos mayoritarios respectivos (cinamaldehído, carvacrol y eugenol), tanto por contacto directo como en fase vapor.

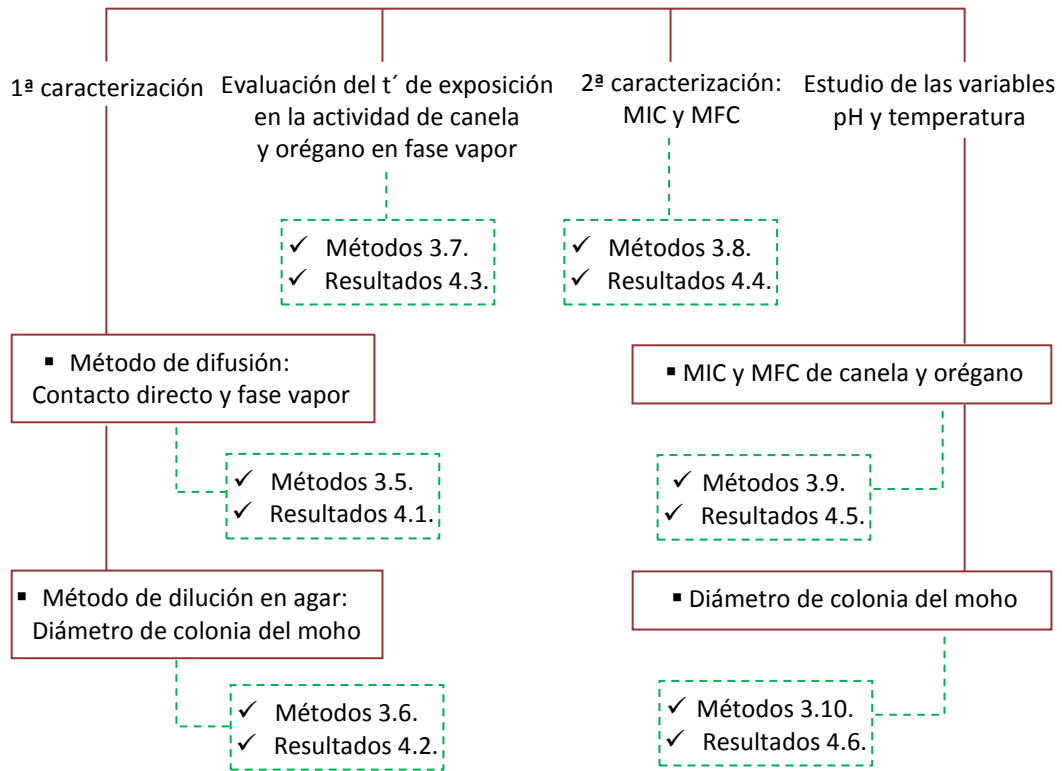
A continuación, se quiso estudiar la influencia del tiempo de exposición en la actividad de los aceites esenciales de canela y orégano.

Tras esto, se llevó a cabo una nueva caracterización antifúngica de las seis sustancias, esta vez mediante macrodilución en medio líquido, para poder obtener de manera reproducible la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Fungicida (MFC) necesarias para cada una de ellas.

Por último, el capítulo se cerró con el estudio de la influencia de las variables pH y temperatura sobre la actividad de los aceites esenciales de canela y orégano, mediante el mismo método previo de macrodilución en líquido. Como se verá posteriormente en la tesis, esta última parte es esencial a la hora de diseñar un futuro envase activo, ya que el compuesto activo añadido tiene que ser eficaz independientemente de las fluctuaciones externas.

En la figura 2.6 se muestra la distribución del trabajo desarrollado en este capítulo, con los apartados correspondientes a los métodos y resultados para cada uno de ellos.

CAPÍTULO 2



**Fig.2.6** Diseño experimental del capítulo 2.

Como puede observarse, cada experimento realizado se explica en su apartado de “métodos” y “resultados” correspondientes.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Instrumentos

Además de los instrumentos y materiales utilizados de manera rutinaria a lo largo de toda la tesis (ver apartado 3.1 del capítulo 1), en este capítulo se emplearon:

- ✓ pH-metro Seven Easy (*Mettler Toledo*).
- ✓ Discos de papel de filtro de 9 mm (*Whatman*).
- ✓ Calibre digital (0-150 mm) (*COMECTA S.A.*).
- ✓ Agitador rotacional, mini twist (*Select Bioproducts*).

### 3.2. Agentes antifúngicos

En este capítulo se utilizaron tres aceites esenciales (EOs) con sus correspondientes compuestos mayoritarios. Así mismo, se evaluó la actividad antifúngica de un tensioactivo sintético, el LAE (Etil Lauroil Arginato).

**Tabla 2.1** Agentes activos utilizados en este capítulo 2.




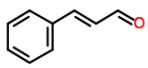
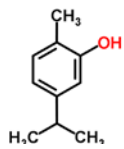
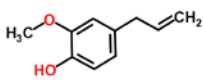
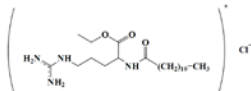
COMPUESTO	ORIGEN	N ° CAS	EMPRESA
 <p>Aceite esencial de canela, desde rama <b>(CIN)</b></p>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	CAS 805-91-6	Argolide (Barcelona)
 <p>Aceite esencial de orégano <b>(OR)</b></p>	<i>Origanum vulgare</i>	8007-11-2	Argolide (Barcelona)
 <p>Aceite esencial de clavo <b>(CLO)</b></p>	<i>Syzygium aromaticum</i>	8000-34-6	Argolide (Barcelona)



Tabla 2.1 Continuación.

	Trans-cinamaldehído 99 % <b>(CINAM)</b>	Compuesto mayoritario de canela	14371-10-9	Sigma-Aldrich, Química S.A. (Madrid)
	Carvacrol > 97 % <b>(CARV)</b>	Compuesto mayoritario de orégano	499-75-2	Sigma-Aldrich, Química S.A. (Madrid)
	Eugenol 99 % <b>(EUG)</b>	Compuesto mayoritario de clavo	97-53-0	Sigma-Aldrich, Química S.A. (Madrid)
	Etil lauroil arginato <b>(LAE)</b>	Tensioactivo sintético	60372-77-2	VEDECSA, (Barcelona)

### 3.3. Composición de los aceites esenciales: canela, orégano y clavo

A continuación (tabla 2.2) se detalla la composición química de cada aceite esencial utilizado, determinada por cromatografía de gases.

Cabe mencionar el alto contenido en cinamaldehído que contiene el aceite esencial de canela obtenido de rama respecto a la canela de hoja. El compuesto principal de ésta última es el eugenol, estando el cinamaldehído presente en una concentración mucho menor, lo que explica que la actividad antifúngica de la primera sea mucho más elevada.

**Tabla 2.2** Composición química de los aceites esenciales de canela, orégano y clavo determinado por cromatografía de gases.

ACEITE ESENCIAL	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/g)
<b>Canela (rama)</b>	Trans-cinamaldehído	900
	Eugenol	3.62
	Benzil benzoato	3.32
	Linalol	1.56
	p-Cimeno	0.989
	Limoneno	0.907
	Estragol	0.008
	Borneol	0.005
	$\alpha$ -Pinoeno	0.005
	$\beta$ -Pinoeno	0.002
<b>Orégano</b>	Carvacrol	801
	Timol	9.66
	Canfor	7.48
	p-Cimeno	7.02
	$\beta$ -Cariofileno	6.10
	1.8-Cineol	3.68
	Borneol	2.13
	Limoneno	1.88
	Linalol	1.58
	$\alpha$ -Humeleno	1.58
	Canfeno	1.45
	Eugenol	1.19
	Estragol	0.99
	$\alpha$ -Pinoeno	0.90
	$\alpha$ -Terpinoleno	0.33
B-Pinoeno	0.25	
<b>Clavo</b>	Eugenol	845
	B-Cariofileno	13.4
	$\alpha$ -Humeleno	2.86
	Estragol	0.69

### 3.4. Cepas de mohos y medios de cultivo

Todos los mohos estudiados a lo largo de la presente tesis, pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (España).

En la tabla 2.3 se muestran las cepas utilizadas en este capítulo, así como la abreviatura empleada en cada caso. Todas ellas se incubaron dentro de las condiciones de cultivo recomendadas por la CECT. La temperatura de incubación fue de 25 °C, a excepción de los experimentos realizados a diferente temperatura, como se verá a lo largo del capítulo. Los días de incubación hacen referencia al tiempo necesario para el crecimiento óptimo de la

cepa (preincubación), lo cual es necesario para obtener inóculos homogéneos. Por tanto, este tiempo de preincubación es independiente de la duración de cada experimento, el cual se estableció en función del objetivo del mismo.

**Tabla 2.3** Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 2.

Todos los códigos corresponden a la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Los días de incubación hacen referencia a la incubación previa para la utilización de dicha cepa, de manera que el tiempo de cada experimento varió según el objetivo.

Cepa (códigos CECT)	Abreviatura	Medio de cultivo	Incubación (días)
<i>Aspergillus flavus</i> 2949	<i>A. flavus</i> 2949	MEA (*PDA)	7
<i>Aspergillus flavus</i> 2687	<i>A. flavus</i> 2687	MEA	7
<i>Aspergillus niger</i> 2088	<i>A. niger</i>	PDA	7
<i>Penicillium roqueforti</i> 2905	<i>P. roqueforti</i>	PDA	7
<i>Penicillium expansum</i> 2278	<i>P. expansum</i>	PDA	7
<i>Fusarium oxysporum</i> 20201	<i>F. oxysporum</i>	PDA	14
<i>Rhizopus stolonifer</i> 2344	<i>R. stolonifer</i>	PDA	7

\* Los inóculos de esta cepa se extrajeron desde medio de cultivo PDA, ya que era más favorable para la recogida de esporas. Sin embargo, las posteriores siembras de los experimentos en medio sólido, se hicieron sobre MEA.

Debido a que las cepas utilizadas variaron en función de cada experimento, en la parte correspondiente a cada uno de ellos se especificará el uso de las mismas, así como las condiciones de incubación requeridas en cada uno de los experimentos.

En este capítulo se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- ✓ PDA: Potato Dextrose Agar (*Scharlab*).
- ✓ MEA nº 1: Malt Extract Agar (*Scharlab*).
- ✓ PDB: Potato Dextrose Broth (*Scharlab*).
- ✓ MEB: Malt Extract Broth (*Scharlab*).
- ✓ YEB: Yeast Extract Broth (*Scharlab*).
- ✓ Para las diluciones de inóculo se empleó NaCl al 0.9 % (*Panreac*).

Todos los caldos y medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones de cada uno de ellos y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, excepto en el caso de MEA, donde se recomienda su esterilización a 115 °C durante 15 minutos.

### **3.5. Primera caracterización. Método de difusión: contacto directo y fase vapor**

Se realizó un primer barrido de actividad de seis compuestos diferentes, mediante la técnica de difusión en agar. Las sustancias analizadas fueron los aceites esenciales de canela, orégano y clavo, así como sus respectivos compuestos mayoritarios, esto es, cinamaldehído, carvacrol y eugenol. Como se explica en los apartados siguientes, los compuestos se aplicaron en un disco de papel de filtro, estudiándose su actividad tanto en contacto directo como en fase vapor.

#### ***3.5.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo***

Las cepas de mohos utilizadas para este primer barrido fueron las siguientes: *A. flavus* 2949, *A. niger*, *P. roqueforti*, *P. expansum*, *F. oxysporum* y *R. stolonifer*. Se empleó en todas ellas el medio de cultivo PDA excepto en el caso de *A. flavus* 2949, donde se utilizó MEA.

#### ***3.5.2. Extracción de los inóculos y siembra de las placas***

Previamente a la utilización de las mismas, todas las cepas fueron incubadas durante 7 días en PDA o MEA para la posterior recogida de inóculo (a excepción de *F. oxysporum* cuya preincubación fue de 14 días).

Para cada cepa, el inóculo extraído se ajustó hasta el mismo nivel de absorbancia como se mostró en el capítulo 1, asegurando en todos los casos una concentración de partida de  $10^6$  CFU/mL. Además, dicha concentración fue confirmada por "dilution plating", es decir, sembrando con asa de Drigalsky 100  $\mu$ L de cada suspensión en placas de PDA estéril y contando el número de colonias por mL tras 7 días de incubación. Como excepción, en el caso de *R. stolonifer* se contó el número de esporas por mL (sp/mL) por cámara de Neubauer, debido a que su rápido crecimiento en masa en el medio de cultivo dificulta la visualización de las colonias.

Posteriormente, se sembraron 100  $\mu$ L de cada inóculo de partida en el medio correspondiente, incubando todas las muestras a 25 °C durante el tiempo que duró el experimento.

Por cada cepa, se prepararon un total de doce réplicas, constituidas por seis controles y seis activos. A su vez y tal y como se indica a continuación, los activos estaban compuestos por tres placas en contacto directo y tres placas en fase vapor.

### ***3.5.3. Placas activas: contacto directo y fase vapor***

Una vez sembradas todas las placas con el inóculo correspondiente tal y como se ha indicado en el punto anterior, se procedió a la aplicación del agente activo en el disco de papel de filtro.

En el caso de las muestras en **contacto directo**, el disco de Whatman se colocó en el centro del medio de cultivo, es decir, en contacto directo con éste (figura 2.7). Tras esto, 10  $\mu$ L del aceite esencial o compuesto mayoritario, ambos puros sin diluir, se depositaron en el disco.



**Fig. 2.7** Método de difusión (contacto directo): aplicación del disco activo en contacto directo con el medio de cultivo.

Para la actividad de los compuestos en **fase vapor**, es necesario que estos no se encuentren en contacto con el medio inoculado. Es por ello que el disco en estas muestras se coloca en la tapa de la placa Petri, tal y como muestra la figura 2.8. Previamente, se deposita una alícuota de suero estéril (de unos 5  $\mu$ L) en el centro de la cara interna de la placa con el objetivo de reducir las posibles interacciones que pueda haber entre el disco activo y la tapa. Inmediatamente después se coloca un cubreobjetos estéril, que será donde finalmente se deposite el disco activo con los 10  $\mu$ L del agente activo.



**Fig. 2.8** Método de difusión (fase vapor): aplicación del disco activo en fase vapor, en la tapa de la placa Petri.

Todas las placas, tanto de contacto directo como de fase vapor, se cerraron con parafilm, para evitar la pérdida de compuestos volátiles y asegurar por tanto la reproducibilidad de las medidas entre réplicas. Además de ello, hay que considerar que en el caso de no cerrar dichas placas, los compuestos volátiles desprendidos afectan a la atmósfera de la incubadora, pudiendo existir por tanto una influencia cruzada entre los diferentes activos evaluados (Inouye S., et al., 2001).

Para tener en cuenta la diferencia de esporulación debido al sellado, la mitad de los controles se cerraron de la misma manera que los controles, mientras que a los otros tres no se les añadió el parafilm y se introdujeron dentro de la estufa en bolsas de polietileno sin cerrar. En este caso los controles sólo servían para comprobar el correcto crecimiento de la cepa, ya que al no formarse halos de inhibición en esos casos, no se pudieron realizar medidas.

Los resultados se tomaron al cabo de 7 días de incubación, excepto en el caso de *F. oxysporum*, ya que debido a un crecimiento más lento la lectura se postergó hasta los 14 días. Como se ha mencionado previamente, por cada tipo de muestra se contó con tres réplicas, y los halos de inhibición formados tras el crecimiento de cada cepa bajo cada compuesto activo se midieron en dos direcciones mediante un calibre digital.

#### ***3.5.4. Análisis estadístico: diferencias obtenidas entre los métodos de contacto directo y fase vapor***

Para evaluar de manera precisa las diferencias entre la actividad de los dos métodos, se realizó una comparación de medias de ambos para muestras independientes según la distribución t-student. Para ello se empleó el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La variable numérica correspondió a los halos de inhibición (mm), mientras que el tipo de exposición (1= contacto directo; 2= fase vapor) hizo referencia a la variable de agrupación. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95 %.

Previamente al análisis de medias, se estudió la homocedasticidad de ambos grupos, asumiendo la igualdad de varianzas cuando el nivel de significación de la prueba de Levene fue mayor de 0.05 y rechazándola cuando fue menor de 0.05. De esta manera, la prueba T para la igualdad de medias se realiza considerando el resultado obtenido por Levene, difiriendo las medias significativamente en el caso de obtener una significación menor de 0.05 y aceptando la igualdad de medias (hipótesis nula) en el caso de ser mayor de 0.05.

### 3.6. Primera caracterización. Método de dilución en agar: diámetro de la colonia del moho

Para este experimento se utilizó la cepa *A. flavus* 2949, sembrando tal y como se ha explicado en otras ocasiones, la cepa previamente durante 7 días en PDA para la extracción del inóculo.

#### 3.6.1. Preparación del activo

Los aceites esenciales de canela, orégano y clavo se prepararon en microtubos de 1 mL en las concentraciones indicadas en la tabla 2.4, diluyendo los compuestos puros en etanol (v/v).

En el caso del LAE, debido a que se encontraba en la forma deshidratada y a su solubilidad en agua, éste se preparó por medio de pesadas en la balanza analítica de precisión teniendo en cuenta los cuatro decimales, para asegurar una mejor precisión en la concentración final. Cada muestra de LAE se diluyó en 2 mL de agua destilada estéril para obtener la concentración final (p/v).

Las concentraciones de los activos por tanto, expresadas como porcentaje, hacen referencia a aquellas preparadas previas a su introducción en el medio de cultivo.

**Tabla 2.4** Concentraciones de los aceites esenciales y de LAE.

Los aceites esenciales se prepararon en etanol (v/v) y LAE en agua destilada estéril (p/v).

EO (μL)	Etanol (μL)	LAE (g)	Agua (mL)	[activo] (%) preparada	[activo] ppm en el medio
0.5	199.5 μL	/	/	0.25 %*	16.66 ppm
1	199 μL	0.01	2	0.5 %	33.33 ppm
2	198 μL	0.02	2	1 %	66.66 ppm
4	196 μL	0.04	2	2 %	133.33 ppm
6	194 μL	0.06	2	3 %	200 ppm
8	192 μL	0.08	2	4 %	266.66 ppm

\* La concentración de 0.25 % sólo se preparó para el EO de canela.

De esta manera, se depositaron 100 μL de cada concentración de activo preparada, en el centro de una placa Petri vacía, a la cual se le añadieron inmediatamente 15 mL de medio de cultivo MEA (a unos 45 °C-50 °C, es decir, en estado líquido). El volumen vertido a cada placa

se midió por medio de una probeta (esterilizada previamente por calor) para asegurar la concentración final de aceite esencial en la placa. Como se indica en la tabla 2.4, las “ppm” (partes por millón) corresponden a las concentraciones mostradas en porcentaje, considerando los 15 mL de medio de cultivo en todos los casos.

Inmediatamente tras la adición del aceite esencial en cada placa, ésta se agitó un mínimo de 30 veces en todas las direcciones posibles, para así facilitar la homogeneización del compuesto activo en el medio de cultivo.

En el caso de los controles se repitió la misma operación, pero añadiendo 100 µL de etanol sin aceite esencial y 100 µL de agua destilada para las muestras de aceite esencial y LAE respectivamente. Es importante que esta última etapa desde el depósito del agente activo hasta la agitación de la placa se lleve a cabo en el menor tiempo posible, de manera que se facilite una mayor distribución del mismo antes de la solidificación del medio de cultivo.

### ***3.6.2. Siembra de *A. flavus****

Una vez solidificadas las placas, éstas se inocularon por medio de una micropipeta en el centro del medio de cultivo, con 10 µL de una suspensión previamente ajustada a  $10^6$  CFU/mL de *A. flavus* 2949. Todas las concentraciones se prepararon por triplicado y las muestras se incubaron a 25 °C hasta la finalización del ensayo, cerrándose las placas con parafilm.

El crecimiento total de los controles es el que establece el tiempo máximo de toma de resultados, ya que una vez que éstos no tienen suficiente espacio para seguir creciendo de manera concéntrica, se pierde la linealidad del crecimiento del moho. De esta manera, la finalización del ensayo correspondió al día 10, último punto dentro de la recta lineal de los controles.

### ***3.6.3. Análisis estadístico: actividad de los agentes activos***

Se extrajo la pendiente de la ecuación de la recta en aquellas cuyo coeficiente de correlación fue superior a 95 %. Se quiso determinar si las diferentes concentraciones de cada activo producían diferencias significativas en la actividad antifúngica. Para ello, se analizaron las medias de las pendientes extraídas entre las diferentes concentraciones por medio del programa SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La pendiente de la recta



es la equivalencia a la velocidad de crecimiento, conocido en siglas como “GR” debido a su traducción inglesa, “*Growth Rate*”.

Se llevó a cabo Anova (“ANalysis Of VAriance”) de un factor, realizando previamente la prueba de Levene para determinar la homocedasticidad de varianzas. En el caso de rechazar la hipótesis nula (p-valor de 0.05) las medias se compararon por medio de las pruebas Welch o Brown-Forsythe, mientras que con un resultado de p-valor mayor de 0.05 éstas se analizaron por Anova.

Posteriormente, se identificó el origen de las diferencias significativas obtenidas mediante las comparaciones múltiples post-hoc. Dentro de estos, se aplicó el test de Bonferroni en el caso de asumir igualdad de varianzas mientras que en el caso de no ser iguales, se realizó el test T2 de Tamhane (T2) añadiendo en algunos casos concretos el de T3 de Dunnett.

Además, como veremos más adelante en los resultados (ver apartado 4.2) hubo ciertos casos donde debido a una baja correlación lineal, se evaluaron las diferencias entre los diámetros de la colonia en lugar de entre las pendientes de las rectas. El análisis estadístico tuvo lugar de la misma manera a la explicada previamente.

### **3.7. Evaluación del tiempo de exposición en la actividad del aceite esencial de canela y orégano en fase vapor**

#### ***3.7.1. Halo de inhibición de *A. flavus* tras diferentes tiempos de exposición de canela y orégano***

El objetivo de este experimento era determinar la influencia del tiempo de exposición de los compuestos volátiles de ambos aceites esenciales en el crecimiento del moho. Para ello, a tiempo “0” se sembraron todas las placas (con asa de Drigalsky), inoculando 100 µL de una solución de *A. flavus* ajustada a  $10^6$  CFU/mL (ver apartado 3.5.2 de este capítulo 2). El medio de cultivo empleado fue MEA. Tras esto, los discos Whatman conteniendo los 10 µL de aceite esencial se colocaron en la tapa de placa Petri para su evaluación en fase vapor (igual que en la sección 3.5.3). Se realizaron tres réplicas para cada uno de los tiempos a estudiar y para cada aceite esencial. Se añadieron tres controles (placas MEA inoculadas con *A. flavus* pero sin aceite esencial) para comprobar el correcto crecimiento de la cepa.

Tras las primeras 24 horas de ensayo se retiró la exposición de tres réplicas de cada aceite esencial, sustituyendo las tapas de las placas con el disco activo por otras intactas. Las placas que dejaron de estar expuestas continuaron incubándose en condiciones normales junto con el resto de placas que seguían con los discos. La misma operación fue repetida a las 48, 72 y 96 horas de ensayo. Los halos de inhibición formados por la acción de la fase vapor de orégano y canela se midieron cada 24 horas por medio de un calibre digital.

Todas las placas del ensayo se cerraron con parafilm y se incubaron a 25 °C durante 12 días.

#### ***3.7.1.1. Análisis estadístico***

De la misma manera que en el experimento anterior, las diferencias significativas se llevaron a cabo mediante el análisis de Anova de 1 factor, realizando para ello tres pasos como se explicó en el apartado 3.6.3. El primero de ellos, la prueba de Levene informa sobre la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad), comparando a continuación las medias de la población por Anova (en caso de asumir varianzas iguales) o Welch o Brown-Forsythe en caso contrario. Por último, las comparaciones múltiples o post-hoc permiten identificar el origen en el caso de haber detectado diferencias significativas. Esto se llevó a cabo por medio del test de Bonferroni (en el caso asumir varianzas iguales en Levene) o por T2 de Tamhane en caso contrario.

#### ***3.7.2. Crecimiento de *A. flavus*, en relación al momento de aplicación del aceite esencial de canela en fase vapor***

A diferencia del resto de experimentos de la tesis, en este caso las placas se sembraron en profundidad con 1 mL de una suspensión de *A. flavus* ajustada a  $10^6$  CFU/mL, tras lo cual se añadieron 15 mL de medio de cultivo MEA, agitando bien la placa para que el inóculo quedase homogéneamente repartido. El aceite esencial de canela se aplicó en fase vapor, de igual manera que antes (ver apartado 3.5.3), cerrando todas las placas con parafilm e incubándolas a 25 °C durante cuatro días que duró el experimento.

Las muestras se realizaron por duplicado. Se realizaron 5 tipos de muestras diferentes, que diferían en función del momento de aplicación o de retirada del disco de canela, como se muestra a continuación:

- ❖ Muestra 1: control, sin disco de canela.
- ❖ Muestra 2: colocación del disco de canela tras 24 h desde la siembra.
- ❖ Muestra 3: colocación del disco de canela tras 4 días desde la siembra.
- ❖ Muestra 4: colocación del disco inmediatamente tras la siembra, y extracción de éste 24 horas después.
- ❖ Muestra 5: colocación del disco inmediatamente tras la siembra, sin extraerlo hasta el final del ensayo.

Tras los cuatro días de experimento, se comparó el crecimiento de cada muestra, midiendo los halos de inhibición formados mediante un calibre digital.

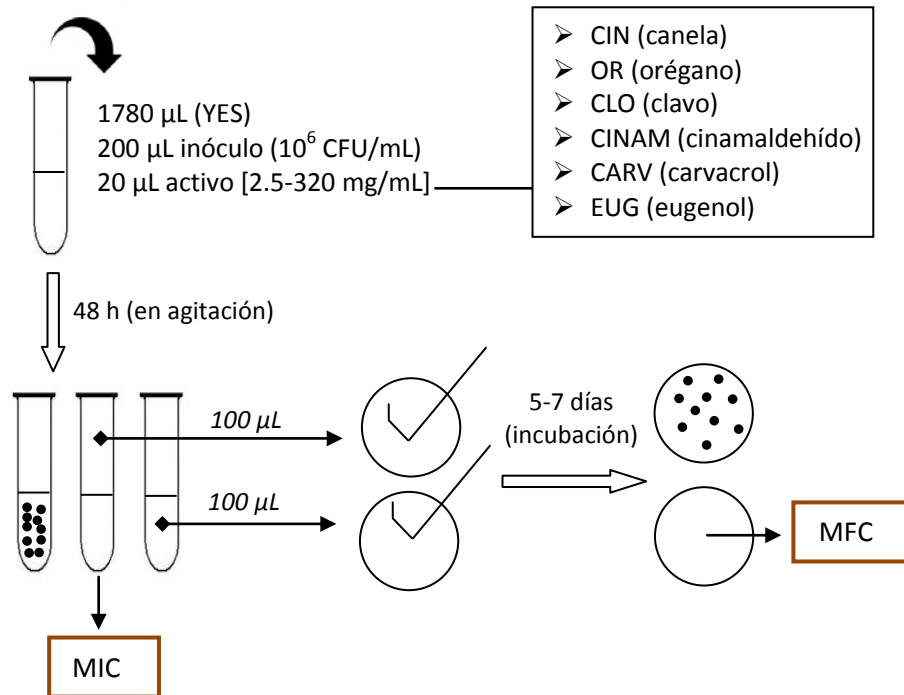
### **3.8. Segunda caracterización. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC o CIM) y Concentración Mínima Fungicida (MFC o CFM)**

Se utilizaron las mismas sustancias activas que en la primera caracterización antifúngica (ver apartado 3.5), es decir, los aceites esenciales de canela, orégano y clavo, así como sus compuestos mayoritarios, cinamaldehído, carvacrol y eugenol. En este caso el análisis se realizó frente a las cepas de *A. flavus* 2949 y *P. roqueforti*.

Se extrajo el inóculo de cada cepa, ajustándolo a una concentración final de  $10^6$  CFU/mL (ver apartado 3.5.2 de este capítulo 2). Para cada uno de los compuestos, se evaluó la actividad antifúngica por medio de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC), siglas procedentes de su traducción en inglés.

#### ***3.8.1. Formación de los tubos de muestra***

Los agentes activos se diluyeron en etanol por medio de diluciones seriadas, en un rango de concentración de 320 mg/mL a 2.5 mg/mL. A continuación, se prepararon tubos conteniendo 1.78 mL de YEB (Yeast Extract Broth) estéril (pH final de 7), a los cuales se añadieron 200  $\mu$ L de inóculo de cada especie (previamente ajustada a  $10^6$  CFU/mL) y 20  $\mu$ L de la concentración correspondiente de agente activo (figura 2.9). De esta manera, la concentración inicial de inóculo se diluye en un factor 10 y la del agente activo en un factor 100. Los controles se formaron de la misma manera, pero añadiendo 20  $\mu$ L de etanol en el lugar del compuesto activo.



**Fig. 2.9** Esquema de la formación de muestras para la determinación de MIC y MFC.

Todos los tubos se colocaron en un agitador orbital, y se incubaron a 25 °C durante 48 horas, tiempo tras el cual se definió la MIC como la concentración más baja donde no se observó crecimiento en el tubo en comparación con el control. Finalmente, de todas aquellas concentraciones donde no hubo desarrollo de mohos, se sembraron 100 µL por medio de asa de Drigalsky en medio MEA (*A. flavus*) y PDA (*P. roqueforti*). Tras el tiempo de incubación de dichas placas (5-7 días), se determinó la MFC como la concentración inferior de compuesto activo que no produjo crecimiento en la placa.

Esta evaluación se realizó un mínimo de tres veces, cada una de ellas por duplicado.

### 3.9. Estudio de las variables pH y temperatura: MIC y MFC de canela y orégano

En este experimento se quiso estudiar cómo influían las variables de pH y temperatura en la actividad de ambos aceites esenciales frente a cinco cepas de mohos: *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*.

Para ello se realizaron las mismas determinaciones de MIC y MFC que las explicadas en el punto 3.9, ajustando en este caso el YEB a tres pH diferentes (pH 3, pH 5 y pH 7) mediante la

adición de HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M previamente a su esterilización en autoclave (121 °C durante 15 min).

Los tubos control y activos se prepararon de la misma manera que en el punto anterior (ver figura 2.9), pero incubándolos a dos temperaturas para cada cepa, esto es, 25 °C y 37 °C para *Aspergillus* y 25 °C y 6 °C para *Penicillium*. Todas las muestras se incubaron durante 48 horas, excepto las de 6 °C, que debido al enlentecimiento del moho la incubación se postergó hasta los 7 días. La determinación de ambas concentraciones, MIC y MFC se llevó a cabo de la misma manera a la explicada en el punto 3.9.

### **3.10. Estudio de las variables pH y temperatura: diámetro de la colonia del moho**

Se utilizaron las mismas cinco cepas que en el experimento anterior (*A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*), y se midió el crecimiento al incubar cada una de ellas a tres pH (pH 3, pH 5, pH 7) y dos temperaturas posibles (25 °C, 37 °C ó 6 °C). A diferencia del anterior, este experimento se realizó en medio de cultivo sólido, midiéndose la velocidad de crecimiento del diámetro de cada colonia bajo las diferentes condiciones de pH y temperatura. No se incluyeron activos, ya que el objetivo era evaluar cómo afectaban dichas variables al crecimiento normal del moho.

#### ***3.10.1. Preparación de los medios de cultivo a diferente pH***

En este caso el cambio de pH fue más complejo que en el caso anterior de YEB (punto 3.9) ya que hay que tener en cuenta que al acidificar un medio de cultivo y someterlo a la temperatura de esterilización (normalmente a 121 °C en autoclave) el agar pierde sus propiedades de solidificación. Por tanto, para evitar esto el ácido tiene que ser añadido después de haber sufrido el calentamiento. A pesar de que sólo el pH 3 presentó este problema, se optimizó el volumen necesario de HCl 0.1 M y de NaOH 0.1 M para conseguir los tres pH mencionados en ambos medios, manteniendo de esta manera las mismas condiciones en todos los casos.

Se emplearon para ello los medios líquidos PDB y MEB debido a que no contienen agar en su composición. Se prepararon dichos caldos en un volumen conocido y se determinó la cantidad necesaria de HCl y NaCl para ajustar el pH en cada caso. Este paso se repitió un

mínimo de tres veces por medio y pH para obtener una buena reproducibilidad. Una vez terminada la optimización, se prepararon los medios líquidos PDB y MEB en los volúmenes conocidos, se añadió 1.5 % de agar en ambos y se procedió a su esterilización en autoclave (121 °C durante 15 min). Tras esto, se introdujeron las botellas de medio estéril en un baño de agua con temperatura regulada a 50 °C para evitar su solidificación. Se añadieron entonces las cantidades determinadas previamente de HCl y NaOH, se agitaron manualmente y se vertieron 15 mL de cada uno de ellos por medio de una probeta estéril. Las placas se dejaron solidificar como en el resto de experimentos, durante 20 min con radiación ultravioleta.

### **3.10.2. Siembra e incubación**

Se extrajeron los inóculos de cada una de las cinco cepas (*A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*), ajustando cada uno a una concentración final de  $10^6$  CFU/mL como en otras ocasiones (ver apartado 3.5.2 de este capítulo 2). De cada una de esas suspensiones se depositó una gota de 10 µl en el centro de cada una de las placas preparadas previamente, con el medio de cultivo con el pH correspondiente. Se utilizó MEA en el caso de ambas cepas de *A. flavus* y PDA para el resto.

Las placas fueron incubadas a 25 °C y 37 °C en el caso de los tres *Aspergillus* y a 25 °C y 6 °C en el de los dos *Penicillium*. No se empleó la temperatura de 6 °C en *Aspergillus* ni la de 37 °C en *Penicillium* debido a la ausencia de crecimiento en esos casos.

La lectura se realizó cada 24 horas, midiendo el diámetro de la colonia formada en cada placa por medio de un calibre digital, y expresando dicha medida en función del tiempo. La duración del experimento varió según la cepa, ya que depende de la velocidad de crecimiento de cada moho, considerando la última medida a aquella próxima al perímetro de la placa.

El experimento constó con un mínimo de cuatro réplicas por cada opción.

### **3.10.3. Análisis estadístico**

De la misma manera que en el experimento 3.6 de dilución en agar, se extrajeron las pendientes de las rectas resultantes de la representación de los diámetros de colonia en el tiempo, obteniendo así la velocidad de crecimiento (GR “*Growth Rate*”) en cada caso. Se

analizaron las posibles diferencias significativas entre las pendientes bajo las variables de pH y temperatura, mediante Anova de un factor. El análisis se llevó a cabo de la misma manera a la explicada en el apartado 3.7.1.1.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **4.1. Primera caracterización. Método de difusión: contacto directo y fase vapor**

Este primer ensayo se realizó con el objetivo principal de comprobar la actividad de las seis sustancias naturales empleadas, sobre diferentes cepas de mohos. Así mismo, se evaluó la actividad de las mismas en función del tipo de exposición, es decir, contacto directo o fase vapor.

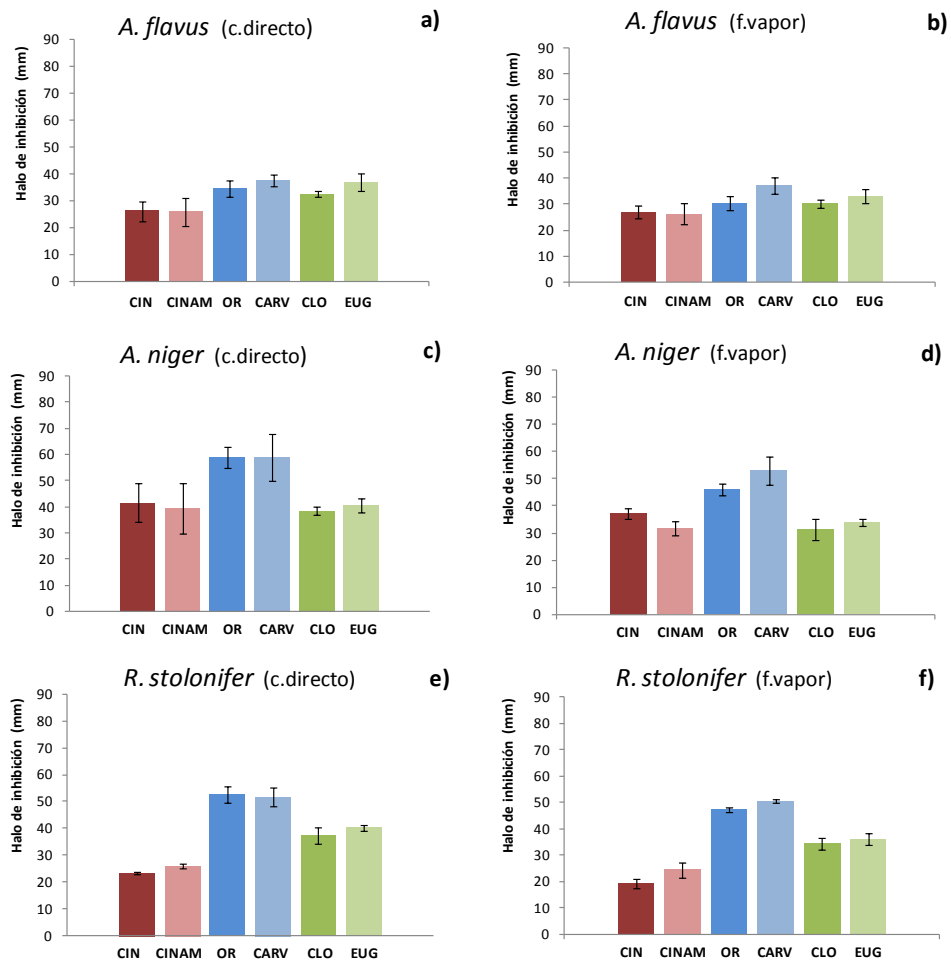
La actividad se midió por medio del halo de inhibición provocado en cada caso tras 7 días de incubación de cada cepa, excepto en el caso de *F. oxysporum* que debido a un menor crecimiento de éste, se tomó a los 14 días. Los halos se midieron en ambas direcciones por medio de un calibre digital (en mm). Por tanto, por cada aceite esencial y tipo de exposición, el resultado corresponde al promedio total de seis medidas, considerando las tres réplicas medidas en las dos direcciones. La variabilidad de éstas se calculó por medio de la desviación estándar.

La discusión de los resultados se llevó a cabo comparando lo siguiente: actividad mostrada por los aceites esenciales y sus respectivos compuestos mayoritarios, diferencias apreciadas en cuanto al tipo de exposición de los mismos a las cepas evaluadas y por último, a las seis sustancias empleadas.

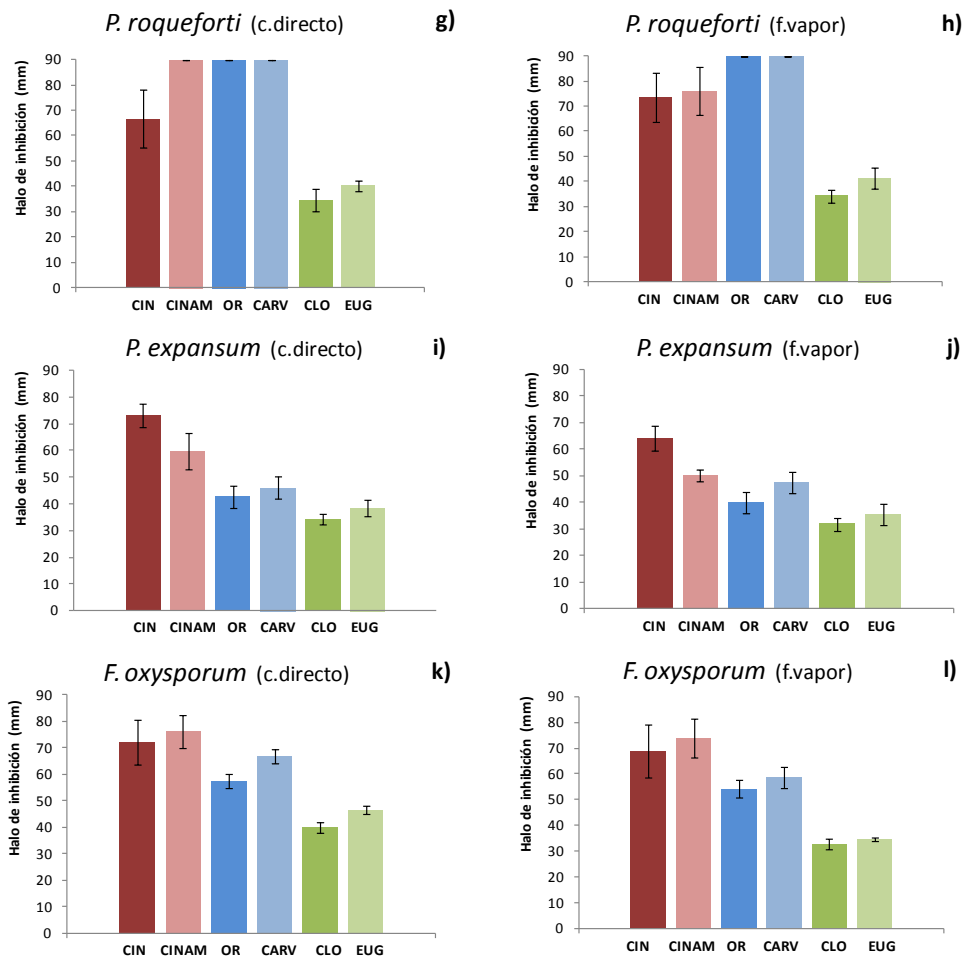
#### ***4.1.1. Actividad antifúngica de los aceites esenciales y sus respectivos compuestos mayoritarios***

Como podemos observar en la figura 2.10, lo más destacable en todos los casos es la gran similitud en la actividad antifúngica de canela y cinamaldehído, orégano y carvacrol y por último, clavo y eugenol. Este hallazgo se encontró en todas las cepas y en las dos metodologías, esto es, contacto directo y fase vapor.





**Fig. 2.10** (a-f) Halos de inhibición (mm) en contacto directo y fase vapor, de los seis compuestos (canela, orégano, clavo, cinamaldehído, carvacrol y eugenol) sobre *A. flavus* 2949, *A. niger* y *R. stolonifer*.



**Fig. 2.10** (g-l) Halos de inhibición (mm) en contacto directo y fase vapor, de los seis compuestos (canela, orégano, clavo, cinamaldehído, carvacrol y eugenol) sobre *P. roqueforti*, *P. expansum* y *F. oxysporum*.

Estos resultados concuerdan con la composición química detallada de los tres aceites esenciales al principio de este capítulo. Como vimos en la tabla 2.2, cinamaldehído, carvacrol y eugenol se cuantificaron como los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de canela, orégano y clavo respectivamente. Además de esto, la composición de las atmósferas de los tres aceites esenciales utilizados en este experimento se analizó previamente en dos trabajos realizados dentro del grupo GUIA. En el primero de ellos se identificó eugenol como el compuesto mayoritario del clavo, relacionando así la actividad de este aceite esencial con la gran concentración de eugenol presente en el mismo (López P., et al. , 2005). Posteriormente, se evaluó la actividad en fase vapor de los aceites esenciales de canela y orégano, donde se identificaron respectivamente cinamaldehído y carvacrol como los compuestos mayoritarios de los mismos y como responsables de su actividad (López P., et al. , 2007b).

Además de esto, puede observarse una cierta variabilidad en cuanto a la actividad de canela y cinamaldehído, siendo en algunos casos mayor la actividad de la primera (fig. 2.10 e,f,g,h,k,l) , mientras que en otros ocurre lo contrario (fig. 2.10 c,d,i,j). La mayor similitud entre ambos compuestos se encontró en la cepa *A. flavus* (fig.2.10 a,b).

Por otro lado, carvacrol y eugenol manifestaron una actividad levemente mayor en comparación con orégano y clavo. Dichas diferencias fueron mínimas, entrando en la mayoría de casos dentro de los márgenes de la variabilidad como muestran las barras de error. Sin embargo, a pesar de no ser un dato concluyente por sí sólo, sí que indica una tendencia a un aumento de la actividad por parte de estos dos compuestos mencionados.

#### ***4.1.2. Análisis estadístico: diferencias obtenidas entre los métodos de contacto directo y fase vapor***

Como hemos podido apreciar en la figura 2.10, destaca la parecida actividad entre los dos tipos de exposición. Como ocurría con anterioridad, la aplicación por contacto directo mostró la misma actividad o ligeramente mayor que por fase vapor. En un resultado anterior llevado a cabo en el grupo GUIA se encontraron diferencias entre el método de difusión en disco por contacto directo y fase vapor. Aunque en ese caso se encontró en general una actividad mayor en la aplicación en fase vapor, hay que mencionar que el trabajo se realizó frente a varias cepas de bacterias, no de mohos. Hay que tener en cuenta que cuando los aceites esenciales se aplican en contacto directo, la actividad depende en un alto grado de la

solubilidad en el medio de cultivo, mientras que en fase vapor entra en juego el equilibrio que se alcanza tras la liberación de los compuestos volátiles activos (Goñi P., et al. , 2009).

Sin embargo, para determinar de manera precisa las diferencias de actividad entre ambos métodos, se realizó el análisis estadístico de las medias por medio de una prueba T para muestras independientes (t-student) con un nivel de significación del 95 % (ver apartado 3.5.4.).

Según los datos obtenidos, en el aceite esencial de canela se detectaron diferencias significativas entre los dos tipos de exposición para las cepas *P. expansum* y *R. stolonifer*. En el caso de cinamaldehído sólo se obtuvo un caso, correspondiente también a la cepa *P. expansum*. Por otra parte, en el caso de orégano las diferencias fueron significativas para *A. flavus*, *A. niger* y *R. stolonifer* mientras que sólo se halló un caso correspondiente a *F. oxysporum* en el caso de carvacrol. Por último, *A. flavus*, *F. oxysporum* y *A. niger* difirieron en las medias de ambos métodos cuando fueron tratados con clavo, y *F. oxysporum*, *A. niger* y *R. stolonifer* cuando se empleó eugenol.

Como veremos más adelante a lo largo de la tesis (capítulos 3 y 4), la actividad en fase vapor de los aceites esenciales se debe a la liberación de los compuestos volátiles de los mismos.

#### **4.1.3. Diferencias observadas entre las cepas evaluadas**

De todas las cepas estudiadas *A. flavus* fue la que presentó una menor diferencia entre las diferentes sustancias (figura 2.10), siendo ligeramente mayor la actividad del orégano, clavo y canela, manteniendo ese mismo orden en relación a los compuestos mayoritarios respectivos (carvacrol, eugenol y cinamaldehído). Esta misma escala se encontró en el caso de *R. stolonifer*, aunque en este caso las diferencias entre las sustancias fueron mayores. Por otra parte, *A. niger* mostró mayor sensibilidad al orégano, seguido de la canela y el clavo. En este caso no se apreciaron diferencias claras entre el cinamaldehído y el eugenol. *P. roqueforti* mostró el mismo orden de actividad que *A. niger*, aunque destacando por encima la gran actividad del orégano y carvacrol (obteniendo inhibición total del crecimiento) y la buena actividad de la canela y cinamaldehído respecto al clavo y eugenol. Por último, en *P. expansum* y *F. oxysporum* se evidenció una clara mejor actividad de la canela con respecto al orégano y el clavo, encontrándose el mismo orden para los compuestos mayoritarios.

Además, los valores de los halos de inhibición en estas dos cepas fueron muy similares. Las conclusiones fueron las mismas para los dos métodos.

#### **4.1.4. Diferencias observadas entre las seis sustancias empleadas**

Entre los compuestos estudiados, clavo y eugenol causaron halos de inhibición muy similares independientemente de la cepa y del tipo de exposición. A pesar de que las diferencias entre los diferentes mohos fueron mínimas, en ambas sustancias *F. oxysporum* resultó ligeramente más sensible, encontrándose *A. flavus* en el extremo contrario.

Respecto al aceite esencial de canela y el cinamaldehído, las cepas que mostraron los halos más amplios fueron *P. roqueforti*, *P. expansum* y *F. oxysporum*, seguidas de *A. niger* y por último *A. flavus*.

Por último, orégano y carvacrol mostraron una inhibición total en el caso de *P. roqueforti* como se comentó en el punto 4.1.3, una actividad similar en *A. niger*, *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, y siendo por último menor en *P. expansum* y *A. flavus*.

#### **4.1.5. Importancia del método utilizado**

A pesar de los resultados mostrados, el método de difusión en disco no resultó apropiado a la hora de determinar la actividad antifúngica de los aceites esenciales debido a la naturaleza hidrofóbica de estos. En el mejor de los casos los resultados que aportan son semi-cuantitativos, siendo en otros cualitativos y poco reproducibles (Kalemba D., et al. , 2003). Además de la reducida hidrosolubilidad de los mismos, también hay diversos factores que pueden variar en gran medida los valores de los halos de inhibición creados, como pueden ser, el volumen exacto de aceite esencial depositado en el disco y el grosor del medio de cultivo en la placa Petri (Burt S., 2004).

Sin embargo, las ventajas proporcionadas en cuanto a la facilidad y rapidez de la técnica, así como la necesidad de volúmenes bajos de aceite esencial, explican que siga siendo hoy en día un método muy extendido. De esta manera, varios autores señalan la posibilidad de utilizar este método de difusión en disco como una caracterización previa, es decir, como un barrido rápido de actividad entre diferentes sustancias y cepas (Burt S., 2004; Kalemba D., et al., 2003). Como ejemplo, véase el trabajo de Pawar V. C., et al. (2007) donde evalúan la sensibilidad de dos cepas de moho frente a 75 aceites esenciales diferentes.

A pesar de ello, debido a las razones expuestas y tal y como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, para una determinación más precisa, es conveniente considerar otros métodos como son la dilución en agar o en medio líquido (Burt S., 2004; David J. R. D., et al., 2013; Gutierrez J., et al., 2009; Holley R. A., et al. , 2005; Kalemba D., et al., 2003).

Por este motivo, con el objetivo de cuantificar de manera fiable la actividad de las sustancias estudiadas en este experimento, se llevaron a cabo los métodos que se exponen en los siguientes apartados de este capítulo.

La comparación de los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de los aceites esenciales y sus compuestos, con aquellos encontrados en la bibliografía se detallará en la parte correspondiente al método de dilución en líquido.

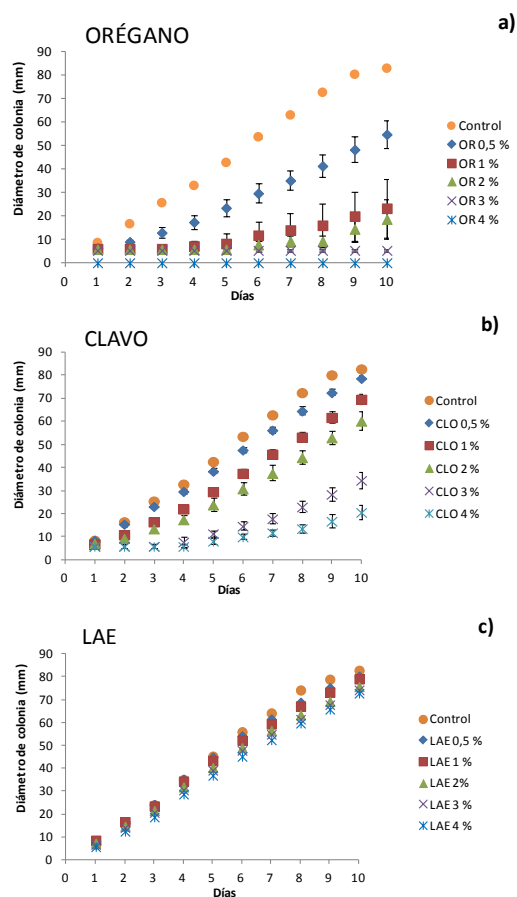
#### **4.2. Primera caracterización. Método de dilución en agar: diámetro de la colonia del moho**

Tras la caracterización anterior, el objetivo de este experimento fue determinar la actividad de los tres aceites esenciales y del surfactante LAE, mediante el método de dilución en agar frente al moho *A. flavus*. Esta técnica, con frecuencia encontrada en inglés como “*poisoned substrate technique*”, permite evaluar la actividad de los mismos tras su dilución en el medio de cultivo. La inoculación posterior del moho en el punto central de la placa permite la cuantificación de su crecimiento mediante la medida del diámetro de la colonia del mismo. Dicha ventaja explica la gran cantidad de trabajos científicos que pueden encontrarse en la bibliografía (Bluma R., et al. , 2008; Carmo E. S., et al. , 2008; Kocic-Tanackov S., et al. , 2012b; Kocic-Tanackov S. D., et al. , 2012c; López-Malo A., et al. , 2007; Passone M. A., et al. , 2012b).

En este experimento concreto se eligió el moho *A. flavus* por dos razones. En primer lugar, por la capacidad de algunas cepas de esta especie de producir la cancerígena micotoxina aflatoxina B1. La segunda razón, por haber sido la especie donde se demostró mayor homogeneidad entre la actividad de las seis sustancias evaluadas previamente (ver apartado 4.1.).

Los resultados de los diámetros de la colonia se muestran en la figura 2.11

Como fue explicado detalladamente en la metodología, los tres aceites esenciales, canela, orégano y clavo, así como el surfactante LAE se prepararon en un rango de concentración de entre 0.5 %-4 %, diluyendo 100  $\mu\text{L}$  de cada una de éstas en 15 mL de MEA. Posteriormente, el diámetro de la colonia crecida (en mm) tras la inoculación de 10  $\mu\text{L}$  en el centro de la placa se midió cada 24 horas por medio de un calibre digital. En la tabla 2.4 (ver apartado 3.6.1) puede encontrarse la equivalencia entre la concentración del aceite esencial preparada en porcentaje y la concentración final de éste en el medio de cultivo, en  $\mu\text{L}/\text{L}$ . Sin embargo, para facilitar la visualización de los datos durante la discusión de los resultados, dichas muestras se encuentran representadas en porcentaje, es decir, referidas a la concentración inicial en su preparación (ver tabla 2.4). Por último, a la hora de discutir con resultados de otros autores, éstas se tomarán teniendo en cuenta el volumen de medio de cultivo vertido, quedando de esta manera el volumen de aceite esencial ( $\mu\text{L}$ ) por el volumen del medio ( $\mu\text{L}/\text{L}$ ).



**Fig. 2.11** Diámetro de colonia (mm) de *A. flavus* 2949. Orégano (a), clavo (b) y LAE (c) se incorporaron mediante dilución en agar. Canela produjo inhibición total en todo el rango de concentración.

El aceite esencial de canela fue sin lugar a dudas el que presentó mayor actividad, inhibiendo completamente el crecimiento del moho incluso al 0.25 %, esto es, con una concentración final en el medio de cultivo de 16.55  $\mu\text{L/L}$ . Debido a esto, dichos resultados no se muestran en la figura 2.11. Esta última concentración se probó sólo para esta sustancia, tras haber obtenido inhibición total en el rango de 0.5 %-4 % en un ensayo previo.

Tras canela, orégano fue la sustancia que mayor actividad produjo (fig.2.11 a), dando paso al clavo (fig.2.11 b) y finalmente al LAE (fig.2.11 c). Además de la mencionada canela, el orégano fue el único que consiguió la inhibición total del moho en las tres réplicas de la concentración más alta (4 %, es decir, 264.90  $\mu\text{L/L}$ ). La mayor actividad del orégano queda patente con la marcada diferencia de crecimiento entre las líneas control y del 0.5 % (16.56  $\mu\text{L/L}$ ), mucho menos distante en el caso del clavo y a priori superpuestas en el caso del LAE.

El LAE es un tensioactivo de tipo catiónico, derivado del ácido láurico y del aminoácido arginina. Aunque es una sustancia relativamente reciente, se pueden encontrar algunas publicaciones de su efectividad antimicrobiana como muestra el artículo de (Woodcock N. H., et al. , 2009) sobre la reducción de la carga bacteriana en leche pasteurizada. Presenta una clara ventaja frente a los aceites esenciales y sus compuestos, y es que no desprende aromas, que como se sabe, es uno de los hándicaps que hace necesario estudiar dichas sustancias naturales de manera que se encuentre una concentración mínima efectiva que no modifique las propiedades organolépticas del alimento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que además de que no posee actividad en fase vapor, el LAE necesita de la presencia de agua para poder disociarse y actuar, donde sí que alcanza una gran actividad (Kawamura Y., et al. , 2008).

#### **4.2.1. Análisis estadístico**

Tras la visualización de los resultados mostrados en la figura 2.11, el promedio de la velocidad de crecimiento (o “*Growth Rate*”) de las réplicas de cada muestra de activo sobre *A. flavus* 2949 se encuentran en la tabla 2.5. De cada una de las muestras (con un mínimo de 4 réplicas) se midieron los halos en dos direcciones, formando con estos una recta de crecimiento en el tiempo. Por tanto, la velocidad de crecimiento se analizó extrayendo las pendientes de las rectas de cada opción.



Dentro de cada activo, se analizó la influencia de las diferentes concentraciones en la actividad producida por medio del análisis estadístico de Anova de 1 factor (ver apartado 3.6.3).

**Tabla 2.5** GR bajo diferentes concentraciones de LAE, orégano y clavo. GR, expresado en mm/día, es el resultado de la pendiente de la recta del diámetro, medido en ambas direcciones de al menos cuatro réplicas. La desviación estándar ( $\pm SD$ ) y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) informan sobre la repetitibilidad del experimento y la linealidad para cada crecimiento.

Muestra	GR (mm/día)	( $\pm SD$ )	$R^2$
CONTROL (H <sub>2</sub> O)	8.91	0.07	0.9890
CONTROL (EtOH)	8.79	0.04	0.9935
LAE 0.5 %	8.30	0.08	0.9920
LAE 1 %	8.08	0.07	0.9945
LAE 2 %	7.81	0.16	0.9954
LAE 3 %	7.69	0.02	0.9960
LAE 4 %	7.64	0.06	0.9973
CLAVO 0.5 %	8,04	0,09	0,9981
CLAVO 1 %	7,17	0,31	0,9912
CLAVO 2 %	6,09	0,38	0,9789
CLAVO 3 %	4,06	0,42	0,9712
CLAVO 4 %	2,33	0,38	0,9720
ORÉGANO 0.5 %	5.53	0.62	0.9870
ORÉGANO 1 %	2.87	1.79	0.8993 *
ORÉGANO 2 %	2.40	1.53	0.6665 *
ORÉGANO 3%	0.00	0.00	0.000 *
ORÉGANO 4 %	n.g.		n.g.

NOTA: El análisis estadístico posterior (Anova de 1 factor) se realizó con las pendientes de 4 réplicas como mínimo por muestra. Sin embargo, en los casos donde la linealidad fue baja (\*), éste se llevó a cabo tomando en su lugar los diámetros de los halos crecidos en días concretos (5, 7, 10 y 15 días de experimento). Las siglas "n.g" hacen referencia a la inhibición completa de crecimiento.

#### **4.2.1.1. Análisis estadístico: influencia del aceite esencial de clavo y de LAE, en la velocidad de crecimiento (GR) del moho**

Se observaron diferencias significativas entre las pendientes de todas las concentraciones de clavo evaluadas (figura 2.11). Igual que ocurrió con el orégano, las concentraciones más altas produjeron diámetros constantes durante los tres y cuatro primeros días. Debido a esto, se extrajeron las pendientes en estos casos considerando los datos entre los días 3 y 10 de experimento para la concentración del 3 % y entre 4 y 10 días para la del 4 %.

Por su parte el LAE produjo un crecimiento muy similar tanto en el control como en los activos, por ello todas las rectas presentaban índices de alta correlación lineal. En cuanto al análisis estadístico realizado, no se observaron diferencias significativas entre concentraciones cercanas, esto es, entre 0.5 % - 1 %, 0.5 % - 2 %, 1 % - 2 %, 2 % - 3 %, 2 % - 4 % y 3 % - 4 %. De esta manera y como era de esperar, las diferencias más notables se observaron entre las concentraciones más extremas. A pesar de ello, la actividad demostrada por el LAE se consideró muy baja, sobre todo comparada con el resto de sustancias.

#### ***4.2.1.2. Análisis estadístico: influencia del aceite esencial de orégano, en el diámetro de colonia del moho***

Como se puede apreciar en la tabla 2.6, el orégano fue la sustancia donde el análisis fue más complejo, ya que sólo la concentración del 0.5 % mantuvo una buena linealidad, siendo el valor del coeficiente de correlación de la recta promedio de 0.9870. En el caso de las muestras de 1 % y 2 % se encontró una mayor irregularidad entre las diferentes réplicas, debido a que algunas de ellas mantuvieron el mismo diámetro de colonia a lo largo de varios días (siendo entonces su pendiente de valor cero) mientras otras continuaron creciendo. Este hecho, el cual conllevó a la pérdida de linealidad puede apreciarse tanto en el aumento de las barras de error para estas concentraciones (figura 2.11) como en las desviaciones estándar más elevadas del GR y los coeficientes de linealidad más bajos (tabla 2.5). Por su parte, la concentración del 3 % mantuvo en todas sus réplicas el mismo diámetro de colonia inicial a lo largo de los 10 días, teniendo por tanto una pendiente nula. Las siglas indicadas con el 4 % como “n.g” (“*non growth*”) hacen referencia a la inhibición total ya comentada para esa concentración.

De esta manera, tras comprobar las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las pendientes del control y la concentración más baja (0.5 %), se optó por analizar las diferencias entre los diámetros de la colonia de todas las concentraciones de orégano a determinados días de ensayo. Debido a que fue a partir del día 4 de ensayo cuando se empezó a observar un aumento en los diámetros en las concentraciones del 1 % y 2 %, se escogieron los puntos a partir de entonces, estudiando las diferencias en cuatro días concretos: a los 5 días, 7 días, 10 días y 15 días (tabla 2.6). El test de comparaciones múltiples o post-hoc llevado a cabo fue T2 de Tamhane. A pesar de que el ensayo terminó a día 10 debido al crecimiento total de los controles, el resto de concentraciones de activo siguieron midiéndose hasta el día 15 (datos no incorporados en los gráficos de la figura 2.11).

**Tabla 2.6** T2 de Tamhane de los diámetros de colonia bajo 1 %, 2 % y 3 % de orégano. Se muestra el nivel de significación obtenido en diferentes días de ensayo, donde el asterisco indica las diferencias significativas. El nivel de confianza fue del 95 % ( $P < 0.05$ ).

Post-hoc	Sig. (5 días)	Sig. (7 días)	Sig. (10 días)	Sig. (15 días)
1 % - 2 %	0.789	0.688	0.994	0.945
1 % - 3 %	0.609	0.103	0.047*	0.006*
2 % - 3 %	0.369	0.017*	0.029*	0.057

Como era de esperar, tanto el control como 0.5 % dieron diferencias significativas comparándolas con el resto de concentraciones en los cuatro tiempos evaluados. De esta manera y con una inhibición total al 4 %, el estudio se centró en las posibles combinaciones entre las concentraciones de 1 %, 2 % y 3 % (tabla 2.6).

La similitud observada en el comportamiento antifúngico de las concentraciones de 1 % y 2 % (figura 2.11 a) quedó constatada con la ausencia de diferencias significativas entre los diámetros de ambas a los cuatro tiempos evaluados (tabla 2.6). Así mismo, el crecimiento paulatino que fue experimentando el moho tratado a estas concentraciones, explican las diferencias significativas que empezaron a observarse respecto a la concentración del 3 %. Como se mencionó previamente, hasta el día 10 de ensayo los diámetros de todas las réplicas del 3 % se mantuvieron constantes. Sin embargo, desde entonces hasta el día 15 que finalizó la recogida de datos, las colonias de algunas réplicas empezaron a crecer, explicando de esta manera la pérdida de significación (0.057) a este último tiempo.

El experimento se repitió entero, obteniendo los mismos resultados, con las diferencias esperables en las barras de error de algunas concentraciones pero con las mismas conclusiones.

Como era de esperar, en las tres sustancias se obtuvo una mayor reducción del crecimiento cuanto mayor fue la concentración de activo en el medio.

#### **4.2.2. Discusión de los resultados de otros autores**

Los autores Passone M. A., et al. (2012) analizaron el efecto de boldo (*Pëumus boldus*), poleo (*Lippia turbinata*), clavo (*Syzygium aromaticum* L), anís (*Pimpinella anisum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a varias cepas de *A. niger* y *A. carbonarius*, así como la producción de OTA (Ocratoxina A). En este caso utilizaron el medio PMEAE (Peanut Meal Extract Agar) a diferente actividad de agua, e inocularon una concentración menor de microorganismo, esto

es, 2  $\mu\text{L}$  de  $10^5$  sp/mL. Entre las sustancias ensayadas, clavo fue la que produjo una mayor reducción del GR y mayor retraso de la fase Lag, a pesar de que las concentraciones probadas (0, 500, 1500 y 2500  $\mu\text{L/L}$ ) fueron mucho mayores que las mostradas en el presente experimento. La misma conclusión la obtuvieron en un trabajo similar, donde clavo volvió a ser la sustancia de mayor actividad frente a boldo, poleo, anís y tomillo, provocando disminución de GR y aumento de la fase Lag. Una vez más, la actividad resultante estuvo influenciada por la concentración de los aceites esenciales (Passone M. A., et al., 2012b).

Viuda-Martos M., et al. (2007) presentaron un trabajo similar, donde destacan especialmente la semejanza en cuanto a las concentraciones de orégano, clavo y tomillo utilizadas. En éste, añadieron los volúmenes de 2  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$  y 8  $\mu\text{L}$  en 18 mL de medio de cultivo. A pesar de la diferencia en cuanto a la siembra del moho, donde inocularon un “plug” de micelio (un disco de moho) de 9 mm en el centro de la placa en lugar de los 10  $\mu\text{L}$  de  $10^6$  sp/mL empleado en nuestro caso, los resultados mostrados guardan una gran semejanza con los discutidos previamente. De esta manera, a los ocho días de evaluación de las tres sustancias, el orégano demostró la actividad más elevada inhibiendo completamente con 4  $\mu\text{L}$  el crecimiento de *A. flavus*, de la misma manera que ocurría en nuestro caso (figura 2.11 a). En cuanto a clavo, éste produjo la inhibición total con 6  $\mu\text{L}$ , mientras que con 4  $\mu\text{L}$  se produjo un diámetro de colonia de 55.23 mm. Dichos resultados coinciden con los mostrados anteriormente, ya que con 4  $\mu\text{L}$  de clavo (figura 2.11 b) se consiguió una reducción importante, pero no se evaluaron concentraciones más altas.

Kocic-Tanackov S., et al. (2012b) inocularon 1  $\mu\text{L}$  de  $10^3$  sp/mL de tres especies (*A. niger*, *A. carbonarius* y *A. wentii*) en el centro del medio de cultivo, y midieron el diámetro de colonia de éstas tras la introducción en el medio de extracto de orégano en las concentraciones siguientes: 0.35 mL/mL, 0.7 mL/mL, 1.5 mL/mL y 2.5 mL/mL. Se obtuvo una reducción del crecimiento dependiente también de la dosis de activo, consiguiendo en el caso de *A. wentii* una inhibición completa del moho tras 30 días a la concentración más alta. En un trabajo similar, los mismos autores consiguieron un efecto inhibitorio de diferentes cepas, dependiente de la concentración del extracto orégano. Dicho efecto fue más acusado en las especies del género *Penicillium* que las del género *Fusarium*. Como bien indican los propios autores, la necesidad de utilizar concentraciones más altas al emplear extractos puede deberse a una menor concentración de orégano en estos respecto al aceite esencial del mismo, hipótesis también apoyada por Vagi E., et al. (2005).

Normalmente, la velocidad de crecimiento del moho (GR) depende de la concentración de aceite esencial, tal y como han mostrado los resultados comentados de la tabla 2.5. Sin embargo, Bluma R., et al. (2008) estudiaron la velocidad de crecimiento (GR) de *A. parasiticus* y *A. flavus* bajo diferentes concentraciones de anís, boldo y orégano (150, 300, 500 y 700 mg kg<sup>-1</sup>), obteniendo una respuesta similar en el GR a diferentes concentraciones de orégano.

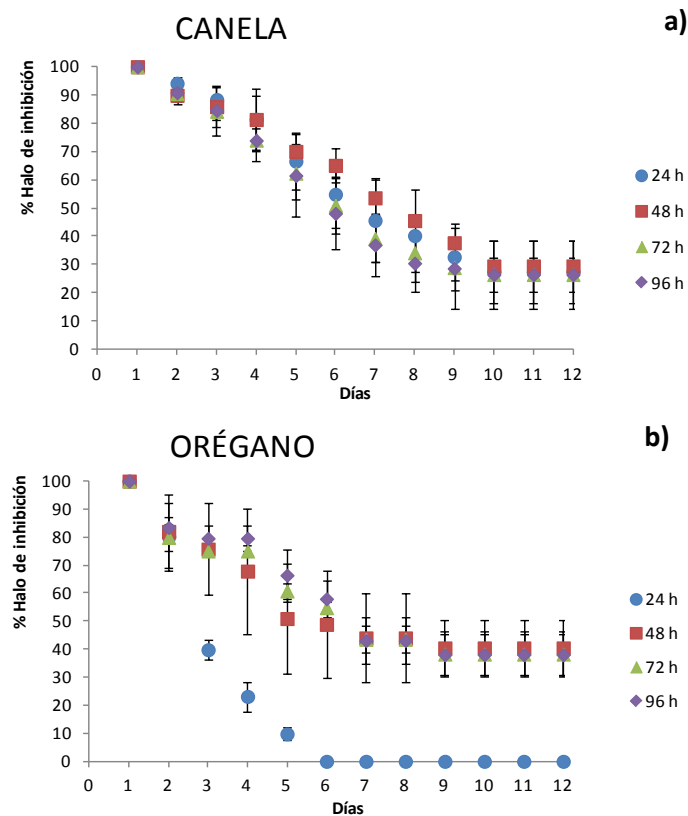
Respecto a la canela, Carmo E. S., et al. (2008) demostraron el poder fungicida durante 14 días frente a las especies *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger*. En dicho trabajo observaron una inhibición completa del diámetro de colonia al añadir al medio de cultivo, 20,40 y 80 µL de canela. Sólo en el caso de *A. niger* se encontró algo de crecimiento con la concentración más baja. Además de la canela también se incluyó en el estudio un conocido antifúngico ampliamente utilizado, ketoconazol, el cual no mostró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la reducción de diámetro de colonia respecto al control. La influencia de la concentración de aceite esencial en la actividad quedó manifiesta en un experimento posterior, donde 20 µL de canela causaron una reducción de la germinación de esporas del 92 %, 86 % y 25 % en *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger* respectivamente, mientras que el 100 % se alcanzó con 40 µL y 80 µL en todas las cepas.

### **4.3. Evaluación del tiempo de exposición en la actividad del aceite esencial de canela y orégano en fase vapor**

#### ***4.3.1. Halo de inhibición de *A. flavus* tras diferentes tiempos de exposición de canela y orégano***

Una vez comprobado en el primer experimento (ver apartado 4.1) que ambos aceites esenciales poseen actividad antifúngica en fase vapor, se quiso profundizar en la influencia que tiene sobre ésta el tiempo de exposición a los mismos. Para ello, parte de las placas activas estuvieron expuestas a cada aceite esencial durante 24 horas, mientras que otras réplicas se mantuvieron durante 48 horas, 72 horas y 96 horas.

Los resultados se tomaron cada 24 horas, midiendo para ello el halo de inhibición (H.I.) por medio de un calibre digital. En la figura 2.12 podemos observar la representación de los datos obtenidos.



**Fig. 2.12** H.I. a diferentes tiempos de exposición de CIN y OR en fase vapor. Canela (a) y orégano (b), ambos sobre *A. flavus* 2949.

El objetivo del ensayo era analizar la influencia del tiempo de exposición, de manera que para normalizar los datos a una misma escala, los halos de inhibición (en mm) se convirtieron en porcentaje (% HI) haciendo referencia el 100 % al primer halo de inhibición del día 1 de esa serie. Por ejemplo, el valor correspondiente al día 2 de cualquiera de las series quedaría así:  $\% \text{ H.I. (día 2)} = (\text{H.I. día 2} * 100) / (\text{H.I. día 1})$ .

En la tabla 2.7 puede verse la disminución en el tiempo del porcentaje de halo de inhibición respecto al primer día de ensayo (considerado éste el 100 %). Los datos mostrados son el promedio de al menos cuatro réplicas, medida cada una en 2 direcciones.

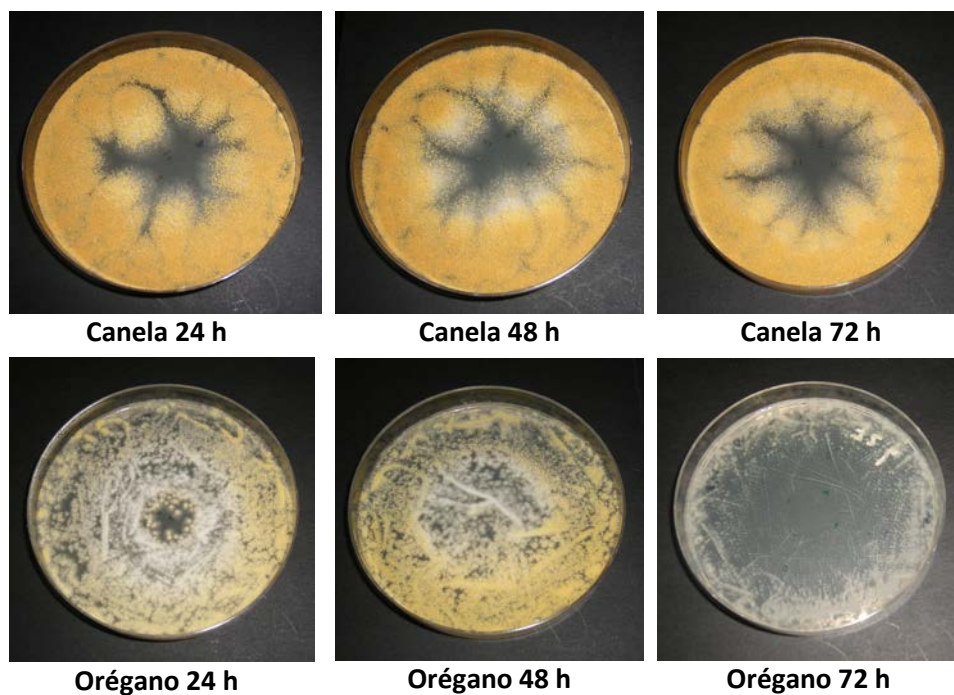
**Tabla 2.7** Porcentaje del halo de inhibición (H.I.) de *A. flavus*, tras 24h, 48 h, 72 h y 96 h de exposición a canela y orégano. La desviación estándar ( $\pm SD$ ) considera al menos 4 réplicas, medidas en ambas direcciones del halo.

	OR		CIN			OR		CIN		
	Días	% H.I.	$\pm SD$	% H.I.		$\pm SD$	% H.I.	$\pm SD$	% H.I.	$\pm SD$
24 h	1	100,00	0,00	100,00	0,00	72 h	100,00	0,00	100,00	0,00
	2	80,13	12,03	94,15	1,99		79,88	4,87	90,53	4,04
	3	39,83	3,53	88,39	1,50		75,06	2,18	84,23	3,06
	4	23,16	5,29	81,39	10,67		75,06	2,18	74,03	4,14
	5	9,79	2,36	66,61	10,27		60,78	2,66	62,37	9,08
	6	0,00	0,00	54,88	11,88		54,82	2,14	50,96	10,22
	7	0,00	0,00	45,64	14,83		43,53	4,90	39,24	8,33
	8	0,00	0,00	40,27	16,11		43,53	4,90	34,19	6,55
	9	0,00	0,00	32,75	11,96		38,26	7,96	28,97	4,66
	10	0,00	0,00	27,36	11,21		38,26	7,96	26,52	6,09
	11	0,00	0,00	27,36	11,21		38,26	7,96	26,52	6,09
	12	0,00	0,00	27,36	11,21		38,26	7,96	26,52	6,09
48 h	1	100,00	0,00	100,00	0,00	96 h	100,00	0,00	100,00	0,00
	2	82,05	12,96	89,89	2,19		83,45	3,55	90,81	2,71
	3	75,73	16,23	85,86	7,02		79,58	4,47	84,54	8,69
	4	67,88	22,30	81,33	8,36		79,58	4,47	73,92	7,12
	5	50,96	19,77	70,04	2,62		66,42	9,38	61,50	14,42
	6	48,87	19,16	65,10	5,82		57,99	6,72	48,12	12,45
	7	44,04	15,89	53,63	6,27		43,09	8,48	36,97	10,81
	8	44,04	15,89	45,59	1,06		43,09	8,48	30,52	10,23
	9	40,47	9,85	37,74	1,81		38,05	7,08	28,67	14,27
	10	40,47	9,85	29,53	1,13		38,05	7,08	26,48	11,95
	11	40,47	9,85	29,53	1,13		38,05	7,08	26,48	11,95
	12	40,47	9,85	29,53	1,13		38,05	7,08	26,48	11,95

Como hemos comentado en el primer experimento del capítulo (ver apartado 4.1), normalmente los halos de inhibición creados por la actividad antifúngica de un aceite esencial, disminuyen con el tiempo. Esto es debido a que puesto que la concentración del aceite esencial que difunde en el agar es gradiente dependiente, el moho que consigue desarrollarse en torno al primer halo de inhibición suele continuar su desarrollo, reduciendo así el área inhibida. Como era de esperar, este fenómeno se produjo en todas las series de tiempos de ambas sustancias. Sin embargo, destaca especialmente la diferencia de comportamiento de ambos aceites en cuanto a la disminución del halo de inhibición.

Tanto en la figura 2.12 como en la tabla 2.7, se puede observar cómo las cuatro series del aceite esencial de canela siguieron exactamente la misma tendencia en el tiempo. En cambio, el aceite esencial de orégano mostró unos resultados muy diferentes entre la serie de 24

horas y el resto de tiempos. Como se puede apreciar, el moho que estuvo expuesto sólo durante las 24 primeras horas aumentó considerablemente su crecimiento una vez que se retiró el disco que contenía el orégano, traduciéndose en una disminución del % H.I. Dicha reducción se hizo patente a partir del día 3 del experimento, llegando en el día 6 a la completa desaparición del H.I. En la figura 2.13 que se muestra a continuación se observan claramente los resultados discutidos, mediante el ejemplo de una réplica de cada muestra. Para poder apreciar las imágenes con mayor detalle, se ha omitido la muestra de 96 horas, mostrándose una réplica de cada uno de los tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas) de los aceites esenciales de canela y orégano.



**Fig. 2.13** Imágenes del H.I. de CIN y OR durante 24 h (1), 48 h (2) y 72 h (3). Nótese cómo el tiempo de exposición claramente influye en la actividad del orégano, mientras que en la canela no.

Los resultados mostrados coinciden con otros previos llevados a cabo en el grupo GUIA, donde se encontró una diferencia en la velocidad de liberación de los compuestos volátiles de canela y orégano (Gutiérrez L., et al., 2010; López P., et al., 2007a). Sin embargo, hay que mencionar que dichos resultados no son de todo extrapolables ya que se llevaron a cabo por medio de films activos, de manera que a diferencia del método de difusión en disco, en ese caso la distribución del activo es homogénea en toda la placa. Dichos trabajos se discutirán por ello más adelante en los capítulos 3 y 4.



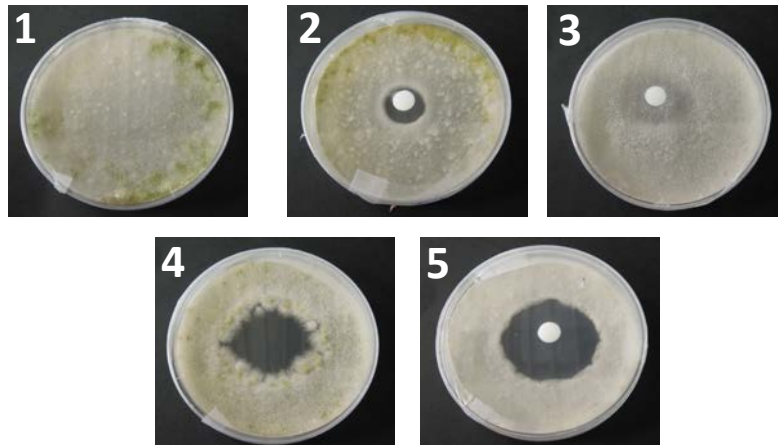
#### ***4.3.1.1. Análisis estadístico: influencia del tiempo de exposición de los aceites esenciales de canela y orégano en el porcentaje de reducción del halo de inhibición***

Las observaciones mencionadas coinciden con el análisis estadístico llevado a cabo a continuación. Se realizó Anova de 1 factor para detectar posibles diferencias entre las medias de los porcentajes de los halos de inhibición. Para cada muestra se consideraron los halos de inhibición de las diferentes réplicas (mínimo de 4), midiendo estos en dos direcciones posibles, longitudinal y transversal. Se llevó a cabo el mismo análisis estadístico de manera independiente para cada uno de los cuatro tiempos de exposición de cada aceite esencial y para los 12 días que duró el experimento.

En el caso de canela no se observaron diferencias significativas en ningún caso, apoyando una vez más el mismo comportamiento entre los tiempos de exposición. Tampoco lo hicieron en el caso del orégano las series de 48 h, 72 h y 96 h entre sí. Por lo tanto, las únicas diferencias significativas encontradas correspondieron a la serie de 24 h del orégano. Por una parte, a partir del día 3 de ensayo (inclusive) y hasta el final del experimento se obtuvieron diferencias significativas al comparar ésta con los tiempos más elevados, es decir, 72 h y 96 h. Sin embargo, se encontró variabilidad de resultados al comparar la misma con la serie de 48 h. De esta manera, los tests de comparaciones múltiples (post-hoc) revelaron diferencias a partir del día 7 según el test T3 de Dunnett, y a partir del día 9 según el T2 de Tamhane. Ambos métodos aportaron valores de significación muy parecidos en esos días mencionados, sin embargo, el hecho de encontrarse en esos casos en torno al 0.05 dio lugar a esas pequeñas diferencias en cuanto a la aceptación o rechazo de la hipótesis nula. Este matiz se debe por tanto, a una mayor conservación del test T2 de Tamhane respecto a T3 de Dunnett, pero no altera las conclusiones del estudio.

#### ***4.3.2. Crecimiento de *A. flavus*, en relación al momento de aplicación del aceite esencial de canela en fase vapor***

Los resultados se muestran en la figura 2.14, en cuya leyenda inferior se detallan las diferencias entre las muestras evaluadas. En este experimento todos los halos de inhibición se midieron a los cuatro días de incubación, que correspondió al tiempo más largo de exposición de las muestras. Las fotografías se tomaron tres días más tarde, no habiéndose producido cambios en los resultados de los halos.



**Fig. 2.14** Crecimiento de *A. flavus* en función del momento de la aplicación del aceite esencial de canela en fase vapor.

Control (1), colocación del disco con canela 24 horas después de la siembra (2) y tras 4 días desde la siembra (3). Colocación del disco tras la siembra y retirada de éste 24 horas después (4). Colocación del disco tras la siembra y sin retirarlo hasta final de ensayo (5).

\*Nota: los discos se encontraban en fase vapor, pero se colocaron en el medio de cultivo a la hora de tomar las fotos.

En primer lugar, se observó que al colocar el disco de canela cuatro días después de haber sembrado el moho (muestra 3), éste creó un halo de retardo visible al final del experimento en comparación con el control (muestra 1). Sin embargo, la actividad fue mucho más evidente cuando en vez de aplicar el disco a los cuatro días se hizo tan sólo 24 horas después de la siembra (muestra 2), ya que entonces se consigue un halo, que aunque de tamaño reducido, éste es claramente de inhibición respecto al retardo de la muestra 3.

Sin embargo, no se observaron cambios a la hora de retirada del disco (muestras 4 y 5), ya que en ambos casos se observaron halos de inhibición muy parecidos. En la muestra 4 el disco de canela se retiró a las 24 horas, mientras que en la muestra 5 éste se mantuvo hasta el final del experimento (incluyendo los 7 días hasta la toma de las fotografías). Dichas observaciones se confirmaron mediante una comparación de medias (prueba T) para muestras independientes, donde no se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los halos de inhibición de ambas muestras.

Por lo tanto, de este experimento se extraen dos conclusiones importantes. La primera de ellas vuelve a apoyar los resultados obtenidos en el experimento con el aceite esencial de canela, donde éste mostraba la misma actividad antifúngica tras 24, 48, 72 ó 96 horas de

exposición en fase vapor. Sin embargo, la segunda conclusión resalta la importancia de la fase Lag del microorganismo, que como vimos en la discusión del experimento anterior, juega un papel esencial. De esta manera, en función de la fase de crecimiento en que se encuentre el moho, la actividad antifúngica alcanzada se verá altamente afectada. Esto ha quedado claramente demostrado al comparar ambas muestras 2 y 3, donde una vez más se subraya lo importante de evitar la contaminación desde el momento inicial, ya que una vez que éste ocurre, la actividad se reduce considerablemente.

#### **4.4. Segunda caracterización. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC o CIM) y Concentración Mínima Fungicida (MFC o CFM)**

Como se ha ido comentando a lo largo de este capítulo, debido a la baja hidrosolubilidad de los aceites esenciales, la determinación de la actividad en medio líquido es una manera fiable y reproducible de medir la actividad antimicrobiana de los mismos.

Por tanto, con el mismo objetivo que en el caso del primer experimento de este capítulo, se quiso analizar la actividad de las seis sustancias (canela, orégano, clavo, cinamaldehído, carvacrol y eugenol), pero esta vez determinándolo en medio líquido. La información aportada además es doble, ya que permite establecer tanto la concentración necesaria para inhibir el moho (MIC) como para impedir su desarrollo posterior (MFC).

Además de las ventajas mencionadas, este método permite tal y como se ha comentado anteriormente, cuantificar con mayor precisión la actividad de dichas sustancias, en contra de lo que ocurría en el primer experimento de difusión en disco (ver apartado 4.1). De esta manera, se analizó la actividad de canela, orégano, clavo, cinamaldehído, carvacrol y eugenol sobre dos cepas escogidas como representación de dos géneros diferentes, esto es, *A. flavus* 2949 y *P. roqueforti*. Ambas concentraciones, referidas como MIC y MFC debido a la terminología inglesa, se expresaron en mg/mL. Cada una de ellas se determinó por duplicado y un mínimo de tres veces, repitiendo el ensayo en días diferentes. Los resultados de los tres aceites esenciales se muestran en la tabla 2.8, y los de sus compuestos mayoritarios en la tabla 2.9.

Debido a que todos los compuestos se probaron en un rango de diluciones seriadas, en algunos casos la actividad de los mismos se encontró ligeramente por encima o por debajo de un determinado valor. Una de las maneras de representar dichas variaciones en cuanto a

la determinación final, consiste en elegir la concentración obtenida con mayor frecuencia, acompañada en ocasiones de la desviación estándar. Sin embargo, finalmente se ha optado por presentar ambos valores en su rango de concentración, ya que indica que la concentración más estable correspondería a un punto intermedio entre ambas. De esta manera, pequeñas variaciones en cuanto al tamaño del inóculo inicial, así como ligeras modificaciones en el tiempo o temperatura de incubación, pueden ser suficientes para inclinar el resultado final hacia uno u otro valor.

Como es bien sabido, la composición de los aceites esenciales varía en función de múltiples factores como son la distribución de la planta, el punto geográfico, la recolección, las condiciones de cultivo y atmosféricas, el proceso de destilación de la misma, etc. Este hecho confiere una gran importancia a los datos aportados por los investigadores pertenecientes al grupo GUIA donde ha sido desarrollada la presente tesis doctoral, ya que el origen de las sustancias empleadas es el mismo.

**Tabla 2.8** MIC y MFC de los aceites esenciales: canela (CIN), orégano (OR) y clavo (CLO). Ambas concentraciones están determinadas en mg/mL, sobre las cepas *A. flavus* 2949 y *P. roqueforti*.

	CIN		OR		CLO	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A.flavus</i>	0.1	0.1-0.2	0.2	0.4	0.4	0.8-1.6
<i>P.roqueforti</i>	0.1	0.2-0.4	0.1	0.4-0.8	0.4	3.2

**Tabla 2.9** MIC y MFC de los compuestos mayoritarios.

Cinamaldehído (CINAM), carvacrol (CARV) y eugenol (EUG). Ambas concentraciones están determinadas en mg/mL, sobre las cepas *A. flavus* 2949 y *P. roqueforti*.

	CINAM		CARV		EUG	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A.flavus</i>	0.1	0.1-0.2	0.2	0.4	0.4	0.8
<i>P.roqueforti</i>	0-1-0.2	0.4	0.1	0.4-0.8	0.2	1.6

#### **4.4.1. Relación de la actividad mostrada entre los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios**

Aunque sólo se consideraron como relevantes aquellas diferencias superiores a un orden de dilución, merece la pena destacar algunos aspectos. En primer lugar, y de la misma manera que ocurría en el primer experimento de este capítulo (ver apartado 4.1), los aceites

esenciales de canela, orégano y clavo dieron resultados muy similares a los de sus compuestos mayoritarios, esto es, cinamaldehído, carvacrol y eugenol. Esto demuestra una vez más, la alta dependencia de dichos compuestos en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. El alto contenido en cinamaldehído del aceite esencial de canela obtenido de la rama, explica la mayor actividad de ésta respecto a la obtenida de la hoja. Esta misma observación se destaca en un trabajo desarrollado por Pawar V. C., et al. (2007) donde comparan precisamente la actividad de dos aceites esenciales de canela procedentes de rama y hoja. Así mismo, estos resultados coinciden con la composición química de los aceites esenciales en líquido mostrada al principio de este capítulo (ver tabla 2.2). Además, las mismas conclusiones se han obtenido en fase vapor. De esta manera, los mismos autores (López P., et al., 2007b) atribuyeron en uno de los trabajos la actividad en fase vapor de orégano y canela a la presencia de cinamaldehído y carvacrol respectivamente, mientras que en otro de ellos identificaron el eugenol como compuesto mayoritario del clavo tras analizar la composición de su atmósfera (López et al., 2005).

#### **4.4.2. Orden de magnitud de la actividad mostrada**

Como puede observarse en la tabla 2.8, la mayor actividad correspondió al aceite esencial de canela y a su compuesto mayoritario, el cinamaldehído, obteniendo en ambas cepas una MIC de 0.1 mg/mL en el primer caso y de 0.1 mg/mL y 0.1-0.2 mg/mL para cinamaldehído en *A. flavus* y *P. roqueforti* respectivamente. Además, el aceite esencial de canela también presentó la CFM más baja, junto con el cinamaldehído en el caso de *P. roqueforti*.

A continuación, en el punto intermedio de actividad se encontraron el aceite esencial de orégano y su compuesto mayoritario, el carvacrol. A pesar de en ambas cepas se encontraron los mismos valores para ambas sustancias, se apreció una ligera mayor actividad del carvacrol en cuanto a que en las concentraciones sub-inhedorias se observó un menor crecimiento del moho en comparación con el orégano.

Por último, las sustancias menos activas fueron el aceite esencial de clavo y su compuesto mayoritario, eugenol, manifestando éste último una mayor actividad, determinado tanto por las concentraciones de igual o menor valor que el clavo y también, por un menor crecimiento a concentraciones sub-inhedorias como ocurría en el caso del

carvacrol. Ambos compuestos necesitaron por tanto las concentraciones más elevadas, destacando especialmente la CFM del clavo en *P. roqueforti* de 3.2 mg/mL.

#### **4.4.3. Discusión de los resultados de otros autores**

Como ya se ha comentado a lo largo de la tesis, la falta de estandarización de métodos para determinar la actividad de los aceites esenciales hace complicado la comparación de los resultados encontrados en bibliografía. Por ello se compararon los datos obtenidos en el presente capítulo con aquellos trabajos donde también se empleó el medio líquido. También hay que tener en cuenta la composición altamente variable de los aceites esenciales, la cual puede interferir de manera directa en la actividad de los mismos. Entre los muchos ejemplos que podemos encontrar en la bibliografía, podemos citar el caso de Pinto E., et al. (2007). En éste, analizan la composición química de tres muestras de *Salvia officinalis* extraídas por hidrodestilación junto con una muestra comercial, frente a varias cepas de levaduras, hongos dermatofitos y mohos filamentosos. Los resultados de las MIC mostraron una clara diferencia entre las diferentes muestras, siendo la adquirida comercialmente la que presentó la actividad más baja.

Comparando nuestros resultados, Kocevski D., et al. (2013) obtuvieron una MIC muy similar (125 ppm) para el aceite esencial de canela (*Cinnamon cassia*) que contenía un 87.23 % de cinamaldehído, frente a dos cepas de *A. flavus*. Mitchell T. C., et al. (2010) encontraron una buena actividad para orégano, con 0.6 µg/mL y 1.25 µg/mL como valores de MIC y MFC respectivamente. Respecto al clavo, Omidbeygi M., et al. (2007) analizaron la actividad antifúngica de éste frente a *A. flavus*, encontrando un 87.5 % de inhibición del crecimiento con 500 ppm.

Respecto a otras sustancias, Rasooli I., et al. (2006) estudiaron la actividad antifúngica de dos variedades de aceite esencial de tomillo por medio de la macrodilución en caldo frente a *A. niger*. Obtuvieron una MIC de 125 ppm y 250 ppm y una MFC de 250 ppm y 500 ppm para *Thymus eriocalyx* y *Thymus X-porlock* respectivamente, empleando un método muy similar al explicado en este experimento. También frente a *A. parasiticus* la variedad de tomillo *T. eriocalyx* mostró mayor actividad, con una MIC y MFC de 250 ppm y 500 ppm, frente a las 250 ppm y 1000 ppm necesarias en el caso de *T. X-porlock* (Rasooli I., et al. , 2005). Los mismos autores determinaron la actividad antifúngica de *Rosmarinus officianalis* y *Trachyspermum copticum* L., frente a *A. parasiticus* mediante el mismo método. En este caso

destacó la actividad de *T. copticum* con una MIC de 600 ppm y una MFC de 3000 ppm, mientras que en el caso de *R. officianalis* la MIC fue de 1750 ppm, no habiéndose alcanzado la MFC (Rasooli I., et al. , 2008).

A pesar de carecer de una clasificación estándar debido a la ya comentada heterogeneidad de los aceites esenciales, ciertos autores han establecido un orden de potencia antimicrobiana dependiendo de las MIC obtenidas. Así, Rammanee K., et al. (2011) evaluaron la actividad antifúngica de cinco aceites esenciales derivados de cítricos, sobre las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, clasificando a *Citrus aurantifolia* Swingle y *Citrus hystrix* DC, como potentes antifúngicos tras haber obtenido en ambos casos una MIC de 0.56 mg/mL y una MFC de 1.13 mg/mL en ambas cepas. En la misma línea, Aligiannis N., et al. (2001) analizaron diferentes variedades del aceite esencial de orégano frente a un amplio rango de microorganismos, considerando las sustancias “de actividad extremadamente fuerte” a aquellas cuyas MIC estuvieran entre 0.65-1.27 mg/mL, y como “débiles” a las MIC situadas entre 1.81-8.85 mg/mL. De esta misma manera, otros autores también han ordenado las sustancias probadas en relación a sus valores de MIC, en escalas parecidas a las comentadas (Souza E. L., et al. , 2007; Thembo K. M., et al. , 2010).

#### **4.5. Estudio de las variables pH y temperatura: MIC y MFC de canela y orégano**

El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia que tienen las variables de pH y temperatura en la actividad de los aceites esenciales. Para ello se escogieron la canela y el orégano por presentar una actividad mayor que el clavo en el experimento anterior. Se amplió el experimento a las siguientes cinco cepas: *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*. Interesaba evaluar las dos especies de *A. flavus* debido a la producción de aflatoxina B1 por parte de la segunda cepa y a la ausencia total en la primera. El resto de especies fueron evaluadas también por su elevada ocurrencia, como ya se comentó en la sección primera de la tesis.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior, pero ajustando el pH del YEB (el medio líquido) a pH 3, pH 5 y pH 7, e incubándolos a continuación a dos temperaturas posibles por cada cepa. Éstas fueron en el caso del género *Penicillium* 6 °C y 25 °C, y en las del género *Aspergillus* 37 °C y 25 °C. No se estudiaron las temperaturas de 6 °C en el género *Aspergillus*

así como la de 37 °C en el de *Penicillium* debido a la imposibilidad de crecimiento de estas cepas bajo las mismas.

De la misma manera que en el caso previo, los resultados se muestran en mg/mL, como un valor único o en un rango de concentraciones, repitiendo así mismo cada determinación un mínimo de tres veces, realizados en diferentes días y siempre por duplicado. Los resultados concernientes al aceite esencial de canela se ilustran en la tabla 2.10 y los del aceite esencial de orégano en la tabla 2.11.

Como puede observarse, el aceite esencial de canela resultó de nuevo más activo que el orégano en todos los casos, obteniendo en general concentraciones más bajas (tabla 2.10).

Sin embargo, el resultado más importante del experimento consistió en el mantenimiento de la actividad de los aceites esenciales en las diferentes condiciones de incubación. De esta manera, puede observarse que los valores de MIC y MFC se mantuvieron constantes o con una diferencia mínima de un orden de dilución, al disminuir el pH o variar la temperatura desde 25 °C hasta 37 °C ó 6 °C. La única excepción se encontró en el caso de *P. roqueforti* a 6° C, donde la concentración fungicida fue ligeramente más baja al aumentar el pH a 7.

A pesar de que, como se verá a continuación, la modificación de las condiciones de incubación modifica el crecimiento del moho, los resultados de este experimento han demostrado que dichas variaciones no afectan a la actividad de los aceites esenciales.

**Tabla 2.10** MIC y MFC de canela a diferente pH y temperatura.

Ambas concentraciones están expresadas en mg/mL y evaluadas en las cepas *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*.

		CANELA					
		pH 3		pH 5		pH 7	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A. flavus</i> 2949	25 °C	0.1	0.1	0.1	0.1-0.2	0.1	0.1-0.2
	37 °C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>A. flavus</i> 2687	25 °C	0.05-0.1	0.1-0.2	0.1-0.2	0.1-0.2	0.1	0.2-0.4
	37 °C	0.05-0.1	0.05-0.1	0.1	0.1	0.1-0.2	0.1-0.2
<i>A. niger</i>	25 °C	0.05-0.1	0.1	0.1	0.1-0.2	0.1-0.2	0.1-0.2
	37 °C	0.05-0.1	0.05-0.1	0.1	0.1	0.1-0.2	0.1-0.2
<i>P. roqueforti</i>	25 °C	0.05-0.1	0.2	0.1	0.2-0.4	0.1	0.2-0.4
	6 °C	0.05-0.1	0.2-0.4	0.05-0.1	0.2-0.4	0.05-0.1	0.2-0.4
<i>P. expansum</i>	25 °C	0.05	0.1	0.1	0.1-0.2	0.05-0.1	0.2
	6 °C	0.05	0.1	0.05-0.1	0.1-0.2	0.1	0.2



**Tabla 2.11** MIC y MFC de orégano a diferente pH y temperatura.

Ambas concentraciones están expresadas en mg/mL y evaluadas en las cepas *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*.

		ORÉGANO					
		pH 3		pH 5		pH 7	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A. flavus</i> 2949	25 °C	0.2	0.2-0.4	0.2-0.4	0.4	0.2	0.4
	37 °C	0.2	0.2-0.4	0.2	0.2	0.2	0.2-0.4
<i>A. flavus</i> 2687	25 °C	0.1-0.2	0.2-0.4	0.2	0.4	0.2-0.4	0.4
	37 °C	0.1-0.2	0.2	0.2	0.2-0.4	0.2	0.4
<i>A. niger</i>	25 °C	0.1	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4
	37 °C	0.1-0.2	0.2-0.4	0.2	0.2-0.4	0.2	0.4
<i>P. roqueforti</i>	25 °C	0.1	0.4	0.1-0.2	0.4	0.1	0.4-0.8
	6 °C	0.1	0.4-0.8	0.1	0.4-0.8	0.1	0.4
<i>P. expansum</i>	25 °C	0.1-0.2	0.4	0.2	0.4	0.2-0.4	0.4
	6 °C	0.1-0.2	0.4	0.1-0.2	0.4	0.2	0.4

#### 4.5.1. Discusión de los resultados de otros autores

La misma conclusión ha sido publicada por otros autores con diferentes sustancias. Suhr K. I., et al. (2003) estudiaron la acción antifúngica de varios aceites esenciales, entre ellos canela, sin obtener diferencias significativas al disminuir el pH de pH 6 a pH 4.5. También con canela, López-Malo A., et al. (2007) encontraron el mismo resultado, manteniendo la misma MIC a pH 4.5 y pH 3.5. En otro trabajo, López-Malo A., et al. (2002) estudiaron la influencia de vainillina, timol, carvacrol, eugenol y citral en la fase Lag de *A. flavus* a pH 3.5 y pH 4.5. Los autores apuntaron que a pesar de que se observó una clara influencia del pH en la fase Lag del moho, los valores de MIC no mostraron diferencias significativas.

Además de esto, los aceites esenciales se presentan como una alternativa interesante respecto a otras sustancias sintéticas como el sorbato potásico y el benzoato sódico. Esto se debe a que éstas, debido a la mayor actividad antimicrobiana de la forma no disociada, son más activas a pH ácido (David J. R. D., et al., 2013; López-Malo A., et al., 2002; López-Malo A., et al., 2007). Los agentes antimicrobianos actúan fundamentalmente por medio de dos vías, bien mediante la disrupción de la membrana o como inhibidor de la transferencia de protones. Dentro del primer mecanismo entran la mayoría de aceites esenciales, mientras que los ácidos orgánicos débiles lo hacen por medio del segundo, explicando así la influencia que tiene el pH en la actividad de estos últimos (Weiss J., et al., 2009).

## **4.6. Estudio de las variables pH y temperatura: diámetro de la colonia del moho**

Como pudimos ver en el ensayo anterior, los aceites esenciales de canela y orégano no modificaron sus valores de MIC y MFC al variar las condiciones de pH y temperatura. Sin embargo, esto no quiere decir que dichas fluctuaciones no interfirieran en el crecimiento normal del moho. De hecho, a pesar de que no se efectuaron dichas mediciones, es esperable un menor desarrollo del moho a condiciones sub-inhedoras.

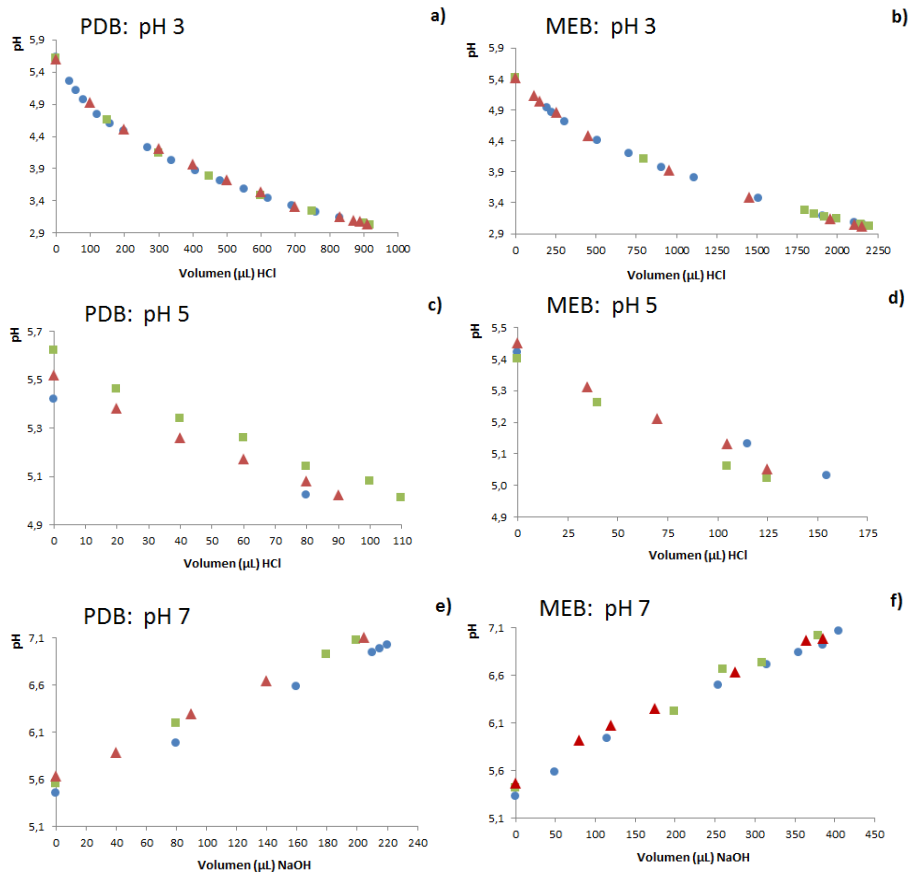
Debido a esto, el presente experimento se planteó con el objetivo de poder cuantificar la influencia de dichas variables en el crecimiento normal del moho. Esto se llevó a cabo en medio sólido, midiendo el diámetro de la colonia del moho en cada caso.

### ***4.6.1. Modificación del pH del medio de cultivo: optimización***

Sin embargo, como se explicó en la metodología correspondiente (ver apartado 3.10.1), hubo que calcular el volumen necesario tanto de HCl como de NaOH para acidificar y alcalinizar el medio de cultivo. Hay que tener en cuenta que la gelificación del agar-agar se debe a la interacción de las hélices formadas por la fracción gelificante de éste, la agarosa, viéndose afectado por diversos factores. Entre estos se encuentra el pH, de manera que la disminución del mismo reduce la fuerza del gel, incrementándose este fenómeno al exponer el agar-agar a altas temperaturas durante periodos prolongados.

Por lo tanto, en primer lugar se comprobó que efectivamente, al reducir a pH 3 el medio de cultivo, éste perdía la capacidad de gelificar tras la esterilización del mismo y posterior enfriamiento. De esta manera, para poder realizar el ensayo se utilizaron los caldos de cultivo correspondientes, MEB y PDB, ya que la ausencia de agar permitió modificar el pH a temperatura ambiente con la ayuda del pH-metro.

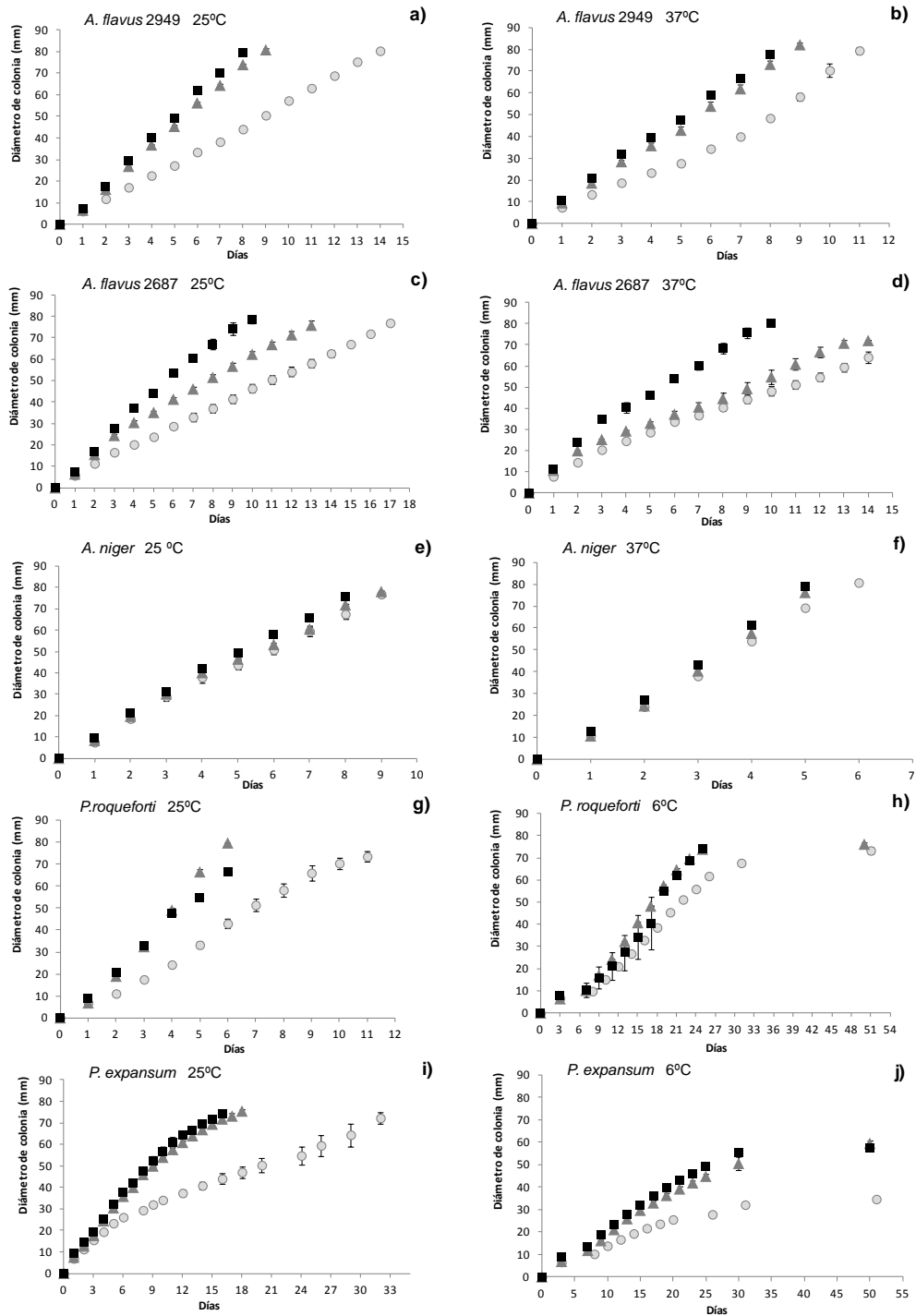
La optimización se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado en el punto 3.10.1. Como puede observarse en la figura 2.15, los resultados fueron muy positivos, encontrando volúmenes muy parecidos entre las tres réplicas de cada opción. Entre los dos medios, cabe mencionar que el MEB contiene extracto de malta, el cual consta fundamentalmente de maltosa, glucosa, sacarosa y dextrina, por lo que podría ser la elevada concentración de azúcares de este medio, necesitando un mayor volumen para modificar el pH del mismo.



**Fig. 2.15** Optimización para la modificación del pH del medio de cultivo. En las figuras se muestra el volumen necesario de HCl y NaOH, para acidificar y alcalinizar de PDA y MEA, utilizando para ello los medios líquidos PDB (Potato Dextrose Broth) y MEB (Malt Extract Broth). Cada línea es el resultado independiente de tres réplicas.

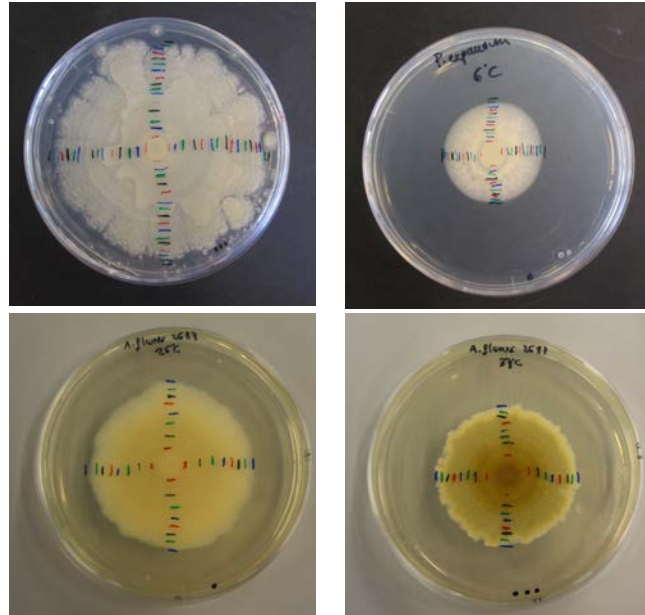
#### 4.6.2. Influencia del pH y la temperatura, en el diámetro de colonia de las cepas control

En la figura 2.16 podemos observar resultados en las diferentes condiciones. Como se puede ver, al descender a pH 3 se produjo en todos los casos una disminución del ritmo de crecimiento del moho, siendo *A. niger* la especie menos afectada por la variación de pH. También puede apreciarse a primera vista, la diferente morfología descrita por los crecimientos en ambos géneros, siendo claramente más rectilíneo en el caso de *Aspergillus* que en *Penicillium*.



**Fig. 2.16** Diámetro de colonia (mm) a diferente pH y temperatura. Se muestran los resultados de *A. flavus* 2949 (a,b), *A. flavus* 2687 (c,d), *A. niger* (e,f), *P. roqueforti* (g,h) y *P. expansum* (i,j), a diferente pH y temperatura. La leyenda es la misma en todos los casos y corresponde a lo siguiente: pH 3 ○ ; pH 5 ▲ ; pH 7 ■

Por otra parte, la figura 2.17 ilustra dos ejemplos de cómo el diámetro de la colonia se ve drásticamente modificado al variar, en el caso de las imágenes mostradas, la temperatura.



**Fig. 2.17** Influencia de la temperatura en el crecimiento del moho. En las imágenes se ve el diámetro de colonia tras el mismo tiempo de incubación para cada cepa. Fila superior: *P. expansum* a 25 °C (izquierda) y 6 °C (derecha). Fila inferior: *A. flavus* CECT 2687 a 25 °C (izquierda) y 37 °C (derecha).

Sin embargo, para poder analizar con precisión la influencia de las variables de pH y temperatura, se llevó a cabo un análisis estadístico de las diferencias entre las líneas de crecimiento. Para ello, se determinó la ecuación de cada recta estableciendo la pendiente como el índice de velocidad, o dicho de otra forma, como la velocidad de crecimiento o “*Growth Rate*” (GR) expresado en las unidades de mm/día. Se extrajo también el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), el cual nos informó sobre la linealidad en cada caso. En el caso del género *Penicillium*, la incubación a 6 °C de temperatura provocó en ambas cepas (figura 2.16 h,j) una estasis manifiesta a los tres pH evaluados, la cual se acentuó a partir del día 30 de experimento. Debido a esto, las ecuaciones de estas dos rectas mencionadas se tomaron descartando el último punto situado en torno a los 50 días en ambas, asegurando así la linealidad de las ecuaciones a la hora de extraer las pendientes correspondientes. De esta manera todos los coeficientes estuvieron situados por encima del 0.95.

Los resultados en relación a la mencionada tasa de crecimiento, abreviado como GR debido a su denominación inglesa (“*Growth Rate*”) así como sus coeficientes de correlación  $R^2$  se muestran en la tabla 2.12.

**Tabla 2.12** Velocidad de crecimiento (GR) bajo diferente pH y temperatura.

Se evaluaron las siguientes cepas: *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. expansum*. GR, expresado en mm/día, es el resultado de la pendiente de la recta del diámetro de colonia de cada cepa, medido en ambas direcciones de al menos cuatro réplicas. La desviación estándar (SD) y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) informan sobre la repetitibilidad del experimento y la linealidad para cada crecimiento.

		25°C		37°C	
		GR ( $\pm$ SD)	R <sup>2</sup>	GR ( $\pm$ SD)	R <sup>2</sup>
<i>A. flavus</i> 2949	pH 7	10.25 (0.03)	0.9982	9.50 (0.15)	0.9984
	pH 5	9.32 (0.06)	0.9983	9.00 (0.20)	0.9984
	pH 3	5.74 (0.03)	0.9990	6.85 (0.22)	0.9758
<i>A. flavus</i> 2687	pH 7	8.12 (0.30)	0.9924	7.80 (0.22)	0.9844
	pH 5	5.74 (0.17)	0.9895	4.94 (0.25)	0.9839
	pH 3	4.37 (0.08)	0.9989	4.26 (0.19)	0.9875
<i>A. niger</i>	pH 7	9.41 (0.15)	0.9962	15.88 (0.08)	0.9959
	pH 5	8.65 (1.02)	0.9942	15.36 (0.35)	0.9916
	pH 3	8.41 (0.26)	0.9959	13.89 (0.14)	0.9973
		25°C		6°C	
<i>P. roqueforti</i>	pH 7	11.34 (3.18)	0.9956	3.12 (0.03)	0.9565
	pH 5	13.87 (0.10)	0.9875	3.24 (0.01)	0.9765
	pH 3	7.20 (0.32)	0.9917	2.41 (0.03)	0.9770
<i>P. expansum</i>	pH 7	4.63 (0.12)	0.9776	1.89 (0.04)	0.9897
	pH 5	4.20 (0.10)	0.9704	1.75 (0.07)	0.9889
	pH 3	1.98 (0.17)	0.9633	1.02 (0.04)	0.9573

#### 4.6.3. Análisis estadístico

Se consideraron diferencias significativas a aquellas cuyo p-valor fue menor de 0.05. Ambas cepas de *A. flavus* resultaron influenciadas por la disminución de pH, mientras que la variación de temperatura no les afectó de manera significativa. Sin embargo, *A. niger* presentó el comportamiento opuesto, ya que sólo se observaron diferencias significativas cuando la temperatura varió. De hecho, esta fue la única cepa donde se aceleró el crecimiento cuando se modificó ésta de 25 °C a 37 °C.

La disminución de crecimiento comentada con anterioridad respecto al pH 3 se ratificó al obtener los GR más bajos. Además, como también se ha visto antes, la temperatura de frío provocó un claro retardo en el desarrollo de la colonia de las dos cepas de *Penicillium*, descendiendo bruscamente el GR. Por su parte *P. expansum* mostró diferencias significativas entre los pH 3 y pH 7, mientras que *P. roqueforti* no las mostró al comparar los tres pH.

#### **4.6.4. Discusión de los resultados de otros autores**

Los resultados expuestos están en concordancia con los encontrados por otros autores. Así, López-Malo A., et al. (2005) encontraron una clara disminución del radio de la colonia de *A. flavus* al disminuir el pH y la actividad de agua ( $a_w$ ), con una ligera modificación del tiempo de germinación. Holmquist G. U., et al. (1983) obtuvieron la misma conclusión, con una reducción notable de *Aspergillus* al reducir a pH 3. Respecto a la temperatura, Plaza P., et al. (2003) observaron una disminución de la fase Lag y del tiempo de germinación de *P. digitatum* y *P. italicum* al variar las condiciones de crecimiento de 25 °C a 10 °C.

## 5. CONCLUSIONES

Los tres aceites esenciales (canela, orégano y clavo) mostraron la misma actividad antifúngica que sus respectivos compuestos mayoritarios (cinamaldehído, carvacrol y eugenol). Esta misma conclusión se obtuvo tanto mediante el método de difusión en disco como en macrodilución en medio líquido.

Sin embargo, a la hora de determinar la actividad antifúngica de los aceites esenciales, el método de macrodilución en líquido se presentó como un método más reproducible que el método de difusión en disco. Además, de esta manera se permite la cuantificación tanto de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) como la Concentración Mínima Fungicida (MFC).

Comparando los tres aceites esenciales estudiados, el aceite esencial de canela fue la sustancia que mostró una mayor actividad tanto en el método de macrodilución en líquido, como en el método de dilución en medio de cultivo. En este último experimento, el tensioactivo sintético probado, LAE, mostró una actividad muy reducida.

Los aceites esenciales de canela y orégano demostraron en primer lugar una clara diferencia en cuanto a la influencia del tiempo de exposición en fase vapor. De esta manera, en el caso de canela no se obtuvieron diferencias entre los cuatro tiempos evaluados, mientras que en el caso de orégano se observó una pérdida de actividad cuando el disco activo se retiró tras las primeras 24 horas. Además de esto, el aceite esencial de canela demostró la importancia de incluir el agente activo antes de que el moho comience a desarrollarse. De esta manera, la aplicación de la canela una vez que el moho había comenzado a crecer, redujo considerablemente su actividad, siendo ésta menor cuanto más desarrollado se encontraba el moho inicialmente.

Por último, a pesar de que las modificaciones de pH y de temperatura afectan visiblemente al crecimiento del moho, dichas variaciones no afectaron a la actividad de las seis sustancias evaluadas. De esta manera, los resultados mostraron en todos los casos una actividad estable a pesar de las fluctuaciones externas.





# CAPÍTULO 3

---

## EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE UN ENVASE ACTIVO CON ACEITE ESENCIAL DE CANELA

- 1. Introducción*
- 2. Objetivos*
- 3. Materiales y métodos*
- 4. Resultados y discusión*
- 5. Conclusiones*



## 1. INTRODUCCIÓN

Como se ha visto en el capítulo anterior, los aceites esenciales estudiados han demostrado poseer una gran actividad antifúngica frente a todas las cepas de moho evaluadas. Además, la marcada acción de los mismos tanto por contacto directo como en fase vapor permite orientar el envase activo hacia una gran variedad de alimentos.

Sin embargo, a la hora de diseñar un envase activo no sólo hay que tener en cuenta la actividad del antimicrobiano frente a las cepas predominantes en el alimento al cual va orientado, ya que hay otros aspectos a considerar que pueden influir en la actividad de éste.

### **1.1. Importancia de la concentración de inóculo y de la concentración de activo en el envase**

Una de las primeras razones en la que hay que pensar cuando un envase activo fracasa, es si la concentración de agente antimicrobiano (en este caso antifúngico) aplicada ha sido suficiente.

Sin embargo, como se desarrollará más adelante en la primera parte experimental de este capítulo, la concentración necesaria no sólo depende de la potencia del agente activo, sino también del tamaño del inóculo presente. Además, hay que considerar la fase de crecimiento del microorganismo en cuestión, ya que a diferencia de las bacterias cuya fase estacionaria se alcanza a las 24 horas, en los mohos ésta lo hace tras varios días de incubación.

#### ***1.1.1. Influencia de la concentración de aceite esencial***

Muchos autores han investigado la influencia de la concentración del activo en la actividad antimicrobiana alcanzada. Hace ya algunos años Boyraz N., et al. (2006) señalaban que la protección durante la producción de un producto alimenticio es vital, puesto que al comienzo la carga inicial de microorganismos es baja. En este trabajo los autores comprobaron que *Satureja hortensis* L. inhibe el crecimiento de la colonia de *Botrytis cinérea* y *Alternaria mali*, siendo más efectiva la acción al aumentar la dosis del activo.

Este mismo hecho ha sido constatado en múltiples trabajos a lo largo de los años, encontrando muchos ejemplos en la bibliografía. Khan M. S. A., et al. (2011) no sólo determinaron la dependencia de la dosis de activo en el crecimiento radial de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton rubrum*, sino que también observaron diferentes daños en la morfología del moho según la concentración y el tiempo de exposición del aceite esencial.

Como es lógico, también la concentración de los aceites esenciales puede influir en su actividad antimicrotóxigena, sirviendo como ejemplo el trabajo de Passone M. A., et al. (2013) donde muestran la reducción de aflatoxina B1 en cuatro mohos a diferentes concentraciones de aceite esencial en fase vapor.

### ***1.1.2. Influencia de la concentración del inóculo***

Sin embargo, igual que los ejemplos citados, la mayoría de trabajos estudian la influencia de un rango de concentración de activo pero frente a una dosis fija de inóculo. Cabe mencionar que la actividad de los aceites esenciales está relacionada con la carga microbiana, tal y como demuestran las curvas de muerte del trabajo de Rasooli I., et al. (2006).

Por todo esto, resulta esencial determinar la influencia de ambas concentraciones, ya que en condiciones donde se espere una menor contaminación del producto, la dosis necesaria para su protección será menor. Las ventajas de todo ello son evidentes, ya que una disminución en la concentración de aceite esencial se traduce en una mejor aceptación del producto y en una reducción del coste de producción del envase.

## **1.2. Liberación de los compuestos volátiles desde el material**

Además de evaluar las diferentes concentraciones de aceite esencial y de inóculo, a la hora de diseñar un envase activo hay que tener en cuenta el sustrato que se va a emplear. El grado de retención del aceite esencial por parte del material influirá en la liberación de sus compuestos volátiles, limitando en mayor o menor medida la acción antimicrobiana alcanzada.

Debido a esto, la concentración de aceite esencial que alcance finalmente el medio de cultivo o el alimento, dependerá principalmente de la cantidad de aceite esencial depositada inicialmente y de la velocidad de liberación del mismo. Es evidente que

dependiendo del tipo de producto y de la situación de almacenamiento en el que éste vaya a encontrarse, se deseará una liberación más o menos rápida del agente activo.

Aunque pueda parecer un tema reciente, la preocupación por una liberación controlada por parte de los envases de alimentos lleva siendo investigada desde hace años. En un excelente review que data de hace casi 20 años, se destaca la microencapsulación como el método de liberación controlada más común en la industria alimentaria. El trabajo presenta modelos matemáticos para diferentes tipos de liberación del agente activo como son la difusión, la biodegradación, la absorción (*“swelling”*) y presión osmótica (Pothakamury U. R., et al. , 1995).

Más recientemente, muchos han sido los autores que han continuado estudiando el perfil de liberación de los compuestos volátiles. En el caso del envase activo, en primer lugar hay que tener en cuenta la composición de los aceites esenciales, siendo más volátiles los monoterpenos hidrocarbonados que los oxigenados. Así mismo, debido a una mayor longitud de cadena, los sesquiterpenos hidrocarbonados, mayores constituyentes del aceite esencial de *Zingiber officinale* le confieren un perfil de liberación más lento, con un coeficiente  $n$  de velocidad de liberación más elevado según la ecuación de Peppas (Owolabi M. S., et al. , 2013). En un trabajo llevado a cabo con un total de 72 aceites esenciales, se obtuvo una mayor actividad en fase vapor en aquellos compuestos que presentaban aldehídos y fenoles como grupo funcional, seguido de alcoholes, cetonas, ésteres, éteres y óxidos y finalmente, hidrocarburos (Inouye S., et al. , 2006).

La presente tesis doctoral ha tenido como objetivo el estudio de actividad antifúngica y antimicotoxigénica de un envase activo, así como el estudio del mecanismo de acción del mismo sobre los mohos. Como bien se ha introducido en la sección I y como se verá a lo largo de este capítulo, los materiales empleados a lo largo de todo el trabajo fueron fundamentalmente PP (Polipropileno) y PET (Polietileno de Tereftalato). Sin embargo, dado el creciente número de trabajos científicos publicados en los últimos años (concretamente en el 2013-2014) sobre materiales biodegradables para el envase de alimentos, se ha querido aprovechar esta ocasión para hacer un resumen sobre los parámetros que se estudian con mayor frecuencia en estos. Dicha información viene contenida en la parte final de la discusión del presente capítulo. Como es evidente, los parámetros estudiados en cada caso guardan una estrecha relación con las necesidades de cada material empleado ya que

la preocupación en muchos casos se enfocará hacia la pérdida de las funciones mecánicas y de las propiedades barrera.

### **1.3. Propiedades mecánicas y permeabilidad de los materiales de envase**

Existen múltiples factores que pueden afectar al envase, que van desde los golpes externos que pueda sufrir, radiaciones ultravioleta y microondas, hasta la composición del alimento, las condiciones de almacenamiento, etc.

Sin embargo, como hemos visto en la introducción general, la elección del material condicionará la actividad del envase activo, y ésta a su vez, dependerá también de la estabilidad del sustrato. Además, el activo incorporado también puede jugar un rol fundamental, ya que puede modificar negativa o positivamente las propiedades originales del material.

Algunos de los parámetros mecánicos que suelen estudiarse son: la fuerza tensil o *tensile strength (TS)*, elongación hasta el punto de fractura y elasticidad. Por otra parte, la permeabilidad suele evaluarse frente al vapor de agua (*WVP*), oxígeno y dióxido de carbono.

### **1.4. Otras variables que pueden afectar al envase**

Además de las propiedades intrínsecas del material discutidas anteriormente, como ya se ha visto a lo largo de la tesis, el éxito de un envase activo antifúngico se alcanzará con la inhibición completa del moho. Sin embargo, como se ha expuesto en los puntos previos, las condiciones de almacenamiento ( $a_w$ , temperatura, pH, tiempo de almacenamiento, etc.) van a jugar un papel importante en la protección del alimento, ya que condicionan entre otros aspectos, la liberación del activo desde el sustrato. Así mismo la actividad de agua ( $a_w$ ), la temperatura y el pH son variables que afectan directamente al desarrollo del moho, es decir, a la germinación de las esporas, el desarrollo del micelio y la posterior producción de micotoxinas. En tercer lugar, hay que tener en cuenta la posible influencia de esas mismas variables en la actividad del aceite esencial incorporado.

De esta manera, vemos que el envase antifúngico es un sistema, un bloque en el cual para que funcione habrá que considerar varios aspectos como son, el grado de sensibilidad

de la cepa, la potencia antifúngica del agente activo elegido, la composición del alimento (o medio de cultivo) y el material del envase, entre otros.



## 2. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO

Este capítulo se diseñó en función de dos objetivos principales. El primero de ellos fue el estudio de la influencia que tiene en la actividad de los aceites esenciales, el tamaño del inóculo y la concentración de agente activo. Dicho objetivo se llevó a cabo por medio de tres experimentos independientes: por contacto directo en medio líquido, por difusión en disco en fase vapor, y por medio de la actividad de un envase activo de PET (Polietileno de Tereftalato).

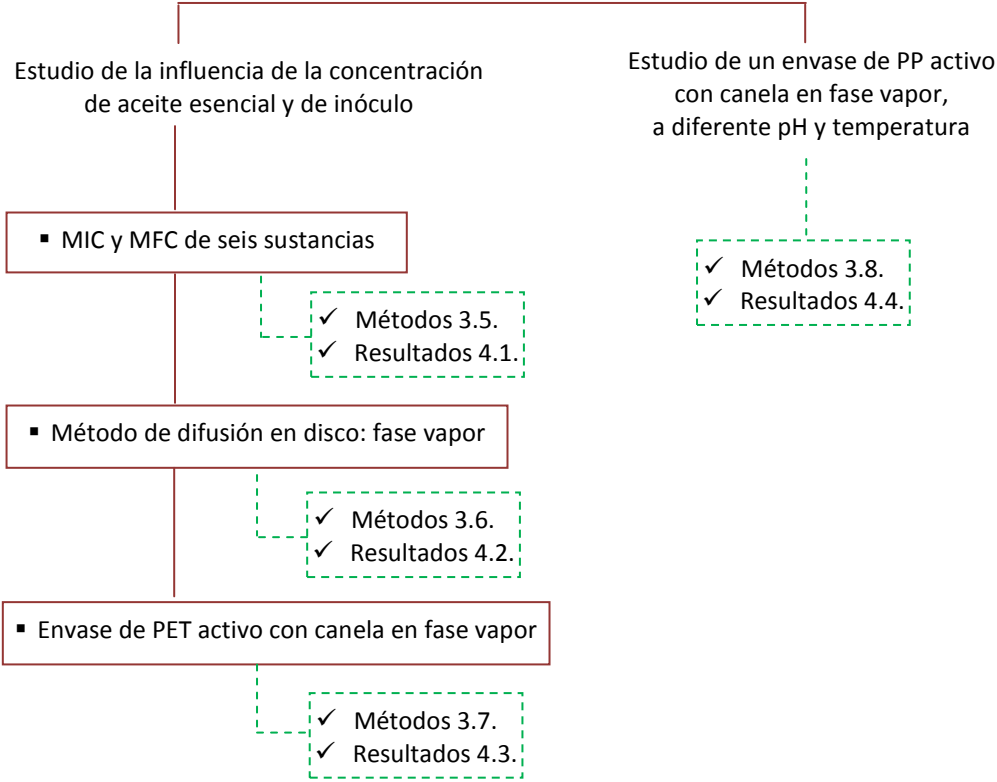
El estudio de contacto directo en medio líquido se llevó a cabo midiendo la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Fungicida (MFC) de tres aceites esenciales (canela, orégano y clavo) y sus compuestos mayoritarios respectivos (cinamaldehído, carvacrol y eugenol), todos ellos a cuatro concentraciones de inóculo de moho. Esto se realizó mediante el método de macrodilución en medio líquido empleado en el capítulo anterior. Para el siguiente experimento en fase vapor se evaluaron dos concentraciones de inóculo frente a cuatro volúmenes de aceite esencial de canela, esta vez mediante difusión en disco en medio sólido. El último experimento de este bloque, también llevado a cabo en medio sólido, fue el estudio de la actividad antifúngica de un envase activo en fase vapor. Para ello, se evaluaron films de PET incorporando canela en un rango de concentración y estudiando su actividad frente a tres concentraciones de inóculo.

De manera similar al capítulo 2, se quiso estudiar la influencia de las variables de pH y temperatura en la actividad de los aceites esenciales. Este experimento se llevó a cabo mediante el estudio en fase vapor de films activos de PP (Polipropileno) incorporando canela en un rango de concentración. En este caso se estudió una sola concentración de inóculo pero ampliando el estudio a cuatro cepas diferentes. En total se estudiaron dos pH y dos temperaturas posibles de crecimiento para cada cepa.

En ambos experimentos llevados a cabo con el material (PET y PP), además de la actividad a corto plazo, se estudió la actividad a largo plazo (durabilidad y estabilidad), así como la acción fungiestática o fungicida alcanzada.

En la figura 3.1 se muestra el desarrollo experimental llevado a cabo en este capítulo.

CAPÍTULO 3



**Fig. 3.1** Diseño experimental del capítulo 3. Como puede observarse, cada experimento realizado se explica en su apartado de “métodos” y “resultados” correspondientes.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Instrumentos

Además de los instrumentos y materiales utilizados de manera rutinaria a lo largo de toda la tesis (ver apartado 3.1 del capítulo 1), en este capítulo se emplearon:

- ✓ pH-metro Seven Easy (*Mettler Toledo*).
- ✓ Discos de papel de filtro de 9 mm (*Whatman*).
- ✓ Calibre digital (0-150 mm) (*COMECTA S.A.*).
- ✓ Agitador rotacional, mini twist (*Select Bioproducts*).
- ✓ Brida de Nylon.

### 3.2. Agentes antifúngicos

Se utilizaron las mismas sustancias naturales que en el capítulo 2 (ver tabla 2.1). Es decir, estos fueron los siguientes:

- ✓ **Aceite esencial de canela** (CIN).
- ✓ **Aceite esencial de orégano** (OR).
- ✓ **Aceite esencial de clavo** (CLO).
- ✓ **Trans- cinamaldehído** (CINAM) 99 %.
- ✓ **Carvacrol** > 97 % (CARV).
- ✓ **Eugenol** 99 % (EUG).

En el capítulo 2 se puede encontrar el resto de información en relación a la nomenclatura de la planta, la procedencia de cada sustancia, el número CAS (ver tabla 2.1), así como la composición de las atmósferas de los tres aceites esenciales (ver tabla 2.2).

### 3.3. Cepas de mohos y medios de cultivo

Todos los mohos estudiados en la tesis, pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (España).

A lo largo de este capítulo, se emplearon las siguientes cepas (tabla 3.1). Todas ellas se incubaron dentro de las condiciones de cultivo recomendadas por la CECT. Como ya se explicó en el capítulo anterior (ver apartado 3.4), los días hacen referencia al tiempo de incubación necesario para la extracción del inóculo inicial (preincubación). Por otra parte, en cada uno de los métodos del capítulo se especificará la cepa empleada en ese caso, así como las condiciones de cultivo requeridas.

**Tabla 3.1** Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 3.

Todos los códigos corresponden a la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Los días de incubación hacen referencia a la incubación previa para la utilización de dicha cepa, de manera que el tiempo de cada experimento varió según el objetivo.

Cepa (códigos CECT)	Abreviatura	Medio de cultivo	Incubación (días)
<i>Aspergillus flavus</i> 2949	<i>A. flavus</i> 2949	MEA, CZP (*PDA)	7
<i>Aspergillus flavus</i> 2687	<i>A. flavus</i> 2687	MEA	7
<i>Penicillium roqueforti</i> 2905	<i>P. roqueforti</i>	PDA	7
<i>Penicillium expansum</i> 2278	<i>P. expansum</i>	PDA	7

\* Los inóculos de esta cepa se extrajeron desde medio de cultivo PDA, ya que era más favorable para la recogida de esporas. Sin embargo, las posteriores siembras de los experimentos en medio sólido, se hicieron sobre MEA o CZP.

En este capítulo se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- ✓ PDA: Potato Dextrose Agar (*Scharlab*).
- ✓ MEA nº 1: Malt Extract Agar (*Scharlab*).
- ✓ CZP: Czapek (*Scharlab*).
- ✓ YEB: Yeast Extract Broth (*Scharlab*).
- ✓ Para las diluciones de inóculo se empleó NaCl al 0.9 % (*Panreac*).

Todos los caldos y medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones de cada uno de ellos y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, excepto en el caso de MEA, donde se recomienda su esterilización a 115 °C durante 15 minutos.

### **3.4. Materiales activos**

Los envases activos evaluados en esta tesis contenían el aceite esencial de canela como agente antifúngico. El desarrollo de los mismos se llevó a cabo mediante una colaboración del grupo GUIA con la empresa ARTIBAL (Sabiñánigo, España), gracias a una nueva tecnología patentada que permite la aplicación del aceite esencial en la superficie tratada del polímero (Garcés O., et al. , 2004).

A continuación se muestran las características de los dos materiales utilizados.

#### ***3.4.1. Films de PET (Polietileno Tereftalato)***

Los films de PET utilizados fueron proporcionados por Artibal y consistieron en láminas de 25  $\mu\text{m}$  de espesor, recubiertos con una formulación orgánica que contenía el aceite esencial de canela a diferente concentración. El gramaje fue de 2-2.5  $\text{g}/\text{m}^2$ . Las concentraciones evaluadas de canela fueron 2, 4, 6 y 8 %, correspondiendo cada punto porcentual a 0.0355  $\text{g}/\text{m}^2$ .

#### ***3.4.2. Films de PP (Polipropileno)***

De manera parecida, las láminas de PP (Artibal) contaban con 30  $\mu\text{m}$  de espesor y estaban recubiertas con una formulación orgánica conteniendo 2 %, 4 % y 6 % de aceite esencial de canela en la formulación del recubrimiento. El gramaje en este caso fue del 2.5  $\text{g}/\text{m}^2$ .

Además, se dispuso en ambos casos de films testigo (PET 0 % y PP 0 %), los cuales presentaban la misma formulación que los activos pero sin el aceite esencial de canela. Las láminas activas fueron preparadas el mismo día o el día anterior a la realización del ensayo.

### **3.5. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Concentración Mínima Inhibitoria (MIC ó CIM) y Concentración Mínima Fungicida (MFC ó CFM) de seis sustancias**

Como se ha explicado al comienzo de este capítulo, este experimento forma parte del primer objetivo: el estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de

inóculo. Esto se llevó a cabo por medio de tres experimentos independientes, siendo éste el primero de ellos.

Para ello, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima fungicida (MFC) de las seis sustancias empleadas en el capítulo anterior, pero esta vez frente a diferentes concentraciones de inóculo.

De esta manera, se evaluó la actividad de los aceites esenciales de canela, orégano y clavo, y sus respectivos compuestos mayoritarios cinamaldehído, carvacrol y eugenol, frente a cuatro concentraciones de inóculo de *A. flavus* 2949.

Como se ha explicado en ocasiones anteriores, el moho fue primero incubado en medio sólido PDA durante 7 días, tiempo tras el cual se extrajo el inóculo y se ajustó a una concentración de  $10^7$  CFU/mL por medio de la medición de absorbancia (ver capítulo 1 y apartado 3.5.2 del capítulo 2). A partir de ésta, se hicieron tres diluciones (1/10) en NaCl 0.9 % hasta llegar a la concentración de  $10^4$  CFU/mL.

El método llevado a cabo fue el mismo que el explicado en el apartado 3.9.1 del capítulo 2 (ver figura 2.9). En resumen, se inocularon 200  $\mu$ L de cada concentración de inóculo preparada, en tubos que contenían 1.78 mL del medio de cultivo líquido estéril (YEB), añadiéndole finalmente a la mezcla 20  $\mu$ L de la dilución correspondiente de cada agente activo. Los controles se formaron de la misma manera, pero añadiendo 20  $\mu$ L de etanol en el lugar del compuesto activo. Los antifúngicos evaluados fueron: tres aceites esenciales (canela, orégano, clavo) y sus compuestos mayoritarios (cinamaldehído, carvacrol y eugenol). Estos fueron preparados previamente por medio de diluciones seriadas en etanol, en un rango de concentración de 320 mg/mL a 2.5 mg/mL. La composición de las atmósferas de los tres aceites esenciales se detalla en el capítulo 2 (ver tabla 2.2).

De esta manera, teniendo en cuenta el último factor de dilución en el tubo problema, las concentraciones finales de inóculo en el tubo de ensayo fueron de  $10^6$ - $10^3$  CFU/mL, y las de agente activo de a 3.2 mg /mL a 0.025 mg/mL.

Todos los tubos se incubaron a 25 °C durante 48 horas, tiempo tras el cual se definió la MIC como la concentración más baja donde no se observó crecimiento en el tubo en comparación con el control. Finalmente, se sembraron por extensión con asa de Drigalsky 100  $\mu$ L en medio MEA de todas aquellas concentraciones donde no hubo desarrollo de

moho. Tras cinco días de incubación de dichas placas, se determinó la MFC como la concentración inferior de compuesto activo que no produjo crecimiento en la placa.

Esta evaluación se realizó un mínimo de tres veces, cada una de ellas por duplicado.

### **3.6. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Método de difusión en disco en fase vapor**

Tras la determinación anterior en medio líquido, se quiso estudiar la influencia de dos concentraciones de inóculo en la actividad en fase vapor de cuatro volúmenes de aceite esencial de canela.

Esto se llevó a cabo sobre la cepa *A. flavus* 2949, ajustando el inóculo hasta una concentración de  $10^6$  CFU/mL (ver capítulo 1 y apartado 3.5.2 del capítulo 2), haciendo dos diluciones (1/10) en NaCl 0.9 % para llegar a un inóculo final de  $10^4$  CFU/mL. Las concentraciones de inóculo empleadas fueron:  $10^6$  CFU/mL y  $10^4$  CFU/mL. De cada una de ellas se sembraron 100  $\mu$ L en placas Petri conteniendo 15 mL de medio de cultivo MEA. Para la evaluación en fase vapor, el aceite esencial de canela se depositó en un disco de Whatman sobre la tapa de la placa Petri, de la misma manera a la explicada en el punto 3.5.3 del capítulo 2 (ver figura 2.8). Se evaluaron cuatro volúmenes de canela sobre cada concentración de inóculo, esto es: 2.5  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L y 20  $\mu$ L. Al igual que ocurría en el experimento 3.6 del capítulo 2, los controles sirvieron para comprobar el correcto crecimiento de la cepa, ya que no se midieron halos de inhibición en esos casos al no formarse inhibición alguna.

Se realizaron tres réplicas por cada concentración de canela y de inóculo, cerrando todas las placas con parafilm para evitar la pérdida de los compuestos volátiles, e incubándolas en la estufa a 25 °C durante 7 días, momento en el cual se tomaron los resultados. La lectura de los halos formados en torno al disco de inhibición (halos de inhibición) se realizó por medio de un calibre digital.

#### **3.6.1. Análisis estadístico**

Se analizaron los halos de inhibición (H.I.) obtenidos en busca de posibles diferencias significativas. Para ello, se compararon las medias por medio de la distribución t-student y Anova de 1 factor, dependiendo del tipo de datos y tal y como vimos en varias ocasiones en

el capítulo 2 (ver por ejemplo el apartado 3.6.3 del capítulo 2). Se utilizó para ello el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

El análisis de las diferencias en el H.I. se dividió en dos partes: a) las diferencias entre dos inóculos distintos para un mismo volumen de canela y b) las diferencias entre los cuatro volúmenes de aceite esencial pero con el mismo inóculo. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95 %.

***a) Análisis estadístico: diferente concentración de inóculo frente al mismo volumen de aceite esencial de canela***

El primer caso se llevó a cabo por medio de una comparación de medias para muestras independientes según la distribución t-student. La variable numérica correspondió a los halos de inhibición (mm), mientras que las dos concentraciones de inóculo ( $10^6$  y  $10^4$  CFU/mL) hicieron referencia a la variable de agrupación. Previamente al análisis de medias, se estudió la homocedasticidad de ambos grupos, asumiendo la igualdad de varianzas cuando el nivel de significación de la prueba de Levene fue mayor de 0.05 y rechazándola cuando ésta fue menor de 0.05. De esta manera, la prueba T para la igualdad de medias se realiza considerando el resultado obtenido por Levene, difiriendo las medias significativamente en el caso de obtener una significación menor de 0.05 y aceptando la igualdad de medias (hipótesis nula) en el caso de ser mayor de 0.05.

***b) Misma concentración de inóculo frente a diferentes volúmenes de aceite esencial de canela***

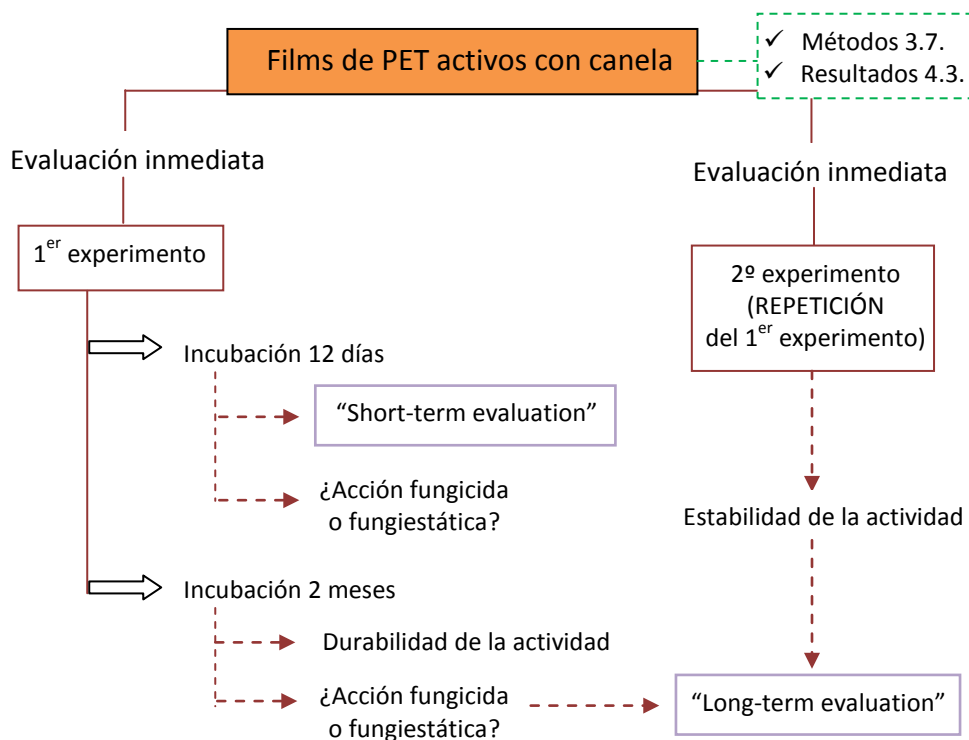
Por otra parte, se analizaron los HI dentro de cada concentración de inóculo, respecto a los cuatro volúmenes de canela (2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ L) por medio de Anova de 1 factor (ver apartado 3.6.3 capítulo 2). La homocedasticidad se evaluó por la prueba de Levene explicada previamente, determinando la diferencia entre las medias por medio de Welch o Brown-Forsythe (en el caso de no asumir varianzas iguales) o por Anova (asumiendo varianzas iguales). A continuación, se identificó el origen de las diferencias significativas obtenidas por medio de las comparaciones múltiples post-hoc, aplicando el test de Bonferroni en el caso de asumir igualdad de varianzas, y el T3 de Dunnet en el caso contrario. De la misma manera que antes, las medias difirieron significativamente en aquellos casos donde el nivel de significación fue menor de 0.05.



### 3.7. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: envase de PET activo con canela en fase vapor

Este experimento constituyó el final del primer objetivo de este capítulo. Se estudió la actividad antifúngicas de films activos de PET con canela en fase vapor frente a *A. flavus* 2949, evaluando la influencia del tamaño de inóculo y de la concentración de activo en la actividad alcanzada. El trabajo se dividió en tres etapas: la evaluación a corto plazo (o “short-term”), la evaluación a largo plazo o “long-term”) y el estudio del efecto antifúngico o antiestático de la actividad antifúngica. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos independientes como se muestra en el diagrama de la figura 3.2.

De esta manera, las láminas de films de PET activos con canela se evaluaron a dos tiempos diferentes, es decir, inmediatamente tras su preparación (1<sup>er</sup> experimento) y tras 2 meses de almacenamiento de éstas a 4 °C (2<sup>o</sup> experimento).



**Fig. 3.2** Diagrama de trabajo del experimento con los films activos de PET con canela.

La preparación de las muestras fue en todos los casos la misma. En primer lugar, se extrajo un inóculo de la cepa *A. flavus* 2949 ajustando el inóculo a una concentración final de  $10^6$  CFU/mL (ver capítulo 1 y apartado 3.5.2 del capítulo 2).

Para estudiar la influencia del tamaño del inóculo se realizaron dos diluciones (1/10) de la suspensión inicial, de manera que al final se utilizaron tres concentraciones de mohos:  $10^6$  CFU/mL,  $10^5$  CFU/mL y  $10^4$  CFU/mL. De cada una de las diluciones de inóculo se sembraron por extensión 100  $\mu$ L en medio de cultivo sólido CZP. Las muestras activas se formaron tras sustituir las tapas de la placa Petri por films de PET activo con canela (2, 4, 6 y 8 %), sujetándolos a la placa por medio de una brida de nylon (figura 3.3). La distancia entre el medio de cultivo y la placa fue de 0.8-1 cm. Se añadieron dos tipos de controles, placas cubiertas con PET testigo sin canela (PET 0 %) y placas cerradas con la tapa normal. Éstas últimas se introdujeron en bolsas de polietileno sin cerrar, para evitar posibles contaminaciones cruzadas en la estufa.

Todas las muestras se realizaron por triplicado y se incubaron a 25 °C con el medio de cultivo hacia arriba.

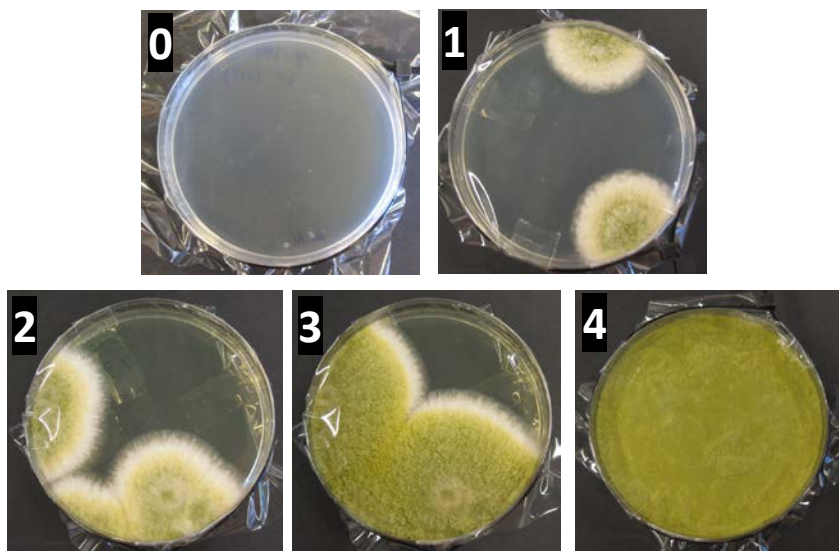


**Fig. 3.3** Colocación del PET para su evaluación en fase vapor. Cierre mediante la brida de nylon.

Las placas preparadas a tiempo cero se incubaron durante 12 días para la evaluación de su actividad antifúngica a corto plazo (“short-term evaluation”). Sin embargo, interesaba estudiar dos parámetros íntimamente relacionados con la actividad a largo plazo de los materiales (“long-term evaluation”). Por un lado, tras la evaluación a corto plazo se alargó el tiempo de incubación de las placas hasta un total de 2 meses, de manera que nos aportara información sobre la durabilidad de la actividad antifúngica. Por otro lado, interesaba estudiar la estabilidad de los materiales. Como se ha podido ver en el diagrama (fig.3.2), esto se llevó a cabo repitiendo de nuevo el mismo experimento con láminas que habían sido preparadas con anterioridad. Esto es, parte de las láminas de PET activas preparadas al comienzo para su primera evaluación se guardaron en nevera (6 °C) durante 2 meses,

repetiendo de nuevo el experimento entero tras dicho periodo. Para evitar una contaminación cruzada entre ellas, las láminas almacenadas se separaron en función de la concentración de canela y se colocaron de manera extendida. Tras esto, cada lote de concentración se envolvió en papel de celulosa y posteriormente, en dos capas de papel aluminio.

En todos los casos se midió el crecimiento del moho diariamente, utilizando para ello una escala cualitativa, de manera que permitiera poder comparar el crecimiento de los diferentes materiales y a diferentes concentraciones. Se estableció para ello la siguiente escala: (0) no crecimiento, (1) crecimiento inicial, (2) crecimiento medio, (3) fuerte crecimiento y (4) crecimiento completo. En la figura 3.4 puede apreciarse un ejemplo de dicha escala.



**Fig. 3.4** Escala cualitativa en función del crecimiento del moho: (0) inhibición total, (1) poco crecimiento, (2) sobre el 50 %, (3) alrededor del 75 %, (4) crecimiento completo. Las imágenes corresponden a *A. flavus* bajo films activos de PET con aceite esencial de canela.

Por último, tanto en el experimento a corto como a largo plazo, se determinó si la actividad antifúngica alcanzada fue “fungiostática” o “fungicida”. Esto se llevó a cabo por medio de dos procedimientos. En el primero de ellos, la mitad de las placas donde no se había producido ningún crecimiento se liberaron de la exposición del activo, sustituyendo los films por tapas nuevas normales. La otra mitad de las placas inhibidas (sin crecimiento de moho) se lavaron con 9 mL de agua destilada conteniendo 0.1 % de Tween 80,

sembrando después 100 µL de dicho lavado en placas nuevas de medio de cultivo. En ambos casos, se refirió como “fungiostática”, a aquella concentración que aunque inicialmente inhibía el crecimiento, permitía su desarrollo posterior, mientras que se consideraron “fungicidas” a las que no produjeron crecimiento en ninguno de los casos.

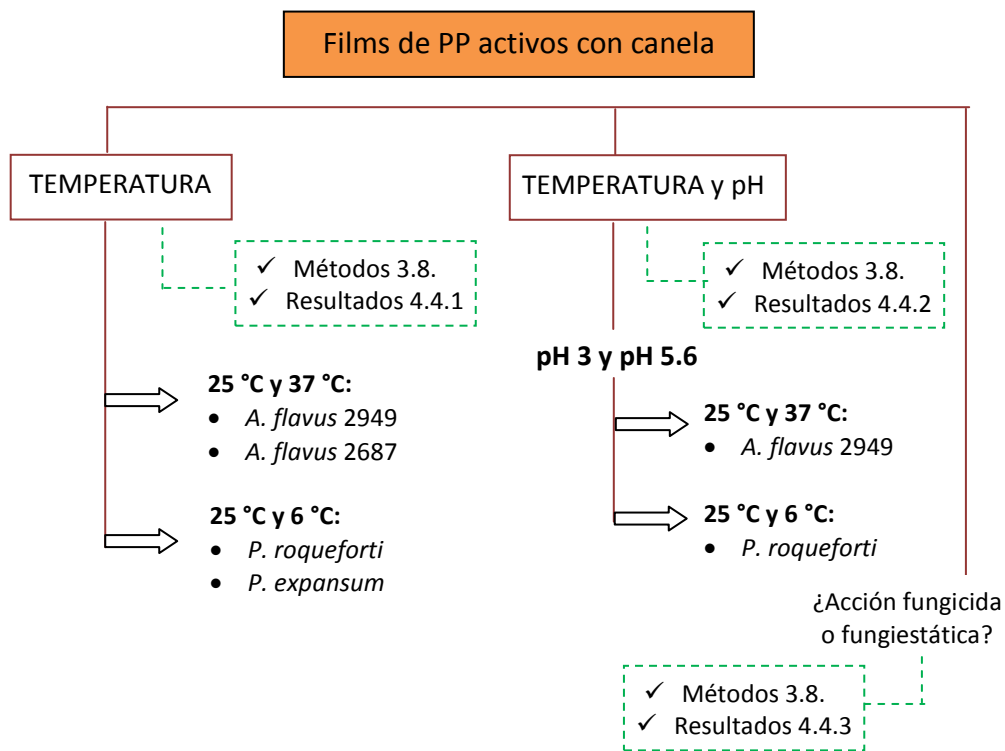
### **3.8. Estudio de un envase activo con canela, a diferente pH y temperatura**

Las cuatro cepas evaluadas en esta ocasión fueron: *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *P. roqueforti* y *P. expansum*. Se extrajo el inóculo de cada una de ellas, ajustándolo a 10<sup>6</sup> CFU/mL (ver capítulo 1 y apartado 3.5.2 del capítulo 2) e inoculando 100 µL de cada suspensión en las placas Petri con el medio de cultivo. En este caso se empleó MEA para las dos cepas de *A. flavus*, y PDA para el género *Penicillium*.

Las placas control y activas se formaron siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.7, es decir, en el caso de las muestras activas con canela, las tapas de las placas Petri se sustituyeron por los films de PP activos con canela (PP 2, 4, y 6 %), sujetándolos a la placa por medio de una brida (ver fig. 3.3). Como en el caso anterior, se añadieron dos controles diferentes: placas con films testigos sin canela (PP 0 %) y placas cerradas con la tapa normal de la placa Petri. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

El experimento se dividió en dos partes, como se muestra en el diagrama de la figura 3.5. De esta manera, en primer lugar se evaluó la actividad antifúngica del PP activo con canela bajo diferentes temperaturas de incubación frente a cuatro cepas. Se eligieron dos temperaturas de incubación para cada cepa, siendo 25 °C y 37 °C en el caso de las dos cepas de *A. flavus*, y de 25 °C y 6 °C en el caso de *P. roqueforti* y *P. expansum*. Cabe mencionar que en este caso no se modificó el pH del medio de cultivo, siendo éste de 5.6 tanto en el medio PDA como MEA.

Una vez hecho esto, se procedió a evaluar la actividad antifúngica de los materiales de la misma manera, pero bajo a un pH más ácido (pH 3). Esto se realizó frente a dos de las cepas anteriores, *A. flavus* 2949 y *P. roqueforti*, incubándose así mismo las muestras a las dos temperaturas de estudio establecidas para cada cepa.



**Fig. 3.5** Diagrama de trabajo del experimento con los films activos de PP con canela.

En este punto cabe recordar, tal y como vimos en el capítulo 2, que la acidificación del medio de cultivo impide la solidificación de éste tras el proceso de autoclavado (donde se calientan hasta 115 °C ó 121 °C). Para solventar este problema, los medios de cultivo fueron acidificados en función de la optimización de un experimento anterior explicado en la presente tesis (ver apartados 3.10.1 capítulo 2).

Por último, para determinar si la actividad producida por los films activos era fungicida o fungiestática, se procedió a lavar una parte de las placas inhibidas mientras que a otras se les retiró la exposición del film activo sustituyendo los films por tapas de placa Petri normales. Por lo tanto, esto se llevó a cabo de la misma manera que la explicada con los films de PET.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **4.1. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC) de seis sustancias**

Los resultados de este experimento se centran en la influencia de las diferentes concentraciones de inóculo en la actividad de los aceites esenciales. La discusión respecto a la actividad obtenida con cada una de las sustancias no se comentará por tanto en este caso, debido a que ésta fue debidamente analizada en el capítulo anterior, siguiendo el mismo método aquí empleado y las mismas sustancias (ver capítulo 2, apartado 4.4).

Cabe recordar, como ya fue discutido en el capítulo anterior, que existen varios métodos a la hora de representar los valores de estas concentraciones, siendo uno de ellos la elección del valor obtenido con mayor frecuencia acompañado de su desviación estándar. Sin embargo, los resultados de la tesis llevados a cabo por esta metodología de dilución en caldo (en capítulos 2 y 3), se han presentado mediante un rango de concentración. Esta forma se ha considerado más apropiada ya que muestra la fluctuación real que, como ya fue comentado en su momento, es producto de pequeñas variaciones experimentales no controlables, como variaciones mínimas de inóculo inicial o diferencias a priori despreciables pero influyentes en las condiciones de cultivo. Por último, de la misma manera que en los experimentos del capítulo 2 a los que se ha hecho referencia, sólo se consideraron como diferencias notables a aquellas mayores de un orden de dilución. Sin embargo, en el caso de observarse diferencias menores (dentro de un orden de dilución) de manera repetida en todas las réplicas y repeticiones del experimento, hablaremos de “tendencia”.

Los datos concernientes a los aceites esenciales de canela, orégano y clavo se muestran en la tabla 3.2, mientras que los obtenidos para sus compuestos mayoritarios respectivos (cinamaldehído, carvacrol y eugenol) se encuentran en tabla 3.3.

**Tabla 3.2** MIC y MFC de canela (CIN), orégano (OR) y clavo (CLO) a diferente inóculo. Ambas concentraciones, expresadas en mg/mL, fueron determinadas frente a cuatro concentraciones de inóculo de *A. flavus* 2949.

<i>A. flavus</i> (CFU/mL)	CIN		OR		CLO	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
10 <sup>6</sup>	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8-1.6
10 <sup>5</sup>	0.1	0.1-0.2	0.2	0.4	0.4	0.8-1.6
10 <sup>4</sup>	0.05	0.05-0.1	0.1-0.2	0.2-0.4	0.4	0.8
10 <sup>3</sup>	0.025-0.05	0.05-0.1	0.1-0.2	0.2-0.4	0.2-0.4	0.4-0.8

**Tabla 3.3** MIC y MFC de los compuestos mayoritarios a diferente inóculo: cinamaldehído (CINAM), carvacrol (CARV) y eugenol (EUG). Ambas concentraciones, expresadas en mg/mL, fueron determinadas frente a cuatro concentraciones de inóculo de *A. flavus* 2949.

<i>A. flavus</i> (CFU/mL)	CINNAM		CARV		EUG	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
10 <sup>6</sup>	0.1-0.2	0.2	0.1-0.2	0.4	0.4	0.8
10 <sup>5</sup>	0.1	0.1-0.2	0.2	0.4	0.4	0.8
10 <sup>4</sup>	0.05-0.1	0.05-0.1	0.1-0.2	0.2-0.4	0.2-0.4	0.4-0.8
10 <sup>3</sup>	0.05	0.05-0.1	0.1-0.2	0.2-0.4	0.2-0.4	0.4-0.8

Como se puede observar, las concentraciones de inóculo próximas entre sí obtuvieron valores muy cercanos de MIC y MFC, como la MIC de canela entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>4</sup> CFU/mL, siendo en esos casos la diferencia máxima observada de un orden de dilución (tabla 3.2). Como se esperaba, la diferencia mayor se encontró siempre entre la concentración más alta y más baja de inóculo, esto es, 10<sup>6</sup> CFU/mL y 10<sup>3</sup> CFU/mL. Sin embargo, sólo en el caso de canela y cinamaldehído se puede hablar de una diferencia considerable entre ambas concentraciones más extremas de inóculo. En el caso de canela la MIC aumentó de 0.025-0.05 mg/mL a 0.1 mg/mL (tabla 3.2), y en el caso de cinamaldehído de 0.05 mg/mL a 0.1-0.2 mg/mL (tabla 3.3). Se obtuvo la misma diferencia para ambos compuestos en el caso de la MFC. De esta manera, canela y cinamaldehído demostraron una influencia notable en cuanto a la importancia de la concentración del inóculo.

Por otra parte, en el resto de los casos se obtuvieron valores prácticamente constantes para 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> CFU/mL y 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU/mL, siendo aún más evidente en el caso concreto de orégano y eugenol. Además, la diferencia máxima de MIC y MFC entre las concentraciones más extremas de inóculo, fueron menores de un orden de dilución. De esta manera, en estos casos la actividad del aceite esencial mostró menor dependencia de la concentración inicial de moho que en canela y cinamaldehído, observándose una leve tendencia sólo al variar considerablemente el inóculo.

#### **4.1.1. Discusión de los resultados de otros autores: la concentración de inóculo en medio líquido**

Los resultados obtenidos coinciden con los de un trabajo previo llevado a cabo en el grupo GUIA, donde se determinó la actividad de los mismos aceites esenciales de canela y orégano por dilución en caldo, frente a cuatro concentraciones de inóculo de *Escherichia coli*. A pesar de tratarse de bacterias, también se observó que la MIC de canela aumentaba ligeramente (un orden de dilución) al incrementar en tres logaritmos la concentración de inóculo, mientras que el orégano y el LAE se mantuvieron constantes a todas las concentraciones de inóculo (Becerril R., 2011). Este hallazgo común, obtenido tanto en *A. flavus* como en *E. coli*, sugiere una diferencia en el mecanismo de actuación de las sustancias evaluadas.

Aunque en el siguiente capítulo se desarrollará con más detalle el mecanismo de acción de las diferentes sustancias empleadas en la tesis, en este apartado mencionaremos las conclusiones obtenidas en cuanto a la influencia del inóculo en la actividad de los aceites esenciales.

#### **4.1.2. Relación entre el tamaño del inóculo y el mecanismo de acción**

A pesar de que los aceites esenciales llevan años investigándose, hoy en día sigue sin haber datos concluyentes sobre la manera de actuar de los mismos. Sin embargo, el hecho de haber obtenido la misma conclusión en estos dos experimentos independientes con bacterias y con mohos, apunta como bien se ha mencionado, a una diferencia en el mecanismo de acción. En el caso de bacterias, hay autores que señalan que el cinamaldehído, principal componente de la canela empleada, actúa en la célula penetrando en su interior. De esta manera, frente a concentraciones elevadas de inóculo, las dosis de canela y cinamaldehído podrían consumirse o inactivarse debido a su introducción en el interior celular (Becerril R., 2011). En el caso de los mohos, como es habitual, son más escasos los estudios centrados en esta línea de investigación. Sin embargo, se ha encontrado la misma conclusión en dos trabajos encontrados de micología clínica, donde determinaron las MIC y MFC de varios antifúngicos clínicos en diferentes cepas por dilución en caldo. A pesar de que observaron ciertas variaciones según la cepa y el antifúngico empleado, se obtuvo en general una fuerte dependencia de la concentración del inóculo en las determinaciones de ambas concentraciones. En ambos trabajos señalaron que el efecto

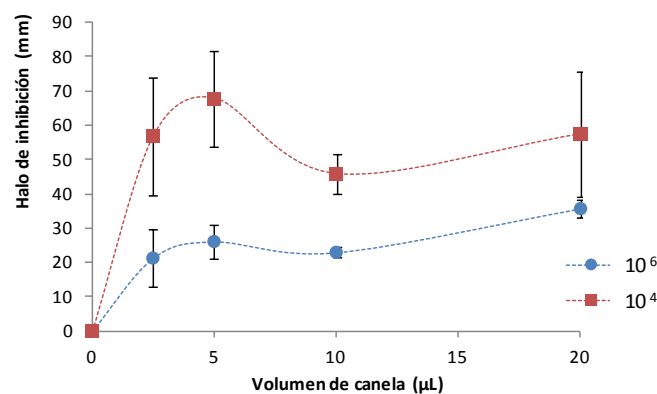


del tamaño del inóculo parece estar relacionado con el mecanismo de acción de las sustancias, siendo más acusado en caso de los antifúngicos cuya acción antimicrobiana se basa en un sistema enzimático (Gehrt A., et al., 1995; Lass-Flörl C., et al. , 2003).

#### 4.2. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: Método de difusión en disco en fase vapor

Como hemos visto en el experimento anterior, la concentración del inóculo claramente es un factor importante que debemos considerar cuando se determina la actividad de un aceite esencial. Si bien la metodología anterior fue llevada a cabo mediante una dilución en caldo, es decir, en contacto directo con el moho, en este caso la evaluación se hizo mediante un disco de papel de filtro conteniendo canela sin contacto con el moho (en fase vapor).

Los halos de inhibición (H.I.) creados por diferentes volúmenes del aceite esencial de canela (2.5, 5, 10 y 20  $\mu\text{L}$ ) se midieron al cabo de siete días en ambas concentraciones de inóculo, esto es,  $10^6$  CFU/mL y  $10^4$  CFU/mL. Como se puede apreciar a primera vista, hay una clara diferencia entre los perfiles de ambos inóculos (figura 3.6) mientras que dentro de cada uno de ellos, la influencia del volumen de canela es menos evidente.



**Fig. 3.6** H.I. (mm) creado por canela en fase vapor a diferente concentración frente a dos concentraciones de *A. flavus* ( $10^6$  y  $10^4$  CFU/mL).

Para poder analizar si las diferencias observadas eran o no significativas ( $P < 0.05$ ), se llevó a cabo un análisis estadístico por SPSS tal y como se ha explicado en la metodología de este experimento (ver apartado 3.6.1).

#### **4.2.1. Análisis estadístico**

Se analizaron las diferencias en el HI: a) al variar el inóculo y mantener el mismo volumen de canela y b) entre los diferentes volúmenes de canela sin modificar el inóculo.

En primer lugar, la prueba T para muestras independientes reveló diferencias significativas entre los dos inóculos  $10^4$  CFU/mL y  $10^6$  CFU/mL a todos los volúmenes de canela excepto el de 20  $\mu$ L.

Por otra parte, dentro del mismo inóculo no se obtuvieron diferencias entre los diferentes volúmenes de canela en la concentración más baja ( $10^4$  CFU/mL), encontrándose un solo caso en la más alta ( $10^6$  CFU/mL), la cual se detectó entre los volúmenes de canela de 10  $\mu$ L-20  $\mu$ L.

Por tanto, como podemos observar, la actividad de canela en fase vapor es más dependiente de la concentración de inóculo que de la concentración de aceite esencial.

Esta misma conclusión ha sido obtenida de manera repetida en experimentos anteriores. Aunque no se muestran los datos, comentaremos como ejemplo, las conclusiones de uno de ellos, también llevado a cabo en fase vapor. Al inocular *A. flavus* por pincho en el centro de una placa desde una suspensión de  $10^6$  CFU/mL, se inhibió completamente el crecimiento tras colocar un disco en la tapa con 2  $\mu$ L y 3  $\mu$ L de canela. Se aumentó el inóculo, sembrando 20  $\mu$ L de la misma suspensión anterior por extensión, sin encontrar crecimiento con 5  $\mu$ L de canela en fase vapor. Sin embargo, al inocular finalmente 100  $\mu$ L desde la misma suspensión de moho (sembrado también por extensión), sí que se observó crecimiento con 5  $\mu$ L y 10  $\mu$ L de canela en fase vapor, obteniéndose además halos de inhibición muy parecidos entre ambas concentraciones. En otros experimentos, donde se probaron diferentes inóculos (tanto diferentes volúmenes de la misma suspensión como diferentes órdenes logarítmicos) y distintos volúmenes de canela en fase vapor, se obtuvo siempre la misma conclusión.

De esta manera, queda demostrada la importancia de la influencia del inóculo en la actividad de los aceites esenciales, habiéndolo determinado tanto en medio líquido en el primer experimento como en este caso en fase vapor.

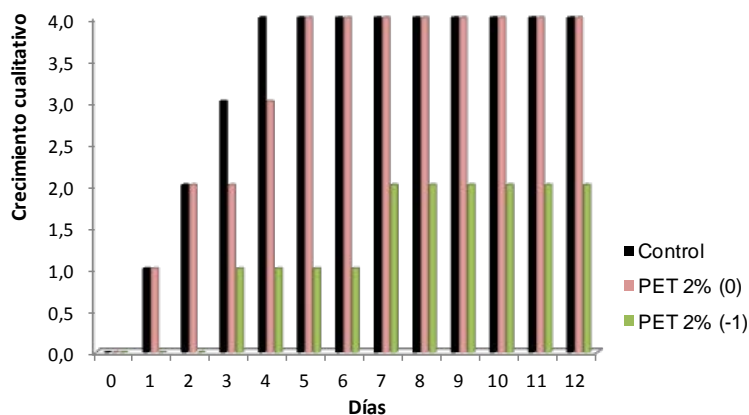
La comparación de los resultados con otros autores se llevará a cabo en el apartado siguiente del PET, ya que también en ese experimento con el material activo se estudió la relevancia del tamaño de inóculo.

### 4.3. Estudio de la influencia de la concentración de aceite esencial y de inóculo: envase de PET activo con canela en fase vapor

Como se ha explicado anteriormente, este experimento también tuvo como uno de sus objetivos, el estudiar la influencia del tamaño del inóculo en la acción alcanzada por el envase activo. Sin embargo, en este caso la evaluación se llevó a cabo con films de PET activos, en un rango de concentración de canela de 2 %-8 % (PET 2 %-8 %).

#### 4.3.1. "Short-term evaluation" o evaluación a corto plazo

En la figura 3.7 se observan los resultados del crecimiento a corto plazo de *A. flavus* con las láminas control o testigo (PET 0 %) y activos con canela (PET 2 %).



**Fig. 3.7** PET activo con canela en fase vapor frente a *A. flavus*.

Las barras corresponden a PET control (0 %) y activo (2 % canela). El eje vertical corresponde a una escala cualitativa descrita en el texto (0-4 puntos), considerando las tres réplicas. Las concentraciones de inóculo (0) y (-1) corresponden a  $10^6$  y  $10^5$  CFU/mL respectivamente. La dilución siguiente ( $10^4$  CFU/mL) no se representa en el diagrama ya que fue completamente inhibida a todas las concentraciones de PET activo.

El crecimiento de *A. flavus* en las placas control (PET 0 %) mostró un ligero retraso entre las concentraciones de  $10^6$  CFU/mL y  $10^5$  CFU/mL, traduciéndose en el segundo caso en una intensidad de esporulación algo menor. Sin embargo, esta apreciación no modificó la escala

aplicada de 5 puntos (desde 0 a 4), ya que además de ser cualitativa, no es lo suficientemente sensible como para poder reflejar este hecho.

Por otra parte, el control de la concentración más baja de *A. flavus* ( $10^4$  CFU/mL) alcanzó el crecimiento total un día más tarde respecto a las otras, pero debido a que los films activos inhibieron completamente el crecimiento en todas las réplicas de esta concentración, ésta no se muestra en el diagrama. Lo mismo ocurre en relación a las concentraciones de canela de 4 %, 6 % y 8 % ya que las tres produjeron inhibición total en todos los casos. Debido a esto, la figura 3.7 sólo muestra los datos que pueden representarse, que son los correspondientes al control y PET 2 % canela frente a  $10^6$  y  $10^5$  CFU/mL.

Como podemos observar en la figura 3.7, las barras negras muestran el crecimiento paulatino de *A. flavus* control (a  $10^6$  y  $10^5$  CFU/mL), el cual llegó a su totalidad a los cuatro días de experimento. El PET activo con 2 % de canela inhibió totalmente el crecimiento de *A. flavus* en el caso de la concentración más baja de inóculo ( $10^4$  CFU/mL), causando en las otras dos un retraso en el crecimiento del moho, siendo éste más evidente en el caso de la concentración intermedia. De esta manera, el PET 2 % con la concentración más alta de inóculo (barras color salmón) creció de manera completa un días más tarde que el control (barras color negro), mientras que en el caso de  $10^5$  CFU/mL el promedio de las réplicas no alcanzó el crecimiento total al cabo de 12 días de experimento (barras color verde).

Debido por tanto a las diferencias de crecimiento obtenidas entre el PET 0 % y PET 2 %, se hizo referencia a esta última como concentración “sub-inhibitoria”. Por otra parte, a las concentraciones superiores de canela (PET 4 %-8 %) inicialmente se les denominó “inhibitorias”, ya que no produjeron crecimiento del moho en ningún caso.

#### ***4.3.2. “Long-term evaluation” o evaluación a largo plazo***

Como se ha comentado previamente en la metodología correspondiente (ver apartado 3.8), las placas siguieron incubándose hasta un periodo de dos meses para evaluar la durabilidad de la acción antifúngica obtenida. Las tres réplicas de  $10^5$  CFU/mL expuestas al PET con 2 % de canela que habían mostrado un crecimiento medio siguieron creciendo lentamente tras los 12 días de ensayo, alcanzando el crecimiento total una semana más tarde. Sin embargo, el resto de placas activas donde se había conseguido inhibir el crecimiento del moho durante los 12 días de experimento, siguieron manteniendo la misma

actividad durante los dos meses. De esta manera quedó demostrada la durabilidad de los films activos.

Además de esto, a la hora de preparar los materiales, parte de estos se guardaron en nevera durante un periodo de 2 meses, para poder así estudiar la estabilidad de los mismos. La evaluación posterior de los mismos se llevó a cabo por medio del mismo experimento, pero con los materiales almacenados en lugar de los recién preparados. La única diferencia que se observó fue en relación a la concentración sub-inhibitoria (PET 2 %), donde en las concentraciones de inóculo intermedia ( $10^5$  CFU/mL) y baja ( $10^4$  CFU/mL), el moho consiguió crecer completamente en una de las placas, mostrando inhibición total en las otras dos réplicas. La dilución más alta de inóculo se comportó mostrando también un retraso del crecimiento de manera semejante al experimento 4.2. Por otra parte, las concentraciones de canela de 4 %- 8 % volvieron a demostrar su alto poder inhibitorio, ya que impidieron cualquier desarrollo del moho a las tres concentraciones de inóculo.

#### ***4.3.3. Determinación de la actividad “fungicida” o “fungiestática”***

Por último, se evaluaron estas últimas placas donde el PET 4 %- 8 % había inhibido por completo el crecimiento de *A. flavus* para comprobar si la actividad era “estática” o “cida”, por medio de dos métodos tal y como se explicó en el apartado correspondiente (3.8).

En los resultados de ambos métodos se observó que el moho que había conseguido inhibición total durante los dos meses del primer experimento, no consiguió volver a crecer, confirmando así la acción fungicida de esas concentraciones tras ese tiempo de exposición, por lo que dichas concentraciones se denominaron de aquí en adelante, “fungicidas”.

#### ***4.3.4. Influencia de la concentración de inóculo y de aceite esencial***

Este experimento ha vuelto a demostrar, de la misma manera que en los anteriores de este capítulo, la enorme relevancia no sólo de la concentración de activo sino del tamaño del inóculo. Una vez más, resulta evidente que ambas guardan una estrecha relación.

La importancia de la concentración de activo se ha señalado también en múltiples trabajos. Por ejemplo, se ha demostrado que concentraciones diferentes de aceite esencial de boldo, poleo y clavo, actúan en diferente grado en la fase Lag del moho y en el contenido de aflatoxina B1 (Passone M. A., et al., 2013). Esta misma conclusión en cuanto a la

influencia de la concentración del aceite esencial en la actividad del mismo la han encontrado múltiples autores, entre los que podemos citar los siguientes (Bluma R., et al. , 2009; Gutiérrez L., et al., 2010; López P., et al., 2007a; Matan N., et al. , 2006; Rodríguez A., et al. , 2008; Velázquez-Nuñez M. J., et al., 2013).

Sin embargo, como se ha comentado en el punto 4.1, hay menos estudios en cuanto a la influencia de la concentración de inóculo. Además de los trabajos mencionados en dicho apartado, podemos destacar en el caso de los mohos alterantes de alimentos, el trabajo de Rasooli I., et al. (2006) donde se evidenció claramente el efecto del tamaño del inóculo en la cinética de muerte de *A. niger* frente a una variedad del tomillo. Además, Wilkinson H. H., et al. (2004) asociaron el incremento en la concentración de esporas con las diferentes etapas de producción de aflatoxina B1 y de sus metabolitos precursores.

No se han encontrado datos hasta el presente de la influencia de la concentración de inóculo de moho en la actividad en fase vapor de un envase activo. Este estudio es clave a la hora de poder optimizar la concentración de activo necesaria, ya que como es lógico, conseguir la concentración mínima de agente activo no sólo abarata el coste del envase, sino que asegura la aceptación sensorial del alimento por parte del consumidor.

Sin embargo, como veremos en el punto siguiente (4.4), también es necesario tener en consideración las diferentes situaciones que pueden tener lugar durante el almacenamiento del producto y en qué grado afectan éstas a la actividad del envase antifúngico.

#### **4.4. Estudio de un envase activo con canela, a diferente pH y temperatura**

En este caso, se evaluó el crecimiento de una sola concentración de inóculo ( $10^6$  CFU/mL) de *A. flavus* 2949, *A. flavus* 2687, *P. roqueforti* y *P. expansum*, bajo PP control (PP 0 %) y PP activo (2 %- 6 % canela), en diferentes condiciones de temperatura y pH. Cabe recordar, que la diferencia entre las dos cepas de *A. flavus* empleadas radica en la producción de aflatoxina B1 (micotoxina altamente carcinogénica) por parte de la segunda de ellas.

El crecimiento del moho producido se midió utilizando la misma escala cualitativa que en el experimento anterior, la cual establecía un total de cinco puntos de crecimiento

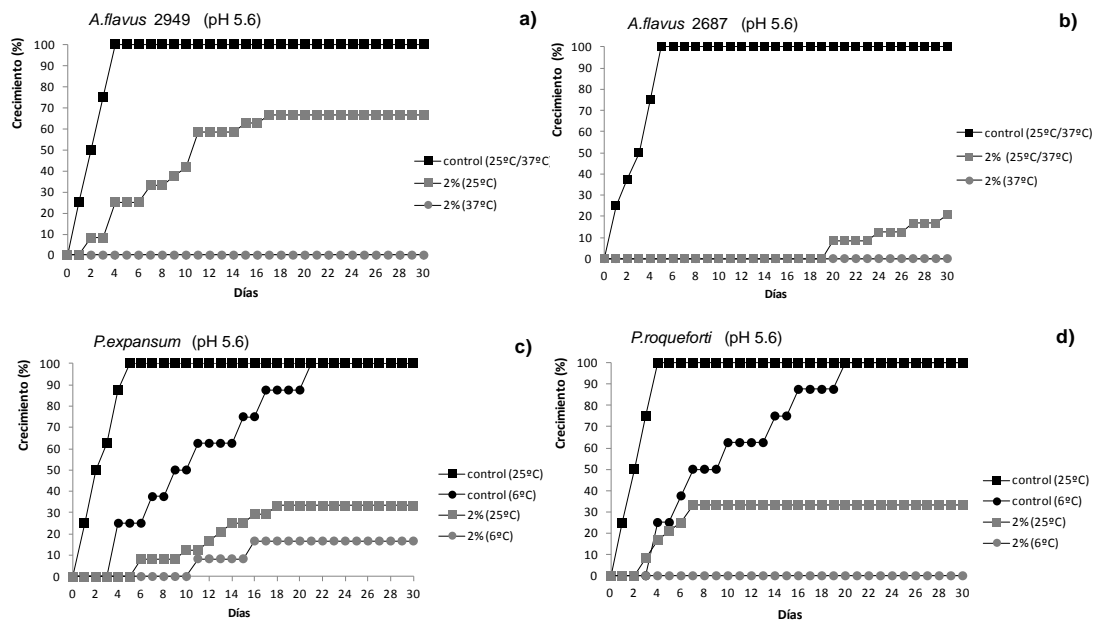
(figura 3.4): (0) nada de crecimiento, (1) poco, (2) medio, (3) fuerte y (4) total. En este caso, en vez de representar el resultado promedio de las tres réplicas como se hizo en el experimento del PET, se eligió hacerlo en porcentaje de crecimiento. Para ello, se sumaron los puntos correspondientes de cada una de las tres réplicas de cada opción, convirtiendo la suma en porcentaje de crecimiento respecto al control (PP 0 %), donde los 12 puntos totales (4 puntos por réplica) corresponden a un 100 % de crecimiento. Hay que tener en cuenta que igual que ocurría en el experimento anterior, en el caso de existir un crecimiento parcial el grado de crecimiento alcanzado no constituye un valor absoluto, sino que más bien nos está indicando una tendencia de mayor o menor actividad. Esto se pone aún más de manifiesto en el caso de pequeñas diferencias que la escala no es capaz de distinguir, como puede ser la apreciación de una ligera reducción en la intensidad de la esporulación.

Respecto a la actividad general, los PP activos mostraron una actividad muy similar al PET, ya que de nuevo la concentración sub-inhibitoria volvió a corresponder al PP 2 % CIN, mientras que las concentraciones superiores, en este caso 4 % y 6 % de canela, inhibieron el crecimiento de *A. flavus* por completo. Por lo tanto, igual que ocurría antes, en las figuras 3.8 y 3.9 sólo se representan la concentración sub-inhibitoria (PP 2 %) y los controles, bajo las diferentes condiciones de incubación estudiadas para cada cepa.

Además de esto, tras haber demostrado en el capítulo anterior la influencia que las variables y pH ejercen sobre el crecimiento normal del moho, se quiso estudiar cómo afectaban éstas a la actividad en fase vapor del envase activo.

#### ***4.4.1. Influencia de la temperatura en la actividad de PP con canela en fase vapor***

En primer lugar, se evaluó la actividad de los films de PP con canela bajo diferente temperatura y sin modificar el pH del medio de cultivo (es decir, a pH 5.6). Los resultados se muestran en la figura 3.8.



**Fig. 3.8** PP activo con canela en fase vapor a diferente temperatura y pH 5.6. Crecimiento de *A. flavus* 2949 (a), *A. flavus* 2687 (b), *P. expansum* (c) y *P. roqueforti* (d) bajo PP control (0 %) y PP activo (2 % canela). El eje vertical corresponde al porcentaje de crecimiento, calculado en relación a una escala cualitativa (0-4 puntos) descrita en el texto, considerando las tres réplicas. Ambas cepas de *A. flavus* se evaluaron a 25 °C y 37 °C, y las dos de *Penicillium* a 25 °C y 6 °C.

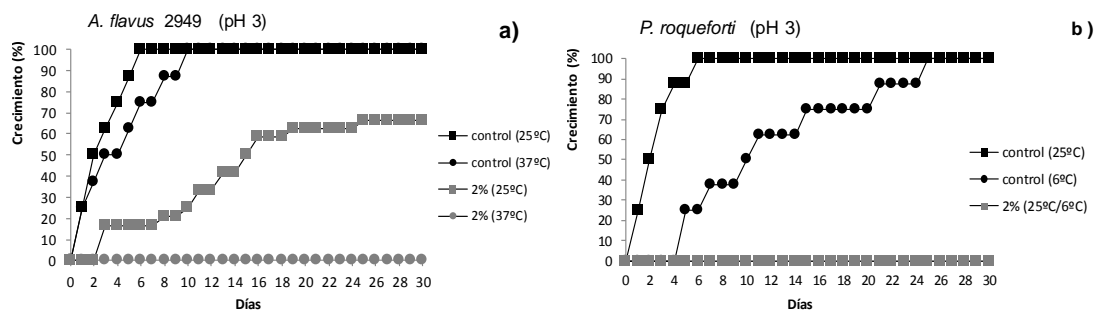
Como se puede observar, el crecimiento del moho se vio afectado por la temperatura. En el caso de las dos cepas de *A. flavus*, el PP 2 % con canela inhibió completamente el crecimiento de ambas a 37 °C (figura 3.8 a, b). En el caso de 25° C, *A. flavus* 2949 experimentó un crecimiento total en dos de las tres réplicas (66 % de crecimiento), mientras que en *A. flavus* 2687 sólo creció una de ellas de manera parcial y que además empezó tras los 20 días de incubación (llegando a un total de 20.83 %). La inhibición total producida por PP 2 % a 37 °C puede ser debida a una disminución en la tasa de esporulación en las dos cepas de *A. flavus* a esa temperatura.

Por otra parte, la temperatura de 6 °C produjo un esperado retardo en el crecimiento y en la esporulación de los dos controles de *Penicillium* (figura 3.8 c, d). Es evidente por tanto, que la influencia concomitante de la temperatura y la canela, explica la gran actividad del PP 2% observada en este caso, ya que sólo una placa de *P. expansum* creció de manera parcial (16.66 %), encontrando inhibición total en *P. roqueforti*.



#### 4.4.2. Influencia de la temperatura y del pH en la actividad de PP con canela en fase vapor

Tras el experimento anterior, se quiso estudiar la actividad de los films activos con canela a pH 3 (figura 3.9). De la misma manera, se evaluó la actividad antifúngica del material en fase vapor bajo las dos temperaturas de incubación establecidas para cada cepa, en este caso *A. flavus* 2949 y *P. roqueforti*.



**Fig. 3.9** PP activo con canela en fase vapor a diferente temperatura y pH 3. Crecimiento de *A. flavus* 2949 (a) y *P. roqueforti* (b) bajo PP control (0 %) y PP activo (2 % canela). El eje vertical corresponde al porcentaje de crecimiento, calculado en relación a una escala cualitativa (0-4 puntos) descrita en el texto, considerando las tres réplicas. Ambas cepas de *A. flavus* se evaluaron a 25 °C y 37 °C (a,b,e), y las dos de *Penicillium* a 25 °C y 6 °C (c,d,f). Además, *A. flavus* 2949 (e) y *P. roqueforti* (f) se estudiaron a pH 3.

Como se puede observar al comparar las figuras 3.8 (a,d) y 3.9 (a,b), los controles de ambas cepas incubados a 25 °C crecieron dos días más tarde al disminuir a pH 3 el medio de cultivo. Sin embargo, el cambio de los controles fue mayor en el caso de las temperaturas de 37 °C y 6 °C. Comparando ambos pH encontramos un retraso de crecimiento de 6 días en el caso de *A. flavus* a 37 °C (figura 3.8 a y figura 3.9 a) y de 5 días en *P. roqueforti* a 6 °C (figura 3.8 d y figura 3.9 b). De esta manera, los controles de ambas cepas mostraron un comportamiento similar ante la disminución de pH. Sin embargo, en el caso de las muestras PP 2 %, el pH resultó ser más influyente en *P. roqueforti*, donde de nuevo parece razonable asociar la reducción del crecimiento de 33.33 % a pH 5.6 hasta la inhibición total a pH 3 (a 25 °C), a la influencia que el pH ha demostrado ejercer sobre la velocidad de crecimiento y esporulación del moho.

Por tanto, las muestras activas mostraron un decrecimiento del moho que se vio reforzado en aquellos casos donde las condiciones de cultivo no fueron óptimas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde a pesar de que los

cambios en pH y temperatura no provocaron cambios en las determinaciones de MIC y MFC, sí que demostraron influir claramente en el desarrollo de la colonia del moho control. En esta ocasión, se ha omitido la comparación bibliográfica con los resultados de otros autores, ya que dicha discusión se encuentra en el apartado correspondiente del capítulo 2.

#### **4.4.3. Determinación de la actividad “fungicida” o “fungiestática”**

En este caso, la determinación de la actividad fungicida o fungiestática se llevó a cabo tras un estudio preliminar de PP activo con canela sobre el moho *A. flavus* (datos no mostrados), donde los films de PP 4 % y 6 % mostraron el mismo poder inhibitorio de siempre. Esas láminas se liberaron de la exposición del aceite esencial de la misma manera que en el experimento del PET (apartado 3.7), tras sólo 15 días de haber estado el moho expuesto. No se obtuvieron crecimientos en ninguna de las resiembras hechas, de manera que de nuevo se confirmó la acción fungicida de PP 4 % y PP 6 % tras 15 días de exposición.

#### **4.5. Discusión de los resultados de otros autores: actividad del envase activo**

Como se ha visto en la introducción del presente capítulo, el material empleado en un envase activo influye en un alto grado en la actividad antimicrobiana alcanzada. Además, la elevada heterogeneidad en la composición de los aceites esenciales y la influencia del sustrato del envase activo en los estudios antimicrobianos, dificulta enormemente la comparación de resultados. Con esta intención, los experimentos realizados en la presente tesis constan de los mismos materiales de envase y aceites esenciales que los empleados previamente por compañeros del mismo grupo GUIA. Debido a esto, la utilización de esos datos ha servido como base a la hora de diseñar varios experimentos de la presente tesis, lo cual explica que exista una referencia tan sólida hacia aquellos trabajos realizados dentro del grupo GUIA.

La comparación de los resultados obtenidos en este capítulo con los polímeros sintéticos se abordará en el primer apartado de esta discusión.

Por otra parte, a pesar de no haberse utilizado en la presente tesis, se ha querido incluir en la presente discusión, un resumen sobre algunos puntos destacables en cuanto a la actividad antimicrobiana del papel parafinado y de los materiales biodegradables.

#### ***4.5.1. Comparación de la actividad antifúngica de los polímeros sintéticos***

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de los films activos de PET y PP están en concordancia con los experimentos previos llevados a cabo en el grupo GUIA con los polímeros sintéticos. Cabe destacar dos trabajos íntimamente relacionados entre sí, que evaluaron la capacidad antimicrobiana de films de diferentes materiales plásticos (PP y el copolímero PE/EVOH (Poliétileno/ vinil alcohol), con los aceites esenciales de canela y orégano (Gutiérrez L., et al., 2010; López P., et al., 2007a). De la misma manera que los datos presentados en este capítulo, en ambos trabajos se consiguió una inhibición completa de los mohos estudiados, con un 4 % de canela en fase vapor. Sin embargo, en ambos casos se apreció una mejor actividad con el PP que con el copolímero, ambos evaluados a la misma concentración nominal de activo, encontrando además una concentración más alta de los compuestos volátiles en las atmósferas del primer material. Esto se debe a una mayor interacción de los compuestos detectados, carvacrol (y timol en menor grado) en el caso del orégano, y cinamaldehído en el caso de canela con la matriz PE/EVOH, ya que el EVOH es muy polar. La difusión de los compuestos a través del PE donde se aplica el recubrimiento activo provoca que los grupos funcionales polares presentes en orégano y canela, fundamentalmente grupos hidroxilo y aldehído, alcancen el EVOH e interaccionen con él, y se fijen por tanto en mayor grado en la matriz que contiene de EVOH que en el PP, provocando entonces una mayor retención (Gutiérrez L., et al., 2010; López P., et al., 2007a). La liberación de carvacrol desde EVOH ha sido ampliamente estudiada por los autores Cerisuelo et al. En un primer trabajo crearon un modelo matemático, donde determinaron la liberación de carvacrol desde films de PP y de EVOH (EVOH-29), en diferentes condiciones de humedad relativa (HR), mediante la constante de Henry's. Mientras que la liberación de carvacrol desde el PP fue constante y apenas cambió con la HR, en el caso de EVOH éste sólo se liberó en gran medida frente a condiciones de elevada humedad. Los autores explicaron este hecho de la misma manera que la comentada anteriormente. Esto es, la retención de carvacrol en EVOH es debido a la interacción de la estructura fenol de éste con los grupos OH del polímero. En cambio, al aumentar la humedad relativa se reduce la solubilidad de carvacrol en el polímero, debido a la naturaleza altamente hidrofílica del EVOH que en presencia de humedad debilita los puentes de hidrógeno intermoleculares, provocando en ese caso una gran liberación del compuesto (Cerisuelo J. P., et al. , 2012b). Utilizando el mismo modelo matemático, estudiaron cómo la incorporación de nanoarcilla de bentonita mejoraba las propiedades del

EVOH anterior (Cerisuelo J. P., et al. , 2012a). Por último, los datos recogidos en ambos trabajos sirvieron para diseñar un envase para salmón, consistente en PP/EVOH/PP, donde gracias al modelo matemático establecido anteriormente, establecieron las condiciones adecuadas para su manufactura y para asegurar la liberación del compuesto y la estabilidad frente a la humedad relativa (Cerisuelo J. P., et al., 2013).

Como se ha visto también en otros trabajos, la liberación de los compuestos activos es mayor por parte de los films monocapa con respecto a los multicapa (Buonocore G. G., et al. , 2005). Esto es lógico, ya que en una multicapa los agentes activos se reparten, mediante el coeficiente de partición, entre los distintos componentes del material multicapa, incluidos los adhesivos.

Sin embargo, se ha demostrado en varias ocasiones, que además de la concentración inicial de activo en el material, la actividad antimicrobiana alcanzada está en función, entre otras variables, de: 1) la velocidad de la liberación de los compuestos, 2) la concentración que llega al medio de cultivo (o alimento), 3) la fase Lag o fase inicial de crecimiento del microorganismo, 4) el tiempo de exposición.

Los autores López P., et al. (2007a) demostraron que tanto cinamaldehído como carvacrol, presentaban un máximo de concentración en torno a las tres horas, disminuyendo más paulatinamente en el caso de carvacrol. Posteriormente, Gutiérrez L., et al. (2010) analizaron la concentración de cinamaldehído y carvacrol que llegaba al agar, donde detectaron concentraciones crecientes de los compuestos al aumentar la concentración nominal de estos en el material, si bien dicho incremento no fue proporcional en ningún caso. Uno de los puntos interesantes del trabajo mencionado, se centra en las concentraciones detectadas de ambos compuestos en dos situaciones diferentes: el crecimiento o no de microorganismos. Los resultados mostraron que en aquellos casos donde se conseguía inhibir el microorganismo, la concentración detectada tanto de cinamaldehído como carvacrol era claramente mayor con respecto a cuando se producía dicho crecimiento. Además, este hecho se tratará con mayor profundidad en el último experimento del capítulo 4 de esta tesis.

Los resultados obtenidos por Gutiérrez L., et al. (2010) mostraron una vez más, que la actividad antimicrobiana no depende sólo de la concentración de activo, ya que los films de PE/EVOH volvieron a ser menos activos, pero en este caso las concentraciones detectadas en el agar para cinamaldehído y carvacrol fueron mayores que para el PP. Sin embargo, para

ejercer el mismo nivel de actividad la concentración necesaria de activo fue mayor en los films de PE/EVOH. De esta manera, la peor eficacia de dicho material respecto a PP se debe a una velocidad de liberación más lenta, que provoca una actividad menor contra el microorganismo durante su fase Lag.

En conclusión, a la hora de diseñar un envase activo hay que tener en cuenta que para conseguir inhibir el crecimiento de un microorganismo, hace falta además que el aceite esencial alcance un umbral mínimo de concentración durante la fase Lag (inicial) de crecimiento del mismo, la cual varía como es natural en relación a la cepa (Gutiérrez L., 2010).

Con respecto a otros autores, se ha investigado la migración de otras sustancias desde polímeros, como es el caso de nisina y natamicina (Hanusová K., et al., 2010). Nostro A., et al. (2012) analizaron la liberación de carvacrol y cinamaldehído midiendo la absorbancia de disoluciones acuosas que contenían trozos de films de EVA (Polietileno co-vinilacetato) al 3.5 % y 7 % de activo. Los resultados mostraron que la cantidad liberada de aceite esencial dependía claramente de la concentración inicial nominal en el polímero. Además, en torno a las 16 horas se produjo en ambos casos la liberación del 60 %-80 % respecto al total del compuesto, siendo mayores las concentraciones detectadas de carvacrol que cinamaldehído. Entre los análisis microbiológicos llevados a cabo, destaca la importante reducción de formación de biofilms sobre los polímeros activos de carvacrol y cinamaldehído respecto al control. Cabe decir que la aparición de dichos biofilms no se debió a una contaminación del material, sino que los formaron mediante incubación del material con diferentes cepas bacterianas en el laboratorio.

#### **4.5.2. Papel parafinado**

Los trabajos previos llevados a cabo en el grupo GUIA demostraron que en el caso del papel parafinado activo, éste necesita una concentración más elevada de canela para poder producir el mismo efecto inhibitorio y fungicida que el obtenido en este capítulo con ambos materiales plásticos. Concretamente en uno de los trabajos, Rodríguez A., et al. (2008) evaluaron un papel parafinado que contenía el mismo aceite esencial de canela que el empleado en nuestro caso, pero frente a una carga microbiana mucho menor ( $10^2$  CFU/mL) del moho *Rhizopus stolonifer*. La concentración de canela necesaria fue mayor que en los experimentos presentados en el capítulo, ya que los papeles activos comenzaron a mostrar

actividad a partir del 2%, consiguiendo una inhibición moderada con el 4 % y una inhibición total al 6 %. Si comparamos estos datos con el experimento del PET de este capítulo, vemos que efectivamente se necesitó una concentración de activo mucho mayor, ya que además la diferencia de inóculo utilizado en ambos experimentos, de  $10^2$  CFU/mL en el papel parafinado a  $10^6$  CFU/mL en el PET, es altamente determinante.

Por otra parte, las pruebas de migración del activo en pan de molde revelaron una vez más, que la actividad alcanzada depende de la fase Lag del microorganismo. De esta manera, a pesar de que los papeles con una concentración de canela del 6 % fueron más activos que los del 4 %, no se detectaron en el pan diferencias significativas entre ambos porcentajes dentro de cada activo. En un trabajo posterior con tomates cherry, donde se analizó la actividad antifúngica de un papel kraft parafinado a las mismas concentraciones de canela y orégano que las previas, se detectó también una concentración más elevada en el tomate en el caso de orégano que de la canela, a pesar de resultar más activo el envase con ésta última. El perfil de ambos compuestos reveló una rápida liberación en ambos casos dentro de las tres primeras horas de experimento (Rodríguez-Lafuente A., et al., 2010).

#### ***4.5.3. Materiales biodegradables***

Tal y como se mostró en la tabla 0.3 de la introducción general, los materiales biodegradables presentan limitaciones en cuanto a sus elevadas permeabilidades al vapor de agua, a los gases y a su limitada resistencia mecánica. Además de esto, la velocidad de liberación de los compuestos activos, es en muchas ocasiones dependiente de la humedad relativa y la temperatura tal y como muestran los siguientes trabajos llevados a cabo con diferentes materiales (Balaguer M. P., et al., 2013b; Balaguer M. P., et al., 2013c; Chalier P., et al., 2009; Mascheroni E., et al., 2011).

### **4.6. Discusión de los resultados de otros autores: durabilidad y estabilidad de la acción antimicrobiana del envase activo**

#### ***4.6.1. Durabilidad y estabilidad de los polímeros sintéticos***

Los dos experimentos llevados a cabo en este capítulo (PET y PP), han demostrado una actividad duradera en el tiempo, ya que las inhibiciones alcanzadas se mantuvieron constantes durante varios meses. Así mismo, la estabilidad de los mismos se comprobó en

el experimento del PET, donde se vio que las láminas analizadas dos meses después de su preparación, guardaban la misma actividad que aquellas que se evaluaron inmediatamente.

Ambos parámetros son muy importantes para la industria, ya que se necesita que la acción sea duradera y estable en el tiempo. Por ello, diversos autores han analizado la influencia de los mismos. Así, Suppakul P., et al. (2011) demostraron que a pesar de que las concentraciones de los compuestos de albahaca en films de LDPE disminuyeron al cabo de un año, la actividad antimicrobiana de los mismos no varió, confirmando así la enorme estabilidad y durabilidad de la acción antimicrobiana inicial.

#### ***4.6.2. Permeabilidad de los polímeros sintéticos y modificación de su estructura tras la adición de activo***

También dentro de los diferentes polímeros sintéticos, las propiedades cambian. Según se recoge en un trabajo del año 1995, la permeabilidad tanto al oxígeno como al dióxido de carbono se situaría en este orden decreciente: LDPE (Polietileno de baja densidad) > PS (poliestireno) > PC (Policarbonato) > PP (Polipropileno) > HDPE (Polietileno de alta densidad) > BiOPP (Biaxial orientado Polipropileno) > PET (Polietileno Tereftalato) > PVdC (cloruro de Polivinilideno). En el caso de la permeabilidad a la humedad, los resultados fueron muy similares destacando sólo la mayor permeabilidad del PS frente a la menor del PVdC. (Hertlein J., 1995). A pesar de que el EVOH (etilen-vinil alcohol) no se estudió en ese trabajo, se sabe que éste proporciona muy alta barrera frente a los gases en ausencia de humedad mientras que pierde estas propiedades con la humedad. Es por ello, que el EVOH se utiliza como capa interna en muchas estructuras multicapa, reforzando así su baja barrera frente a la humedad y pudiendo ser utilizado en numerosas aplicaciones de envase (Aucejo S., et al. , 2000).

En este contexto, los envases de LDPE y HDPE no serían apropiados para el almacenamiento de hierbas, ya que su elevada permeabilidad a los gases provoca una pérdida considerable de los compuestos volátiles, siendo más conveniente, por ejemplo, algunas estructuras multicapa (Chaliha M., et al. , 2013). Sin embargo, el LDPE sigue estudiándose como envase activo (Vasile C., et al. , 2013), así como el PP (Torlak E., et al. , 2013). Otros materiales, como el copolímero PP/PVA han demostrado su aplicación in vivo al preservar la calidad de la carne fresca durante más tiempo, gracias a la actividad del aceite esencial de canela y del extracto de ruibarbo (Chen G., et al., 2014).

El uso tan extensivo del PET en la fabricación de botellas se debe fundamentalmente a que es un polímero muy puro, semicristalino, fácil de procesar y con bajas permeabilidades a la humedad y a los gases (Minelli M., 2014). Destacan también sus elevadas propiedades mecánicas y su estabilidad química (Gohil R. M., 2012). Sin embargo, quizá la característica más interesante sobre éste es la posibilidad de utilizar PET reciclado, cuya aceptación para uso alimentario ha ganado mucho en los últimos años debido al desarrollo de la tecnología de reciclado que permite una descontaminación eficaz. Hay que destacar además que esto es posible por la poca capacidad de absorción del PET de otros contaminantes y la difícil difusión de los mismos en el seno del polímero. Uno de los trabajos recientes encontrados, muestra la actividad antifúngica de un envase activo con PET reciclado (Junqueira-Gonçalves M. P., et al., 2013).

Además, en contraste con algunos de los materiales biodegradables citados anteriormente, los films EVA (copolímero de etileno y Acetato de vinilo) no sufrieron modificaciones en su superficie tras la aplicación de los aceites esenciales de carvacrol y cinamaldehído (Nostro A., et al., 2012) así como de citronela, linalol y eugenol (Nostro A., et al., 2013).

Tras la exhaustiva revisión bibliográfica, resulta evidente que la elección del polímero es un paso esencial para conseguir un material eficaz en la propiedad del producto. Como señalan Catalá R., et al. (2009), la selección del material deberá tener en cuenta las condiciones de conservación y de vida útil deseadas para cada producto.

De esta manera, a pesar de que en los últimos años ha aumentado considerablemente el estudio de nuevos materiales, los polímeros sintéticos siguen siendo hoy en día muy utilizados, ya que en general ofrecen grandes prestaciones en cuanto a la reducida permeabilidad a los gases y a la gran resistencia mecánica que soportan. Por tanto, a día de hoy las propiedades funcionales de los materiales biodegradables no son comparables a los polímeros sintéticos, tal y como se mostró en la tabla 03 de la introducción general de esta tesis. como bien recoge un completo trabajo sobre el tema (Wihodo M., et al., 2013).

Para finalizar, los experimentos de este capítulo han demostrado que el envase activo constituye una alternativa eficaz para conseguir la protección del producto desde el inicio del proceso. Esto evitaría la propagación de esporas que produce en muchos casos la contaminación de los productos adyacentes. Como se verá en el último capítulo de la presente tesis, el envase activo no sólo es capaz de inhibir el crecimiento del moho, sino de



reducir o evitar la producción de micotoxinas, que son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de mohos, muchas de ellas con reconocida toxicidad y carcinogenicidad.

Además, las buenas propiedades demostradas a largo plazo por un lado en cuanto a la durabilidad de su actividad y a la estabilidad del material, presenta a los polímeros sintéticos como buenos candidatos para el envase activo a nivel industrial, ya que son capaces de mantener por otro lado su actividad bajo diferentes condiciones de cultivo.

Por último, aunque no se ha trabajado con ello en esta tesis, cabe mencionar que desde hace años se investiga el uso de atmósfera modificada para evitar el crecimiento fúngico. Merece la pena destacar tres excelentes trabajos llevados a cabo en pan, donde en el primero consiguen la inhibición mediante diferentes concentraciones de nitrógeno y dióxido de carbono (Guynot M. E., et al. , 2003), y en los otros dos adicionan la atmósfera modificada a un envase activo (Nielsen P. V., et al. , 2000; Suhr K. I., et al. , 2005).

## 5. CONCLUSIONES

En primer lugar, se ha destacado la importancia de estudiar la influencia de la concentración de inóculo y de la concentración de aceite esencial en la actividad antifúngica alcanzada. Sin embargo, los datos obtenidos respecto a las seis sustancias evaluadas (canela, cinamaldehído, orégano, carvacrol, clavo y eugenol), muestran una clara diferencia entre ellas. De esta manera, el aceite esencial de canela y su compuesto mayoritario (cinamaldehído), fueron los compuestos donde se encontró una mayor influencia en la actividad al variar la concentración de inóculo. Una de las posibles razones que explicaron este hecho, fue la existencia de un mecanismo de acción claramente más complejo de canela y cinamaldehído respecto a las otras sustancias evaluadas.

Además de esto, la actividad en fase vapor del aceite esencial de canela demostró en el experimento del disco de difusión, ser más dependiente de la concentración de inóculo que de la concentración de aceite esencial. Por su parte, el experimento de PET reveló una vez más, que la eficacia de la actividad depende en alto grado de la concentración inicial de inóculo.

Respecto a la actividad producida por el envase activo, ambos materiales produjeron el mismo grado de actividad. De esta manera, la incorporación de un 2 % de canela en los films de PP y PET, produjo un claro enlentecimiento del moho respecto al control, constituyendo así la concentración sub-inhibitoria. Las concentraciones superiores (a partir del 4 % de canela), ejercieron en ambos materiales un efecto inhibitorio que demostró ser no sólo fungiestático sino también fungicida.

El experimento del PP demostró la buena actividad alcanzada bajo las diferentes variables de temperatura y pH evaluadas. Los datos obtenidos mostraron que los compuestos volátiles del aceite esencial de canela fueron capaces de ejercer su acción antifúngica incluso en la temperatura de nevera (6 °C). En resumen, la modificación de las condiciones de dichas variables, vio ligeramente reforzada la actividad antifúngica, debido a un menor crecimiento del moho bajo condiciones extremas (como por ejemplo, pH 3 y 6 °C).

Ambos materiales demostraron también poseer no sólo actividad a corto plazo, sino también a largo plazo, debido a una larga duración de la actividad. Además, en el caso del

PET, la estabilidad de los materiales quedó demostrada tras obtener el mismo resultado de actividad antifúngica con films almacenados durante dos meses que con aquellos preparados inicialmente.

Para terminar, y tal y como se ha demostrado por tanto a lo largo de este capítulo, el aceite esencial de canela se presenta como un agente de elección para su aplicación en fase vapor. Además, ambos materiales han mostrado ser adecuados, haciendo del envase activo un sistema eficaz y fiable, capaz de garantizar la protección del producto por medio de la inhibición de su crecimiento fúngico. Como se verá en la última parte de la tesis, esta actividad se complementa así mismo con una posible reducción de la producción de micotoxinas.

Por último, hay que considerar siempre, que cuanto antes se aplique el envase activo, la respuesta alcanzada será mucho mayor, ya que tanto la concentración de inóculo como la fase Lag del moho ejercen un efecto directo sobre la actividad del envase. Este aspecto es vital, ya que permite aplicar una concentración de aceite esencial más baja, traduciéndose en una mayor aceptación sensorial del producto y en un menor encarecimiento en la producción del envase.

# CAPÍTULO 4

---

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

- 1. Introducción*
- 2. Objetivos*
- 3. Materiales y métodos*
- 4. Resultados y discusión*
- 5. Conclusiones*



## 1. INTRODUCCIÓN

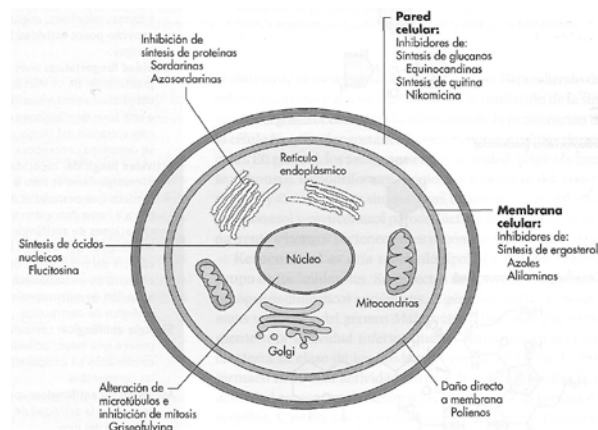
A pesar de que la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de los aceites esenciales, se ha querido aprovechar esta introducción para exponer brevemente el mecanismo de acción de los principales antifúngicos clínicos. A diferencia de lo que ocurre con los aceites esenciales, estas sustancias sintéticas son diseñadas con el objetivo de actuar frente a una diana en concreto, lo que implica un necesario y profundo conocimiento previo.

En el caso de los aceites esenciales, la heterogeneidad en su composición provoca en muchos casos un daño multi-target previo a la muerte celular. Sin embargo, como es evidente, esto variará en relación a la composición del aceite esencial y también de la cepa de moho. Debido a esto, muchos de los estudios de mecanismo de acción se llevan a cabo con los compuestos mayoritarios de dicho aceite esencial, para así minimizar las posibles interacciones entre los componentes de éste. Los datos de su mecanismo de acción encontrados hasta el momento, obtenidos tanto en esta propia tesis doctoral como por otros autores se verán a lo largo de la parte experimental de este capítulo.

El estudio del mecanismo de acción es un paso fundamental para poder optimizar el desarrollo de un envase activo. En primer lugar, permite estudiar las posibles aplicaciones del mismo, conocer los factores que pueden influir en su actividad, así como la concentración necesaria de activo y las posibles combinaciones más efectivas. Además de esto y como veremos en este primer punto de la introducción, el estudio del mecanismo de acción arroja información vital para entender los posibles mecanismos de resistencia que pueden desarrollar los microorganismos.

### **1.1. Los antifúngicos clínicos y su mecanismo de acción**

Como hemos visto a lo largo de la tesis, los hongos son microorganismos no sólo capaces de alterar casi cualquier producto alimentario, sino que también son responsables de importantes micosis. Los antifúngicos clínicos que se administran desde hace años para su tratamiento son ampliamente conocidos, los cuales actúan atacando dianas específicas del hongo. Debido a una mayor complejidad estructural, estos presentan un mayor número de dianas que las bacterias, tal y como se aprecia en la figura 4.1 (Murray P. R., et al. , 2006).



**Fig. 4.1** Posibles dianas de los antifúngicos.  
(Murray et al. 2006)

Podríamos resumir las sustancias antifúngicas empleadas en clínica en función de las principales dianas frente a la cual actúan. Destacan como los más importantes los polienos, los azoles, las equinocandinas y las aliaminas.

Desde la década de los 50 hasta el descubrimiento de los azoles, los polienos constituyeron el tratamiento de elección. La anfotericina B es el compuesto más importante dentro de estos, cuya acción antifúngica se debe a la unión con el ergosterol de la membrana plasmática de los hongos. Aunque hasta hace unos años se creía que la unión de los polienos al ergosterol de la membrana plasmática causaba en todos los casos la formación de poros y la consecuente permeabilización de membrana y pérdida de componentes celulares, investigaciones más recientes han demostrado que no es necesaria la formación de dichos poros para su acción. Sin embargo, en el caso de formarse estos, la actividad antifúngica se ve reforzada (Delattin N., et al. , 2014). A pesar de que los casos de resistencia a los polienos son excepcionales, el uso de los mismos, principalmente de anfotericina B, se vio restringido debido a los efectos tóxicos producidos, especialmente nefrotóxicos (Delattin N., et al., 2014). Esto se explica debido a que la anfotericina es capaz de unirse también al colesterol presente en las membranas celulares de los mamíferos (Murray P. R., et al., 2006), por lo que la administración de la misma mediante liposomas reduce dichos efectos tóxicos (Delattin N., et al., 2014; Ghannoum M. A., et al. , 1999). Sin embargo, dichas aplicaciones se ven limitadas debido al elevado coste (Murray P. R., et al., 2006).

Los azoles es otro de los grupos más ampliamente investigados en clínica, de los cuales los más conocidos son los imidazoles como miconazol y ketoconazol, y los triazoles como

fluconazol, itraconazol y voriconazol. Dichos compuestos ejercen su acción antifúngica mediante la inhibición de la síntesis de ergosterol, concretamente inhibiendo la enzima lanosterol 14  $\alpha$ -demetilasa que es dependiente del citocromo P450, responsable de la conversión del lanosterol a ergosterol. Esto produce una depleción del ergosterol y un aumento de sus precursores, causando además algunos de ellos una acción estática sobre el crecimiento fúngico (Balkis M. M., et al., 2002; Delattin N., et al., 2014). Además de esto, se ha visto que algunos azoles como el miconazol, inducen la acumulación de ROS en los hongos (Delattin N., et al., 2014). Los hongos tratados por tanto con azoles, presentan una membrana plasmática con alteraciones en su estructura y funciones (Balkis M. M., et al., 2002; Ghannoum M. A., et al., 1999). Como es evidente, también los azoles pueden presentar toxicidad debido a su posible unión con el colesterol de las membranas de los mamíferos, sin embargo la dosis requerida para ello es mucho más elevada que la necesaria para su acción antifúngica (Balkis M. M., et al., 2002; Ghannoum M. A., et al., 1999). Por ejemplo, el voriconazol es 250 veces más activo frente a la enzima fúngica que frente a la mamífera (Ghannoum M. A., et al., 1999). El compuesto que más interfiere con la biosíntesis del colesterol en las membranas de mamíferos es el ketoconazol, y por tanto, el más tóxico de este grupo (Balkis M. M., et al., 2002; Ghannoum M. A., et al., 1999; Murray P. R., et al., 2006). En el caso de las aliainas, éstas presentan la misma diana que los azoles, sin embargo, actúan inhibiendo el primer paso de la síntesis de ergosterol, habiéndose encontrado en este caso un mayor efecto antifúngico debido al incremento de escualeno que a la deficiencia en la producción de ergosterol (Balkis M. M., et al., 2002).

Las equinocandinas son los antifúngicos más recientes dentro de los que se utilizan para el tratamiento clínico. Éstas inhiben la enzima  $\beta$  1,3-glucano sintetasa, que como cabe recordar, es la enzima que cataliza la formación del  $\beta$  1,3-D-glucano, un polisacárido esencial en la estructura de la pared celular fúngica. La principal ventaja es que presentan una diana específica de los hongos, ya que las células de mamíferos no contienen pared celular, sin embargo su espectro es estrecho ya que está limitado a *Candida* y *Aspergillus*. Los compuestos más conocidos son la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina (Delattin N., et al., 2014).



## 1.2. La resistencia a los azoles: un problema emergente

Hace casi 20 años que empezaron a publicarse los primeros datos concernientes a la resistencia de *Aspergillus fumigatus* frente a itraconazol. Desde entonces esta situación ha ido agravándose, hasta el punto de que en el año 2010 dos laboratorios de Estados Unidos detectaron una tasa de resistencia del 50% de *A. fumigatus* frente al itraconazol (Denning D. W., et al. , 2011). Existen numerosos trabajos que señalan el aumento de resistencia de los hongos a estos antifúngicos sintéticos, fundamentalmente a los azoles (Balkis M. M., et al., 2002; Denning D. W., et al., 2011; Ghannoum M. A., et al., 1999; Mortensen K. L., et al. , 2010; Vermeulen E., et al. , 2013). Este hecho es altamente preocupante, ya que se ha determinado que los pacientes que sufren de aspergillosis invasiva resistente a los azoles, presentan un riesgo de mortalidad del 88% (Denning D. W., et al., 2011).

Debido a que los azoles son ampliamente utilizados para la protección antifúngica de los productos agrícolas, desde hace algunos años existe una hipótesis que apunta a que precisamente, el uso extensivo de estos antifúngicos en el ambiente es la causa del aumento de la resistencia encontrada en *Aspergillus*. Una de las evidencias que apoyan esta teoría, es la estructura molecular tan semejante que comparten los triazoles empleados en agricultura y en clínica. Sin embargo, tal y como apunta el “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC, 2013), son necesarios más estudios para confirmar esta hecho.

La resistencia a los azoles se ha convertido en un problema de salud pública, donde existen dos grupos de pacientes claramente afectados: aquellos que presentan aspergillosis que afectan al sistema nervioso central, y aquellos con aspergillosis crónica. Las razones en ambos grupos son diferentes, ya que en el primer caso se debe a que las alternativas probadas han resultado ser menos eficaces que los azoles, mientras que en el segundo caso se trata de un aspecto económico. Hay que tener en cuenta que a día de hoy, los azoles son el único grupo de las sustancias activas frente a *Aspergillus* que pueden administrarse por vía oral, por lo que la sustitución de dichos tratamientos crónicos por otros que requieran de una administración por vía venosa, aumentaría considerablemente los costes (ECDC, 2013).

### **1.3. Los aceites esenciales como alternativa**

Si bien es cierto que en clínica las alternativas son más difíciles de alcanzar, no ocurre lo mismo en el campo agroalimentario. Los datos mostrados hasta el momento parecen indicar, que una sustitución parcial del uso de los antifúngicos sintéticos en agricultura, mejoraría la situación actual en relación a la problemática que plantea el excesivo uso de estos. Como bien se ha expuesto a lo largo de la tesis, el envase activo constituye una opción efectiva para evitar la proliferación microbiana del producto, pudiendo aplicarse además desde las fases iniciales de la cadena, como son el almacenamiento y el transporte del producto, que constituyen etapas críticas en la contaminación del alimento.

### **1.4. Algunas de las técnicas empleadas**

#### ***1.4.1. Microscopía***

Aunque a día de hoy las técnicas microscópicas siguen evolucionando y formando parte de los estudios más complejos, no hay que olvidar que el desarrollo de las mismas se debe a muchos siglos de constante evolución. Sólo basta con echar un vistazo a los hallazgos más notables en cuanto al tema. Zacharias Jensen inventó ya entre los años 1591-1608 el microscopio compuesto, aunque fue Johannes Kepler en 1611 quien mejoró su diseño, en el que tanto el objetivo como el ocular pasaron a ser de tipo convexo (Soto Eguibar E., 1993). El microscopio fue la herramienta responsable de la introducción por primera vez del término “célula” por parte del inglés Robert Hook en 1655, del descubrimiento de los protozoos por parte de Anton Van Leewenhoek en 1674, quien a su vez perfeccionó las lentes del microscopio, del postulado de la teoría celular por Schleiden y Schwann en 1838, etc (Alberts B., et al. , 1994). A esta larga lista habría que sumar una multitud de brillantes científicos que gracias a las técnicas microscópicas pudieron aportar hallazgos claves para la ciencia, como son Robert Koch, Alexander Fleming y Ramón y Cajal entre muchos otros.

A día de hoy, las técnicas microscópicas siguen reinando en el campo de la microbiología. A pesar de que el microscopio óptico se sigue empleando de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios, su límite de resolución de 0.2  $\mu\text{m}$  hace que en muchas investigaciones sean necesarias técnicas superiores. Aunque no vamos a entrar en detalle en cada una de las técnicas que existen en la actualidad, citaremos las que se emplean con mayor frecuencia en micología.

Quizá la diferencia de cuándo aplicar una u otra técnica, estriba en la preparación previa de la muestra. En la microscopía electrónica, con una resolución normal de 0.1 nm, la fuente de iluminación es un haz de electrones que viajan por una columna donde se ha producido vacío, hasta que chocan con la muestra. De esta manera, el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) emplea los electrones que han atravesado la muestra, mientras que el Microscopio Electrónico de Barrido o “Scanning Electron Microscopy” (SEM) utiliza los electrones dispersados o emitidos a partir de la superficie de la muestra. La información que aportan ambos métodos es diferente, ya que el TEM proporciona detalles de orgánulos celulares, necesitando para ello que la muestra se presente en cortes ultrafinos (de 50 a 100 nm), mientras que con el SEM se obtienen imágenes tridimensionales de superficie. Debido al vacío de la cámara en ambos casos, no es posible estudiar la célula viva en estos casos, ya que ésta necesita una etapa previa de fijación y deshidratación. Cabe mencionar que desde hace unos años, la técnica e-SEM o “environmental (ambiental) SEM permite analizar muestras húmedas. Un excelente trabajo del 2008, explica las diferencias entre el SEM convencional, así como el e-SEM y otras técnicas aún más innovadoras como la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) (Kaminskyj S. G. W., et al. , 2008).

Debido a que la microscopía electrónica requiere una fijación de muestra, no es posible analizar las células vivas. Para ello se puede recurrir a la utilización de un microscopio de contraste de fases o a un microscopio de campo oscuro, los cuales permiten la observación directa de la muestra. Sin embargo, a día de hoy una de las técnicas más aplicadas para el estudio del mecanismo de acción de antifúngicos, es la microscopía de fluorescencia, utilizándose con frecuencia un microscopio confocal (Hickey P. C., et al. , 2009; Hickey P. C., et al. , 2005; Riquelme M., et al. , 2007). Básicamente, ésta consiste en el marcaje de orgánulos o zonas de interés dentro de la célula mediante tinciones de fluorescencia (fluorocromos). Las esporas de los mohos presentan irregularidades a la hora de la penetración de los fluorocromos, debido fundamentalmente a la diferencia en el estado germinativo de éstas (Brul S., et al. , 1997; Oakley B. R., et al. , 1985). El completo trabajo de Hickey P. C., et al. (2005), ofrece una información detallada sobre los fluorocromos que han sido utilizados con éxito para la tinción de mohos. Así mismo, presenta la concentración aproximada necesaria para cada uno de ellos, e incluye una explicación del método que se utiliza con frecuencia para el análisis de las hifas, denominado “agar invertido”. Como ya se ha visto en la introducción general de la tesis, la distribución de los orgánulos en la hifa es heterogénea y además, dependiente de la fase de crecimiento de ésta. A pesar de todo,

mediante una correcta manipulación de la muestra y el uso de una concentración óptima de flurocromo, es posible obtener resultados excelentes.

### ***1.4.2. Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)***

El FTIR es una herramienta analítica que dentro del campo de la micología se ha aplicado por un lado con fines de identificación, bien de especies o de metabolitos producidos (Fischer G., et al. , 2006; Naumann A., 2009). Sin embargo, también se ha utilizado para analizar posibles cambios en la composición celular (Saulou C., et al. , 2010; Szeghalmi A., et al. , 2007). En cualquier caso y como se discutirá en el capítulo, hay que tener en cuenta el estado de la muestra de partida para poder así optimizar la preparación de la misma (Fischer G., et al., 2006; Gazi E., et al. , 2005). La radiación infrarroja comprende tres zonas diferente: infrarrojo cercano ( $4000-13000\text{ cm}^{-1}$ ), medio ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) y lejano ( $100-400\text{ cm}^{-1}$ ) (Stuart B., 2004), siendo la zona media donde se llevan a cabo los estudios biológicos.

Cabe recordar que la espectroscopía de infrarrojo es una técnica basada en la vibración de los átomos de una molécula. Para ello, tiene que existir un cambio en el momento dipolar de la molécula durante la vibración (entendido como “infrared-active molecule”). Dentro de lo que se denomina “vibración”, ocurren movimientos de elongación o “stretching” y de deformación o “bending”. Las vibraciones pueden ser simétricas o asimétricas en el caso de “stretching”, o tener lugar dentro y fuera del plano en el caso de “bending” (Stuart B., 2004). De esta manera, el espectro de infrarrojo resultante se obtiene de la fracción de radiación absorbida por una muestra cuando ésta es atravesada por el haz infrarrojo. Por tanto, dicha energía absorbida que se puede observar en cualquiera de los picos de un espectro, corresponde a la frecuencia de vibración. Sin embargo hay que tener en cuenta, que la intensidad de señal obtenida será mayor en las moléculas asimétricas que en las simétricas. De igual modo, cuanto más alejados se encuentren en la tabla periódica los átomos de una molécula, más intensas serán las bandas formadas (Stuart B., 2004).

Por otra parte, la transformada de Fourier (FT) ha ayudado a mejorar la calidad de los espectros de infrarrojo además de a reducir el tiempo necesario para la adquisición de los datos. Esto se produce mediante la interferencia entre dos haces, dando lugar a un interferograma. Para ello, la radiación emitida desde la fuente pasa a través de un interferómetro antes de llegar a la muestra y finalmente al detector. El interferómetro más

utilizado en espectrometría es el de Michelson, que consiste en dos planos perpendiculares entre sí (Stuart B., 2004).

Las diferentes vibraciones que ocurren a lo largo de gran parte o de la totalidad de una molécula forman lo que se conocen como las bandas de un espectro de un infrarrojo, es decir, cada banda observada corresponde al movimiento de vibración de un enlace en concreto. Debido a que cada compuesto posee un comportamiento único, la asociación de estas bandas se conoce como huella dactilar del compuesto o “fingerprint”.

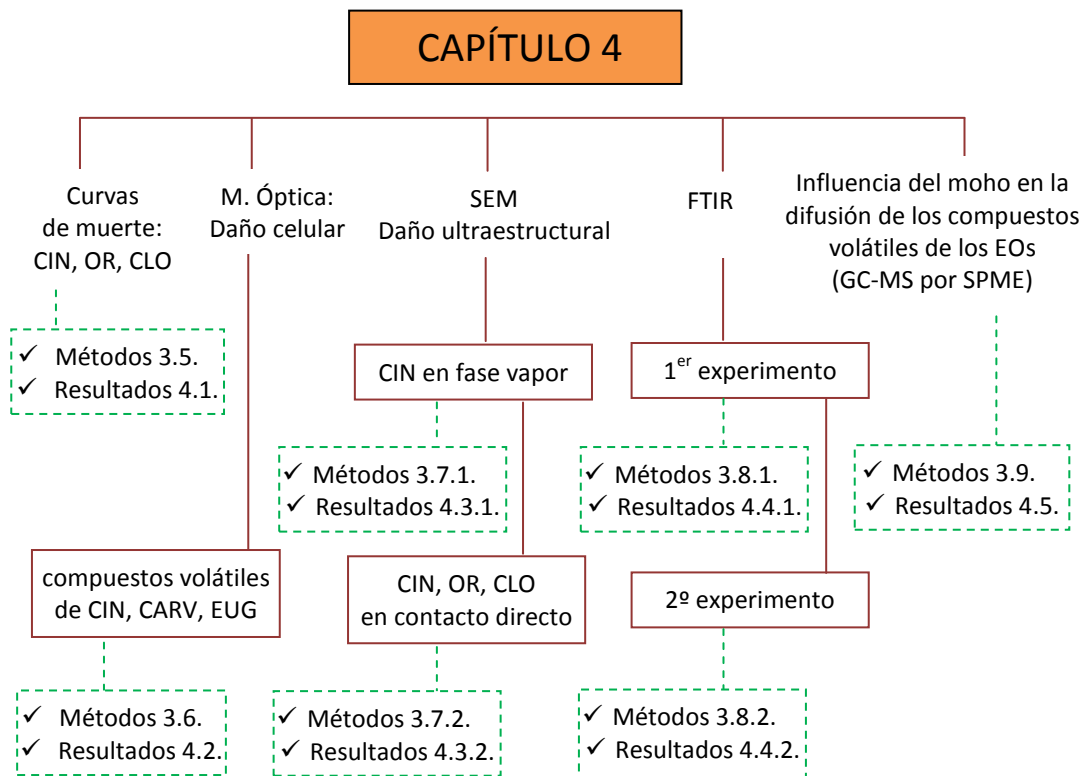
## 2. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TRABAJO

Una vez determinada la actividad antifúngica de los diferentes aceites esenciales empleados (canela, orégano y clavo) y de sus compuestos mayoritarios respectivos (ver capítulo 2), y tras haber evaluado la actividad de los envases activos con canela en fase vapor (ver capítulo 3), se procedió a estudiar el mecanismo de acción de las diferentes sustancias. El desarrollo experimental llevado a cabo se muestra en el diagrama de la figura 4.2.

El primero de los experimentos llevados a cabo, las curvas de muerte, sirvió para establecer el punto de muerte de los mohos frente a cada uno de los aceites esenciales, ya que el comportamiento descrito en éstas guarda una estrecha relación con su mecanismo de acción. A continuación, los dos experimentos posteriores sirvieron para poder observar los daños causados en la morfología del moho *Aspergillus flavus*. El primero de ellos se realizó por microscopía óptica, donde se evaluaron diferentes zonas de crecimiento de la placa Petri tras la exposición en fase vapor de cinamaldehído, carvacrol y eugenol, estudiando también tres tiempos de exposición. Tras esto, gracias al aumento de resolución que aporta la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se pudieron estudiar con detalle los cambios provocados por el aceite esencial de canela en fase vapor en el moho inoculado en la placa, y por los tres aceites esenciales en las esporas expuestas a diferentes concentraciones en contacto directo en medio líquido.

Los experimentos de microbiología se completaron con un estudio de espectroscopía de infrarrojo (FTIR) de manera que se pudieran evaluar posibles cambios en la conformación de las proteínas de la banda amida I a la exposición de canela en fase vapor.

Por último, se estudió por cromatografía de gases (GC) la difusión de cinamaldehído, carvacrol y eugenol en las diferentes zonas de inhibición que crean dichos compuestos en la placa Petri. Además, se evaluó la influencia que guarda el crecimiento del moho con la proporción de compuesto detectada en cada una de dichas regiones.



**Fig. 4.2** Diseño experimental del capítulo 4. Como puede observarse, cada experimento realizado se explica en su apartado de “métodos” y “resultados” correspondientes.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Instrumentos

Además de los instrumentos y materiales utilizados de manera rutinaria a lo largo de toda la tesis (ver apartado 3.1 del capítulo 1), en este capítulo se emplearon:

- ✓ pH-metro Seven Easy (*Mettler Toledo*).
- ✓ Discos de papel de filtro de 9 mm (*Whatman*).
- ✓ Calibre digital (0-150 mm) (*COMECTA S.A.*).
- ✓ Agitador rotacional, mini twist (*Select Bioproducts*).
- ✓ Portafiltros Swinnex (13 mm) Pq/10 (SX0001300) (*Millipore*).
- ✓ Membrana policarbonato (13 mm) de 0.22  $\mu\text{m}$  Pq(100 (GTTP01300) (*Millipore*).
- ✓ Microplacas estériles de 12 pocillos (*Scharlab*).
- ✓ Microscopio Electrónico de Barrido: Inspect F Scanning Electron Microscope (SEM) (*FEI*).
- ✓ FTIR del primer experimento: Bruker Vertex 70 Interferometer, acoplado a un microscopio Bruker Hyperion 2000 Vis-IR (*Bruker*).
- ✓ FTIR del segundo experimento: Bruker Vertex 70 Interferometer, acoplado a un microscopio Bruker Hyperion 3000 Vis-IR.

### 3.2. Aceites esenciales (EOs)

Como agentes antifúngicos, se utilizaron los aceites esenciales de canela, orégano y clavo evaluados en los capítulos 2 y 3. En el capítulo 2 se puede encontrar la información completa en relación a la nomenclatura de la planta, la procedencia de cada sustancia, el número CAS (ver tabla 2.1), así como la composición de las atmósferas de los tres aceites esenciales (ver tabla 2.2).

### 3.3. Cepas de mohos y medios de cultivo

En este capítulo se utilizaron sólo dos de las cepas empleadas en los dos capítulos anteriores. Como ya se explicó en ocasiones anteriores, los días de incubación hacen referencia al tiempo necesario de preincubación para la recogida de esporas a la hora de



hacer los inóculos iniciales. En cada experimento del capítulo se detallará el uso de las cepas, así como las condiciones de cultivo establecidas en cada caso.

**Tabla 4.1** Cepas utilizadas a lo largo de este capítulo 4.

Todos los códigos corresponden a la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Los días de incubación hacen referencia a la incubación previa para la utilización de dicha cepa, de manera que el tiempo de cada experimento varió según el objetivo.

Cepa (CECT)	Abreviatura	Medio de cultivo	Incubación (días)
<i>Aspergillus flavus</i> 2949	<i>A. flavus</i>	MEA/CZP (*PDA)	7
<i>Penicillium roqueforti</i> 2905	<i>P. roqueforti</i>	PDA	7

\* Los inóculos de esta cepa se extrajeron desde medio de cultivo PDA, ya que era más favorable para la recogida de esporas. Sin embargo, las posteriores siembras de los experimentos en medio sólido, se hicieron sobre MEA o CZP. Como en este capítulo sólo se evaluó una cepa de *A. flavus*, la abreviatura no incluye el código de referencia.

De manera similar a los capítulos anteriores, los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

- ✓ PDA: Potato Dextrose Agar (*Scharlab*).
- ✓ MEA nº 1: Malt Extract Agar (*Scharlab*).
- ✓ CZP: Czapek (*Scharlab*).
- ✓ YEB: Yeast Extract Broth (*Scharlab*).
- ✓ Para las diluciones de inóculo se empleó NaCl al 0.9 % (*Panreac*).

Todos los caldos y medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones de cada uno de ellos y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, excepto en el caso de MEA, donde se recomienda su esterilización a 115 °C durante 15 minutos.

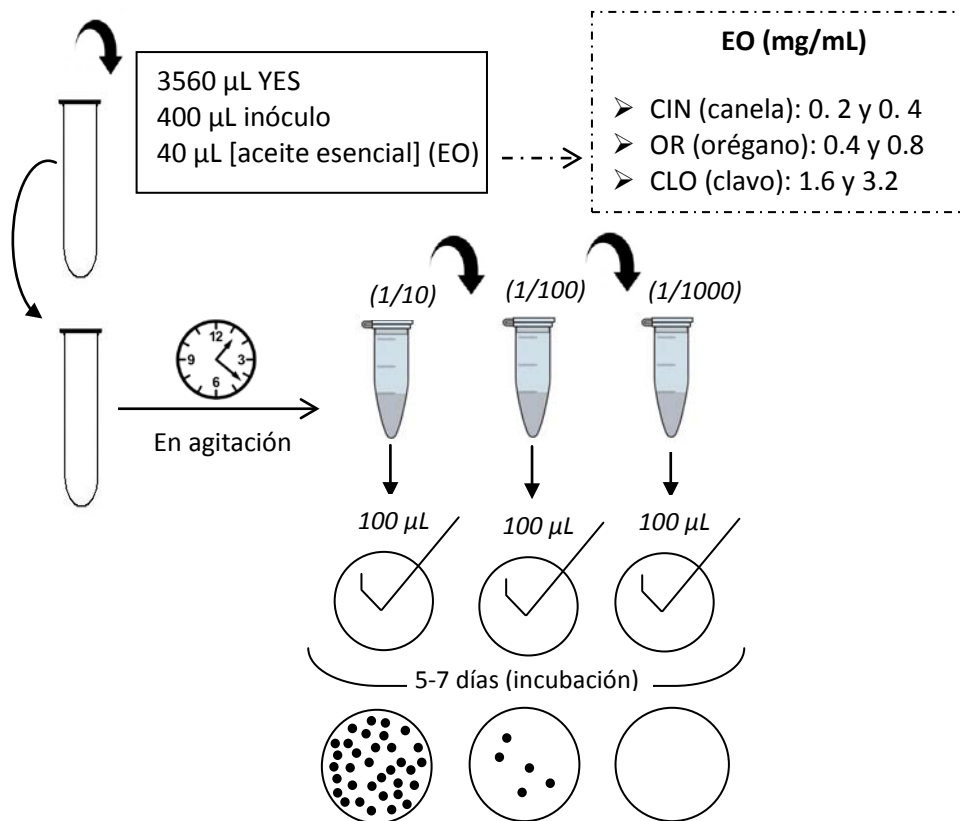
### 3.4. Reactivos

- ✓ Etanol sin estabilizar, grado HPLC (*Scharlab*).
- ✓ Glutaraldehído (*Panreac*).
- ✓ Cacodilato sódico (*Panreac*).
- ✓ Sacarosa (*Panreac*).

### 3.5. Curvas de muerte

Se evaluó la velocidad en el mecanismo de acción de los tres aceites esenciales (canela, orégano y clavo) sobre ambas cepas, *A. flavus* y *P. roqueforti*. Tras una incubación previa durante 7 días a 25 °C en medio PDA, se extrajeron los inóculos de las dos cepas, ajustándolos en NaCl 0.9 % a una concentración final de  $10^6$  CFU/mL (ver apartado 3.5.2 del capítulo 2).

Las muestras se prepararon por medio de una macrodilución en caldo YES (Yeast Extract Broth), similar al método explicado en los capítulos anteriores en las concentraciones mínimas inhibitorias y fungicidas (MIC y MFC), pero en este caso, en un volumen final de 4 mL en vez de 2 mL. En la figura 4.3 se muestra un esquema de la preparación de los tubos problema, así como de la evaluación de los diferentes puntos de la curva de muerte.



**Fig. 4.3** Esquema de la formación de las muestras para las curvas de muerte de los tres EOs.

Igual que en ocasiones anteriores, hay que tener en cuenta que la concentración de inóculo final en el tubo es de  $10^5$  CFU/mL. Todos los tubos problemas se mantuvieron en

agitación constante durante todo el tiempo que duró la curva. El tiempo de la curva de muerte se inicia inmediatamente tras la adición del aceite esencial, ya que si no, se pierde el contaje de los puntos iniciales. Como se observa en el diagrama (figura 4.3), en los diferentes tiempos se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de la solución inicial, las cuales se diluyeron (1:10) en 900  $\mu\text{L}$  de NaCl 0.9 % las veces necesarias para poder llevar a cabo el recuento posterior de colonias en placa Petri. La siembra en placa (100  $\mu\text{L}$ ) se realizó en superficie por medio del asa de Drigalsky como en ocasiones anteriores, empleándose medio de cultivo MEA en el caso de *A. flavus* y PDA para *P. roqueforti*. Los resultados se obtuvieron tras el contaje del número de colonias por mL (CFU/mL) en las placas tras 5-7 días de incubación. A la hora de calcular la concentración de moho presente en el tubo inicial a partir del recuento en placa de la dilución correspondiente, es importante considerar el último factor (1:10) correspondiente a la dilución en placa, debido a que el recuento se indica sobre 1 mL. De esta manera, un resultado por ejemplo de 30 colonias en la dilución (1:1000), hará referencia a  $3 \times 10^5$  CFU/mL en la disolución inicial (o tubo problema). Los recuentos se realizaron en las placas que contenían un rango de 10-60 colonias de moho. Conforme el antifúngico actúa, es necesario coger la muestra de una disolución más concentrada, es decir, en los últimos puntos de la curva la alícuota de la disolución problema se siembra sin diluir. Por tanto, los recuentos finales de la curva de menos de 10 colonias (procedentes de la disolución inicial) no se consideraron para su representación gráfica, sin embargo, sí se tuvieron en cuenta ya que se consideró como presencia de crecimiento.

Finalmente, para minimizar la influencia en la variabilidad entre la concentración inicial de inóculo entre las diferentes réplicas de cada muestra, los recuentos obtenidos (CFU/mL) se transformaron en logaritmo "Lg", haciendo referencia la concentración en cada punto de la curva (Lg N) a la concentración inicial en el tiempo cero (Lg No), quedando por tanto en cada tiempo,  $\text{Lg } N/\text{No}$ .

Por último, las muestras control se realizaron de la misma manera pero añadiendo 40  $\mu\text{L}$  de etanol, para comprobar la inocuidad de dicha concentración en el medio conteniendo el moho.

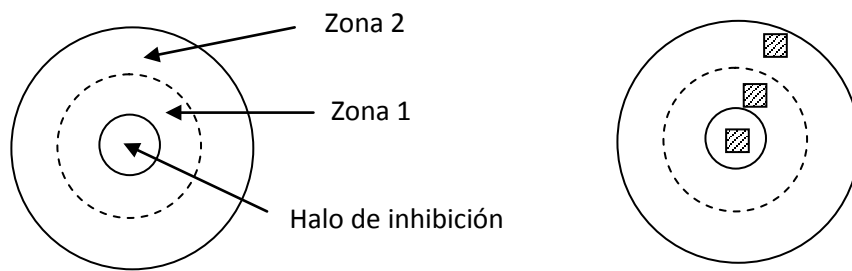
Los tiempos a los cuales se fueron extrayendo las alícuotas se distribuyeron en función de la velocidad de cada aceite esencial. Cada una de las muestras (de aceite esencial) se realizó por duplicado un mínimo de 3 veces, llevándolo a cabo en días diferentes.

### **3.6. Microscopía Óptica: Daño celular causado por los compuestos volátiles de cinamaldehído, carvacrol y eugenol**

Se quiso observar los daños producidos por el cinamaldehído, carvacrol y eugenol en el moho, cuando estos se exponen en fase vapor. Dichos compuestos se escogieron por ser los compuestos mayoritarios del aceite esencial de canela, de orégano y clavo respectivamente. Este experimento se llevó a cabo sobre la cepa *A. flavus*.

A partir de un cultivo de 7 días en PDA, se extrajeron inóculos ajustándolos en NaCl 0.9% a una concentración final de  $10^6$  CFU/mL (ver apartado 3.5.2 del capítulo 2). En el caso de las placas activas la siembra se realizó por medio del asa de Drigalsky con 100  $\mu$ L de inóculo, colocando un disco con el aceite esencial en la tapa de la placa, de la misma manera a la mostrada en el experimento 3.6 del capítulo 2. De esta manera, las placas activas contenían 10  $\mu$ L en fase vapor de cinamaldehído, carvacrol y eugenol. Los controles, sin disco activo, se sembraron inoculando dos o tres alícuotas de 10  $\mu$ L de la misma suspensión inicial en diferentes puntos de la placa Petri, de manera que el moho pudiera crecer en colonias individualizadas. Todas las placas (activas y controles) se cerraron con parafilm. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

Las placas se incubaron a 25 °C, procediéndose a su análisis tras 24 horas, 48 horas y 72 horas de incubación. Como se ha explicado en capítulos anteriores, el método de difusión en disco provoca tres zonas diferenciadas en el medio de cultivo, las cuales las hemos denominado: halo de inhibición, halo de retardo (o zona 1) y zona periférica (o zona 2). Esto ocurre debido a que el aceite esencial (tanto en contacto directo como en fase vapor), difunde desde la parte central donde la concentración es mayor, hasta la periferia de la placa. En la figura 4.4 se observan las diferentes zonas de manera esquemática, la cual también se utilizará para explicar la metodología de los siguientes experimentos de SEM y FTIR.



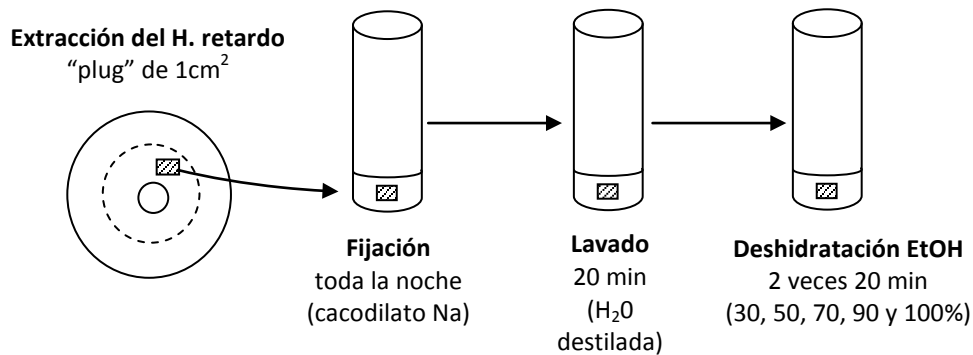
**Fig. 4.4** Dibujo esquemático de las tres zonas creadas por el gradiente de concentración del EO tras el experimento de disco de difusión (izquierda). Trozos escogidos para el estudio de cada zona (derecha).

En el momento de la observación se extrajo un trozo de muestra de cada una de las tres zonas, haciendo para ello una incisión en el medio de cultivo de 2 cm<sup>2</sup> y colocando la muestra directamente sobre un portaobjetos de vidrio. Esta técnica permite la visualización de esporas o micelio formado sin necesidad de destruir la muestra, ni de fijarlas por medio de tinciones. En el caso de los controles, el área extraída correspondió a un trozo de la colonia formada. Todas las muestras se observaron por microscopía óptica.

### 3.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

#### 3.7.1. Daño ultraestructural causado por el aceite esencial de canela en fase vapor

Se evaluaron los cambios morfológicos del mohó *A. flavus* en presencia del aceite esencial de canela en fase vapor. Para ello, las muestras activas se prepararon de la misma manera a la mencionada en el apartado anterior (punto 3.5), pero evaluando tres volúmenes de aceite esencial en el disco activo: 10 µL, 20 µL y 30 µL. En esta ocasión, tanto las placas activas como controles se sembraron con 100 µL de inóculo previamente ajustado a 10<sup>6</sup> CFU/mL por medio del asa de Drigalsky. El medio de cultivo empleado esta vez fue CZP. Todas las placas se cerraron con parafilm y se incubaron a 25 °C.



**Fig. 4.5** Preparación y extracción del halo de retardo de una muestra activa, para SEM. Como se ve, el halo de retardo la zona de interés. En el caso de los controles, debido al crecimiento homogéneo del moho, el "plug" se extrajo de un punto cualquiera de la placa.

En la figura 4.5 se muestran los pasos seguidos tras la extracción de la muestra desde la placa. La muestra extraída correspondió a un "plug" de moho junto con el medio de cultivo del halo de retardo en el caso de las placas activas, mientras que en los controles ésta se cogió de una zona cualquiera, debido al crecimiento homogéneo del moho. A diferencia del experimento anterior, en esta ocasión el trozo fue algo menor (1cm<sup>2</sup>).

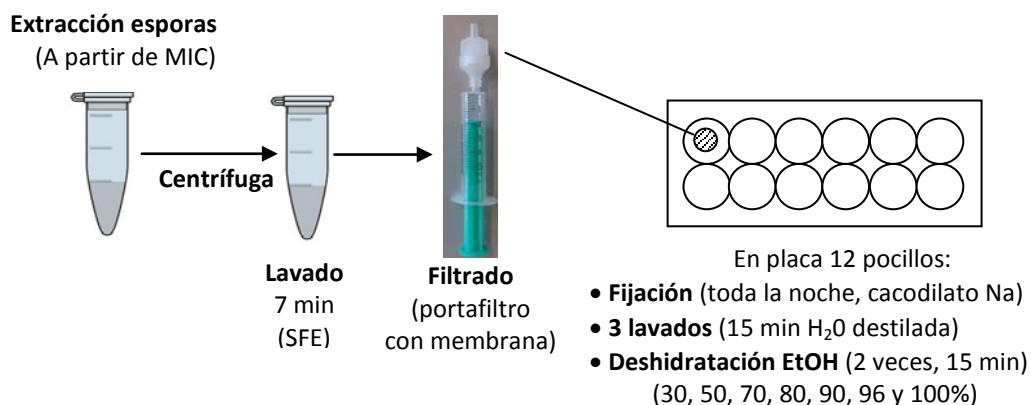
Una vez extraídos, cada uno de ellos se introdujo en un tubo de ensayo de 5 mL que contenía 1 mL de 2.5 % de glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio con sacarosa. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente toda la noche para su fijación. Al día siguiente, se retiró el tampón cacodilato por medio de una pipeta, y se lavó cada una de las muestras, dejándolas 20 minutos con 1 mL de agua destilada. A continuación, se realizó una deshidratación en gradiente de etanol (30, 50, 70, 90 y 100 %), repitiendo cada uno de ellos dos veces y dejándolos actuar durante 20 minutos. Las muestras permanecieron en el último paso (100 % etanol), y se mantuvieron en nevera hasta el momento de análisis. Antes de su estudio, se sacó del tubo cada trozo de muestra, depositándolo sobre un trozo de un cubreobjetos de vidrio, para su recubrimiento con oro.

Las imágenes de SEM se tomaron por medio de un microscopio marca Inspect F, trabajando entre 5-30 kV y con una resolución de 1.5 nm.

### 3.7.2. Daño ultraestructural causado por los aceites esenciales de canela, orégano y clavo en contacto directo

En este experimento se quiso observar los daños producidos en *A. flavus* por los tres aceites esenciales empleados a lo largo de la presente tesis (canela, orégano y clavo), esta vez en contacto directo en medio líquido. A diferencia del experimento anterior, en esta ocasión interesaba estudiar los daños producidos en las esporas del moho incubadas a diferentes concentraciones de activo. Para ello, el inóculo de moho fue extraído de una placa previamente incubada a 25 °C durante 7 días, ajustándolo a una concentración de  $10^6$  CFU/mL. Las muestras se prepararon en tubos de ensayo mediante el método de dilución en caldo empleado para los experimentos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Fungicida (MFC) explicada en experimentos anteriores.

Tras 48 horas de incubación en agitación constante, se recogieron las esporas de las concentraciones de activo a partir de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), es decir, aquellas donde no se produjo crecimiento macroscópico de moho en el tubo. Para poder centrifugar las muestras, se dividió el volumen de cada uno de los tubos de MIC (2 mL) en dos microtubos de 1.5 mL. En el caso de los controles, se utilizaron inóculos de moho recién recogidos de una placa de cultivo tras 7 días de incubación en PDA. Esto es debido a que las esporas inoculadas en un caldo de cultivo, presentan a las 48 h germinación completa y un avanzado desarrollo del micelio. Debido a esto, las esporas expuestas a concentraciones iguales o superiores a la MIC de canela, se compararon con esporas recién cogidas de una placa de cultivo sin haber sido expuestas al aceite esencial.



**Fig. 4.6** Preparación de las muestras para el segundo experimento de SEM. En el caso de las muestras activas éstas procedían del experimento de MIC/MFC, mientras que las esporas control se extrajeron de placas de medio cultivo tras 7 días de incubación.

Como se puede ver en la figura 4.6, cada una de las muestras se sometió a una centrifugación de 5 minutos a 9892 g. El pellet recogido de cada tubo se lavó durante 7 minutos con 1 mL de suero fisiológico estéril (SFE), filtrando posteriormente la disolución por medio de una jeringa de 2.5 mL con un portafiltro acoplado que contenía una membrana de policarbonato de 13 mm de diámetro y 0.22  $\mu\text{m}$  de poro. Tras el filtrado, cada una de las membranas se depositó en una placa de 12 pocillos, los cuales contenían 1.5 mL de tampón cacodilato (2.5 % glutaraldehído y 0.3 % de sacarosa en 0.1 M de tampón cacodilato). La placa se dejó 2 h a temperatura ambiental y toda la noche a 6<sup>o</sup> C para la fijación de las muestras. Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces con 1.5 mL de agua destilada, utilizando para ello diferentes pocillos de la placa, y dejando actuar cada lavado durante 15 minutos. Por último, igual que en el experimento anterior, se llevó a cabo el gradiente de deshidratación, empleando en esta ocasión 30, 50, 70, 80, 90, 96 y 100 % de etanol, repitiendo cada paso dos veces y dejando actuar 15 min cada uno de ellos. De esta manera, las membranas que contenían las esporas se guardaron en 100% de etanol, hasta que en el momento del análisis se depositaron en el soporte del SEM para su recubrimiento con oro. El equipo utilizado fue el mismo que en el experimento previo del SEM.

Todas las muestras se realizaron por duplicado.

### **3.8. Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)**

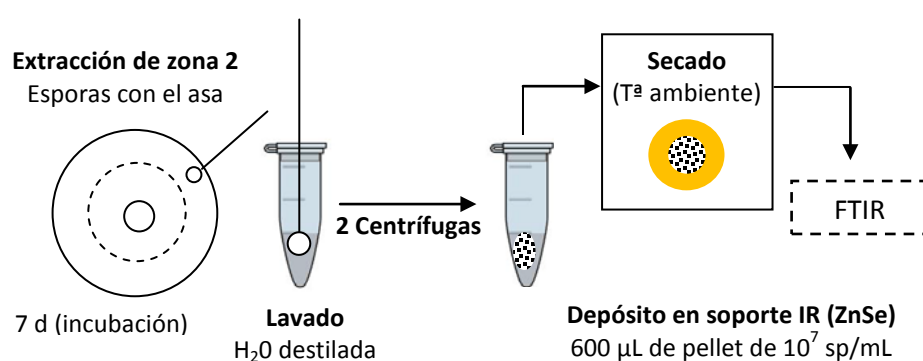
Los posibles cambios bioquímicos producidos en *A. flavus* debido al aceite esencial de canela en fase vapor fueron analizados por medio de FTIR. El objetivo principal fue el análisis de las esporas del moho, dividiendo para ello el experimento en dos partes claramente diferenciadas.

La preparación inicial de las muestras fue en ambos casos la misma, sembrando placas de medio CZP con 100  $\mu\text{L}$  de inóculo de *A. flavus* a una concentración de 10<sup>6</sup> CFU/mL, y aplicando 10  $\mu\text{L}$  de canela en las muestras activas por medio de un disco de Whatmann en fase vapor, tal y como hemos visto en numerosas ocasiones a lo largo de esta tesis. Por otra parte, las placas de medio CZP inoculadas pero sin disco activo, constituyeron los controles. Todas las placas se cerraron con parafilm y se incubaron a 25 °C.



### 3.8.1. Primer experimento de FTIR

En el primer experimento de FTIR las muestras (control y activo) se incubaron durante 7 días, tras lo cual se recogieron las esporas de las placas activas con un asa de siembra, procediendo éstas de la zona 2, desde su comienzo al terminar el halo de inhibición y hasta la periferia de la placa. En el caso de los controles las esporas se extrajeron de diferentes zonas de la placa, ya que al no contener aceite esencial, el crecimiento del moho es homogéneo. En la figura 4.7 se muestra el método seguido para la extracción de las esporas y la preparación de éstas para su análisis por FTIR.



**Fig. 4.7** Preparación de las muestras para el primer experimento de FTIR. En el esquema se muestra el proceso desde una placa activa (difusión en disco en fase vapor).

Para cada una de las muestras (control y activo), las esporas se depositaron en un microtubo que contenía 1 mL de agua destilada, llevando a cabo dos centrifugaciones de 7 min a 9892 g para lavar tanto la muestra control como activa. La concentración extraída de esporas desde la placa Petri fue de  $10^7$  sp/mL. De cada una de las muestras, del pellet final obtenido se depositaron 600 µL en soportes individuales de IR (discos de ZnSe de 4 mm de grosor y 40 mm de diámetro), dejándolos secar a temperatura ambiente antes de analizar por IR.

Se optimizaron tanto el procedimiento de extracción, como la centrifugación necesaria para el lavado por centrifugación sin perder muestra y el volumen adecuado para el depósito en el soporte de infrarrojo. Para ello, previamente se probó a extraer inóculos de diferentes concentraciones de esporas ( $10^6$  sp/mL y  $10^7$  sp/mL), depositando a su vez distintos volúmenes de los pellets finales tras las centrífugas (300, 600 y 1000 µL). Por otra parte, para comprobar que no se perdía muestra durante el proceso, se contó el número de esporas por

mL (contaje por cámara de Neubauer), tanto en el inóculo inicial del primer microtubo como tras las dos centrifugaciones.

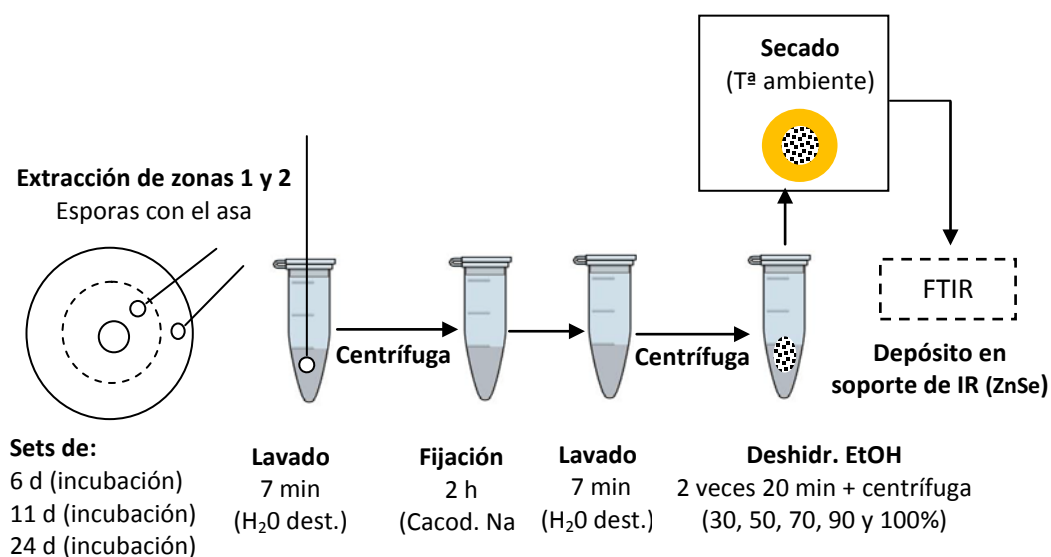
El FTIR utilizado fue un interferómetro Bruker Vertex 70 acoplado a un microscopio Bruker Hyperion 2000 Vis-IR, y con detector MCT. Cada soporte contenía una muestra (control o activo). Los espectros de absorción se tomaron en al menos 20 puntos diferentes de cada soporte que contenía la muestra, por medio de 256 scans, entre  $4000$  y  $850\text{ cm}^{-1}$  y con una resolución espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

El experimento se llevó a cabo por triplicado.

### 3.8.2. Segundo experimento de FTIR

A diferencia del anterior, en esta ocasión se quiso evaluar la influencia del tiempo de exposición al aceite esencial de canela. Para ello, las placas fueron preparadas en tres sets independientes de muestras, incubándolas durante 6 días, 11 días y 24 días.

Tal y como se muestra en la figura 4.8, las esporas fueron recogidas de la zona 1 y de la zona 2 por medio del asa de siembra, depositándolas en un microtubo que contenía 1 mL de agua destilada para su lavado. Las esporas de las placas control se recogieron como en el caso anterior.



**Fig. 4.8** Preparación de las muestras para el segundo experimento de FTIR. En el esquema se muestra el proceso desde una placa activa (difusión en disco en fase vapor).

Cada muestra se sometió a una primera centrifugación, añadiéndole al pellet resultante 1 mL de tampón cacodilato de sodio (ver apartado 3.7.2), el cual se dejó actuar durante 2 horas para la fijación de las esporas. Tras un segundo lavado con agua destilada, acompañado de una centrifugación, éstas fueron deshidratadas en un gradiente de etanol (30, 50, 70, 90 y 100%). Todos los pases se llevaron a cabo mediante centrifugaciones (9892 g durante 7 min), y dejando actuar cada uno de ellos durante 20 min.

En el momento del análisis, se recogieron los pellets con una pipeta Pasteur, depositándolos en las mismas ventanas de ZnSe. En esta ocasión se utilizó un interferómetro Bruker Vertex 70 acoplado con un microscopio Bruker Hyperion 3000 Vis-IR, con un detector FPA (Focal Plane Array) con 64x64 elementos. Los espectros de absorción se tomaron por medio de 128 scans en modo binario 2 x 2, obteniendo en cada adquisición espectros simultáneos de 32 x 32. Cada uno de los espectros cubrió un área de muestra de 5.2 x 5.3  $\mu\text{m}^2$ . Se eligieron varias zonas dentro de cada muestra, con la ayuda del microscopio. Se utilizó el mismo rango de longitud de onda que en el caso anterior, y se obtuvo la misma resolución.

El experimento se llevó a cabo por duplicado.

### ***3.8.3. Procesamiento de datos***

Para el análisis de los datos se utilizó en ambos experimentos el software OPUS (versión 6.5, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania). Tras una primera compensación atmosférica, se llevó a cabo una primera derivada utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay con 9 puntos de suavizado (“smoothing points”). Los siguientes análisis del primer experimento se analizaron con el programa Igor Pro (versión 6, Wavemetrics, Portland, OR, Estados Unidos), mientras que en el segundo experimento todo se realizó en OPUS.

En la sección de resultados y discusión correspondiente se encuentra una explicación más detallada del análisis de datos llevados a cabo en cada uno de los experimentos.

## **3.9. Influencia del crecimiento del moho en la difusión de los compuestos volátiles de los aceites esenciales**

En los anteriores capítulos de esta tesis hemos visto reiteradamente que la exposición a los aceites esenciales crea diferentes zonas de crecimiento en el moho inoculado,

observándose entonces las comentadas zonas en el medio de cultivo: halo de inhibición, halo de retardo y zona 2. No obstante, tal y como se discutió en el primer barrido de actividad de los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios llevados a cabo en el capítulo 2, no todas las sustancias muestran el mismo comportamiento.

Debido a esto, este experimento tuvo como primer objetivo el análisis de la difusión en fase vapor de los compuestos principales de los aceites esenciales de canela, orégano y clavo, esto es, cinamaldehído, carvacrol y eugenol respectivamente. Sin embargo, como también interesaba estudiar la difusión de los mismos en ausencia y en presencia de crecimiento de moho, se prepararon sets de muestras inoculadas con moho y sin inocular.

### ***3.9.1. Formación de las muestras inoculadas y sin inocular***

Por un lado, las muestras inoculadas se sembraron por asa de Drigalsky con 100  $\mu\text{L}$  de  $10^6$  CFU/mL de *A. flavus* 2949, tras un cultivo previo de 7 días en PDA. Las placas activas se formaron de la misma manera que en el resto de experimentos realizados por difusión en disco en fase vapor. Esto es, se añadió 10  $\mu\text{L}$  de cada uno de los compuestos a evaluar (cinamaldehído, carvacrol y eugenol) en discos Whatman de 9 mm, colocándolos en la tapa de la placa para su evaluación en fase vapor. Los controles consistieron en placas inoculadas con el moho pero sin disco activo. Por otra parte, las muestras de medio de cultivo sin inocular se formaron de la misma manera pero sin sembrar el moho.

En todos los casos se utilizaron placas conteniendo 15 mL de medio PDA medido con probeta estéril. Todas las placas se cerraron con parafilm y se incubaron a 25 °C durante 4 días que duró el experimento.

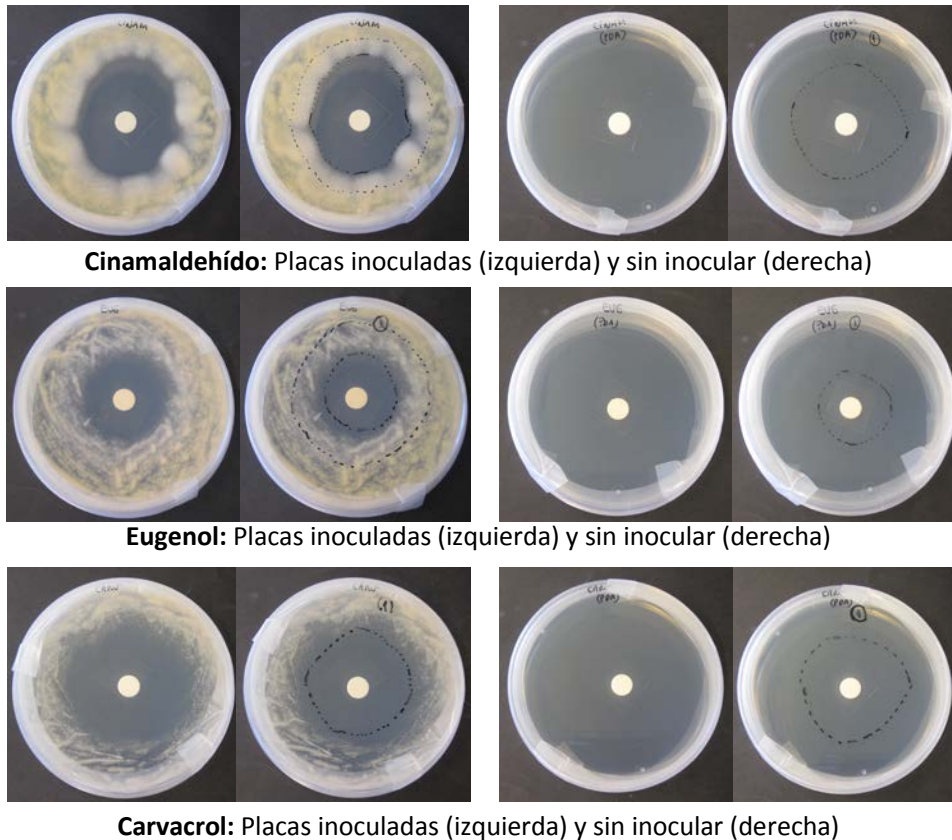
Se hicieron cuatro réplicas para las muestras con moho y tres réplicas para las no inoculadas.

### ***3.9.2. Extracción de las muestras***

Tras los 4 días de incubación, en primer lugar se hicieron las fotos de cada una de las réplicas y se midieron los halos de inhibición y de retardo formados en las placas inoculadas. Dichos halos obtenidos se utilizaron como referencia para las placas de medio de cultivo sin inocular. Para ello, para cada compuesto se realizó un promedio de los halos de inhibición, dibujándolo a continuación en las placas sin inocular correspondiente, partiendo siempre

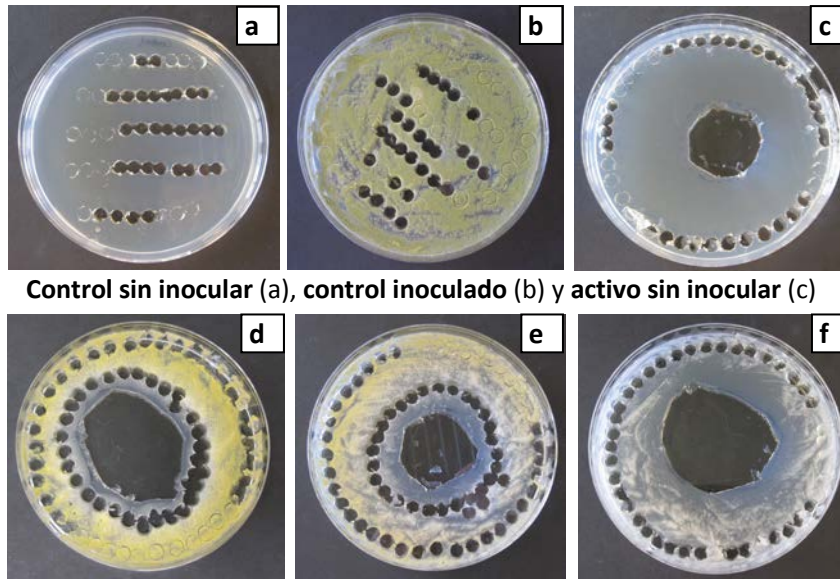
desde el disco central. En la figura 4.9 podemos ver un ejemplo visual de una de las réplicas de cada opción (inoculada y no inoculada) para cada una de las tres sustancias.

A continuación, se extrajeron las muestras que interesaba evaluar. Cada una de ellas se depositó en el interior de un vial de 20 mL de cromatografía de gases, el cual se cerró por medio del tapón de rosca para impedir la pérdida de los compuestos volátiles. Todas las muestras extraídas se pesaron en la balanza analítica de precisión.



**Fig. 4.9** Marcaje de los halos de inhibición, en placas activas inoculadas y sin inocular. Fila superior (cinamaldehído), centro (eugenol) e inferior (carvacrol). En todos los casos se muestra la imagen de una de las réplicas de cada opción. Como figura en el texto, el promedio de los halos de inhibición de las réplicas activas inoculadas sirvió para poder establecer el diámetro de los halos de inhibición en las placas sin inocular.

El criterio de muestra seleccionado se estableció de la siguiente manera, tal y como se puede ver en la figura 4.10. Por un lado, de las muestras inoculadas y expuestas con cinamaldehído y carvacrol se recogió muestra tanto del halo de retardo como de la zona 2, extrayendo entre 30 y 35 “plug”s del medio de cultivo con la ayuda de un sacabocados de 6 mm. Sin embargo, las placas inoculadas con carvacrol no presentaron halo de retardo, motivo por el cual sólo se analizaron el halo de inhibición y la zona 2.



**Control sin inocular (a), control inoculado (b) y activo sin inocular (c)**

**Activos inoculados: cinamaldehído (d); eugenol (e); carvacrol (f)**

**Fig. 4.10** Extracción de las muestras de las diferentes zonas.

Las imágenes muestran una réplica de cada opción. En la parte superior se pueden ver tanto el control sin inóculo (a) como inoculado (b). La extracción de las placas activas sin inocular se llevó a cabo como en la figura "c", mientras que en fila inferior se ve un ejemplo de las zonas extraídas para cinamaldehído (d), eugenol (e) y carvacrol (f).

Por otra parte, también se extrajeron dos zonas en lugar de tres en el caso de las placas activas sin inocular. Esto se debió a que al no existir moho, no fue posible poder distinguir entre dos zonas tan próximas como son el halo de inhibición y halo de retardo. Por último, la extracción de los controles, tanto con moho como sin él, se realizó por medio de "plugs" de diferentes puntos repartidos por la superficie del medio de cultivo.

Respecto al criterio de extracción aplicado, hay que mencionar dos aspectos fundamentales. El primero de ellos es que para cada compuesto activo estudiado (tanto en las placas inoculadas como sin inocular), se extrajo el mismo número de "plugs" del halo de retardo como de la zona 2. Así mismo, para poder asociar de la manera más precisa el gradiente de concentración obtenido dentro de cada una de las placas o réplicas, éstas se marcaron previamente a la extracción, de manera que en todo caso se supo de qué réplica provenía exactamente cada dato. Esto permite, comparar de manera fiable los resultados no sólo a nivel global para cada tipo de muestra, sino también dentro de las réplicas individuales que componen cada una de ellas. Por último, las cuantificaciones de los compuestos obtenidos se estudiaron junto con las fotografías de los crecimientos macroscópicos de todas las réplicas.

### 3.9.3. Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante una microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS). Los analitos se sorbieron y concentraron por medio de una fibra SPME (Solid Phase Microextraction) suministrada por Supelco (*Bellefonte, PA, USA*). Para ello, se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 (*Agilent Technologies*), con una columna HP5MS de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase, y un detector de espectrometría de masas 5973 (*Hewlett Packard*). El equipo dispone de un inyector automático programable, CTC Analytics CombiPal (*Agilent, Palo Alto, CA, USA*). De esta manera, los analitos sorbidos por la fibra se transportan de manera automática al portal de inyección, donde son desorbidos para su separación.

Cada compuesto se analizó en modo “scan” (con una relación  $m/z$  de 40 a 350, identificándose por comparación de su espectro de masas con los compilados en la bases de datos del GC-MS, y en modo “SIM” (Selective Ion Monitoring), utilizando para ello las masas características obtenidas previamente para cada uno de los tres compuestos. La cuantificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo mediante concentraciones conocidas de cada uno de ellos, diluidos en el mismo medio de cultivo pero sin agar, esto es, en PDB. Cada recta de calibrado utilizada estuvo compuesta por un mínimo de cuatro puntos.

La inyección se realizó en modo *splitless* a una temperatura de 250 °C, con un flujo de Helio de 1 mL/mL (99.999 % pureza, calidad C50, *Carbueros Metálicos*). El resto de los parámetros utilizados se muestran en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2** Parámetros utilizados para la extracción por SPME (GC-MS)

<b>CombiPal HS-SPME</b>	
Tiempo de preincubación (s)	300
Temperatura de incubación (°C)	40
Velocidad de agitación del vial durante extracción (rpm)	500
Tiempo de extracción (s)	300
Tiempo de desorción (s)	120
Tiempo de limpieza de la fibra (s)	180

Tras la identificación de los compuestos, se calculó el Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ), utilizando para cada uno de ellos entre 4 y 5 concentraciones bajas de patrón de referencia.

### ***3.9.4. Análisis estadístico***

La comparación de las áreas obtenidas de los tres compuestos se llevó a cabo utilizando la versión 15.0 del programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En primer lugar, se determinó si la zona de la placa ejercía un efecto significativo en la detección del compuesto volátil, lo cual se analizó comparando dichas áreas, tanto en las placas inoculadas como sin inocular. A continuación, interesaba estudiar la influencia del crecimiento del moho en la distribución de los compuestos, comparando para ello la misma zona de ambos tipos de muestras, inoculada y sin inocular.

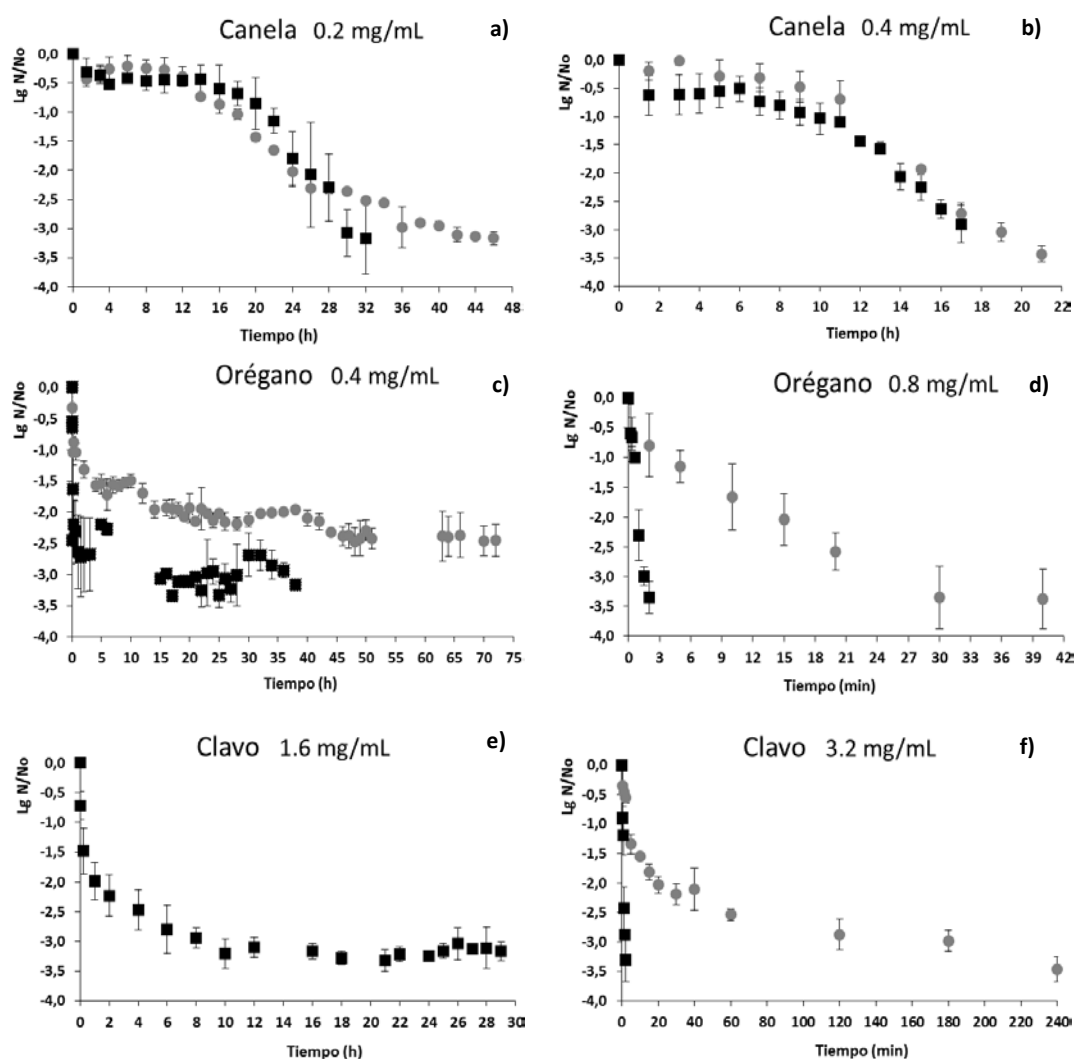
El análisis se realizó mediante una distribución t-student en el caso de disponer de dos grupos de población, y por Anova de 1 factor cuando se tenían más de dos. Los mismos análisis se han utilizado en otras ocasiones a lo largo de esta tesis (ver por ejemplo punto 3.6.3 del capítulo 2). En todos los casos se llevó a cabo previamente la prueba de Levene para determinar la homocedasticidad de varianzas, comparando las medias por medio de las pruebas Welch o Brown-Forsythe en el caso de no asumir igualdad de varianzas ( $p$ -valor en la prueba de Levene  $< 0.05$ ) y por medio de Anova en situación contraria. Por otra parte, se identificó el origen de las diferencias detectadas por Anova de 1 factor mediante las comparaciones múltiples post-hoc. Dentro de éstas últimas, se aplicó el test de Bonferroni en el caso de asumir igualdad de varianzas mientras que en el caso de no ser iguales, se realizó el test T2 de Tamhane (T2) añadiendo en algunos casos concretos el de T3 de Dunnett. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95 %.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Curvas de muerte

Las curvas de muerte de los tres aceites esenciales se muestran en la figura 4.11.



**Fig. 4.11** Curvas de muerte de los aceites esenciales de canela (a,b), orégano (c,d) y clavo (e,f) frente a las cepas *A. flavus* CECT 2949 (■) y *P. roqueforti* CECT 2905 (●).

Cabe recordar que las MFC obtenidas para *A. flavus* fueron de 0.1-0.2 mg/mL (canela), 0.4 mg/mL (orégano) y 0.8-1.6 mg/mL (clavo). En el caso de *P. roqueforti* se obtuvieron valores similares, con 0.2-0.4 mg/mL (canela), 0.4-0.8 mg/mL (orégano) y 3.2 mg/mL (clavo). De esta manera, las MFC estudiadas para canela y orégano fueron las obtenidas para *P. roqueforti* en las dos cepas, ya que la MFC de *A. flavus* para estas dos sustancias se

encontraba también dentro de dichos rangos. Las concentraciones de clavo evaluadas fueron 1.6 mg/mL y 3.2 mg/mL, correspondiendo la primera al valor más alto dentro del rango de MFC de *A. flavus*, y la segunda a la MFC de *P. roqueforti*, que fue ligeramente mayor. La elección de las concentraciones se hizo de manera que permitiera por un lado, estudiar la MFC individual de cada cepa, y por otro establecer una comparativa de ambas cepas a una misma concentración dada.

Como se puede observar en la figura 4.11, a pesar de que la canela ha demostrado poseer la actividad antifúngica más alta en esta tesis, su cinética de muerte es más lenta en comparación con orégano y clavo. Este hecho es todavía más acusado en las concentraciones elevadas (fig. 4.11 d y 4.11 f) donde se observó un rápido descenso en los primeros minutos. Comparando el punto de muerte entre las dos cepas, podemos observar una ligera diferencia entre ellas, lo cual podría ser atribuible a que las tres sustancias mostraron unas MFC ligeramente menores para *A. flavus* que para *P. roqueforti*. Además, cabe mencionar la diferente forma descrita por las tres sustancias, especialmente en el caso de canela.

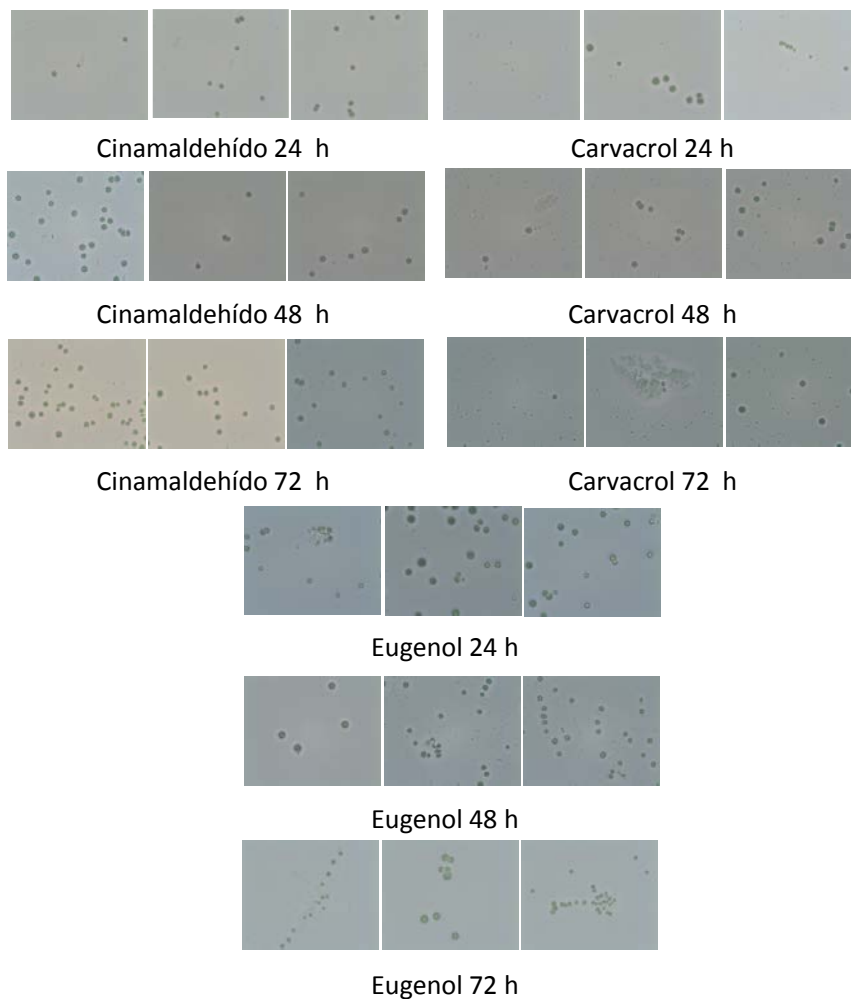
Como es bien sabido, la velocidad de acción de una sustancia activa está en relación con el mecanismo de acción de ésta, y no con su potencia antimicrobiana (Becerril R., 2011; Cebrián G., et al. , 2008). Los autores Rasooli I., et al. (2006) encontraron el mismo resultado, ya que al determinar la MIC de dos especies de tomillo por un método similar de macrodilución en caldo, la sustancia más activa mostró un comportamiento más lento en la curva de muerte.

Por último, las curvas de muerte mostradas sugieren un comportamiento diferente para el aceite esencial de canela que para las otras dos sustancias. El mismo hallazgo se obtuvo en un trabajo previo en el grupo GUIA con bacterias, apoyando la hipótesis de que el cinamaldehído (compuesto mayoritario de canela) entraría en el interior de la célula, mientras que carvacrol y eugenol tienen una acción más directa en la membrana (Becerril R., 2011).

## **4.2. Microscopía Óptica: Daño celular causado por los compuestos volátiles de cinamaldehído, carvacrol y eugenol**

Cabe mencionar que las imágenes de esporas que se muestran en este apartado corresponden a imágenes compuestas, es decir, debido a que en algunos casos las esporas se

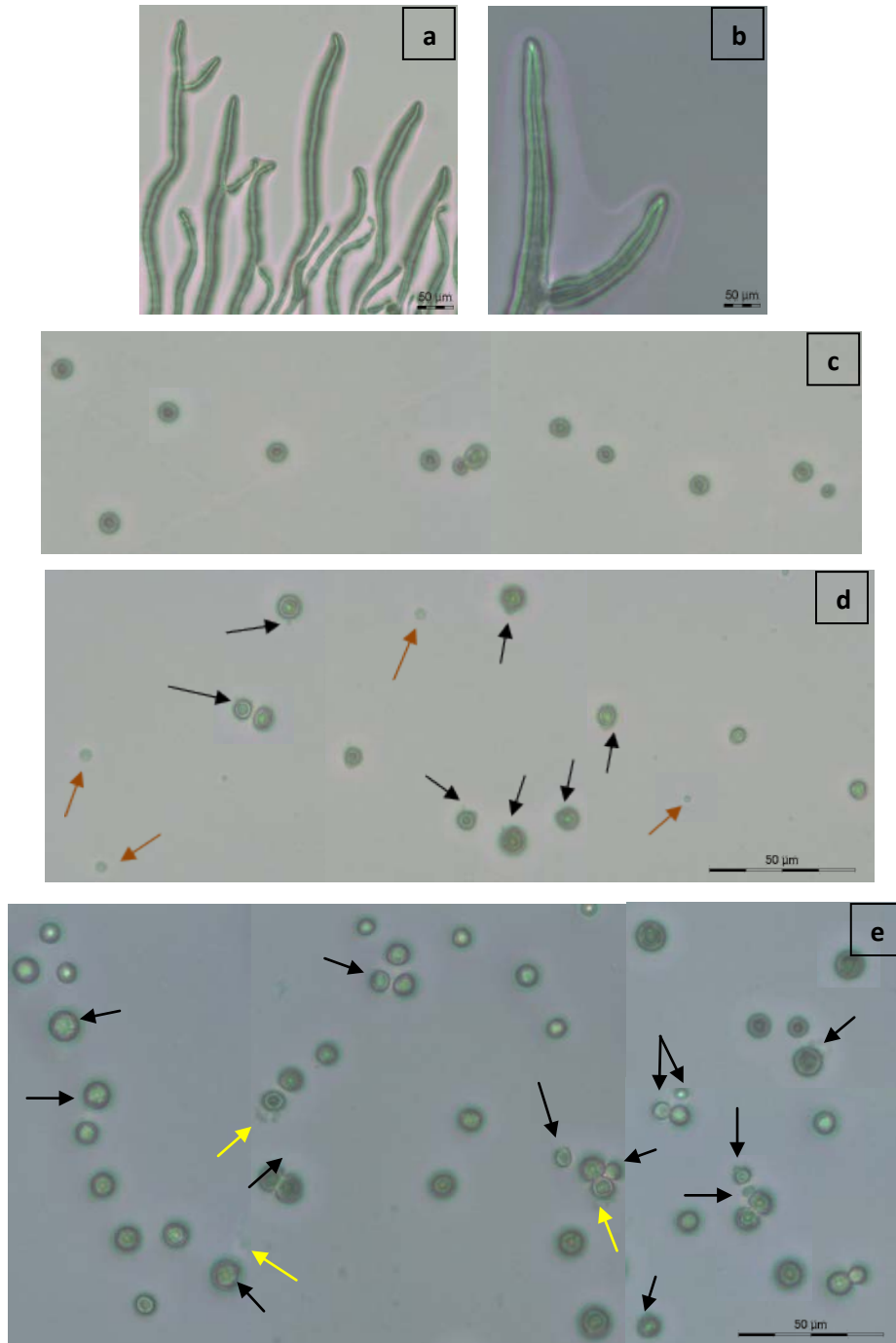
encontraban muy dispersas, éstas se agruparon dentro de la misma figura para facilitar la presentación de los resultados. De esta manera, para poder observar la distribución original de las esporas en cada una de las muestras, se ha incluido la figura 4.12, donde se ve como ejemplo tres de las numerosas imágenes tomadas del halo de inhibición para cada sustancia en los diferentes tiempos de exposición.



**Fig. 4.12** Distribución de las esporas de *A. flavus* en el H.I. de las placas activas con cinamaldehído, carvacrol y eugenol, en los diferentes tiempos de exposición.

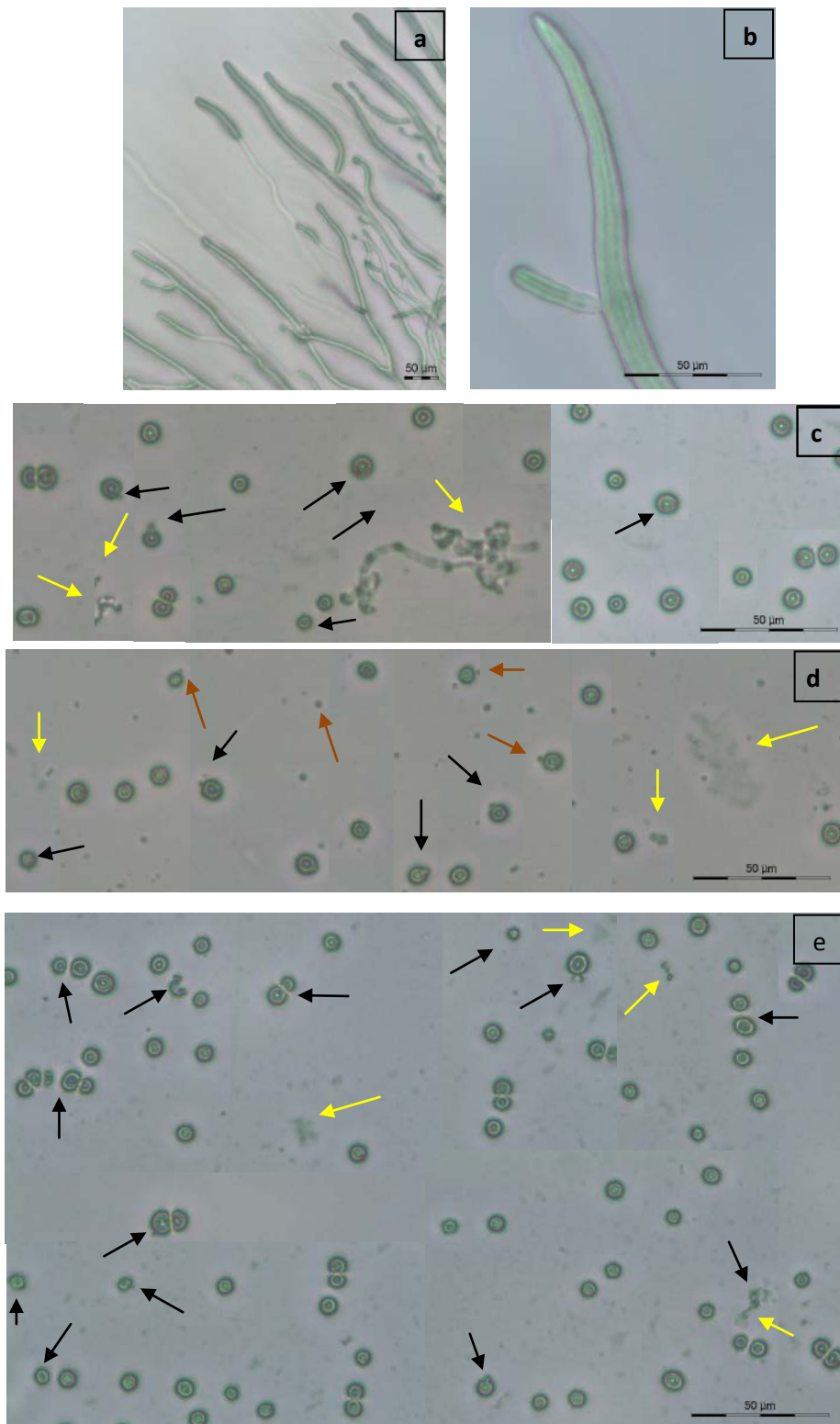
Los controles, inoculados mediante una alícuota de 10  $\mu$ L de inóculo ( $10^6$  CFU/mL), fueron creciendo de manera radial. Como era de esperar, el centro de la colonia presentó un desarrollo más elevado y desorganizado, lo cual dificultó enormemente la observación más allá de las 24 horas de incubación. Debido a esto, se estudió la morfología de las hifas más periféricas de la colonia, ya que además éstas pueden compararse con las hifas que se van desarrollando en el halo de retardo de las placas activas. Las vistas generales de las imágenes

fueron tomadas con el objetivo de 10, mientras que para la observación en detalle se utilizó el de 40. Las imágenes resultantes del daño de los tres compuestos tras 24 y 48 horas se muestran en las figuras 4.13 y 4.14.



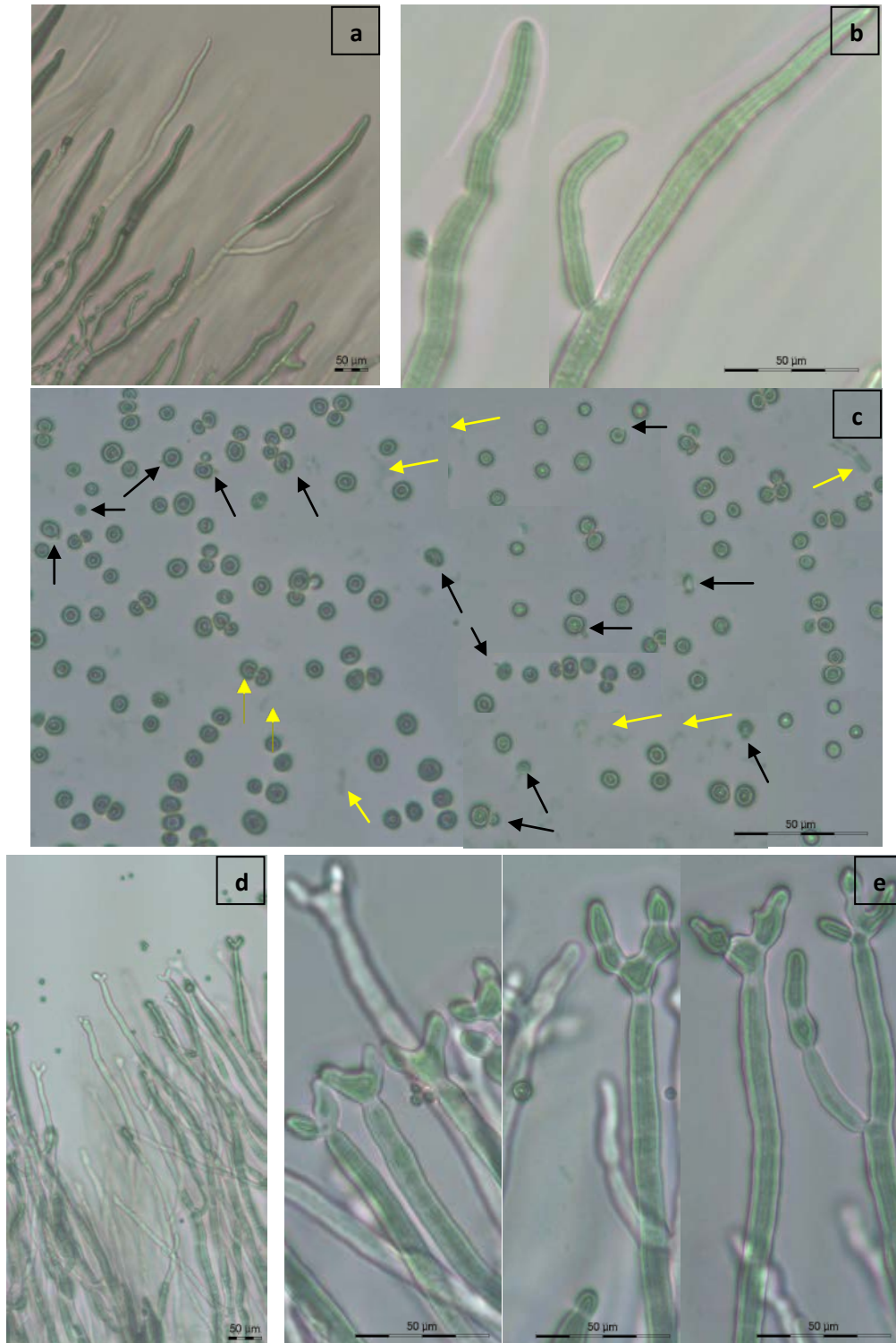
**Fig. 4.13** Daño celular en *A. flavus* tras 24 horas (m.óptica).

Control (a,b); cinamaldehído (c); carvacrol (d); eugenol (e). Las flechas de colores indican algunas de las zonas más relevantes de las alteraciones observadas: daño en membrana externa y pared celular (flecha negra); pérdida de contenido citoplasmático (flecha amarilla); formación de "blebs" en las placas expuestas a carvacrol (flecha roja).

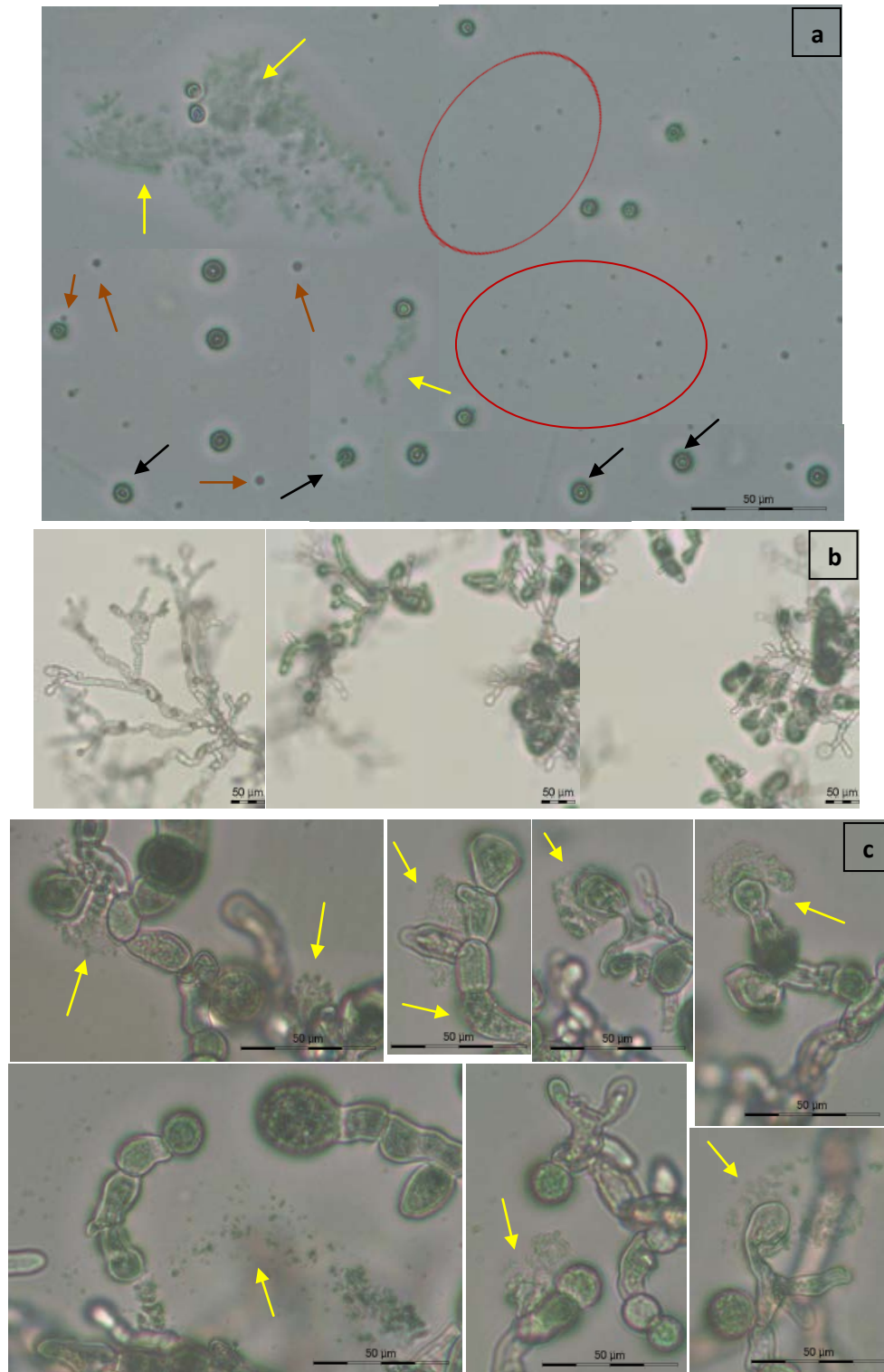


**Fig. 4.14** Daño celular en *A. flavus* tras 48 horas (m.óptica). Control (a,b); cinamaldehído (c); carvacrol (d); eugenol (e). Las flechas de colores indican algunas de las zonas más relevantes de las alteraciones observadas: daño en membrana externa y pared celular (flecha negra); pérdida de contenido citoplasmático (flecha amarilla); formación de “blebs” en las placas expuestas a carvacrol (flecha roja).

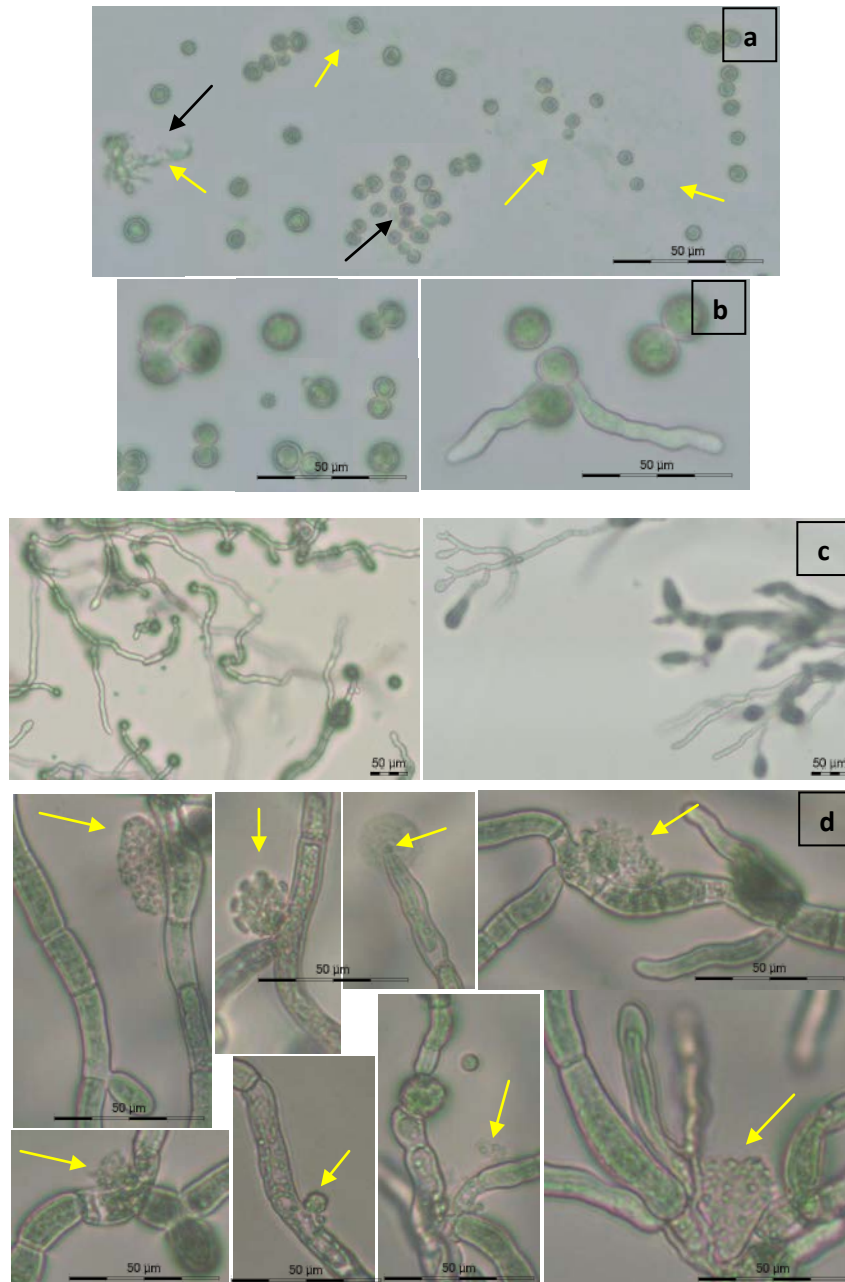
El daño tras 72 horas con cinamaldehído, carvacrol y eugenol se muestran en las figuras 4.15, 4.16 y 4.17 respectivamente.



**Fig. 4.15** Daño celular en *A. flavus* tras 72 horas por cinamaldehído (m.óptica). Control (a,b), halo de inhibición (c) y halo de retardo (d,e). Las flechas de colores indican algunas de las zonas más relevantes de las alteraciones observadas: daño en membrana externa y pared celular (flecha negra); pérdida de contenido citoplasmático (flecha amarilla); formación de "bleds" en las placas expuestas a carvacrol (flecha roja).



**Fig. 4.16** Daño celular en *A. flavus* tras 72 horas por carvacrol (m.óptica). Halo de inhibición (a) y halo de retardo (b,c). Las flechas de colores indican algunas de las zonas más relevantes de las alteraciones observadas: daño en membrana externa y pared celular (flecha negra); pérdida de contenido citoplasmático (flecha amarilla); formación de “bleds” en las placas expuestas a carvacrol (flechas y círculos rojos).



**Fig. 4.17** Daño celular en *A. flavus* tras 72 horas por eugenol (m.óptica). Halo de inhibición (a,b), y halo de retardo (c,d).

Tras las primeras 24 horas de incubación, todas las esporas del control habían germinado (fig. 4.13), mostrando en la periferia de la pequeña colonia hifas con un desarrollo normal, las cuales fueron creciendo de manera organizada con el fin de colonizar el sustrato (a, b). Las placas activas mostraron un crecimiento casi inapreciable en la periferia, ocupando el halo de inhibición casi la totalidad de la superficie. Las esporas inoculadas mostraron un daño mayor al ser expuestas a carvacrol (d) y eugenol (e) que a cinamaldehído (c). De esta manera, el cinamaldehído afectó de manera irregular a las esporas, ya que una parte de ellas sí se



mostraron afectadas, mientras que el aspecto de otras fue aparentemente normal. Sin embargo, en el caso de carvacrol destacó la reducción en el número de esporas por campo con respecto a cinamaldehído y eugenol, algo que puede observarse claramente en la figura 4.12. En este caso, las pocas esporas que se encontraron presentaron las membranas visiblemente alteradas, mostrando múltiples prolapsos y evaginaciones en la pared celular (flechas negras), muchas de ellas con pérdida del contenido celular (flechas amarillas). No obstante, la observación más destacable fue la formación de microvesículas en los tres tiempos de exposición (flechas y círculos rojos), todos ellos de un tamaño prácticamente constante, con un diámetro promedio en torno a 2  $\mu\text{m}$ . Además de esto, la concentración de dichas vesículas fue aumentando considerablemente, encontrando a las 72 horas muy pocas esporas en el halo de inhibición y estando las pocas restantes severamente dañadas. Aunque no se ha encontrado ningún resultado semejante en otros trabajos con mohos, la formación de “bled” se ha visto en algunas células durante la apoptosis celular, donde la membrana celular que se desprende forma vesículas que acaban expandiéndose debido a una contracción celular mediada por los filamentos de actina del citoplasma (Wickman G., et al. , 2012; Wickman G. R., et al. , 2013). Aunque es cierto que las imágenes obtenidas no bastan para poder afirmar de manera rotunda de que se traten de “microbleds”, es un resultado que tras haberse repetido de manera constante en todos los tiempos, apunta una vez más a un daño severo en la pared y en la membrana externa.

A excepción de la formación de las mencionadas vesículas y tal y como se ha comentado antes, los daños causados por eugenol fueron muy similares a los de carvacrol. En ambos compuestos se observó irregularidad de las envolturas externas con destacados prolapsos, encontrando en numerosas ocasiones y sobre todo a las 72 horas, gran cantidad de restos celulares dispersos (figuras 4.16 y 4.17).

Sin embargo, en el caso de cinamaldehído, a las 24 horas se observaron muchas esporas con apariencia normal, aumentando el daño a partir de las 48 horas, observando entonces esporas completamente abiertas y pérdida de contenido celular, aunque como bien se ha dicho, éste se liberó en menor cantidad que en eugenol y carvacrol.

Además de las esporas, tras las 72 horas de incubación se formaron en las placas activas los denominados halos de retardo. Por tanto, en este tiempo se analizaron muestras procedentes del halo de inhibición y del halo de retardo para cada compuesto. Si comparamos las imágenes tomadas del control con los compuestos activos, podemos

destacar varios aspectos. Como se ha comentado con anterioridad, las hifas control correspondieron a la periferia de la colonia del moho, concretamente a la parte distal de éstas, lo que se conoce como ápex. Éstas crecieron de manera unidireccional en los tres tiempos del control (fig.4.13-4.15), siendo las hifas rectilíneas, de paredes turgentes y sin mostrar ramificaciones en su parte más distal. Sin embargo, las hifas del halo de retardo a las 72 horas mostraron claras anomalías en los tres compuestos activos. De esta manera, en el halo de retardo expuesto a cinamaldehído se observaron hifas unidireccionales como en el control, pero prácticamente todas ellas bifurcadas e incluso trifurcadas en el ápex (fig. 4.15).

Carvacrol y eugenol volvieron a mostrar un comportamiento común, ya que en ambos casos las hifas desarrolladas en el halo de retardo crecieron formando pequeñas colonias irregulares, sin orden aparente (fig. 4.16 b y fig. 4.17 c). Sin embargo, el hallazgo más importante de estas dos sustancias, fue que muchas zonas de esas hifas se encontraron dañadas, vertiendo hacia el exterior contenido citoplasmático, viéndose incluso en algunos casos poros en la envoltura externa (fig. 4.16 c y fig. 4.17 d).

En la introducción general de la tesis hemos visto que los mohos son organismos complejos, en cuanto a su estructura, crecimiento y reproducción. Tal y como y se vio, el citoesqueleto de los mohos es una estructura dinámica, que juega un papel importante en funciones vitales como son el mantenimiento de la forma, y el control del movimiento celular, pero también en el transporte de vesículas y orgánulos y en la división celular. Dentro del citoesqueleto de los mohos, los principales componentes son los filamentos de actina y los microtúbulos, ambos de composición proteica. Los primeros están constituidos por monómeros de actina y los segundos por heterodímeros ensamblados de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina (Riquelme M., et al., 2011). Después de unos años de controversia donde se creía que los microtúbulos citoplasmáticos no influían en el crecimiento apical de la hifa, se demostró que efectivamente estos sí que juegan un papel fundamental, ya que a pesar de que durante el proceso de mitosis la mayoría de estos se desensamblan, una pequeña porción permanece durante la mitosis para cubrir las necesidades requeridas para el crecimiento del ápex. De hecho, el transporte de larga distancia del material desde las vesículas secretoras se asocia a dichos microtúbulos (Riquelme M., 2013). En un trabajo anterior de los mismos autores, el moho *Aspergillus nidulans* fue tratado con dos sustancias inhibitoras del citoesqueleto. En el caso de la exposición a benomil, provocó un crecimiento anómalo de las hifas, mostrando en las imágenes un cambio en la dirección de éstas y una ramificación excesiva. Sin embargo, el tratamiento con citocalasina A no afectó a la direccionalidad de las hifas, pero sí causó una

bifurcación en el ápex de las mismas (Hickey P. C., et al., 2005). A pesar de que harían falta estudios suplementarios que apoyaran esta hipótesis, los resultados obtenidos en este experimento en relación al halo de retardo de cinamaldehído tras 72 horas, donde se observó una clara excesiva bifurcación e incluso trifurcación en el ápex de las hifas, puede ser un indicador de una afectación del citoesqueleto, provocando así el crecimiento anómalo en comparación con las hifas control.

Debido a las limitaciones de resolución de microscopía óptica, el siguiente experimento se llevó a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido (“SEM” Scanning Electron Microscopy), para así poder completar la observación de los daños provocados por cinamaldehído, carvacrol y eugenol, utilizando en esa ocasión los aceites esenciales de los cuales derivan estos.

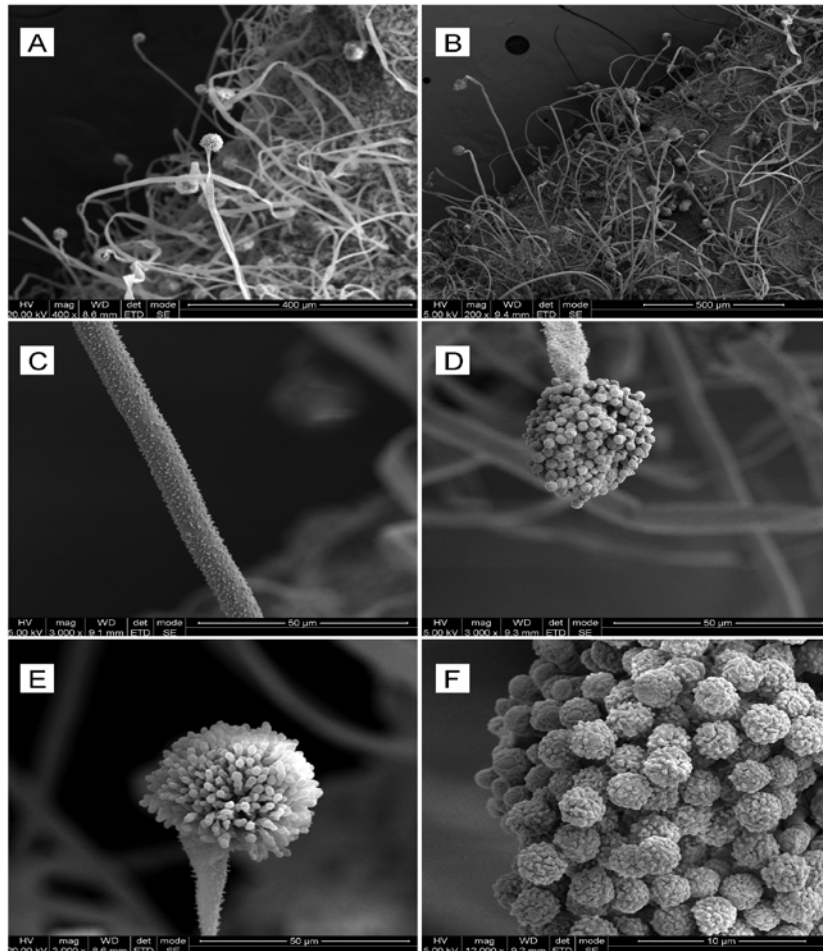
Por tanto, la discusión en torno al daño ultraestructural provocado tanto por los aceites esenciales como por sus compuestos mayoritarios, se abordará en el siguiente apartado de SEM, junto con la comparación bibliográfica de los resultados.

### **4.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

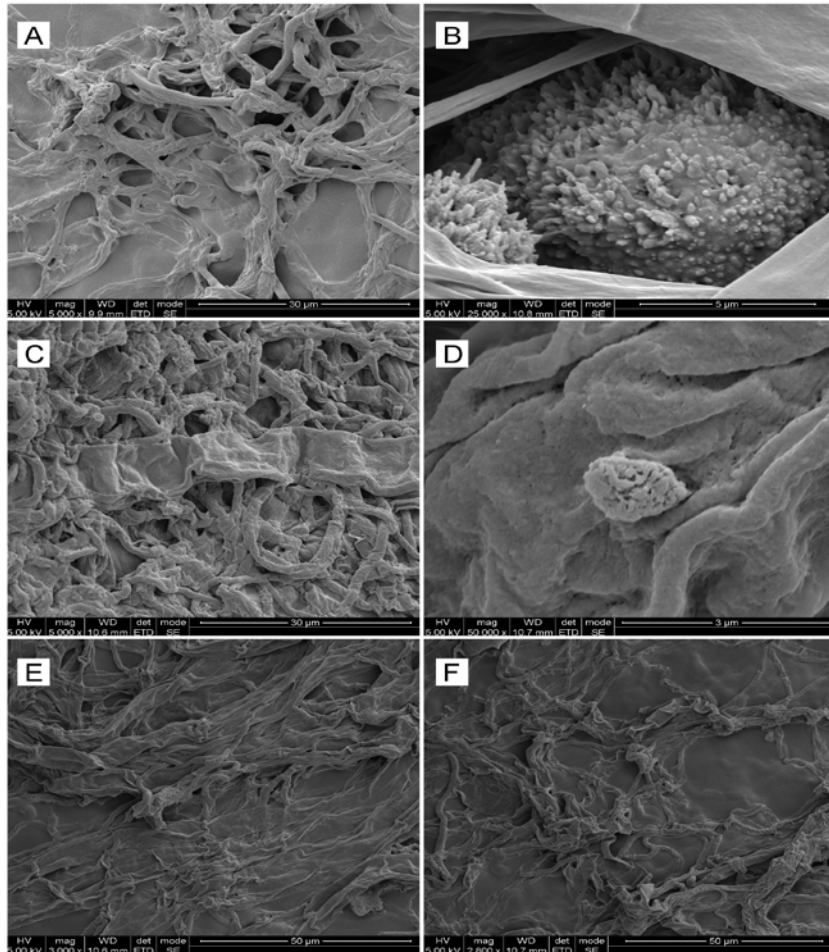
#### ***4.3.1. Daño ultraestructural provocado por el aceite esencial de canela en fase vapor***

Debido a que el aceite esencial de canela ha sido la sustancia que ha aportado una mayor actividad a lo largo de esta tesis, en este primer experimento de SEM se quiso estudiar el daño producido por sus compuestos volátiles sobre una de las cepas más estudiadas, *A. flavus*. Para ello, cabe recordar que las placas activas se formaron mediante un disco de aceite esencial de canela en fase vapor, evaluando en este caso el halo de retardo formado.

En las figuras 4.18 y 4.19 se muestran los resultados de las muestras control (sin disco) y activas respectivamente.



**Fig. 4.18** Resultados de SEM de las muestras control. Vista general (a, b); detalles de una hifa (c) y un conidióforo (d, e) y de las esporas formadas en éste (f) donde se pueden apreciar las espículas características de la superficie de éstas.



**Fig. 4.19** Resultados de SEM de las muestras activas. Daño provocado con diferente volumen de aceite esencial de canela en fase vapor: 10  $\mu$ L (a, b); 20  $\mu$ L (c, d); 30  $\mu$ L (e, f). Detalle de un conidióforo claramente afectado (b). Como puede verse, la esporulación se redujo casi a su totalidad, donde la única espora individual encontrada estaba completamente deformada (d).

Como se ha discutido de manera reiterada a lo largo de la tesis, el halo de retardo que se forma tras la exposición a un aceite esencial constituye la concentración sub-inhibitoria de éste. A pesar de que la observación macroscópica muestra un micelio blanquecino con remarcable ausencia de esporulación, las muestras analizadas reflejan que la parte más cercana de ese halo, colindante con el halo de inhibición, se encuentra altamente dañado.

En el control (fig. 4.18) podemos observar un micelio aéreo donde se alcanzan numerosos conidióforos (a, b). Las hifas se muestran rígidas, conservando su forma tubular y con la pared rugosa característica (c). Los conidióforos muestran vesículas globosas (d, e), así como las esporas en detalle con las espículas cubriendo la superficie de éstas (f).

Por el contrario, las muestras expuestas al aceite esencial de canela mostraron un daño evidente (figura 4.19). Con 10  $\mu\text{L}$  de activo, el micelio se mostró como un conjunto de hifas que habían perdido la forma, encontrándose agregadas unas a otras. Los pocos conidióforos encontrados mostraban un fuerte daño en las fiálides ("*phialides*"), muchas de ellas con ausencia de esporas. El aumento de volumen de aceite esencial provocó una masa de micelio más agregada (c), obteniendo con 30  $\mu\text{L}$  hifas prácticamente adheridas al sustrato (e, f) y una inhibición completa de la esporulación. Una de las esporas individuales encontradas (d) se mostró completamente deformada, apreciando en esa misma imagen, las hifas completamente aplanadas (d). Los daños encontrados podrían deberse a dos escenarios diferentes, que el moho creciera de manera aberrante debido a la exposición de los compuestos volátiles de canela, o bien que éstos provocaran el daño una vez crecido éste.

#### ***4.3.2. Daño ultraestructural causado por los aceites esenciales de canela, orégano y clavo en contacto directo***

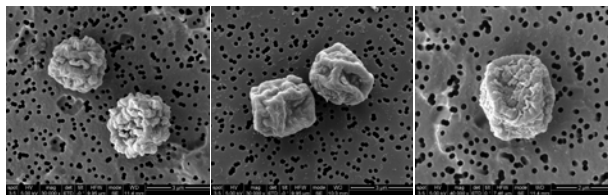
Tal y como vimos en las curvas de muerte (fig. 4.11), los aceites esenciales de canela, orégano y clavo mostraron diferencias entre ellos, destacando sobre todo el comportamiento de canela frente a orégano y clavo. En el experimento posterior vimos que efectivamente, cinamaldehído (compuesto mayoritario de canela) mostró un comportamiento claramente diferente respecto a carvacrol y eugenol, compuestos mayoritarios de orégano y clavo respectivamente. Por último, al inicio del capítulo 3 comprobamos que la variación en la concentración de inóculo afectaba más a la actividad de canela y cinamaldehído que al orégano, clavo y ambos compuestos mayoritarios, lo cual se ha asociado precisamente con una diferencia en el mecanismo de acción de los agentes activos.

En resumen, todos los experimentos llevados a cabo hasta ahora apuntan a que el aceite esencial de canela se comporta de una manera diferente y menos directa que orégano y clavo.

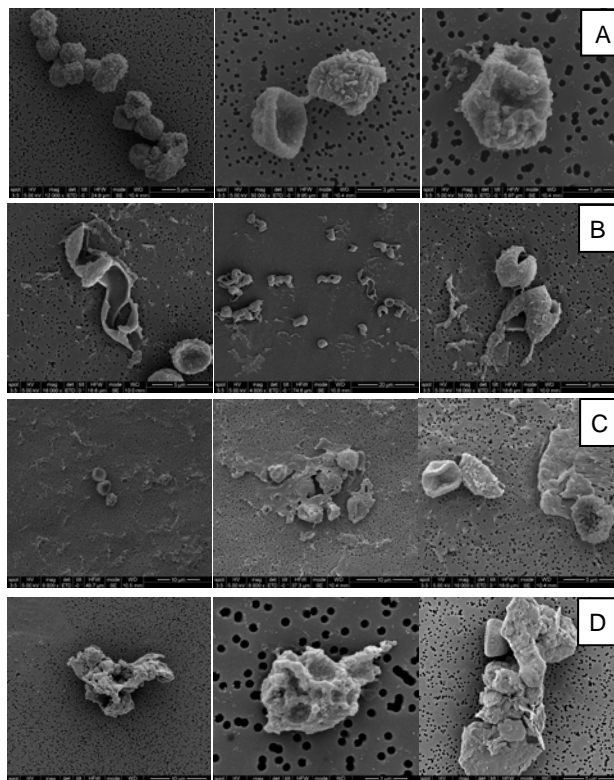
Por este motivo, en este segundo experimento de SEM se quiso estudiar el daño producido en las esporas del moho *A. flavus* cuando éstas son expuestas a los aceites esenciales de canela, orégano y clavo a concentraciones fungicidas. Como se ha explicado en la metodología, se partió desde medio líquido, analizando la morfología de las esporas inoculadas en los tubos problema. Las MFC (Concentración Mínima Fungicida) obtenidas previamente en el capítulo 2, fueron: canela (0.1-0.2 mg/mL), orégano (0.4 mg/mL) y clavo

(0.8-1.6 mg/mL). En el caso de canela, además de las dos concentraciones del rango MFC se evaluaron dos concentraciones superiores, ya que el experimento de microscopía óptica discutido en este capítulo (ver apartado 4.2) había mostrado daños menos visibles en las envolturas externas para cinamaldehído que para los otros compuestos. Las concentraciones de orégano estudiadas correspondieron a su MFC y una concentración superior, mientras que con clavo éstas fueron las dos halladas en el rango de MFC.

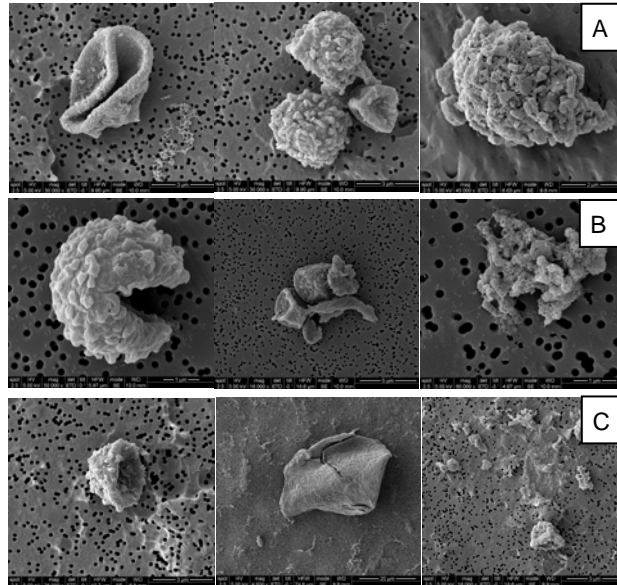
Las figuras 4.20-4.23 muestran las imágenes de las esporas control, tratadas con canela, orégano y clavo respectivamente.



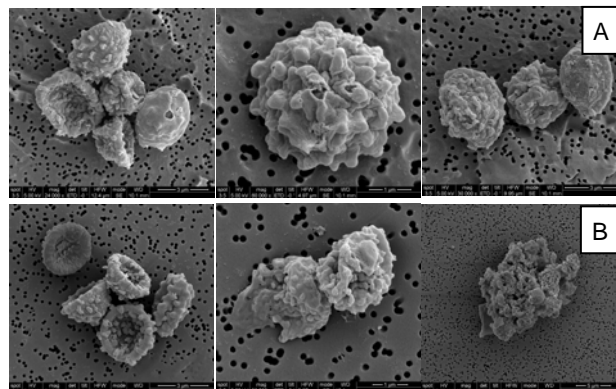
**Fig. 4.20** Resultados de SEM de esporas control (a-c)



**Fig. 4.21** Resultados de SEM de esporas tratadas con canela. Cada fila muestra tres réplicas de la misma concentración: 0.1 mg/mL (a), 0.2 mg/mL (b), 0.4 mg/mL (c), 0.8 mg/mL (d).



**Fig. 4.22** Resultados de SEM de esporas tratadas con orégano. Cada fila muestra tres réplicas de la misma concentración: 0.4 mg/mL (a), 0.8 mg/mL (b), 1.6 mg/mL (c).



**Fig. 4.23** Resultados de SEM de esporas tratadas con clavo. Cada fila muestra tres réplicas de la misma concentración: 0.8 mg/mL (a) y 1.6 mg/mL (b).

Como puede observarse en la figura 4.21 a, las esporas expuestas a canela 0.1 mg/mL fueron parcialmente afectadas, ya que parte de ellas no mostraron daño (izquierda), mientras que otras se vieron claramente deformadas (centro). Al aumentar la concentración a 0.2 mg/mL (b), siendo ésta la concentración mayor dentro del rango de MFC de canela, vemos que el daño es severo, estando la mayoría de las esporas completamente seccionadas. Concentraciones superiores al rango de MFC mostraron una destrucción masiva de éstas, formando en muchos casos una masa celular irreconocible (c, d).



Las esporas expuestas a la MFC de orégano (0.4 mg/mL) se vieron claramente más dañadas que la concentración más baja del rango de MFC de canela. Es decir, todas las esporas de esta concentración estaban alteradas (fig. 4.22 a), bien deformadas (izquierda) o formando una masa celular (derecha). De manera similar que con canela, al aumentar la concentración al doble y triple de la MFC, la mayoría de éstas se mostraban adheridas formando una masa. Sin embargo, lo que destacó de orégano fueron los poros que se pueden observar en la superficie de la pared de celular de muchas de las esporas, como muestra la imagen del centro de la concentración de 0.4 mg/mL (fig. 4.22 a) y la foto de la espora abierta de la izquierda de la concentración de 0.8 mg/mL (fig. 4.22 b).

Por último, las esporas tratadas con clavo (fig. 4.23) conservaron más su forma redondeada, formando éstas una masa celular sólo con la concentración más elevada de su rango de MFC (1.6 mg/mL) (figura 4.23 b). Una vez más, el clavo mostró especial daño en la pared celular, como bien muestran los enormes poros de las imágenes izquierda y centro de la MFC (figura 4.23 a).

#### **4.3.3. Discusión de los resultados de otros autores**

Los experimentos de microscopía óptica y electrónica (SEM), han demostrado que los aceites esenciales son capaces de alterar la morfología del moho tanto en fase vapor como en contacto directo.

Por una parte, los daños obtenidos en el experimento de microscopía óptica por carvacrol y eugenol en fase vapor (ver apartado 4.2), mostraron desde el principio en el halo de inhibición esporas con pérdida de integridad de membrana, causando una liberación de material citoplasmático. Así mismo, las hifas del halo de retardo tras 72 horas de exposición formaron pequeñas colonias formadas por hifas con la pared dañada en muchas ocasiones. Además, los poros observados en SEM en las envolturas externas de las esporas de *A. flavus* por los aceites esenciales de orégano y clavo indican que la pared celular es una diana clara de sus compuestos fenólicos carvacrol y eugenol respectivamente. También, cabe recordar que las curvas de muerte obtenidas en el primer experimento de la tesis (ver apartado 4.1), mostraron una mayor velocidad de acción de ambos aceites esenciales comparado con canela, acentuándose el resultado con las dosis altas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chami F., et al. (2005), donde los aceites esenciales de orégano y clavo demostraron afectar a la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. No sólo el

comportamiento de las curvas de muerte fue muy similar a los mostrados en este capítulo, sino que las imágenes de SEM revelaron grietas en la superficie de las levaduras al tratarlas con orégano, y formas aberrantes de éstas con clavo. El orégano también causó alteraciones en la superficie de *Sclerotinia sclerotiorum* (Soylu S., et al. , 2007). La misma conclusión se ha obtenido en trabajos posteriores con otras sustancias como *Thymus pulegioides* (Riquelme M., et al., 2007) cuyos compuestos mayoritarios son carvacrol y timol y con *Syzygium aromaticum* con un alto contenido de eugenol (Pinto E., et al. , 2009). En ambos casos, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* se tiñeron positivamente con IP (Yoduro de Propidio), un fluorocromo que tiene la capacidad de penetrar en la célula tras el daño en las envolturas externas, reduciendo además el contenido de ergosterol, compuesto específico de la membrana plasmática fúngica. De esta manera se hace hincapié una vez más, en la gran afinidad de estos compuestos por la pared celular. Hay que tener en cuenta que la reducción de la biosíntesis de ergosterol torna más porosa a la membrana, y que además, el grupo hidroxilo característico de estos compuestos fenólicos aumenta su capacidad hidrofílica, facilitando así la interacción con la membrana plasmática (Ahmad A., et al. , 2011).

En relación a cinamaldehído, merece una mención especial la comentada bifurcación y trifurcación del ápex de las hifas del halo de retardo formado tras 72 horas en fase vapor, obtenidas en el experimento de microscopía óptica. Tal y como se ha discutido, las hifas mantuvieron la unidireccionalidad hacia la colonización del sustrato, pero la excesiva bifurcación manifiesta una clara alteración en su crecimiento. Además, las imágenes del segundo experimento de SEM a la concentración de MFC más elevada del rango (0.2 mg/mL) mostró las esporas completamente seccionadas y abiertas, mientras que la concentración más baja de MFC les afectó de manera irregular. Khan M. S. A., et al. (2011) midieron la actividad antielastasa y antiqueratinasa de varias sustancias en el moho *Aspergillus niger*, en el que el cinamaldehído provocó la reducción más alta de la enzima antielastasa y mayor disminución en la actividad de la enzima queratinasa que eugenol. *A. niger* se escogió para dicho experimento, porque presentaba una mayor producción de dichas proteinasas, estando éstas relacionadas con la patogenia del moho, ya que facilitan la destrucción tisular y digieren importantes proteínas como los anticuerpos (Khan M. S. A., et al., 2011). En levaduras del género *Candida*, también isoeugenol provocó daños más severos en la membrana respecto a metoxicinamaldehído, afectando además ambos compuestos a la actividad de la enzima ATP-asa, aunque el pH del interior celular disminuyó en mayor grado en las células tratadas con isoeugenol. Además de esto, este trabajo destaca que ambas

sustancias fueron activas frente a todas las cepas testadas, incluyendo aquellas resistentes a fluconazol, causando además un nivel de toxicidad menor que éste, ya que el porcentaje de hemólisis encontrado fue menor (Shao X., et al. , 2013). Los mismos autores obtuvieron el mismo resultado un año más tarde con cinamaldehído (Shreaz S., et al. , 2013). Por otra parte, la reducción en la esporulación causada por la concentración sub-inhibitoria del aceite esencial de canela en fase vapor (ver apartado 4.3.1), ha sido observada también por otros autores en el caso de cinamaldehído, donde se puede observar en las imágenes de microscopía óptica, conidióforos incompletos (Carmo E. S., et al., 2008).

En conclusión, los resultados mostrados en este capítulo apoyan la hipótesis que se baraja desde hace algunos años, que apunta a que el cinamaldehído, compuesto principal del aceite esencial de canela empleado, podría entrar al menos parcialmente, en el interior de la célula, actuando de esta manera como una sustancia activa multi-target (Becerril R., 2011). En los trabajos con bacterias se han obtenido conclusiones parecidas a los mostrados en este capítulo, ya que carvacrol y eugenol provocan una disrupción mayor de la membrana que cinamaldehído, aumentando los dos primeros la permeabilidad de ésta, e incrementando el contenido extracelular de ATP en comparación con cinamaldehído (Oakley B. R., et al., 1985). También en bacteriología se ha encontrado que el cinamaldehído juega un papel fundamental como inhibidor de la división celular, ya que modifica la morfología del “Z ring” de las bacterias (Wickman G. R., et al., 2013). Además de esto, los resultados mostrados en un trabajo previo del grupo GUIA evidenciaron un daño mayor en la pared celular bacteriana por los films activos de orégano que de cinamaldehído, detectando además cinamaldehído en el extracto de células muertas (Becerril R., et al. , 2007).

Además de las sustancias evaluadas en este capítulo, muchos otros compuestos han demostrado tener capacidad de alterar la morfología de los mohos, como es el caso del aceite esencial de tomillo, (Rasooli I., et al., 2006), camomila (Tolouee M., et al. , 2010) y naranja (Sharma N., et al. , 2008). En este último, se pueden observar bifurcaciones en el ápex de las hifas de *A. niger*, de manera similar a los resultados discutidos para el halo de retardo de cinamaldehído en microscopía óptica.

También ha habido avances en el estudio del mecanismo de acción de los aceites esenciales. De esta manera, un trabajo reciente demostró que el aceite esencial del árbol del té, provocaba cambios en la estructura de *Botrytis cinerea*, obteniendo un incremento de los ácidos grasos saturados en detrimento de los insaturados (Shao X., et al., 2013). El mismo

resultado fue obtenido unos años antes por Di Pasqua R., et al. (2006) en el tratamiento de bacterias con aceites esenciales. Otro de los estudios relevantes de Pinto et al., se centró en la actividad antifúngica del aceite esencial *Ferulago capillaris*, constituido principalmente por monoterpenos hidrocarbonados. A diferencia de un trabajo previo de la misma autora discutido anteriormente, en este caso el aceite esencial evaluado no redujo el contenido de ergosterol. Sin embargo, el estudio arrojó una aportación interesante, ya que a pesar de que a partir del octavo de la MIC (MIC/8) se redujo la actividad mitocondrial hasta en un 50 %, la posterior evaluación del potencial de membrana mitocondrial por medio de la acumulación de rodamina 123, dio resultados inesperados. A diferencia de lo que ocurría con el yoduro de propidio, la rodamina es un fluorocromo que necesita potencial de membrana para poder penetrar, por lo que tiñe selectivamente las células vivas. De esta manera, las concentraciones inferiores a MIC/16 provocaron un aumento progresivo en la acumulación de dicho fluorocromo, encontrando el mismo resultado al aumentar progresivamente la concentración activa hasta llegar a un valor próximo al control con el doble de la MIC. El primer resultado se asoció con una recuperación del potencial de membrana al ir disminuyendo gradualmente las concentraciones sub-inhedoras, mientras que el aumento de fluorescencia a concentraciones inhibitorias elevadas se relacionó con un mecanismo de defensa celular, ya que existen proteínas anti-apoptóticas que puedan expresarse en casos de daño celular severo en un intento de contrarrestar el estrés oxidativo (da Cruz Cabral L., et al., 2013).

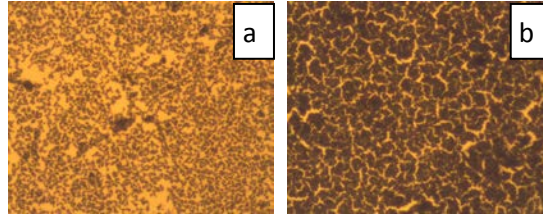
#### **4.4. Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)**

En ambos experimentos se partió de placas activas inoculadas expuestas a un disco de canela en fase vapor y de controles inoculados pero sin agente activo. Sin embargo, tal y como vimos en la metodología, la zona escogida así como el análisis de los datos de cada experimento varió.

##### **4.4.1. Primer experimento de FTIR**

A priori, la optimización del depósito dio buenos resultados, ya que con 600  $\mu\text{L}$  de volumen de una suspensión de esporas a una concentración de  $10^7$  sp/mL, se consiguió cubrir la superficie del soporte de ZnSe de manera homogénea (figura 4.24). Además de esto, el conteo por cámara de Neubauer demostró que las dos centrifugaciones realizadas desde

la extracción de las esporas hasta el depósito final en la ventana de IR no provocaron pérdida de muestra.



**Fig. 4.24** Depósito de muestra en el soporte de ZnSe:  $10^6$  sp/mL (a) y  $10^7$  sp/mL (b).

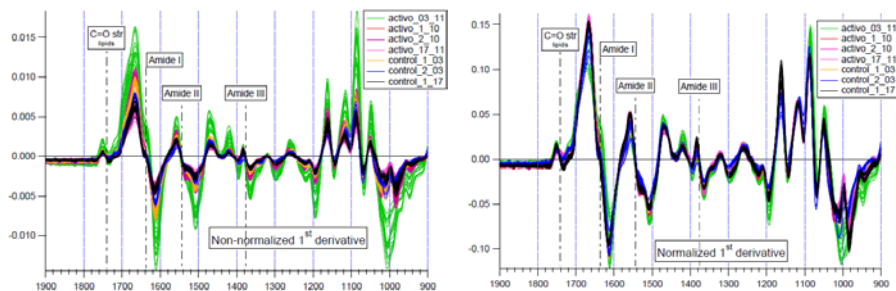
Por cada una de las muestras se analizaron hasta 20 puntos diferentes de cada ventana de IR, es decir, contando las tres réplicas se obtuvo un total de 60 espectros para control y activo. Tras una compensación atmosférica y normalización de los espectros, se realizó una primera derivada (utilizando el programa OPUS).

Después de un primer barrido que abarcó un rango de longitud de onda de 800 a  $2800\text{ cm}^{-1}$ , de todas las bandas obtenidas, nos quedamos con un total de 7: amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1600\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$ ), ácidos nucleicos ( $1180\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ), carbohidratos ( $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ), lípidos (C=O en  $1725\text{ cm}^{-1}$ , C-H entre  $2800\text{-}2996\text{ cm}^{-1}$ ), y las de los enlaces N-H derivados de las proteínas ( $3025\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ ). Las bandas fueron muy similares a las descritas por Naumann A. (2009) y Saulou C., et al. (2010) para la clasificación de 26 cepas diferentes de mohos, y para estudiar el mecanismo de acción de una sustancia activa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente.

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis cluster, siguiendo el algoritmo de Ward y calculando las diferencias mediante la distancia Euclídea. No se encontraron diferencias entre las muestras control y activo, considerando las tres réplicas independientes realizadas en diferentes sesiones.

Esto pudo deberse fundamentalmente a dos problemas esenciales. En primer lugar, la muestra estaba compuesta por esporas recogidas de la zona 2, tanto de la parte más colindante al halo de retardo como del área más periférica de la placa Petri. De esta manera, en el hipotético caso de haber sufrido algún cambio bioquímico, la heterogeneidad de la muestra biológica recogida impidió una interpretación más precisa de los resultados obtenidos.

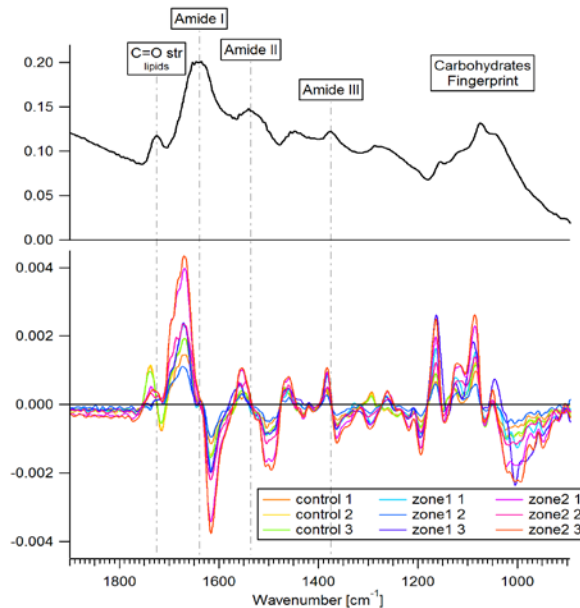
Por otra parte, a pesar de que el depósito cubría prácticamente la totalidad de la superficie del soporte utilizado, el espesor resultante no fue homogéneo. Esto se puede apreciar claramente si observamos la primera derivada de las principales bandas evaluadas, de los espectros normalizados y sin normalizar (figura 4.25). Este resultado nos indica que otro de los problemas encontrados en esta parte experimental, radicó en las diferencias notables entre los espesores de las diferentes muestras analizadas.



**Fig. 4.25** Primera derivada de algunos espectros de muestras control y activas. Espectros no normalizados (izquierda) y normalizados (derecha).

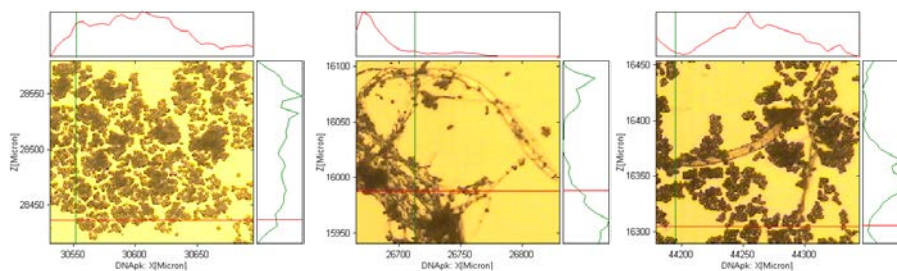
#### 4.4.2. Segundo experimento de FTIR

Tras los resultados del experimento anterior, en este caso se recogieron esporas de zonas diferentes, halo de retardo (zona 1) y la zona periférica (zona 2), constituyendo cada una de ellas una muestra independiente. Se decidió analizar ambas zonas, ya que el halo de retardo se forma debido a una clara influencia del aceite esencial, la cual se manifiesta por una disminución macroscópica del crecimiento del moho, acompañada por una fuerte reducción en la tasa de esporulación. Además, se quiso estudiar también la influencia del tiempo de exposición en los posibles cambios bioquímicos experimentados, por lo que se prepararon sets de muestras de 6, 11 y 24 días de incubación. En la figura 4.26 se muestra uno de los espectros de una muestra control, con las bandas más relevantes para este estudio, y debajo, la primera derivada de esas mismas bandas, de diferentes muestras control y activas.



**Fig. 4.26** Espectro de FTIR de una de las muestras de *A. flavus*. Arriba: señalización de las bandas más importante. Abajo: primera derivada correspondientes a controles, halo de retardo (zona 1) y zona periférica de la placa Petri (zona 2).

Sin embargo, la preparación de la muestra no resultó adecuada, obteniéndose además una distribución irregular en el depósito de IR, como muestran las imágenes del microscopio acoplado, correspondientes al control, zona 1 y zona 2 de una de las réplicas de 6 días (figura 4.27).

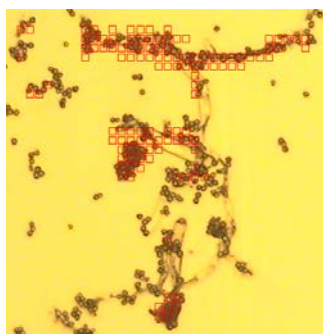


**Fig. 4.27** Depósito de muestra en el soporte de ZnSe de una de las réplicas activas de 6 días: control (izquierda), zona 1 (centro), zona 2 (derecha).

El análisis de datos fue complejo y se realizó en diferentes etapas. En primer lugar se integraron las 7 bandas definidas en el primer experimento de FTIR, sin embargo, dentro de la misma muestra se observaron diferencias de señal notables dentro de los 1024 espectros obtenidos por cada punto. Evidentemente, este problema se relacionó de manera directa con las irregularidades encontradas entre los depósitos de las diferentes muestras, tanto en distribución como en espesor del film creado.

Se intentó solventar el problema del depósito de dos maneras. En primer lugar se establecieron ratios mediante una combinación de las 7 bandas descritas anteriores, lo cual ayudó a disminuir la enorme variabilidad encontrada en primera instancia. Sin embargo, seguía existiendo un problema fundamental, que consistió en que muchos puntos tomados por el detector FPA, realmente no contenían muestra de moho. Debido a esto, se creó un filtro común, utilizando para ello 3 bandas de gran anchura partiendo de las 7 definidas anteriormente, quedando de esta manera: “proteínas” (1754-1485  $\text{cm}^{-1}$ ), “proteínas & lípidos” (1479-1193  $\text{cm}^{-1}$ ) y “carbohidratos” (1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ ). Para ello, se contó con las imágenes del microscopio acoplado, de manera que fue posible asociar los datos de los espectros con la zona de muestra evaluada. El procesamiento matemático quedó determinado de manera que se estableció que un espectro contenía muestra biológica en el caso de cumplirse de manera simultánea los siguientes tres criterios fundamentales: el valor para la banda normalizada de “proteínas” era mayor de 0.4, el valor para la banda normalizada de “proteínas & lípidos” era mayor de 0.375 y por último, el valor de la banda de “carbohidratos” normalizada era mayor de 0.3.

Se aplicó el mismo filtro creado para todas las muestras, de manera que permitió descartar aquellos datos que no procedían del moho, sino del soporte vacío. En la figura 4.28 se puede ver como ejemplo, una de las imágenes del microscopio acoplado de una de las muestras evaluadas, donde cada cuadrado hace referencia a un marcador del tamaño de 1 pixel.



**Fig. 4.28** Filtro aplicado para análisis por FTIR.

Como puede observarse, el filtro es razonable pero no es perfecto, ya que descarta algunas zonas que sí que contienen muestra mientras que en otros casos incluye marcadores vacíos, encontrándose la mayoría de estos en las zonas cercanas a los bordes de la muestra.



Finalmente, se aplicó el filtro a los espectros de todas las muestras, no encontrándose diferencia entre las muestras control y activo. Lo único que se observó fue un ligero desplazamiento de la amida I en el set de 24 días, situándose aproximadamente en  $1637\text{ cm}^{-1}$  en el caso de las muestras control y zona periférica (zona 2) y en  $1632\text{ cm}^{-1}$  en el caso del halo de retardo (o zona 1). Sin embargo, las desviaciones estándar de las muestras fueron muy elevadas, de manera que haría falta añadir muestras más optimizadas para poder confirmarlo.

A pesar de que los experimentos de FTIR no arrojaron los resultados esperados, esto no desmerece a la técnica en sí. De hecho, desde hace años se plantea como una alternativa a la hora de identificar y clasificar las especies de mohos, tal y como reflejan los siguientes trabajos (Fischer G., et al., 2006; Naumann A., 2009; Pena R., et al., 2014). Sin embargo, el procedimiento empleado a la hora de preparar la muestra es vital. Así, Fischer G., et al. (2006) publicaron un trabajo donde compararon hasta cinco protocolos diferentes de preparación de muestra, partiendo siempre desde una suspensión de esporas. Desde un punto de vista biológico las esporas tienen una importancia innegable, ya que contienen micotoxinas y son el medio de dispersión en los bioaerosoles. Además, también presentan un estado fisiológico menos variable e influenciado por las condiciones de cultivo que el micelio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a diferencia de las bacterias y las levaduras, las esporas de los mohos son hidrofóbicas, lo que provoca que haya que tratarlas con especial cuidado. Por eso, de los cinco protocolos probados, los mejores resultados los obtuvieron al dispersar éstas inicialmente en 40 % de metanol. Finalmente, de los films de esporas obtenidos, descartaron aquellos que fueron excesivamente finos o gruesos, pasando por un control de calidad, ya que en esos casos los análisis no fueron reproducibles en cuanto a intensidad de señal (Fischer G., et al., 2006). Por otra parte, Naumann A. (2009) también consiguió en un 95-99 % clasificar satisfactoriamente hasta 26 especies diferentes de mohos mediante ATR-FTIR. Esto fue posible gracias a que antes de depositar el micelio extraído, éste fue transformado en un polvo seco, de manera que se elimina la gran heterogeneidad inherente de las hifas.

La técnica de FTIR también se ha empleado para estudiar los cambios bioquímicos sufridos por un moho durante las diferentes etapas de desarrollo. Así, en un excelente trabajo llevado a cabo con *Neurospora*, se analizó la diferencia de intensidad entre las bandas de: la hifa vegetativa, la hifa durante la esporulación, la espora germinando y la espora madura. Destaca la gran heterogeneidad del micelio comentada en ocasiones anteriores, ya

que pocas micras detrás del ápex, la composición de la hifa cambia notablemente. Los autores obtuvieron también un perfil diferente entre los diferentes estadios de crecimiento, ya que las bandas de lípidos y carbohidratos de las esporas maduras y las esporas durante la germinación fueron mucho mayores en comparación con la hifa vegetativa. La ventaja de las imágenes de microscopio es evidente, ya que los cambios obtenidos en las distintas fases pudieron ser fácilmente asociados a los diferentes momentos de desarrollo del moho (Jilkine K., et al. , 2008). De manera similar, Szeghalmi A., et al. (2007) analizaron las bandas obtenidas en tres mohos diferentes (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora* y *Rhizopus*) a dos niveles diferentes de la hifa, el ápex y a 150  $\mu\text{m}$  de éste. Encontraron una alta variabilidad en la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas y carbohidratos, tanto entre las tres cepas como entre los dos puntos de la hifa escogidos. Además de esto, analizaron el crecimiento del moho en condiciones de estrés como alta temperatura y pH básico.

Las ventajas de la técnica por tanto son claras, ya que permite asociar los cambios bioquímicos sufridos por el moho, durante diferentes procesos como son el crecimiento o una situación de estrés debido por ejemplo a condiciones de incubación. Siguiendo esta línea, el FTIR ha sido utilizado para investigar el mecanismo de acción de las sustancias activas. Skotti E., et al. (2014) analizaron la actividad antifúngica de seis plantas aromáticas frente al moho *Alternaria alternata*, de las cuales tres de ellas consiguieron reducir la producción de esporas mientras que las otras tres las aumentaron. Dividieron por tanto las seis muestras en dos grupos de poblaciones, y realizaron un análisis de componentes principales (PCA) con la segunda derivada de las bandas más importantes, encontrando cambios en la intensidad de las bandas entre las muestras control y tratadas (con ambos grupos de plantas). Concretamente, las variaciones más notables se obtuvieron para las bandas de amida I, II, III y polisacáridos, lo que sugiere la activación de diferentes mecanismos moleculares por parte del moho frente a la situación de estrés al cual está expuesto.

Siguiendo la misma línea, Saulou C., et al. (2010) encontraron un desplazamiento de hasta 30  $\text{cm}^{-1}$  en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* expuesta a un recubrimiento de plata en comparación con levaduras de un inóculo recién recogido. Este resultado coincide con el ligero desplazamiento observado en nuestras muestras activas correspondientes a la amida I, aunque tal y como fue discutido previamente, las elevadas desviaciones estándar indican que sería necesario procesar un mayor número de muestras para poder confirmar dicho resultado.

Con todo esto, queda reflejado que la técnica de FTIR presenta unas prestaciones claras para su utilización en el estudio de los mohos, ya que permite asociar los cambios sufridos por estos a su estructura heterogénea y su complejo desarrollo. A lo largo de la discusión hemos visto que la técnica es aplicable tanto a nivel de identificación y clasificación de especies, lo cual es una tarea ardua en este campo, como en los estudios más precisos de mecanismo de acción de sustancias activas y de cambios bioquímicos sufridos por situaciones de estrés. Sin embargo, la preparación de muestra sigue siendo un obstáculo a vencer en muchas ocasiones, ya que no es fácil obtener un depósito homogéneo, sobre todo si se trata de micelio. En este contexto, recientemente se ha publicado un método validado, donde consiguen resultados satisfactorios mediante la rotura del micelio en pequeños trozos, seguida de dos centrifugaciones (Lecellier A., et al. , 2014).

Por tanto, este último trabajo publicado en este año 2014 podría servir como una referencia muy útil en nuestro caso, ya que como hemos visto, el halo de retardo (colindante al halo de inhibición) que se forma tras la exposición al aceite esencial de canela está compuesto fundamentalmente por micelio. El análisis de las esporas, siendo que éstas se encontraban ya más lejos del halo de inhibición, no mostró cambios, lo cual incide una vez más en el interés del análisis del micelio crecido en dicho halo de retardo. Además, experimentos previos en este capítulo han confirmado que el micelio crecido en esa zona, experimenta una fuerte reducción en la esporulación, y un crecimiento anormal que se hizo patente tanto en la ultraestructura de las hifas mostrada por SEM, como por la excesiva bifurcación del ápex de las hifas obtenidas por microscopía óptica.

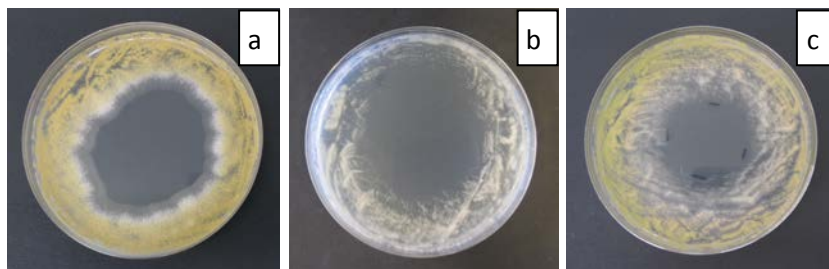
#### **4.5. Influencia del crecimiento del moho en la difusión de los compuestos volátiles de los aceites esenciales**

En experimentos previos de esta tesis doctoral hemos visto que los aceites esenciales de canela, orégano y clavo, se comportan igual que sus compuestos mayoritarios respectivos cinamaldehído, carvacrol y eugenol. Sin embargo, también se ha observado en varias ocasiones a lo largo de esta tesis, que el moho expuesto a los aceites esenciales que consigue crecer, lo hace manifestando unas claras diferencias en relación al aspecto macroscópico en la placa. De esta manera, al comienzo del capítulo 2 vimos que además de crearse halos de inhibición de diámetro diferente, cinamaldehído forma un halo de retardo muy nítido y marcado que consta fundamentalmente de micelio sin esporulación (fig. 4.29 a), mientras

que en eugenol éste suele ser también visible pero algo más irregular o difuso (fig. 4.29 c), y por último en el caso de carvacrol, éste apenas se distingue de la zona 2 o periférica (fig. 4.29 b). Esto conlleva importantes cambios morfológicos en el moho, como los mostrados en los experimentos de microscopía óptica y electrónica (SEM) de este capítulo.

Se sabe que los aceites esenciales son sustancias complejas, formadas por compuestos con diferente lipofilidad e hidrofiliidad. De esta manera, cuando se añaden a un medio de cultivo, los aceites esenciales se distribuyen en su fase acuosa, en un grado que depende de la hidrofiliidad de los compuestos que contenga. Como varios autores apuntan desde hace unos años, la eficacia antifúngica de los aceites esenciales en fase vapor se debe a una absorción de estos en el agar, difundiendo a través de él, y a una deposición directa en el micelio del moho (Inouye S., et al., 2000; Tullio V., et al., 2007).

De esta manera, el objetivo de este experimento fue estudiar el mecanismo de difusión de los aceites esenciales, evaluando también la influencia del crecimiento del moho en dicha difusión. Para ello, en lugar de trabajar con los tres aceites esenciales más estudiados en esta tesis (canela, orégano y clavo), se ha optado por utilizar en esta ocasión sus compuestos mayoritarios, evitando así la interferencia de otras sustancias en menor concentración.



**Fig. 4.29** Imágenes de halos de inhibición y retardo de *A. flavus* tras 4 días. Exposición en fase vapor de: cinamaldehído (a), carvacrol (b) y eugenol (c). La zona 2 corresponde a la zona periférica de la placa.

Tal y como se ha explicado en la metodología correspondiente (ver apartado 3.9), se midieron los halos de inhibición de las placas activas con moho, utilizando el promedio resultante de las 4 réplicas inoculadas para establecer el halo de inhibición y de retardo de las placas activas sin inocular. En la tabla 4.3 se encuentran la medida de los halos, así como los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada compuesto. La detección de los compuestos se llevó a cabo simultáneamente en modo SCAN y SIM, confirmando en éste último las masas características de cada uno de ellos mediante la relación masa-carga ( $m/z$ ).

**Tabla 4.3** Datos de los compuestos analizados en su difusión.

Halos de inhibición (H.I.) y de retardo (H.R.), junto con la desviación estándar (*SD*), de cinamaldehído, carvacrol y eugenol, en las placas inoculadas con *A. flavus*. El Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ), ambos en ng/g, hacen referencia a las concentraciones mínimas detectables y cuantificables, mostrándose el coeficiente de correlación lineal obtenido ( $R^2$ ).

	H.I. (mm)	$\pm SD$	H.R. (mm)	$\pm SD$	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	$R^2$	<i>m/z</i>
<b>CINAMALDEHÍDO</b>	45.71	4.29	63.76	4.90	5.43	18.10	0.9995	131
								103
<b>ESTIRENO</b>	---	---	---	---	0.18	0.60	0.9986	77
								104
								78
<b>CARVACROL</b>	38.72	2.41	---	---	1.20	3.99	0.9988	51
								135
								50
<b>EUGENOL</b>	29.94	1.11	58.86	1.43	3.97	13.25	0.9884	164.1
								149

Tras el análisis cromatográfico, se integraron las áreas de los compuestos obtenidos en modo SCAN y se evaluó lo siguiente:

- **Compuestos obtenidos en las placas inoculadas y sin inocular.**
- **Difusión de los compuestos volátiles en las diferentes zonas de la placa Petri.** Para ello primero se compararon los tres compuestos, evaluando después dentro de cada uno de ellos, las diferencias obtenidas entre las distintas zonas de la placa mediante un análisis estadístico.
- **Influencia del crecimiento del moho** en la distribución de los compuestos en las diferentes zonas. En este caso, se analizaron los perfiles de distribución de las placas inoculadas con moho, respecto a las placas sin inocular. Las diferencias significativas se determinaron también mediante análisis estadístico.

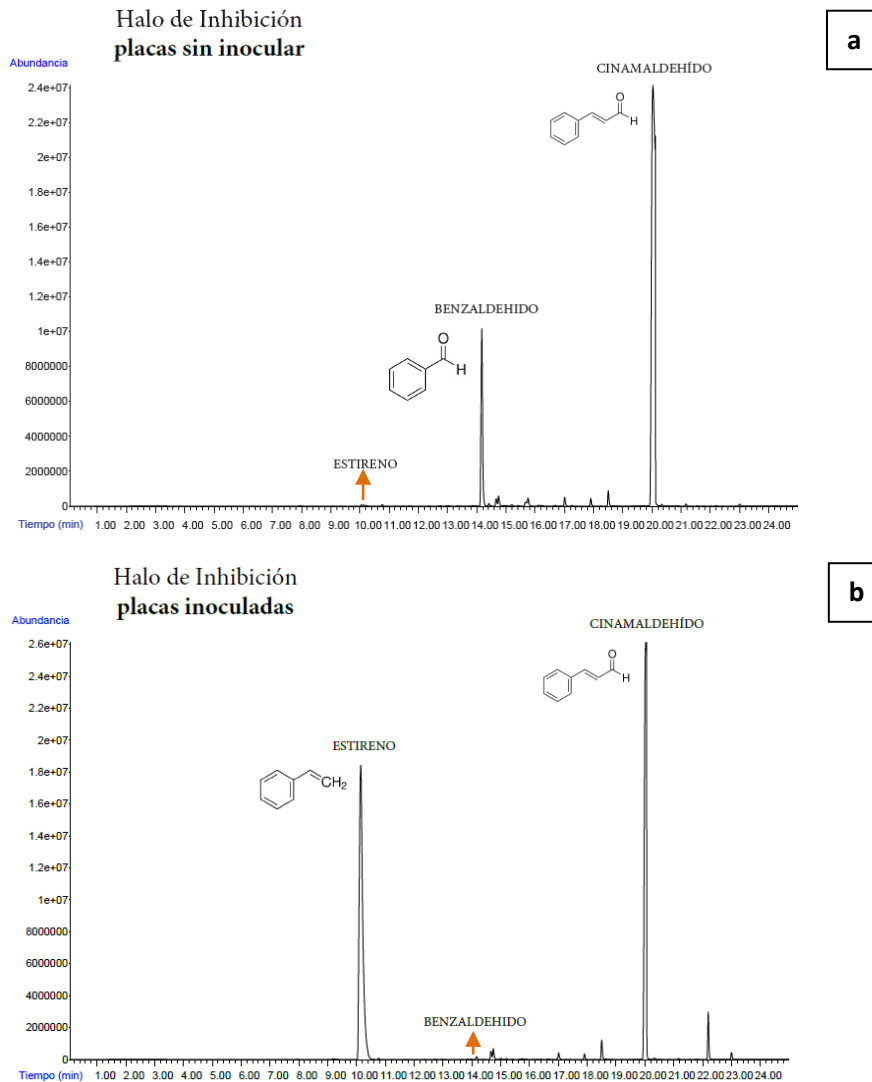
Cabe recordar que las áreas evaluadas en las placas activas inoculadas fueron: halo de inhibición (H.I.), halo de retardo (H.R.) y zona 2 (o zona periférica). Sin embargo en las placas activas sin inocular, es decir, las placas con medio de cultivo y expuestas al agente activo pero sin moho, sólo se evaluaron dos zonas: la parte central de la placa y la zona más periférica. Como es lógico, al no existir moho en dichas placas, no se crean diferentes zonas de crecimiento, por lo que el halo de inhibición en estas placas no inoculadas corresponde

simplemente al punto central de la placa, de la misma superficie que el halo de inhibición de las placas inoculadas con el moho. A pesar de esto, para evitar confusiones se ha mantenido el mismo nombre en ambos tipos de placas activas, tanto en las inoculadas como las sin inocular, de manera que el halo de inhibición hace siempre referencia a la parte central de la placa y la zona 2 a la parte más periférica. Hay que añadir, que en las placas sin inocular no se evaluó la zona que correspondería al halo de retardo en las placas inoculadas. El análisis de dicho halo de retardo en estas placas sin inocular demostró en un experimento previo (datos no mostrados) no ser reproducible, obteniendo datos contradictorios entre las réplicas de una misma muestra. Esto se explica debido a que el crecimiento del moho marca los límites visuales de las zonas a extraer (figura 4.29), de manera que las placas activas sin inocular carecen de dicho indicador. Además, hay que tener en cuenta que el halo de retardo es siempre una zona que se aprecia con mayor dificultad, situándose en el medio del halo de inhibición y de la zona 2 (zona periférica) y siendo normalmente de menor tamaño que éstas. Dicho halo de retardo tampoco se evaluó en las placas inoculadas con moho y expuestas a carvacrol, debido a que en este compuesto, la falta de nitidez del halo formado dificultó la extracción de muestra de manera óptima, ya que no hay apenas diferencia visual entre el halo de retardo y la zona 2 o periférica.

#### ***4.5.1. Compuestos obtenidos en las placas inoculadas y sin inocular***

Las figura 4.30 muestran un ejemplo de los cromatogramas del halo de inhibición, de las placas activas con cinamaldehído, inoculadas con el moho y sin inocular.

En primer lugar tal, las placas sin moho mostraron un alto contenido de benzaldehído (tiempo de retención de 14 minutos) (fig. 4.30 a), disminuyendo más de 2 órdenes de intensidad en el caso de las placas inoculadas con el moho (figura 4.30 b), lo que explica que haya que acercarse al ruido para apreciar un pequeño pico donde aparece la flecha naranja. Además de esto, dicho compuesto no apareció en el resto de zonas evaluadas, tanto en el caso de estar inoculadas como en los que no, de manera que sólo se vio a las concentraciones más elevadas, esto es, en el halo de inhibición.



**Fig. 4.30** Cromatogramas de las muestras de cinamaldehído.

Placas activas sin inocular (a) e inoculadas con moho (b). Se ha escogido como ejemplo visual el halo de inhibición por ser la más interesante en la aparición de compuestos.

El benzaldehído es un producto que puede resultar de la degradación de cinamaldehído. Así, en un trabajo anterior llevado a cabo en el grupo GUIA, (Rodríguez Á., 2009) se analizó la composición de una emulsión activa de parafina con canela recién preparada, y otra almacenada durante cinco semanas. Los resultados de las atmósferas analizadas por cromatografía de gases, mostraron que con el tiempo, la concentración de cinamaldehído fue disminuyendo mientras que la de benzaldehído fue aumentando. Como bien señaló el autor, Hay que tener en cuenta que la formación del benzaldehído desde el cinamaldehído ocurre a través de una reacción retroaldol en medio acuoso y que se ve favorecida por la temperatura.

Sin embargo, el hecho más destacable de las muestras de cinamaldehído fue la aparición de estireno, un producto que se forma tras un proceso de degradación de algunos compuestos de la canela, entre ellos el cinamaldehído. A diferencia del benzaldehído, en este caso sí que se observó una clara influencia no sólo entre las diferentes zonas de la placa sino también del moho. Esto se discutirá más adelante.

A pesar de que no existen muchos trabajos al respecto, la biotransformación del cinamaldehído por parte de algunas cepas de mohos ha sido descrita anteriormente (Hao B. H., et al., 2013; Wickman G. R., et al., 2013). En uno de estos trabajos, se analizaron las concentraciones obtenidas de hasta 100 muestras de diversas variedades de canela procedentes de diferentes orígenes y con diferente actividad de agua ( $a_w$ ), donde se encontraron niveles de estireno en un rango entre  $< 0.5 \mu\text{g/g}$  a  $523 \mu\text{g/g}$ . Entre las variedades de canela utilizadas, la que presentó una concentración más baja de estireno correspondió a la misma variedad que se ha utilizado en esta tesis, es decir, *Cinnamomum zeylanicum* (procedente de Sri Lanka). En el otro extremo encontraron una variedad de canela procedente de la región de Korintji (Indonesia), donde dichas concentraciones de estireno fueron muy elevadas, aumentando aún más conforme la actividad de agua fue mayor. Los autores relacionaron este resultado con una posible mala conservación de la canela durante el transporte desde Indonesia a Francia, donde se realizó el estudio. Además de esto, los autores contaminaron 5 muestras de canela de diferentes variedades entre las que se encontraba la variedad de Sri Lanka, con tres especies de moho (*Penicillium citrinum*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*). Las cinco muestras de canela se evaluaron además enteras y molidas. Los resultados obtenidos mostraron que tras la inoculación de los mohos y la incubación de las muestras tras 10 días, la concentración de estireno aumentó considerablemente excepto en la variedad de Sri Lanka. En este último caso, a pesar de que la concentración de  $\text{CO}_2$  liberado aumentó notablemente, la contaminación fúngica no mostró un aumento considerable en el nivel de estireno. Finalmente, en todas las muestras de canela obtuvieron niveles más bajos de estireno tras la molienda de ésta, lo que relacionaron con un aumento en la liberación de los compuestos volátiles procedentes de ésta, lo cual provoca la inhibición del crecimiento del moho y por ende, de la producción de estireno (Hao B. H., et al., 2013). Cabe mencionar que el estireno es un compuesto que no tiene límite de migración específica y que puede usarse como monómero pero no como aditivo en la producción de polímeros tal y como figura en el *Reglamento (UE) Nº 10/2011* sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. De esta

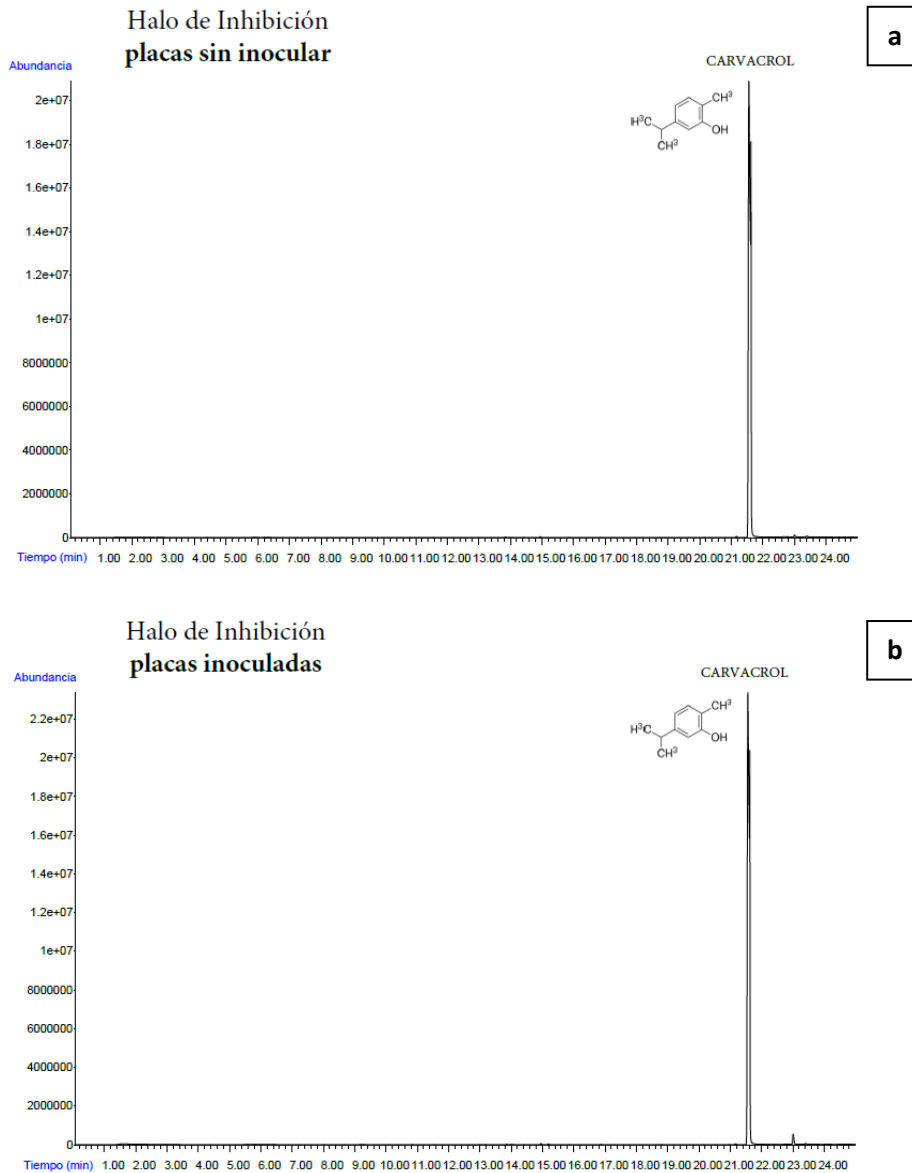


manera, el estireno se utiliza para su polimerización en la formación del poliestireno, material empleado en muchos envases. Debido a que no tiene límite de migración específica o “Specific Migration Limit” (SML), el estireno que migre desde el envase al alimento tiene que cumplir el límite de migración global o “Overall Migration Limit” (OML) de 60 mg/kg (60 ppm). En un trabajo reciente, Gelbke H.-P., et al. (2014) evaluaron los límites de exposición segura (SEL) de los consumidores hacia el estireno como sustancia desde el material de envase. Basándose en los efectos tóxicos documentados en animales y humanos (fundamentalmente en ambos destaca la ototoxicidad y alteraciones en la discriminación del color), establecieron el SEL en un rango entre 90-120 mg/persona/día. Teniendo en cuenta el consumo de 1 kg de alimento al día por una persona adulta, el límite de migración considerado como seguro para los consumidores se quedaría entonces en 90 ppm, estando por tanto su nivel de seguridad muy por encima del OML.

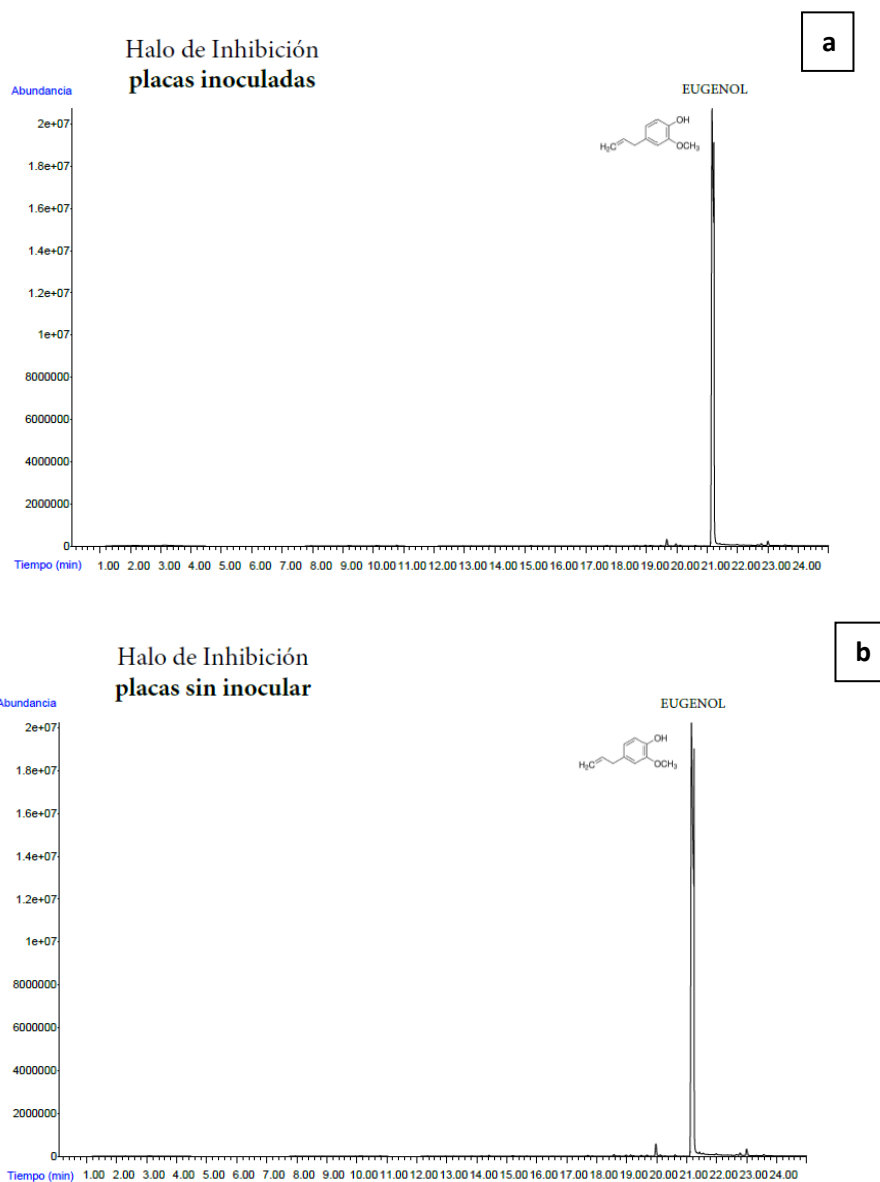
Los cromatogramas del resto de zonas de las placas con cinamaldehído no mostraron picos adicionales que fueran relevantes para el estudio, además de los ya comentados. Sí se vieron importantes diferencias en la intensidad de la señal entre cinamaldehído y estireno, tanto en el caso de las placas inoculadas como en las no inoculadas, lo cual se discutirá en el siguiente punto.

Por último, tal y como se puede observar, las muestras activas con carvacrol (figura 4.31) y eugenol (figura 4.32) mostraron los mismos picos en los cromatogramas entre las placas sin inocular (a) e inoculadas con el moho (b). Además, a diferencia del cinamaldehído, no se observó ningún compuesto resultante de degradación, ni como respuesta al crecimiento del moho. En todos los casos se mostró un ejemplo de los cromatogramas obtenidos, eligiendo el halo de inhibición, ya que dicha zona fue la más interesante en el caso de cinamaldehído. Lo único que varió respecto al resto de zonas estudiadas fue la intensidad de la señal, tal y como ocurría en el caso de cinamaldehído y que se tratará también a continuación.

En todas las muestras analizadas, aparecieron pequeños compuestos de una intensidad cercana al ruido, y que provenían bien de la propia fibra SPME, del medio de cultivo empleado o incluso ftalatos procedentes del vial donde se contenían las muestras. No se tuvieron en cuenta para el análisis ya que no influyeron en este experimento ni aportaron más información de la ya discutida.



**Fig. 4.31** Cromatogramas obtenidos en las muestras de carvacrol. Placas activas sin inocular (a) e inoculadas con moho (b). Se ha escogido como ejemplo visual el halo de inhibición para poder comparar con cinamaldehído.

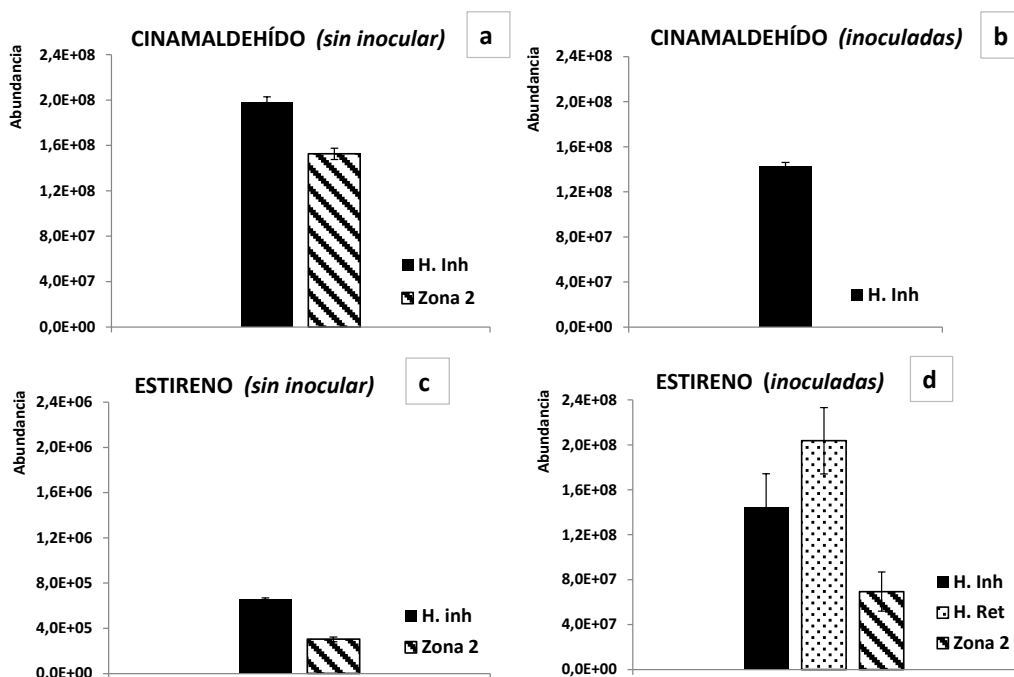


**Fig. 4.32** Cromatogramas obtenidos en las muestras de eugenol. Placas activas sin inocular (a) e inoculadas con moho (b). Se ha escogido como ejemplo visual el halo de inhibición para poder comparar con cinamaldehído.

#### ***4.5.2. Difusión de los compuestos volátiles en las diferentes zonas de la placa Petri***

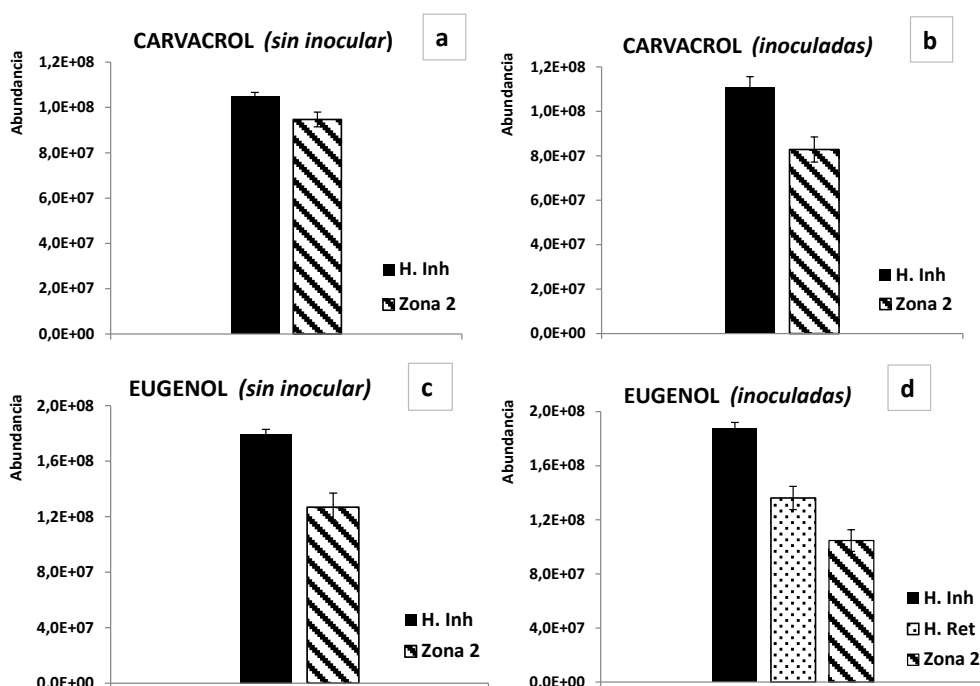
Los resultados de las diferentes zonas evaluadas de las placas activas tanto inoculadas como sin inocular, se representan en las figuras 4.33 y 4.34. Para poder comparar la intensidad de la señal entre las placas inoculadas y no inoculadas de cada compuesto, los diagramas de barras se han representado utilizando la misma escala.

En primer lugar, la comparación de las gráficas de las placas activas sin inocular, nos informan acerca del mecanismo de difusión de los compuestos volátiles en las diferentes zonas de la placa. De esta manera, si observamos ambas figuras se aprecia que cinamaldehído (figura 4.33 a), carvacrol (figura 4.34 a) y eugenol (figura 4.34 c) difunden de manera muy semejante. Cabe recordar además en el caso de cinamaldehído, la presencia de estireno, tal y como se mencionó anteriormente. En definitiva, la disminución de cinamaldehído, carvacrol y eugenol desde el halo de inhibición hasta la periferia, demuestra que estos alcanzan la concentración más elevada en el centro de la placa, desde donde estos, tras ser absorbidos por el agar, van distribuyéndose hacia la zona más periférica.



**Fig. 4.33** Distribución de cinamaldehído (a,b) y estireno (c,d) en distintas zonas de la placa.

En las placas sin inocular con el moho se analizaron dos zonas: halo de inhibición (H.I.) y zona 2. En el caso de las placas inoculadas, se analizaron las tres zonas: halo de inhibición (H. Inh), halo de retardo (H. Ret) y zona 2. Nótese que en el caso de las placas inoculadas sólo se detectó cinamaldehído en el halo de inhibición, mientras que apareció estireno en las tres.



**Fig. 4.34** Distribución de carvacrol (a,b) y eugenol (c,d) en distintas zonas de la placa. En las placas sin inocular con el moho se analizaron dos zonas: halo de inhibición (H.I) y zona 2. En el caso de las placas inoculadas, se analizaron las tres zonas: halo de inhibición (H. Inh), halo de retardo (H. Ret) y zona 2.

Esto se confirmó mediante un análisis estadístico, que reveló diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre todas las zonas evaluadas de las muestras sin inocular en todos los casos, esto es, cinamaldehído, carvacrol, eugenol, y el producto derivado del cinamaldehído, el estireno.

#### **4.5.3. Influencia del crecimiento del moho en la distribución de los compuestos en las diferentes zonas**

Las placas inoculadas mostraron perfiles diferentes respecto a la difusión normal de las placas sin inocular, lo que indica que la presencia del moho juega un papel fundamental en la distribución de los compuestos volátiles. De entre los compuestos evaluados, cinamaldehído arrojó de nuevo los resultados más interesantes (figuras 4.30 y 4.33). Por un lado, en dichas placas inoculadas éste sólo fue detectado en el halo de inhibición (figura 4.33 b), no encontrándose por tanto ni en el halo de retardo ni en la zona 2. Esto significa que de permanecer algo de concentración en dichas zonas, ésta fue menor que el límite de detección, siendo para cinamaldehído de 5.43 ng/g (tabla 4.3). Además, como se puede observar en las placas de cinamaldehído sin inocular (figura 4.33 c), las concentraciones más elevadas de estireno correspondieron al centro de la placa, donde aun así éstas fueron bajas,

ya que la concentración máxima detectada correspondió a la parte central de la placa (llamado halo de inhibición) y fue de 25 ng/g. Sin embargo, en el caso de las placas inoculadas con el moho, la concentración de éste se disparó, aumentando la abundancia en tres órdenes de magnitud respecto a las placas no inoculadas (figura 4.33 d). Hay que tener en cuenta, que la MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) y la MFC (Concentración Mínima Fungicida) del estireno frente a esta misma cepa son más elevadas que la del aceite esencial de canela y cinamaldehído (datos no mostrados), por lo que es lógico pensar que el moho provoque dicha ruta de biotransformación de un compuesto de menor toxicidad para su desarrollo.

Para poder confirmar si efectivamente el moho ejercía un efecto significativo en la intensidad de señal de las diferentes zonas de cinamaldehído y estireno, se compararon éstas entre las placas inoculadas y sin inocular. Se obtuvieron diferencias significativas en todos los casos ( $P < 0.05$ ), es decir, para ambos compuestos los halos de inhibición y la zona 2 fueron significativamente diferentes cuando se inoculó el moho.

En el caso de carvacrol la diferencia entre el halo de inhibición y la zona 2 es claramente mayor en las placas inoculadas que en las placas sin inocular (figura 4.34 a,b). Esto mismo se vio en las muestras de eugenol, obteniendo una disminución gradual entre las tres zonas evaluadas, y siendo aún mayor en este caso la diferencia entre el halo de inhibición y zona 2 (figura 4.34 c,d).

El análisis estadístico llevado a cabo entre las placas inoculadas y no inoculadas de carvacrol y eugenol mostró los mismos resultados entre ellos. Esto es, se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) al comparar ambas zonas periféricas (zona 2) de las placas inoculadas y sin inocular. Sin embargo, la comparación de los halos de inhibición de los dos tipos de placa no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), siendo además los dos únicos casos donde se encontró este resultado.

#### ***4.5.4. Discusión de los resultados con otros autores***

Los resultados mostrados en este experimento, coinciden con los datos obtenidos previamente en un experimento del grupo GUIA, donde la concentración de cinamaldehído y carvacrol que se detectó en el medio de cultivo, fue mayor en el caso de tener inhibición del microorganismo. Igual que ha ocurrido en nuestro caso, la diferencia entre la concentración que produjo inhibición del moho y aquella concentración que produjo crecimiento, fue

mayor en el caso de cinamaldehído que en el caso de carvacrol (Gutiérrez L., et al., 2010). Esto coincide con nuestros resultados mostrados de las placas inoculadas, ya que mientras que en el caso de carvacrol se observa una notable disminución entre el halo de inhibición y la zona 2, en el caso de cinamaldehído la diferencia entre ambas zonas fue total debido a que éste no se detectó más que en el halo de inhibición. Sin embargo, en este último caso hay que considerar que parte de esa desaparición puede deberse a la biotransformación del cinamaldehído a estireno, tal y como hemos visto.

Como hemos visto a largo de la tesis, la actividad antifúngica de los aceites esenciales y de sus compuestos mayoritarios está sujeta a varios factores, donde además de la concentración del agente activo, influye el tamaño del inóculo, las condiciones de cultivo, la composición del sustrato, etc. Sin embargo, no hay que olvidar también, sobre todo cuando nos referimos a la actividad en fase vapor, que la velocidad de liberación de estos al sustrato es un factor esencial que influirá de manera determinante en la efectividad del envase activo. En el capítulo 3 se encuentra una amplia discusión sobre este tema (ver apartado 4.5.1).

En un trabajo mencionado anteriormente y publicado por Inouye S., et al. (2000), los autores relacionaron la actividad antifúngica en fase vapor de siete aceites esenciales, con la concentración detectada de los compuestos volátiles tanto en el agar como en el micelio del moho de *Aspergillus fumigatus*. De dicho experimento obtuvieron varias conclusiones muy interesantes. La primera de ellas fue que el efecto antifúngico alcanzado (medido como inhibición del crecimiento apical de la hifa) se debió en todos los casos al compuesto mayoritario de cada aceite esencial. El experimento consistió en lo siguiente. Una vez que el moho había comenzado su crecimiento, lo expusieron a concentraciones crecientes de cada aceite esencial y midieron cómo afectaba a su crecimiento apical, determinando al mismo tiempo la concentración de los compuestos volátiles tanto en el agar como en el micelio. Además de esto, tras una exposición corta (30 minutos) el moho fue liberado del aceite esencial, determinando entonces la acción antifúngica alcanzada, como fungistática, fungicida o intermedia en relación a la capacidad de recuperación de crecimiento por parte del moho. Entre las sustancias estudiadas figuraron los aceites esenciales de canela y tomillo, siendo sus compuestos mayoritarios cinamaldehído y carvacrol. Finalmente, los autores clasificaron las diferentes sustancias en tres grupos diferenciados en relación al comportamiento en su actividad y en su difusión. Los aceites de canela y tomillo, así como sus compuestos mayoritarios, pertenecieron al tercer grupo, es decir, sustancias que retardaron el crecimiento del moho a la dosis inicial, y que lo detuvieron completamente a

una concentración superior. Sin embargo, tras la retirada de la exposición de estos, el moho pudo recrecer pero de manera incompleta. Las concentraciones detectadas tanto en el agar como en el micelio del moho por parte de canela y tomillo, fueron muy inferiores al resto de sustancias evaluadas, destacando además el tomillo con las concentraciones más bajas de todas. Esto fue relacionado por los autores con una menor volatilidad del carvacrol (Inouye S., et al., 2000). Sin embargo, si tenemos en cuenta tanto los resultados mostrados en este experimento como los obtenidos en el capítulo 2 en relación a la influencia del tiempo de exposición en la actividad en fase vapor de los aceites de canela y orégano (ver experimento 4.3 del capítulo 2), se pone de manifiesto una vez más, que además de la potencia antifúngica de la sustancia activa, la actividad en fase vapor depende en un alto grado de la velocidad de liberación de los compuestos volátiles. De esta manera, el momento en el cual se alcance la concentración mínima efectiva influirá directamente, y se alcanzará mayor o menos actividad dependiendo de la fase Lag del moho en ese preciso momento. Debido a esto, es probable que las concentraciones tan bajas obtenidas para carvacrol en el trabajo discutido anteriormente (Inouye S., et al., 2000), se deban a su velocidad de liberación más lenta, necesitando un tiempo de exposición más prolongado para liberarse completamente.

Por último, los resultados obtenidos en este experimento han demostrado que la exposición en fase vapor de dichos compuestos volátiles crea en todos los casos un gradiente de concentración en la placa Petri. Como se esperaba, la parte central, justo el punto debajo de donde se encuentra el disco activo, es la zona que muestra una concentración mayor del compuesto. De esta manera, la zona más periférica de la placa presenta una clara disminución debido, tal y como se ha discutido, en primer lugar al proceso de difusión en sí y a que estos necesitan absorberse para difundir a través del agar. Sin embargo, como se ha visto también, la presencia del moho influye notablemente en el perfil de distribución de los compuestos en las diferentes áreas. Además de esto, tal y como ocurrió en los experimentos de este capítulo, de nuevo cinamaldehído ha mostrado un comportamiento claramente diferente respecto a carvacrol y eugenol, destacando entre otros aspectos ya mencionados, la producción de estireno como biotransformación del cinamaldehído.



## 5. CONCLUSIONES

Los experimentos llevados a cabo en relación al mecanismo de acción de las sustancias evaluadas han demostrado por un lado, que el aceite esencial de canela presenta un comportamiento claramente diferente respecto a los aceites esenciales de orégano y clavo. Este resultado ha estado apoyado en primer lugar por las curvas de muerte, donde las concentraciones de orégano y clavo provocaban la muerte rápida del moho sobre todo a las concentraciones más elevadas, mientras que con la canela se obtuvieron siempre los tiempos de muerte más largos. Esta diferencia en la cinética de muerte está estrechamente relacionada con su mecanismo de acción, ya que las sustancias que actúan más en las envolturas externas provocan un daño más rápido.

Además de esto, los compuestos mayoritarios de canela, orégano y clavo, es decir, cinamaldehído, carvacrol y eugenol respectivamente, demostraron por medio de la microscopía óptica, daños evidentes en el experimento de difusión en disco. De esta manera, las esporas que no germinaron y que estuvieron presentes en el halo de inhibición resultaron en todos los casos dañadas, aunque en el caso de orégano y clavo se observaron daños mayores, traducidos en alteraciones evidentes en la pared celular y en las membranas, formándose evaginaciones y prolapsos y provocando pérdida de material celular. Un resultado muy llamativo fue en el caso de carvacrol, la formación de pequeñas vesículas de tamaño bastante uniforme, que llegaron a ocupar casi la totalidad del campo observado en detrimento de las esporas. Como era de esperar, los daños producidos fueron más extensos con la exposición más prolongada (24 h, 48 h y 72 h). De esta manera, en el último tiempo (72 h) se estudiaron los halos de retardo formados, es decir, el crecimiento del moho que se desarrolló colindante al halo de inhibición. En el caso de carvacrol y eugenol se observó que el moho creció formando pequeñas colonias orientadas de manera irregular, y mostrando un daño severo en algunas zonas de las hifas, con pérdida de material citoplasmático. En cambio, el halo de retardo formado con cinamaldehído mostró hifas turgentes y dirigidas hacia la colonización de nuevo sustrato igual que ocurre en la periferia de una colonia de moho control. Sin embargo, éste provocó una alteración muy destacable en la parte distal de las hifas, de manera que prácticamente la totalidad de éstas presentaban una bifurcación e incluso trifurcación en su extremo.

Con el objetivo de ahondar con mayor profundidad en los daños celulares anteriores, se llevaron a cabo dos experimentos de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). En el primero de ellos, el aceite esencial de canela aplicado en fase vapor, demostró, tras seis días en un estudio de difusión en disco, daños evidentes en el halo de retardo del moho, observándose una brusca reducción de la esporulación, hifas completamente aplanadas y conidióforos aberrantes. Sin embargo, el siguiente experimento de SEM llevado a cabo con esporas tratadas en medio líquido con los tres aceites esenciales, mostraron imágenes claras que confirman los daños anteriores observados por microscopía óptica. De esta manera, mientras que canela provocó la rotura completa de las esporas a concentraciones superiores a su Concentración Mínima Fungicida (MFC), orégano y clavo mostraron un claro daño en las envolturas externas de las esporas en todas las concentraciones fungicidas, lo cual fue muy evidente en las imágenes de clavo, donde se observaron agujeros perfectamente formados en la pared.

La técnica de espectroscopía de infrarrojo (FTIR) aplicada no aportó los resultados esperados. Sin embargo, el problema fundamental radicó en el depósito de muestra, debido a la elevada complejidad de la muestra, y a que el objetivo que se buscaba era muy específico. Sin embargo, ambos experimentos han servido como un estudio preliminar que deja abierta la aplicación de dicha técnica como una herramienta muy útil a la hora de investigar el mecanismo de acción de los aceites esenciales, ya que a pesar de que los resultados no fueron concluyentes, sirvieron para encaminar una futura optimización de la preparación del depósito de muestra.

Por último, el experimento de cromatografía de gases en el cual se prepararon placas por el método de difusión en disco con los tres compuestos (cinamaldehído, carvacrol y eugenol), aportaron resultados altamente interesantes. Para empezar, el método llevado a cabo en espacio de cabeza (HS) por SPME demostró una gran reproducibilidad, proporcionando datos muy consistentes y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) muy bajos para todos los compuestos evaluados. Las placas Petri con el medio de cultivo y expuesta a las tres sustancias, se evaluaron tanto sin inocular como inoculadas con el moho. Todos los compuestos demostraron un comportamiento parecido en su difusión, de manera que la concentración más elevada se detectó siempre en el centro de la placa, disminuyendo gradualmente hasta la periferia de ésta. Por otra parte, se demostró que el crecimiento del moho juega un papel importante en el mecanismo de difusión, ya que el perfil descrito por la distribución de estos en las diferentes zonas evaluadas de la placa, cambiaron respecto a las

placas no inoculadas. Sin embargo, el resultado más llamativo fue de nuevo con cinamaldehído, ya que en este caso se observaron dos compuestos adicionales, uno de ellos el benzaldehído, compuesto ya descrito anteriormente como producto de degradación del cinamaldehído. La otra sustancia encontrada fue estireno, donde se vio un elevadísimo aumento en su producción en el caso de las placas con moho. Este resultado corrobora los datos de otros autores, donde se ve que efectivamente, el moho es capaz de metabolizar el cinamaldehído formando de esta manera el estireno.

# CHAPTER 5

---

## DIMINUTION OF AFLATOXIN B1 PRODUCTION CAUSED BY AN ACTIVE PACKAGING CONTAINING CINNAMON ESSENTIAL OIL

- 1. Introduction*
- 2. Objectives*
- 3. Materials and methods*
- 4. Results and discussion*
- 5. Conclusions*



## 1. INTRODUCTION

### 1.1. The main features responsible for the mycotoxin production

Filamentous fungi are able not only to colonize and to spoil a wide range of food products, but they have also the ability to synthesize secondary metabolites. Among them, mycotoxins are produced by some species and pose a risk to vertebrates after ingestion, inhalation or skin contact. However, the illness they cause, named mycotoxicosis, does not require necessarily the presence of the fungus. Due to that, mycotoxins are regarded as abiotic hazards but with a biotic origin (Marin S., et al. , 2013; Perrone G., et al. , 2007). Mycotoxins only include secondary fungal metabolites that cause harm to vertebrates, thus, those active against bacteria, protozoa and lower animals as insects are excluded (Hocking A. D., et al. , 2006).

Mycotoxins are comprised in the up to 30.000 known secondary metabolites that form the exo-metabolome in filamentous fungi. The profile of this wide range of secondary metabolites has been for more than 25 years the main topic in fungal systematics, taxonomy and ecology (Frisvad J. C., et al. , 2008; Thrane U., et al. , 2007). However, some of the literature published along these years was based on an erroneous association between species and mycotoxin production. Hence, first of all the importance of an accurate association should be emphasized, as it will crucially determine the rational decisions on the status of foodstuffs suspected to contain mycotoxins (Frisvad J. C., et al. , 2006).

As we have already seen in section I, fungal growth depends on the nutrient source and factors such as temperature, water activity ( $a_w$ ), pH, oxygen and also time. However, mycotoxin production does not always take place simultaneously to mould growth, and the conditions required are not the same for all the mycotoxins. For example, aflatoxin B1 is formed under conditions of temperature and  $a_w$  close to the minimum necessary for mould growth. However, patulin, penicillic acid and ochratoxin A are produced within a smaller range than for growth. It can be established that *Aspergilli* growth and mycotoxin production take place at higher temperature compared to *Penicillia*. The rest of conditions also play a role in the mycotoxin formation. Hence, low oxygen concentrations clearly reduce the production of patulin and penicillic acid, meanwhile less than 1 % oxygen limit

the production of aflatoxins. Other factors can be also responsible for the mycotoxin production, as the pH and the incubation time (Samson R. A., et al., 2004).

## 1.2. Presence and geographical distribution of the main mycotoxins

Food products are susceptible of being contaminated at different stages as pre-harvest, harvest, processing, storage, transport and handling, with the subsequent production of mycotoxins (Magan N., 2006; Marin S., et al., 2013; Perrone G., et al., 2007). Despite they are ubiquitously present in agricultural commodities, such as cereals and oil seeds, there is a clear difference regarding the different geographical areas. This is mainly due to the fact that mycotoxin production is highly dependent on the environmental factors, such as temperature and moisture content (Milani J. M., 2013), as was previously mentioned. Moreover, besides climate and other factors explained before, mycotoxins are also affected by plant and storage problems, and by non-infectious factors such as the bioavailability of micronutrients, insect damage and the attack from other pest (Milani J. M., 2013).

Among the 300-400 mycotoxins known today, the main groups are: **aflatoxins**, **zearalenone (ZEA)**, **deoxynivalenol (DON)**, **fumonisin** and **ochratoxin A (OTA)** (Schatzmayr G., et al., 2013). The goal of this last work published in 2013, was to assess the mycotoxin contamination in feed and feed raw materials by means of a survey programme launched in 2004. A total of 19.757 samples were analysed, proceeding from a broad variety of commodities and from different areas. Figure 5.1 shows the results of the distribution published by the authors (Schatzmayr G., et al., 2013).

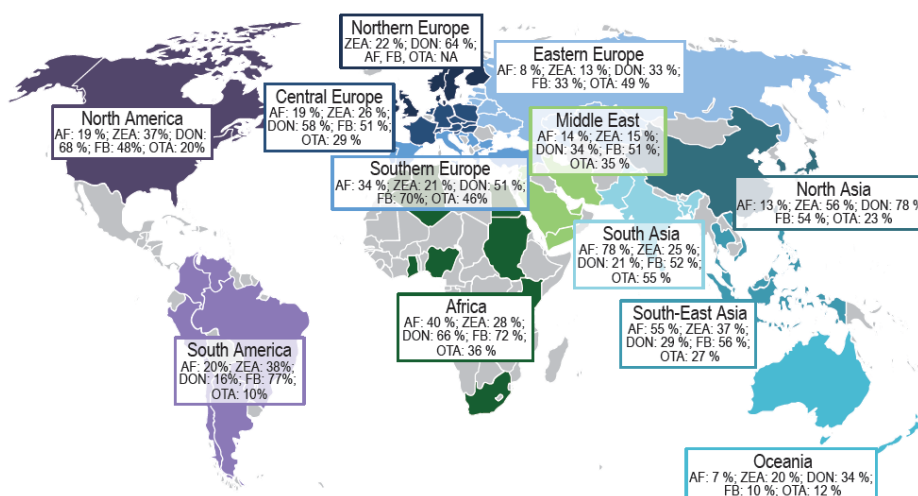


Fig. 5.1 Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain.

As we can see, once again the climate conditions appears to play a fundamental role in the mycotoxin production. Hence, samples collected in the same geographical area but in different season exhibited a different mycotoxin profile considering the main four group previously described. This was due not only to the temperature registered but also to the precipitation (Schatzmayr G., et al., 2013). Also, it is important to highlight that in crops, mycotoxins are not homogeneously distributed, hampering in many cases the analysis of the samples.

However, within the main mycotoxins other authors also encompass other **trichothecenes**, besides **DON** and **patulin** (Bezerra da Rocha M. E., et al. , 2014; Marin S., et al., 2013), **citrinin**, **Alternaria toxins** and **ergot alkaloids** (Marin S., et al., 2013).

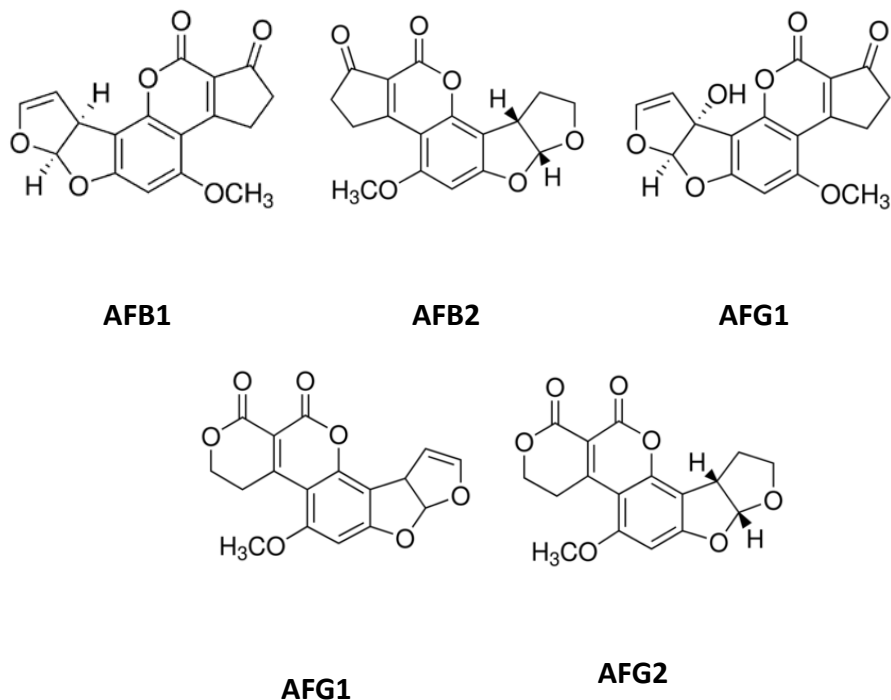
### **1.3. Foodborne mycotoxins, focusing on Aflatoxins**

As it is well known, fungal contaminated crops can be directly ingested in the diet, or being used as feed for livestock. Once inside, they can be accumulated in different organs or tissues (Marin S., et al., 2013).

#### **1.3.1. The pathogenicity of Aflatoxins and current legislation**

Aflatoxins are difuranocoumarins that can be produced by the following species: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus arachidicola*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* and *Aspergillus minisclerotigenes* (Samson R. A., et al., 2010). However, the principal species producing aflatoxins are *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Despite there are more than 20 different aflatoxins, the more important among them are aflatoxins B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) and G2 (AFG2), all of them presenting similar chemical structures as shown below in figure 5.2. They owe their names to the colour of their fluorescence under ultra violet light, and their relative position on TLC (Thin Layer Chromatography) plates (Frisvad J. C., et al., 2006). Aflatoxin M1 is formed after metabolism of AFB1 in milks of mammals upon consumption of aflatoxin contaminated feed. Due to the deletion of a gene responsible for the formation of the G aflatoxins, the species *Aspergillus flavus* is not able to produce G aflatoxins, while *Aspergillus parasiticus* can produce the four of them (Perrone G., et al., 2007). Because usually AFB1 is the major aflatoxin produced and the most potent carcinogen, it is regulated, as we will see later, by a lower and independent ML (Maximum Limit) in relation to the others.





**Fig. 5.2** Molecular structure of aflatoxins B1, B2, M1, G1 and G2.

Aflatoxins were discovered in 1962 after the death of thousands of turkey in England, where laboratory results revealed the presence of the species *Aspergillus flavus* (Bezerra da Rocha M. E., et al., 2014; Wu F., et al. , 2014). They are classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as Group 1, due to the high toxicity as mutagenic, teratogenic and carcinogenic compounds (Womack E. D., et al. , 2014). They have also immunosuppressing properties, being able to produce thymic aplasia and to induce multiple human infections after contamination (Bezerra da Rocha M. E., et al., 2014). AFB1 is the most toxic natural occurring liver carcinogen known (Womack E. D., et al., 2014), causing hepatocellular carcinoma (HCC) in human and other animal species (Wu F., et al., 2014), and increasing the risk of liver cancer in people suffering a chronic infection with hepatitis B (Bezerra da Rocha M. E., et al., 2014; Womack E. D., et al., 2014). The pathogenic action of AFB1 occurs after being metabolized mainly in the liver to AFB1-8,9-exo-epoxide and 8,9-endo-epoxide, and binding the exo-epoxide to DNA, with the subsequent formation to 8,9-dihydro-8-(N<sub>7</sub>-guanyl)-9-hydroxy AFB1 (AFB1-N<sub>7</sub>-Gua) adduct. This last is converted to two secondary products, an apurinic site and a more stable ring opened AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY) adduct, being more persistent *in vivo* than the AFB1-N<sub>7</sub>-Gua. The enzymes involved in this pathogenic process are CYP3A4, 3A5 and 1A2, all from the cytochrome P450 (Marin S., et al., 2013).

However, it is worth mentioning that aflatoxins not only produce chronic and carcinogenic effects, but they are also responsible for acute aflatoxicosis and growth impairment in children. Hence, we can find over the last decades several outbreaks after consumption of heavily contaminated products, as the followings: India (1970) by corn, with at least 97 deaths; Kenia (1980) by maize with 20 hospitalizations and 20 % mortality; Malasya (1995) by noodles; Kenya (2004) by homegrown maize, with 317 affected and 125 deaths (Wu F., et al., 2014).

### ***1.3.2. Aflatoxins in food commodities***

Despite aflatoxins present a higher concentration in raw materials, they are stable under normal food processing conditions as roasting, extrusion, baking and cooking. Due to this, also processed foods pose a potencial hazard for human health (Kitic D., et al. , 2013; Marin S., et al., 2013).

Management of aflatoxins includes prevention, regulation and detoxification (Womack E. D., et al., 2014). As the data collected by EFSA (European Food Safety Authority) in 2007 show, the B and G aflatoxin producing species *Aspergillus parasiticus* is more adapted to a soil environment, which restricts more its distribution compared to *Aspergillus flavus*, being this last one ubiquitous in nature and colonizing mostly the aerial parts of leaves and flowers (Marin S., et al., 2013). However, nowadays, the development of global markets means that most of the contaminated products can be found anywhere.

Cereals deserve a special attention, due to the fact that it is the most important source of food in the world. However, besides direct consumption cereals are also used for other purposes. As shown data published by Siegel D., et al. (2011) the European cereal trade in the year 2009-2010 was mainly divided into: feed (50.8 %), food and human consumption (26.9 %), seed production and other uses (19.5 %) and bioethanol (2.8 %). The last three percentages saw a rise since the year 2007-2008. Moreover, recent data from the Food and Agricultural Organization FAO (2014) have established the world's cereal production in 2498.1 million of tonnes (table 5.1).

**Table 5.1** FAO (2014). Cereal production, supply and utilization (2004-2014).

Year	Million tonnes		
	Production	Supply	Utilization
2004/05	2070.9	2494.9	2021.2
2005/06	2048.8	2523.0	2042.9
2007/08	2131.5	2549.0	2137.4
2008/09	2285.2	2699.2	2187.6
2009/10	2266.1	2759.6	2233.8
2010/11	2257.7	2780.6	2272.3
2011/12	2354.5	2855.3	2327.6
2012/13	2306.6	2827.1	2328.8
2013/14	2521.1	3024.2	2412.4
2014/15	2498.1	3071.9	2461.9

All these reasons explain why fungal contamination in cereals have always been a major concern for the international community. Despite higher aflatoxin concentrations are expected in warm and humid subtropical and tropical areas, as shows the high incidence of aflatoxins in maize ears (Milani J. M., 2013), in the last year 2013 the notifications of aflatoxins in maize raised (RASFF, 2013). Table 5.2 shows a summary of these results.

**Table 5.2** Number of mycotoxins notifications in the last decade, by RASFF.

Hazard	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
AFLS	839	946	801	705	902	638	649	585	484	341
DON				10	4	3	2	11	4	8
FUM	14	2	15	9	2	1	3	4	4	7
OTA	27	42	54	30	20	27	34	35	32	54
PAT		6	7		3					
ZEA			1	6	2				4	
Total	880	996	878	760	933	669	688	635	528	410

The increase of the aflatoxins in maize was due to to a severe drought during 2012 growing season of maize in the south of Europe, leading to several RASFF notifications of aflatoxins in maize exceeding the permitted maximum (5 µg/g for AFB1 and 10 µg/g for the aflatoxins in total). In contrast, fortunately the decrease of the notifications related to the presence of aflatoxins in peanuts from India (from 88 notifications in 2012 to 15 in 2013)

and in dried figs from Turkey (from 135 notifications in 2012 to 40 in 2013) drove to a significantly decrease of the total of the mycotoxins (table 5.2).

Aflatoxins can be also present in a wide range of food products. The following are some examples of the recent bibliography published in 2014 about aflatoxin contamination occurrence, concerning different products: cereals (Abrunhosa L., et al. , 2011), almonds (Zivoli R., et al. , 2014), peanuts (Kamika I., et al. , 2014), corn and rice (Firdous S., et al. , 2014), wheat (Alkadri D., et al. , 2014), oil seeds (Bordin K., et al. , 2014), Brazil nuts (Milhome M. A. L., et al. , 2014), flours (Demirel R., et al. , 2014), fruits (Iqbal S. Z., et al. , 2014), vegetables (Van de Perre E., et al. , 2014), medicinal plants (Ashiq S., et al. , 2014), etc. However, aflatoxins may be also found in an endless list of products, including bakery products, several seeds and nuts, etc. In brief, any food commodity may be subject to contain aflatoxins, including not only raw materials but also finished products.

According to an EFSA report from 2007, the samples presenting the highest levels of AFB1 were Brazil nuts, pistachios and spices. After these, some samples of figs, peanuts and almonds also exceeded the maximal limit (EFSA, 2007).

The first European Legislation establishing the MLs (Maximum Levels) for aflatoxins in some food products is *Regulation n° 466/2001* , being replaced by *Regulation n° 1881/2006* and presenting the last modifications in *Regulation n° 165/2010* . As we can see in the three Regulations, there are MLs for AFB1, for the sum of aflatoxins (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) and for AFM1. Due to the specific presence of AFM1 in milk derivatives products, this aflatoxin is regulated for infant formulae including milk and dietary products for medical purposes. Some of these MLs (AFB1 and the sum of AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) that are worth mentioning are: maize and rice (5 µg/kg and 10 µg/kg), other cereals and derived from cereals (2 µg/kg and 4 µg/kg), peanuts and other seeds for direct consumption or as an ingredient (2 µg/kg and 4 µg/kg), almonds, pistachios and apricots kernels for direct consumption or as an ingredient (8 µg/kg and 10 µg/kg) and hazelnuts and Brazil nuts for direct consumption or as an ingredient (5 µg/kg and 10 µg/kg). Higher MLs are established for some products as seeds, nuts and fruits, which are subjected to sorting or other physical treatment before consumption.

The main difference between *Regulation n° 466/2001* and *Regulation n° 165/2010* lies on the specificity of the list of food products. Hence, in *Regulation n° 165/2010* we can find a more detailed distinction between different nuts and fruits. This was motivated after

different studies that demonstrated that the high aflatoxin concentrations detected in Brazil nuts and pistachios from market products, posed a stronger impact on total human exposure than the change of the MLs (EFSA, 2007).

However, Europe pose a more restrictive legislation about mycotoxin food contamination. Some Latin American countries as Argentina, Brazil, Uruguay, Paraguay and Venezuela are part of a common union called MERCOSUR, which accepts level ranges higher than EU (Bordin K., et al., 2014; EFSA, 2007; Schatzmayr G., et al., 2013). For instance, the MLs for peanuts and maize for the sum of aflatoxins (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) is 20 µg/Kg. Other countries following this 20 µg/Kg ML are United States and China.

Besides, some countries such as China, Canada and Australia have adopted different tolerance limits for aflatoxins in peanuts and other grains, based on the frequency of consumption and climate characteristics (Bordin K., et al., 2014).

To sum up, all limits should comply with the ALARA (as lowest as reasonable accepted) recommended by the FAO (2004).

#### **1.4. Essential oils (EOs) to control the aflatoxin / mycotoxin levels in food products**

As we have said in several occasions, fungi contamination constitutes not only a health problem but also a huge economic loss. To cite an example, it is believed that in crops the 5-10 % of the total global production is lost due to mycotoxins (Abrunhosa L., et al., 2011).

All the data gathered up throughout the different chapters in this thesis have demonstrated that essential oils are natural substances able to avoid or reduce fungal growth. First of all, in chapter 2 we showed the antifungal activities of different essential oils (cinnamon, oregano and clove) and their major components (cinnamaldehyde, carvacrol and eugenol). Besides, these results obtained were discussed with those from other authors, thus showing the potential use of a wide range of natural substances. After that, we saw in chapter 3 that essential oils are active substances that can be properly added in order to develop and produce an active packaging, being able to act against diverse moulds and under different incubation conditions.

Having said that, it is logic to assume that the less the mould grows, the less mycotoxin concentration will pose. Due to this, all the works discussed along this thesis showing antifungal properties are to a greater or lesser degree, related to a possible diminution of mycotoxin production.

As we have addressed in the present introduction of this chapter, mycotoxins can be produced in all the steps of the food chains. Because the complete elimination from contaminated commodities is nearly impossible, the most effective manner to avoid mycotoxin in such a concentration that could harm human health is to prevent accumulation in agricultural commodities (Schatzmayr G., et al., 2013). One of the first measure that should be applied from the beginning of the food chain consists of a physical separation of contaminated crops from others, since it will save a great cost derived from discarding an entire lot (Womack E. D., et al., 2014). This should be always kept in mind in order to carry out a suitable storage and transport of the food products along the food chain.

Essential oils have been proposed since many years as an efficient way to control mycotoxin production in stored grains (Juglal S., et al., 2002). More recently, a review by da Cruz Cabral L., et al. (2013) presents two list of the works published in the last decade concerning antifungal and antimycotoxigenic activities respectively, both achieved by different plant compounds. More in particular, another review shows a more exhaustive information about the results provided by many essential oils to reduce the aflatoxin concentration (Kitic D., et al., 2013). In this context, essential oils have recently demonstrated to protect grains from aflatoxin contamination (Esper R. H., et al. , 2014). However, these are only a few examples and therefore, the role of essential oils as a biological approach to avoid or control aflatoxin accumulation will be dealt in the discussion section of this chapter.

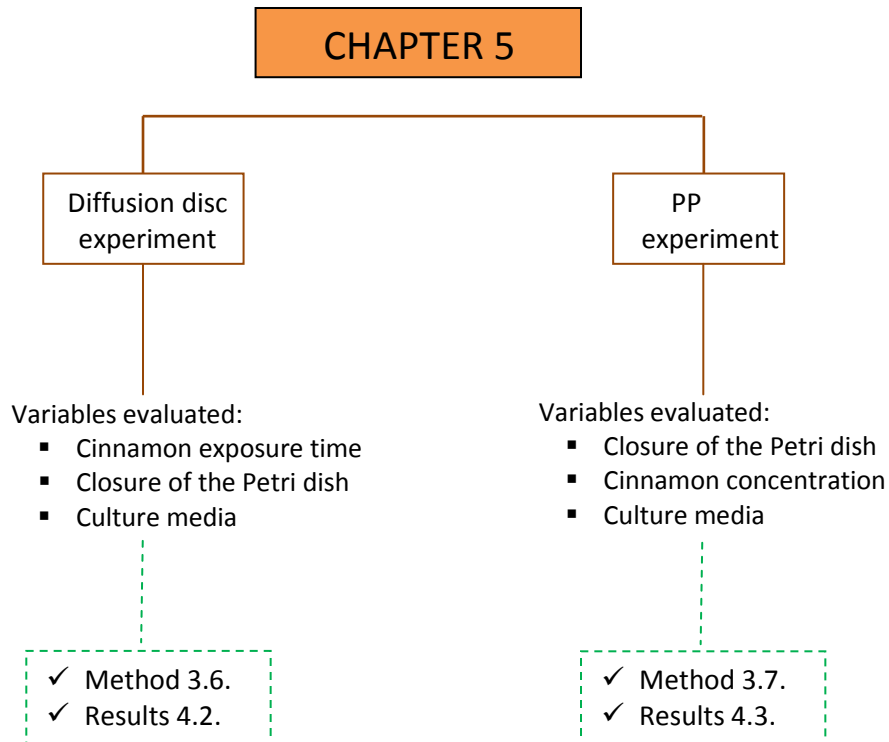
Finally, we have to mention that besides the biological methods, there are others such as physical and chemical techniques as the ones summarized by Womack E. D., et al. (2014) and the work by Luo X., et al. (2014) where ozone was applied to detoxify the aflatoxin concentration in corn flour.

## 2. OBJECTIVES AND EXPERIMENTAL PLAN

The present work shows an antifungal and anti-mycotoxin packaging able to act by vapor phase against the mould *Aspergillus flavus* and therefore, the aflatoxin B1 production. The application of the vapor phase permits to avoid a direct contact with the food product. Hence, the principal aim of this system is to reduce or to inhibit completely the aflatoxin B1 production, using active packaging containing cinnamon at different concentration.

The experimental plan was divided into two different experiments, the first one carried out by a paper diffusion disc containing cinnamon essential oil in vapor phase and the second one with the active polypropylene (PP) films containing cinnamon essential oil, acting also on vapor phase (figure 5.3). Previously the sensorial perception was studied, confirming the compatibility of the same PP films used in this work with most of the food aromas (Gutiérrez L., et al., 2009b). Besides, it is well known that accumulation of aflatoxins depends on the substrate, being some of them extremely favorable for the growth of aflatoxigenic fungi and therefore, the formation of aflatoxins (Rocha M. E. B. d., et al. , 2014). Because of that, five different culture media were employed in the two experiments, to study the antimycotoxigenic action of the vapor phase of cinnamon on the different composition substrates. Moreover, the influence of the exposure time of the cinnamon essential and the seal of the Petri dish was evaluated as additional variables. Finally, the antifungal and antimycotoxigenic actions of both cinnamon sub-inhibitory and fungicidal concentrations were evaluated in the PP (Polypropylene) active films.

Aflatoxin B1 quantification was carried out by UPLC<sup>R</sup> system, coupled to a fluorescence detector, without needing a previous derivatization due to the high sensitivity of this analytical technique. Besides, the chromatographic method has been also optimized, achieving a specific separation of the mycotoxin from matrix effects.



**Fig. 5.3** Experimental plan of chapter 5.

The work was divided mainly in two different sections, whose information can be found in the corresponding sections.



## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Microbial culture

*Aspergillus flavus* (*A. flavus*) CECT 2687 from the University of Valencia (Spain) was used as aflatoxin B1 (AFB1) producer strain. As solid media, Malt Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Dox-Agar (CZP) and Agar-Agar were provided by Scharlab (*Scharlau*). Yeast Extract Agar (YES) and Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA) were constituted following Samson et al., (2010) indications, with some variations for CYA: 50 g CZAPEK agar (*Scharlau*), 5 g Yeast Extract (*Scharlau*), 0.01 g ZnSO<sub>4</sub> (*Scharlau*), 0.005 g CuSO<sub>4</sub> (*Scharlau*), distilled water (1L). Physiological solution (NaCl 0.9%) (*Panreac*) was employed as diluent.

### 3.2. Cinnamon essential oil (CIN EO)

Cinnamon essential oil (*cinnamomum zeylanicum*, CAS 8015-91-6) from the bark was used as active agent. It was fortified and supplied by Argolide (Spain). Usually CIN EO from the leaves contains eugenol and trans-cinnamaldehyde as major components. However, CIN fortified used in this work, presents trans-cinnamaldehyde as major compound (900 mg/g) and eugenol as minor compound (3.62 mg/g). Other components at trace level concentration were also present.

### 3.3. Reagents and aflatoxin extraction

Dichloromethane (DCM) (GC 99.8%, *Scharlau*), ethyl acetate (HPLC, 99.7% *Sigma-Aldrich*), methanol (MeOH) (99.9% LC-MS Fluka, *Sigma-Aldrich*), formic acid (98-100 % *Scharlau*), acetonitrile (ACN) (*Scharlau*), orthofosforic acid 85% (*PANREAC*, Barcelona - España) and water (milli-Q water 18.2 Ωm), were used as solvents. Aflatoxin B1 (AFB1) was provided as standard by Sigma-Aldrich (A6636, CAS 1162-65-8) in 10 mg powder. It was kept at 2-8 °C until used, and reconstituted in Methanol (99.9% LC-MS Fluka, *Sigma-Aldrich*) for further dilutions. For the extraction process, a 6mm core borer (*Scharlau*), amber vials and PTFE 0.22 μm filter (*Scharlau*) (13mm diameter) were employed before the UPLC analysis.

Flow of N<sub>2</sub> (ALPHAGAZ1, 99,999% Global Purity, Air Liquide Zaragoza-Spain) was used to evaporate the extraction solvents.

### 3.4. Antifungal materials

For the antifungal characterization of the CIN over the mould *A. flavus*, 9 mm Whatman paper disc (*Scharlau*) and polypropylene (PP) films were used in two independent experiments. Active PP with 2 %, 4 % and 6 % CIN (PP 2 % CIN, PP 4 % CIN, PP 6 % CIN) and blank PP without CIN (PP 0 %) were supplied by Artibal (Sabiñánigo, Spain), consisting of 30 µm thick layer coated with an organic base formula containing the essential oil at different concentrations, according to the EU patent (Garcés O., et al., 2004). The grammage of the coating was 2.5 g/m<sup>2</sup>. Besides, parafilm (*Scharlau*) and a digital caliper (*Comecta S.A.*) to measure the inhibition area in the first experiment were employed.

### 3.5. Chromatographic conditions

An acquity UPLC<sup>R</sup> binary solvent manager system, coupled to a W474 fluorescence detector was used (*Waters*, Palo Alto, CA, USA). Excitation at 362 nm and emission at 425 nm was recorded. In order to better adapt the variability of the samples to the AFB1 determination, two different methods (“A” and “B”) were applied. A C18 Phenomenex HPLC column (250 x 2 mm, Luna 3 µm) and a C18 UPLC BEH Acquity column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) were used for the first and second method respectively. The same precolumn (Van Guard<sup>TM</sup> BEH C18, 1.7 µm) was maintained in both cases. Detection Limit (LOD) and Quantification Limit (LOQ) were calculated for both of them.

For the method A, methanol was used as eluent A and milli-Q water as eluent B. The mobile phases consisted of (15:85) (MeOH:milli-Q water) both with 0.1% orthophosphoric acid. The flow rate was 0.3 mL/min and the gradient system consisted of: 0-0.67 min, 15% solvent A; 0.67 – 4 min, linear gradient from 15 to 35% A; 4 – 5 min, linear gradient from 35 to 90 % A; 5 – 5.1 min, linear gradient from 90 to 15% A; 5.01 – 8 min, 15% A. Post-run time was 1 min. The column temperature was set to 30 °C. Injection volume was 10 µL.

Method B was developed in isocratic system at 0.3 mL/min with a combination of three different solvents as mobile phase (MeOH:ACN:milli-Q water) (45:15:40). The same column temperature (30 °C) and injection volume (10 µL) were employed.

In both experiments, samples were obtained in a wide range of AFB1 concentration. The concentration of AFB1 in the samples was calculated from the peak areas using the standard AFB1 calibration curve. With the aim of reducing at minimum level the possible error in the quantification, different lineal ranges from the calibration curve were applied according to the AFB1 concentration of the sample.

### **3.6. Diffusion disc experiment**

#### ***3.6.1. Experimental plan***

Fungal conidia were harvested after previous inoculation on PDA for 7 days at 25 °C, and transferred into a test tube with physiological saline solution (NaCl 0.9%). A final concentration of  $10^6$  sp/mL (spores/mL) was reached and confirmed by Neubauer chamber. From this suspension, 100 µL were seeded with a sterile Drigalsky spatel onto Petri dishes containing 15 mL of the corresponding culture media.

Samples were performed in relation to the experimental plan designed. Three different variables were considered: the exposure time, the closure of the Petri dish and the culture media used. Within the closure of the dish, the influence of the cinnamon essential oil applied in the active samples was also evaluated. For the active plates, the inhibition area was measured everyday with a digital caliper. The experiment was carried out by triplicate.

#### ***3.6.2. Influence of the CIN exposure time***

The whole experiment was performed four times as above described, forming four identical independent set of samples, but extracting the AFB1 at 4 days, 7 days, 10 days and 15 days respectively.

#### ***3.6.3. Influence of the closure of the Petri dish***

Once the mould was inoculated in all plates, three different types of samples were performed. Disc active samples were performed by placing a 9 mm Whatman disc containing 10 µL of CIN in vapor phase, i.e. without any contact with the inoculated mould. After that, these active plates were closed with parafilm to avoid the rapid loss of the CIN as well as to get a better reproducibility within the replicates. As has been demonstrated,

samples containing essential oils must be analyzed under sealed conditions to prevent the complete loss of essential oil (Inouye S., et al., 2001).

To evaluate the influence of the parafilm in the aflatoxin production, two different samples were performed: “control 1” and “control 2” samples. On one hand “control 1” samples are referred to those inoculated plates without cinnamon and closed with the normal lid without parafilm. On the other hand “control 2” samples were named to the inoculated plates without cinnamon, closing the Petri dish with the lid and finally, sealing the system with the parafilm. All the plates were incubated at 25 °C.

#### ***3.6.4. Influence of the culture media***

Five different culture media were used, that is, YES, CYA, MEA, PDA, and CZP. At the moment of the aflatoxin extraction, an additional sample was summed up, named as POOL and formed as a homogeneous mixture of the five media mentioned. Each Petri dish was performed by triplicate.

### **3.7. PP experiment**

#### ***3.7.1. Experimental plan***

Plates were inoculated as in the previous experiment. Three variables were also evaluated: the closure of the Petri dish, the CIN EO concentration in the active PP films and the culture media used. The experiment was also carried out by triplicate.

#### ***3.7.2. Influence of the closure of the Petri dish***

In this case, active PP films with 2 %, 4 % and 6 % CIN were evaluated, adding also two different controls. The “control 1” was performed as described in the previous experiment. A PP film control named as “PP 0 %” was added by closing the Petri dishes with blank PP without cinnamon. In all cases, films were attached to the Petri dish using a nylon cable tie (López P., et al., 2007a). All plates were incubated at 25 °C with the agar at the bottom. Growth in the active plates (PP 2 % CIN, PP 4 % CIN and PP 6 % CIN) was checked and quantified every day.

### ***3.7.3. Influence of the CIN concentration***

The PP experiment was performed at different CIN concentrations. Active films with PP 2 % CIN as sub-inhibitory concentration and PP 4 % CIN and PP 6 % CIN as fungicidal concentrations were evaluated. For these last concentrations, only YES and CYA media were evaluated, having also 3 replicates for each medium and each CIN concentration.

## **3.8. Aflatoxin B1**

### ***3.8.1. Collecting sample from the agar***

Plugs were taken with a 6 mm cork borer on the agar surface, placed into a first amber vial and weighted. In the case of controls (the control 1 sample, control 2 samples and PP 0 % samples), plugs were taken randomly from the whole surface of the dish due to the homogenous growth. However, a different nuance was applied for the active plates. In the disc diffusion experiment plugs in the active plates were taken on the retard area. However, in the PP experiment the mould under PP 2 % CIN did not experiment the same growth degree in the three replicates of each culture media. Because of that, two different areas were defined in each PP 2 % CIN plate, the “growth area” (with mould growth) and the “clean area” (agar without visible mould). An extraction scale from 0 to 8 points was built in order to correlate the AFB1 extracted with the fungal growth obtained. The scale was built as follows: Eight plugs were taken when the visual growth showed the total plate covered by the mould (100 % of growth area), combining the number of plugs from both areas in relation to the fungal development, in such a way that the total number of plugs from each plate was always 8. Hence, 7 plugs from the growth area and 1 plug from the clean area were taken when the mould occupied more than 75% of the plate and so on; 6 plugs, 5 plugs, 4 plugs, 3 plugs, 2 plugs and 1 plug from the growth area were taken when the mould covered 75%, more than 50 %, 50 %, more than 25%, 25% and less than 25% respectively. In the case of total mould inhibition, the 8 plugs were taken from the clean area.

### ***3.8.2. Aflatoxin B1 extraction***

Once plugs were placed into the first amber vial, the next steps were the same for both experiments, following the procedure (O'Brien M., et al. , 2006) with slight differences. First, 1.8 mL of solvent mixture ((Ethyl Acetate: DCM: MeOH) (3:2:1) + 1% Formic acid) were

added to each vial, and the vial was left closed during the night at room temperature and kept away from light. Next day, the vials were ultrasonicated for 45 min (without heat), and for each sample, the extracted fraction was transferred into a second amber vial, evaporating the solvent under N<sub>2</sub> flow at 30 °C. Once completely dried, the residue was re-dissolved with 1.2 mL of MeOH, ultrasonicated for 15 min, filtered by 0.22 μm PTFE and placed into 2mL amber vials for the chromatographic analysis.

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

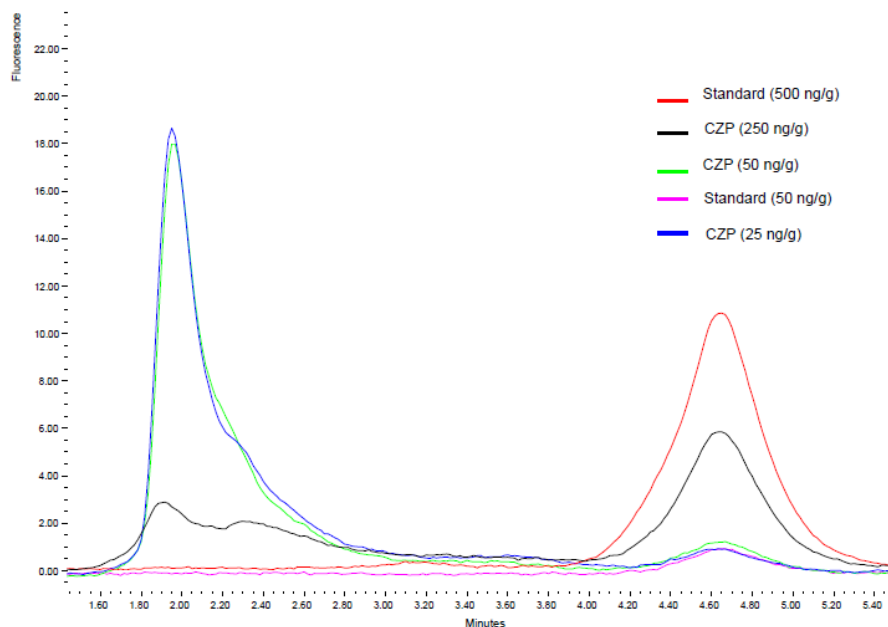
The main goal of this experiment was to study the antimycotoxigenic action of an antifungal packaging containing cinnamon essential oil in vapor phase. As we have already seen in the previous section of materials and methods, this has been developed in two different experiments. Besides, in both cases different variables have been studied, as the importance of the different culture media, the incubation time, the closure of the Petri dish and the cinnamon concentration.

### 4.1. Chromatographic separation and analytical characteristics

The disc experiment was the first step of the experimental plan. Due to that, the samples were prepared and analyzed by the method A. However, in the second experiment an interference coming from the culture media was observed at similar retention time as the AFB1 under the fungicidal concentrations (PP 4 % CIN and PP 6 % CIN). In the first case (diffusion disc experiment) samples were correctly analyzed and quantified by the method A, due to the non influence of the unknown peak (near to baseline noise) compared to the high AFB1 concentration in the samples.

However, fungicidal concentrations in PP experiment revealed the need of an improved method (B) for those samples presenting a very low AFB1 content. For this, plugs from CZP Petri dishes without inoculation (blank samples) were spiked before UPLC<sup>R</sup> injection, with three concentrations of the AFB1 standard: 25, 50 and 250 ng/g. Moreover, two additional standard AFB1 concentrations (50 and 500 ng/g) were added without CZP culture media. Three different vials were prepared and processed following the extraction step mentioned for the rest of samples of this experiment (see section 3.8.2). However, 0.4 mL instead of 1.2 mL of MeOH were used to dissolve the final sample, in order to enhance the signal of the interference and hence, to facilitate the optimization of the method. A complete separation of the mycotoxin was achieved at 4.6 min, finding the interference between 1.8-2.8 min. The total separation was also confirmed as shown in figure 5.4, with a good correlation ( $R^2 = 0.9987$ ) between the areas of AFB1 peak extracted from the five samples. Because PP experiment was designed in a second step, this method B was applied to all the samples of the PP experiment.

As Detection Limit (LOD) and Quantification Limit (LOQ), 0.85 ng/g and 2.84 ng/g were achieved for the method A, and 1.03 ng/g and 3.45 ng/g respectively for the method B. Also, a high accuracy and linearity (0.999 in almost all samples) was achieved.



**Fig. 5.4** Chromatographic optimization of method B.

The different concentrations of AFB1 are isolated from three CZP spiked samples and the two concentrations of the standard (4.6 min retention time). Interferences from the culture media can be appreciated between 1.8-2.8 min retention time (left).

## 4.2. Diffusion disc experiment

As we demonstrated in chapter 4, the vapor phase of CIN creates a gradient of active concentration in the plate, resulting in three different areas of mould growth (“inhibition area”, “zone 1 or retard area” and “zone 2 or peripheric area”). Thus, the inhibition area placed under the active disc presents the highest CIN concentration. Despite CIN was not detected in the next area (“retard area or zone 1”), the mould is able to develop but showing a clear damage, traduced mainly as lack of sporulation and hyphae damage. In conclusion, all the experiments highlighted the retard area as the most interesting zone of the active plate.

Due to this, the main goal of this work was to study the production or inhibition of the AFB1 concentration on the mould exposed to the sub-inhibitory concentration, that is, the



retard area. The results of AFB1 concentrations contained in the samples from the disc diffusion experiment are shown in table 5.3 (active samples) and table 5.4 (control 1 and control 2 samples). Each concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) is expressed as the average of the three independent replicates. A low standard deviation was obtained between the replicates, indicating the good reproducibility achieved. As additional information, all the data from both tables have been represented into figure 5.5, where all the concentrations have been converted to % AFB1 concentration, referring both to control 1 samples. With this we comply two different objectives: 1) to clearly visualize the diminution of AFB1 achieved by the active packaging, and 2) to reduce the variability due to the influence of the inoculum size.

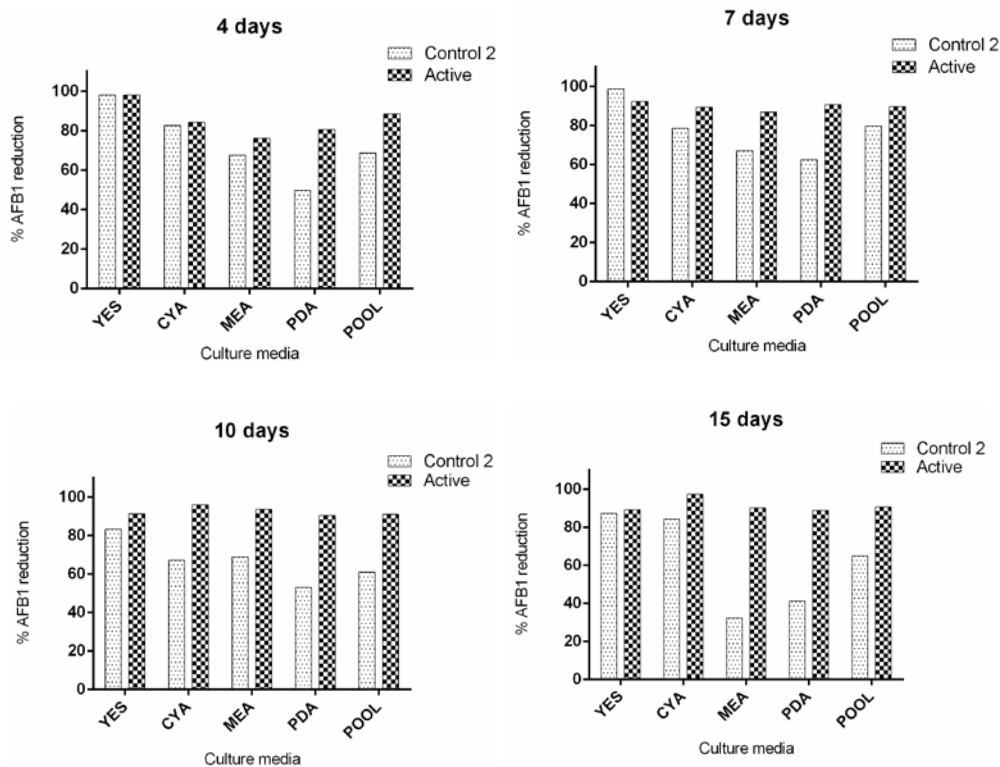
**Table 5.3** AFB1 data in active samples (disc with cinnamon and sealed with parafilm).

Analytical characteristics, concentration of the samples and standard deviation (*SD*), both expressed as  $\mu\text{g/g}$ . All the samples presented in this table are the average from three independent replicates and they were analyzed by the chromatographic method described in the text as "A".

SAMPLE (type, media)	Linear Range ( $\mu\text{g/g}$ )		Linearity ( $R^2$ )	Accuracy ( $\mu\text{g/g}$ )		Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	$\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )
	Min	Max		Calculated	Real		
Active, 4 days, YES	0.10	6.44	0.9999	0.52	0.53	0.68	0.02
Active, 4 days, CYA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.81	0.09
Active, 4 days, MEA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	6.15	0.45
Active, 4 days, PDA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	4.23	0.32
Active, 4 days, POOL	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.53	0.48
Active, 7 days, YES	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.09	0.18
Active, 7 days, CYA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.21	0.10
Active, 7 days, MEA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	3.40	0.18
Active, 7 days, PDA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.07	0.16
Active, 7 days, POOL	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.94	0.23
Active, 10 days, YES	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.80	0.12
Active, 10 days, CYA	0.03	1.00	0.9999	0.10	0.10	0.48	0.01
Active, 10 days, MEA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.41	0.03
Active, 10 days, PDA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.91	0.26
Active, 10 days, POOL	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.23	0.14
Active, 15 days, YES	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	4.28	0.50
Active, 15 days, CYA	0.03	1.00	0.9999	0.10	0.10	0.49	0.05
Active, 15 days, MEA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	1.97	0.15
Active, 15 days, PDA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.60	0.30
Active, 15 days, POOL	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.07	0.12

**Table 5.4** AFB1 data in control 1 (without parafilm) and control 2 (with parafilm) samples.

SAMPLE (type, media)	Linear Range ( $\mu\text{g/g}$ )		Linearity ( $R^2$ )	Accuracy ( $\mu\text{g/g}$ )		Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	$\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )
	Min	Max		Calculated	Real		
Control 1, 4 days, YES	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	34.33	2.76
Control 1, 4 days, CYA	1.00	32.13	0.9991	12.02	12.01	11.46	0.88
Control 1, 4 days, MEA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	25.81	1.40
Control 1, 4 days, PDA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	21.88	0.83
Control 1, 4 days, POOL	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	21.98	1.35
Control 1, 7 days, YES	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	26.88	0.62
Control 1, 7 days, CYA	1.00	32.13	0.9991	12.02	12.01	11.34	0.44
Control 1, 7 days, MEA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	25.93	0.75
Control 1, 7 days, PDA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	22.22	0.25
Control 1, 7 days, POOL	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	19.07	0.15
Control 1, 10 days, YES	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	20.43	1.90
Control 1, 10 days, CYA	1.00	32.13	0.9991	12.02	12.01	11.99	0.31
Control 1, 10 days, MEA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	21.90	0.87
Control 1, 10 days, PDA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	19.96	0.26
Control 1, 10 days, POOL	1.00	32.13	0.9991	12.02	12.01	13.70	0.89
Control 1, 15 days, YES	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	39.63	1.82
Control 1, 15 days, CYA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	19.53	0.75
Control 1, 15 days, MEA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	19.77	0.16
Control 1, 15 days, PDA	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	23.39	0.21
Control 1, 15 days, POOL	6.44	49.78	0.9976	20.02	19.53	22.05	2.50
Control 2, 4 days, YES	0.10	6.44	0.9999	0.52	0.53	0.71	0.15
Control 2, 4 days, CYA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.00	0.18
Control 2, 4 days, MEA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	8.36	0.50
Control 2, 4 days, PDA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	10.97	0.40
Control 2, 4 days, POOL	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	6.87	2.11
Control 2, 7 days, YES	0.03	1.00	0.9999	0.10	0.10	0.36	0.06
Control 2, 7 days, CYA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	2.43	0.23
Control 2, 7 days, MEA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	8.54	0.78
Control 2, 7 days, PDA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	8.33	0.50
Control 2, 7 days, POOL	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	3.87	0.60
Control 2, 10 days, YES	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	3.42	0.33
Control 2, 10 days, CYA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	3.93	0.16
Control 2, 10 days, MEA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	6.81	0.62
Control 2, 10 days, PDA	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	9.35	0.46
Control 2, 10 days, POOL	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	5.34	0.62
Control 2, 15 days, YES	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	5.01	0.37
Control 2, 15 days, CYA	0.36	20.02	0.9998	6.44	6.32	3.09	0.19
Control 2, 15 days, MEA	6.44	42.96	0.9989	20.02	19.26	13.37	0.86
Control 2, 15 days, PDA	6.44	42.96	0.9989	20.02	19.26	13.78	0.95
Control 2, 15 days, POOL	0.52	20.02	0.9997	6.44	6.32	7.72	1.31



**Fig. 5.5** Reduction of AFB1 concentration in the disc experiment.

Bars indicate the percentage of reduction of AFB1 concentration in the “control 2” samples and “active” samples in relation to the “control 1” samples. The antimycotoxigenic action is manifest after 4 days, 7 days, 10 days and 15 days of incubation time.

#### 4.2.1. Influence of the CIN and the closure of the Petri dish

Control 1 samples contained in all cases the highest mycotoxin concentration, in the range of 11.34 – 39.63  $\mu\text{g/g}$ . This was an expected result, considering that in these samples the mould is able to grow under favorable conditions. Due to the use of the parafilm in the active samples, control 2 and active samples were compared in order to reveal the effect of the CIN concentration on the AFB1 production. For this purpose, statistical analyses were carried out by SPSS software (SPSS 15.0 for Windows). For each individual set (4 days, 7 days, 10 days and 15 days), an independent analysis was made for each culture media. One way Anova (Analysis Of Variance) was used to determine the statistical differences between control 2 and active samples. First, depending on the variance’s homogeneity (Levene test), Anova or Welch test were applied to detect possible differences between AFB1 concentrations in control 2 and active samples. After that, the origin of the differences was identified by post-Hoc multiple comparisons tests (Tukey or T3 Dunnet, depending on the previous Levene conclusion). Significant differences were determined at the  $P < 0.05$  level.

As can be seen in figure 5.5, AFB1 concentration was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in all the active samples containing CIN, with only three exceptions. On one hand, at 4 days YES and CYA active samples produced  $0.68 \mu\text{g/g}$  and  $1.81 \mu\text{g/g}$  of AFB1 respectively, and  $0.71 \mu\text{g/g}$  and  $2 \mu\text{g/g}$  in the control 2 samples. Moreover, at 7 days YES experimented more reduction in control 2 ( $0.36 \mu\text{g/g}$ ) than in the active samples ( $2.09 \mu\text{g/g}$ ). To explain this finding control 1 (control without parafilm) and control 2 (control with parafilm) were also compared applying the same statistical methods as mentioned. A significant difference was obtained in all cases ( $P < 0.05$ ), that is, in the four independent sets and for all the media. Besides, microbiological changes were also evident when the control plate was closed with the parafilm (control 2). In general, a decrease of sporulation and a slight retard in growth were observed comparing those to the control 1 samples. This fact may be explained by a possible reduction of oxygen in the plate when sealing with parafilm.

#### ***4.2.2. Influence of the culture media and the CIN exposure time***

Nevertheless, despite the parafilm influenced the growth in all the culture media, different intensity was observed between them, being YES and CYA the most affected substrates. Among all the media tested, YES is the most enriched medium, provoking on *A. flavus* a rapid and strong growth and observing from the fourth day a high and green sporulation all over the whole plate. This explains why control 1 samples made in YES media contained the highest level of AFB1 in most of the cases, with maximum of  $39.63 \mu\text{g/g}$  at 15 days. However, when the parafilm is used to close the Petri dish (control 2 samples) the mould grows heterogeneously over the plate, resulting in a white mass of mycelia with small areas of irregular sporulation. The size of those sporulation areas became wider in the last sets of 10 days and 15 days of incubation, which explains why from the 10th day, a significant reduction ( $P < 0.05$ ) was obtained in YES active samples comparing to YES control 2 samples. CYA experimented similar behavior than YES, but the parafilm effect was not as strong as in YES. When closing the CYA plates with parafilm, minor changes on the mould growth was observed compared to YES culture medium. Besides, as mentioned above CYA experimented a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in all cases except for the first set of 4 days.

In relation to the other two culture media, PDA and MEA, only a decrease of sporulation with minor color intensity was observed, evidencing a lower effect of the parafilm on the mould growth. Microbiological observations revealed a concordance between growth affectation and AFB1 concentration. The fact that the parafilm itself reduced the

sporulation suggests that the atmosphere of the headspace of the Petri dish could be affected, as parafilm closure is more efficient seal than only the Petri dish lid. The results indicate that parafilm caused more diminution on AFB1 concentration comparing to the active samples in the three cases above mentioned.

However, the comparisons between active and control 2 samples demonstrated a significant reduction on AFB1 content, highlighting the positive action achieved by the volatile compounds from CIN.

Among the media tested in this work, CZP appeared as the least appropriate for AFB1 production, highlighting the importance of the substrate composition on the aflatoxin B1 production. All the samples extracted in CZP were prepared and analyzed, but only a few control samples gave a low signal, being the majority below the LOQ. For this reason, data from CZP have been excluded in this experiment and are not presented in tables 5.3 and 5.4 and figure 5.5. Finally, POOL samples are the result of a homogeneous extraction from the five culture media, which explains the absence of the microbiological observations in those cases.

Moreover, additionally to the aflatoxin concentration shown, the inhibition area (H.I.) and retard area (H.R.) were measured in both directions in the three replicates of the different culture media. Table 5.5 shows the results for the active plates incubated for 4 days and 7 days, while table 5.6 contains the data for the sets of 10 days and 15 days.

**Table 5.5** Inhibition (H.I.) and retard area (H.R.) in the active plates. Sets of 4 and 7 days.

4 days	H.I.	$\pm sd$	H.R.	$\pm sd$	7 days	H.I.	$\pm sd$	H.R.	$\pm sd$
<b>YES</b>	54,71	2,45	---	---	<b>YES</b>	44,41	13,13	---	---
<b>CYA</b>	49,07	5,25	58,76	1,10	<b>CYA</b>	41,24	3,23	54,07	4,18
<b>MEA</b>	41,35	3,16	55,62	2,86	<b>MEA</b>	35,01	1,81	49,25	2,27
<b>PDA</b>	40,76	4,61	61,77	3,44	<b>PDA</b>	36,49	1,55	57,92	1,69
<b>CZP</b>	48,73	1,70	58,90	1,62	<b>CZP</b>	40,69	3,55	63,12	3,28

In some cases the specific area was not visualized (---)

**Table 5.6** Inhibition (H.I.) and retard area (H.R.) in the active plates. Sets of 10 and 15 days.

10 days	H.I.	$\pm sd$	H.R.	$\pm sd$	15 days	H.I.	$\pm sd$	H.R. (1)	$\pm sd$	H.R. (2)	$\pm sd$
<b>YES</b>	41,98	12,81	47,94	2,15	<b>YES</b>	---	---	21,57	6,80	43,64	12,53
<b>CYA</b>	39,58	16,27	49,82	14,57	<b>CYA</b>	---	---	19,67	3,01	49,73	3,26
<b>MEA</b>	29,68	6,63	54,88	1,25	<b>MEA</b>	15,80	3,72	33,16	4,50	54,94	6,33
<b>PDA</b>	28,90	4,13	65,12	4,95	<b>PDA</b>	21,51	2,01	37,03	3,66	59,09	1,76
<b>CZP</b>	28,96	4,48	59,09	4,34	<b>CZP</b>	19,27	1,38	38,46	1,75	56,45	1,92

In some cases the specific area was not visualized (---)

As can be noted, a different inhibition degree was achieved considering the different culture media and the incubation period. However, as we have demonstrated above, in this experiment the main role of the culture media has been related to the mycotoxin production, rather than the inhibition area formed. Hence, the mycotoxin was developed directly depending on the sporulation rate.

As the authors (Thrane U., et al., 2007) say, the production of secondary metabolites requires a significant amount of carbon and in some cases, nitrogen, due to the fact that mycotoxin production is a high energy-consuming process. In fact, they recommend the use of YES, CYA and PDA among others. Besides, the use of several culture media provides a broad view of the entire exo-metabolome of a fungus (Thrane U., et al., 2007). Due to all these reasons, this experiment was carried out taking into account the aflatoxin B1 production in five different culture media.

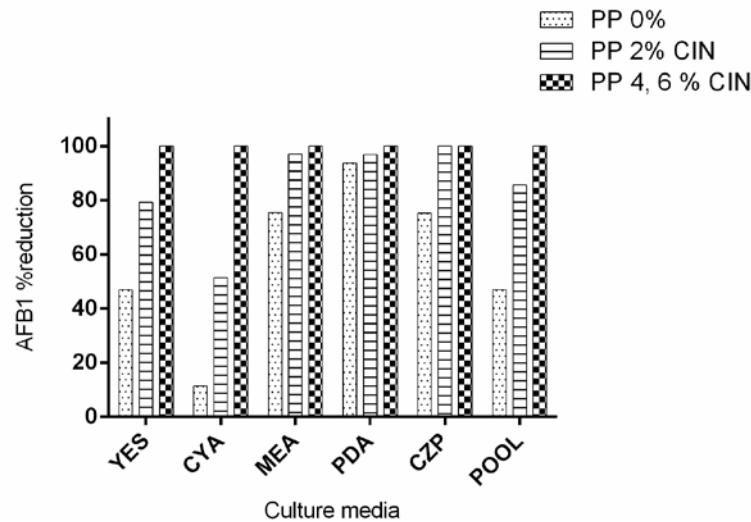
### 4.3. PP experiment

The results of AFB1 concentrations contained in the samples from the PP experiment are shown in table 5.7. The aflatoxin concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) is expressed as the average of the three independent replicates. A low standard deviation was obtained between the replicates, indicating the good reproducibility achieved. As in the first experiment, AFB1 concentrations have been converted to percentage of AFB1 reduction, referring the concentrations from PP 0 % and PP 2 %-6 % CIN to the control 1 samples (figure 5.6). In this case, the increment of the number of plugs (from 20 plugs to 24 plugs) was enough to obtain low but quantifiable concentrations ( $> \text{LOQ}$ ) for all the CZP control samples.

**Table 5.7** PP (Polypropylene) experiment.

Analytical characteristics, concentration of the samples and standard deviation (*SD*), both expressed as  $\mu\text{g/g}$ . Control 1 (control without PP), PP 0% (control closed with PP without cinnamon) and active PP films (PP with 2 %, 4 % and 6 % CIN) are shown. All the samples presented in this table are the average from three independent replicates and they were analyzed by the chromatographic method described in the text as “B”.

SAMPLE (type, media)	Linear Range ( $\mu\text{g/g}$ )		Linearity ( $R^2$ )	Accuracy ( $\mu\text{g/g}$ )		Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	$\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ )
	Min	Max		Calculated	Real		
Control 1, YES	12.02	86.01	0.9998	34.93	34.72	38.24	1.70
Control 1, CYA	0.52	34.93	0.9997	12.02	12.27	13.29	0.57
Control 1, MEA	0.52	34.93	0.9997	12.02	12.27	24.96	1.91
Control 1, PDA	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	17.72	0.38
Control 1, CZP	0.03	1.03	0.9999	0.36	0.35	0.18	0.01
Control 1, POOL	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	19.76	0.23
PP 0%, YES	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	20.26	0.25
PP 0%, CYA	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	11.78	0.88
PP 0%, MEA	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	6.13	0.27
PP 0%, PDA	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	1.12	0.09
PP 0%, CZP	0.01	0.36	0.9999	0.05	0.05	0.04	0.00
PP 0%, POOL	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	10.47	0.24
PP 2%, YES	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	7.90	1.79
PP 2%, CYA	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	6.46	0.50
PP 2%, MEA	0.10	12.02	0.9999	0.52	0.51	0.73	0.04
PP 2%, PDA	0.10	12.02	0.9999	0.52	0.51	0.56	0.19
PP 2%, CZP						< LOD	
PP 2%, POOL	1.03	49.97	0.9998	20.02	19.65	2.84	0.74
PP 4 %, YES						< LOD	
PP 4 %, CYA						< LOD	
PP 6 %, YES						< LOD	
PP 6 %, CYA						< LOD	



**Fig. 5.6** Reduction of AFB1 concentration in the PP experiment. PP experiment. Bars indicate the percentage of reduction of AFB1 concentration in PP 0 % and active samples (PP 2 % CIN, PP 4 % CIN and PP 6 % CIN) in relation to the control 1 samples. A clear reduction was obtained in the case of the PP 2 % CIN meanwhile the PP 4 % CIN and PP 6 % CIN reached the complete reduction of the mycotoxin (100 %).

#### 4.3.1. Influence of the closure of the Petri dish

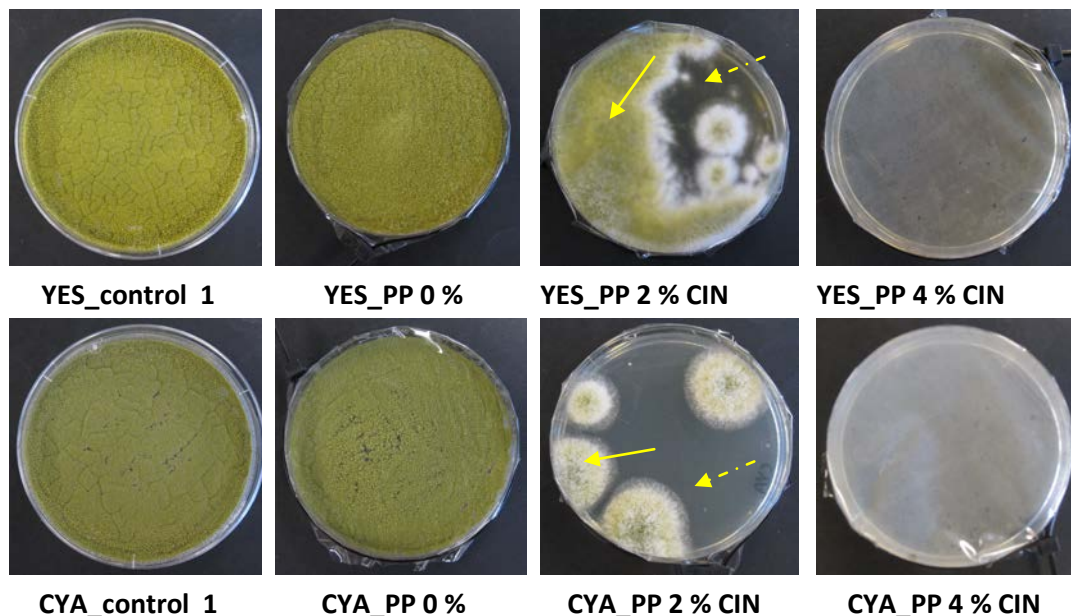
The highest AFB1 concentrations corresponded again to the control 1 samples. Similar statistical analyses as in the disc experiment were performed. For that, one way Anova was done for each culture media between the AFB1 concentrations from the three types of samples: control 1, PP 0 % and PP 2 % CIN.

Control blank film without CIN (PP 0 %) also caused a significant diminution ( $P < 0.05$ ) in the AFB1 compared to the control 1 sample. However, this fact was not as strong as the parafilm effect, that is, the mycotoxin was not reduced in the same degree. Moreover, in this case the macroscopic growth in PP 0 % and control 1 sample was very similar. The mould experimented the same lag phase and the sporulation achieved the whole surface of the Petri dish at 4<sup>th</sup> day of incubation time in both cases. Despite a slight minor intensity in the sporulation was observed in PP 0 % plates, no differences on the color were seen. The microbiological observations of the controls was equal for all the media tested, however, in



contrast to the first experiment, in this case PDA and MEA experimented more reduction in AFB1 content when the PP 0 % was applied (figure 5.6). The following AFB1 concentrations were found in the control 1 samples: 38.24  $\mu\text{g/g}$  (YES), 13.29  $\mu\text{g/g}$  (CYA), 24.96  $\mu\text{g/g}$  (MEA), 17.72  $\mu\text{g/g}$  (PDA), 0.18  $\mu\text{g/g}$  (CZP) and 19.76  $\mu\text{g/g}$  (POOL). In the case of PP 0 % samples, the AFB1 concentrations obtained were: 20.26  $\mu\text{g/g}$ , 11.78  $\mu\text{g/g}$  (CYA), 6.13  $\mu\text{g/g}$  (MEA), 1.12  $\mu\text{g/g}$  (PDA), 0.04  $\mu\text{g/g}$  (CZP) and 10.47  $\mu\text{g/g}$  (POOL). Hence, similarly to the parafilm, the closure by the blank PP film seems to alter the atmosphere in the plate, affecting the mould sporulation intensity and the further mycotoxin production but in a much lower degree than the parafilm did.

In figure 5.7 we can see a visual example of the antifungal activity achieved by active PP in two of the culture media, YES and CYA.



**Fig. 5.7** Examples of mould development in two culture media (YES, CYA), in PP experiment. Only one of the three replicates has been chosen as an example of growth for all the options mentioned. The two zones of growth and clear area established for the PP 2 % CIN are indicated by a solid and a dashed line respectively

#### ***4.3.2. Influence of the CIN concentration***

On one hand, the mould growth was clearly affected by the PP 2 % CIN comparing to the control samples, that is why it was referred as “sub-inhibitory concentration”. As explained in section 2.8.1, a growth scale was established in order to extract the sample in relation to the growth observed. Considering the three replicates of each culture media, PP 2 % CIN achieved a 41.67 % of mould reduction in YES, while 66.67 % and 95.83 %

diminution was obtained for CYA and CZP. Finally, MEA and PDA suffered the same growth degree, obtaining 79.17 % of fungal reduction in both cases.

On the other hand, the antimycotoxigenic action of the PP 2 % CIN was evaluated following the same statistical analyses as, obtaining a significant reduction of the AFB1 accumulation in all cases ( $P < 0.05$ ) comparing PP 2 % CIN and PP 0 % samples. However, as observed in figure 2, a different degree was obtained in the different media. As explained before, in this experiment MEA and PDA were more influenced by the closure with the blank film (PP 0 %) than the rest of the culture media. This fact explains why in these cases, despite the concentrations of AFB1 from PP 2 % CIN were significantly reduced, the differences in the bars between PP 0 % and PP 2 % CIN are not so evident for MEA and PDA comparing to the rest culture media. The AFB1 concentrations obtained in the PP 2% CIN samples were: 7.9  $\mu\text{g/g}$  (YES), 6.46  $\mu\text{g/g}$  (CYA), 0.73  $\mu\text{g/g}$  (MEA), 0.56  $\mu\text{g/g}$  (PDA) and 2.84  $\mu\text{g/g}$  (POOL). In the case of CZP, the AFB1 concentration was not detected ( $< \text{LOD}$ ).

In addition to the sub-inhibitory concentration, active PP with 4 % and 6 % CIN were tested on YES and CYA culture media. Due to the inhibition of mould growth, these concentrations were considered as MIC (Minimal Inhibitory Concentration). However, at the moment of the extraction, 6 supplementary plugs were taken from active plates with PP 4 % and 6 % CIN and placed onto new fresh PDA plates. No growth was observed in any case after 7 days of incubation at 25 °C, confirming the fungicidal action of these concentrations. Due to this, the PP 4 % and PP 6 % CIN were referred as “fungicidal concentrations”. Due to the absence of growth mentioned, all the plugs from these concentrations were extracted from the entire plate, considering the whole Petri dish as clear area. Analytical data revealed that AFB1 concentrations for PP 4 % CIN and PP 6 % CIN were below the LOD, hence reducing the 100 % of the mycotoxin content.

Finally, the differences on visual growth development between all types of samples of YES and CYA can be seen in figure 5.7. The minor changes between controls (control 1 and PP 0 %), the clear reduction of mould growth caused by the sub-inhibitory concentration (PP 2 % CIN) and the total inhibition caused by the fungicidal concentrations (PP 4 % CIN and PP 6 % CIN) are shown. For this, YES and CYA have been chosen as the visual example, due to the fact that fungicidal concentrations were applied to these two culture media. Images corresponding to PP 6 % CIN are not presented, because the same total inhibition was obtained for PP 4 % CIN and PP 6 % CIN as explained above.

Passone M. A., et al. (2013) analyzed the antifungal and antimycotoxigenic activity of the vapor phase of *Peumus boldus* essential oil on *A. flavus*. They obtained a clearly retard in the lag phase at dose higher than 1000  $\mu\text{L/L}$ , as well as a total inhibition of the AFB1 content. In another work, cinnamon extract seemed to act more as a fungistatic rather than a fungicidal agent (López-Malo A., et al., 2007). This observation is also in agreement with our results obtained for the sub-inhibitory PP 2 % CIN, because despite it presented a clear diminution on AFB1 content, the mould is able to grow beyond the 4 days. The correlation between antifungal action and essential oil concentration has been also pointed out by other authors (Bluma R., et al., 2009; Matan N., et al., 2006; Rodríguez A., et al., 2008; Velázquez-Nuñez M. J., et al., 2013). Also, in a previous work (Manso S., et al., 2013), active PET (Polyethylene Terephthalate) films with CIN in the range of 2 %-8% concentration were evaluated under three different *A. flavus* suspensions ( $10^6$ ,  $10^5$  and  $10^4$  sp/mL). As well as in the present experiment, PET 2 % CIN was determined as the sub-inhibitory concentration at  $10^6$  sp/mL of *A. flavus* suspension, while antifungal effect was found between PET 4 %-8 % CIN. However, an important outcome from that study, finding for PET 2 % CIN a complete inhibition at  $10^4$  sp/mL, revealed not only the importance of the CIN concentration on the antifungal action, but also the initial fungal suspension. Hence, extrapolating the present results to this mentioned situation, we could positively achieve a 100 % reduction on AFB1 accumulation from the 2 % CIN at low fungal concentration. This dependence on the mould suspension has also been concluded by other researchers (Rasooli I., et al., 2006), and more specifically, the increased on conidia production has been related to the sequence steps in the biosynthesis of aflatoxin B1 (Wilkinson H. H., et al., 2004). Because of that, the first step for an effective and durable antifungal effect should be to avoid the spore germination, which prevents the posterior mycelium development, decreasing the risk of possible conidia formation and hence, the consequent AFB1 production.

#### **4.4. Mechanism of action: antifungal and antioxidant activity of CIN vapor phase on the aflatoxin production**

It seems probable that damage caused by volatile compounds from the cinnamon essential oil (cinnamaldehyde and probably eugenol) may affect the enzymatic mould activity. Cinnamaldehyde has demonstrated to inhibit the elastase and keratinase activity, two extracellular enzymes associated with their virulence factor, in *A. fumigatus* and *T. rubrum* (Khan M. S. A., et al., 2011). Most of the reactions in aflatoxin biosynthesis are

mediated by oxygenases enzymes (Dutton M. F., 1988). The antioxidant properties of essential oils lead to an antiaflatoxic action (Patil R. P., et al. , 2010). Hence, blocking the enzymatic activity of a biosynthetic enzyme constitutes one of the three possible levels to inhibit AFB1 biosynthesis and that secondary metabolism is sensitive to stress, due to the correlation between oxidative stress and cellular development and differentiation (Alpsoy L., 2010). Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and ROS (reactive oxygen species) produce during the oxidative stress are also related to aflatoxin formation (Holmes R. A., et al. , 2008). The inhibition of LOX (Lipoxygenase), the enzyme responsible for the lipid peroxidation, in peach fruits, caused by an active packaging containing CIN, has been demonstrated (Montero-Prado P., et al. , 2011). Besides, Alpsoy L. (2010) pointed out that the essential oils can decrease the pathogenic effect of aflatoxins by two different ways: reducing the formation of DNA binding, and reacting with the ROS that aflatoxins produce. The radical scavenging activity of cinnamaldehyde has been proved (Pezo D., et al. , 2008). Diminution of aflatoxin B1 reached by both antifungal and antioxidants properties highlights the option to include in the packaging material the cinnamon essential oil as a protective agent against fungal development and mycotoxin production, thus contributing to the food safety.

## 5. CONCLUSIONS

The results obtained in the present work demonstrated that the vapor phase of CIN essential oil achieved to reduce significantly ( $P < 0.05$ ) the AFB1 content.

However, the closure of the Petri dish has demonstrated to play an important role, as well as the composition of the different substrates.

Besides, despite the different methodology applied in both experiments (disc samples and PP films), the same conclusion was confirmed. CIN concentration has been pointed out to act not only as antifungal but also as antimycotoxigenic agent, showing a significant reduction of the AFB1 production at PP 2 % CIN and a total inhibition at PP 4 % CIN and PP 6 % CIN.

As we have seen, both last active concentrations confirmed the fungicidal behavior, so the complete AFB1 reduction is expected to be constant. This indicates the impossibility of the spores inoculated to grow, and therefore, to produce the secondary metabolite above the LOD.

**SECTION IV:**  
**CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONS

Although the previous chapters emphasized the individual conclusions from each experiment, a short abstracts of the most relevant conclusions reached in the Thesis is described as follows:

1. It is demonstrated that turbidometry is a fast, accurate and feasible measurement to quantify the inoculum of a mould. Besides, a good correlation between the turbidometric values and the counts of inoculum, either by CFU/mL or by number of spores per mL (sp/mL). In addition, turbidometry allows to guaranty the reproducibility within the experiments which involve the inoculation of moulds.
2. The antifungal activity of essential oils (EOs) can be carried out by different methods. Among them the determination in liquid media has been shown as the most reliable, accurate and quantifiable method. It is the most appropriate method when the substances to evaluate are liposoluble rather than hidrosoluble, as is the case of EOs. This technique allows the obtention of MIC and MFC.
3. Among the evaluated substances, the cinnamon essential oil and its major compound, cinnamaldehyde, were the stronger antifungal ones, with the lowest MIC and MFC, folowed by oregano and carvacrol and clove and eugenol.
4. In addition to natural substances, the surfactant LAE was also evaluated as antifungal. However, it only showed antifungal activity by direct contact and it was not efficient in vapour phase, as it is non volatile.
5. The antifungal activity in vapour phase is critical to design an active packaging. The results obtained showed that cinnamon EO has a faster release than oregano EO. Thus, oregano EO is more dependent on exposure time.
6. The study of active packaging containing cinnamon EO in vapour phase showed a reduction in the mould development with only 2 % of cinnamon EO, whereas total inhibition was achieved in all cases with 4 % of cinnamon. The same behaviour and the same values were obtained with PP and PET. The activity and inhibition was maintained at least for 2 months. The active materials also showed a very good



stability, as those immediately prepared showed the same activity than those 2 months old..

7. The antifungal activity of both cinnamon and oregan EOs was evaluated at different pH and temperatura values. The same MIC and MFC were obtained at different pH (pH 3, pH 5 y pH 7) and temperatures (6 °C, 25 °C y 37 °C). Active PP was also evaluated under these conditions and the same results were obtained. With the active material, some of these conditions, such as acidic medium at pH 3 and incubation at 6 °C reinforced the antifungal action, which was attributed to the slow down of mould development.
8. The influence of inoculum and EO concentrations has been widely studied. First, the MIC and MFC of the six substances (three EOS and their major compounds) were studied versus four concentrations of inoculum of *Aspergillus flavus*. Among them, cinnamon EO and cinnamaldehyde were the most influential substances on the variation of inoculum concentration. The first experiment with active PET showed the same result, with total inhibition in all cases with the lowest concentration of inoculum. In addition, the differences obtained with the variation of inoculum has been shown as being closely related to the mechanism of action of these substances.
9. The diffusion of cinnamaldehyde, carvacrol and eugenol in vapour phase by the disc diffusion method was analyzed in three different areas of the Petri dish: inhibition, retard and peripheric area. The study was carried out by SPME-GC-MS. The highest concentration was found in all cases, as expected, in the central point of the dish and a gradual decrease was obtained from the center to the peripheric zone. The experiment was performed with and without mould inoculation. It was found that the presence of mould played an essential role in the distribution of the compounds in the three zones. The most relevant results were obtained with cinnamaldehyde, where styrene appeared at high concentration level as a metabolite from the mould in the presence of cinnamaldehyde. In these cases, cinnamaldehyde was not found anymore. The LOD for all substances were also very low.
10. The mode of application of cinnamon EO in vapour phase directly influences the antifungal action. The antifungal activity of cinnamon EO in vapour phase decreased when it was applied to the grown mould. This fact emphasizes the importance of applying the active material before the mould starts to develop.

11. The study of mode of action has demonstrated that cinnamon EO and its major component, cinnamaldehyde, follow a different mechanism from oregano (and carvacrol) and clove (and eugenol). In short words, oregano and clove showed a kinetics of death faster than cinnamon and cinnamaldehyde. Besides, the study by optical microscopy of the exposure in vapour phase of carvacrol and eugenol to *A. flavus* showed strong damages in its cellular wall and membrane (prolapse and evaginations), but the damages were less important in the case of cinnamon. Carvacrol produced small vesicles of uniform size and the absence of entire spores. The observation of the retard area formed by the three substances after 72 hours of exposure showed damaged hyphae in the case of carvacrol and eugenol with high loss of intracellular content, while in the case of cinnamaldehyde the hyphae closed to the inhibition area grew in a directional way, but with a high degree of split in the apex.
12. Further studies by SEM confirmed damages in the retard halo, caused by cinnamon EO in vapour phase by the disc diffusion method. The damage of spores of *A. flavus* exposed by direct contact to the three EOs demonstrated once again that the wall and membrane were seriously affected, even with pores, by carvacrol and eugenol.
13. Although FTIR did not show the expected results, recent publications show this technique as very promising either for the identification of mould species or for the studies of antifungal mechanisms.
14. The active packaging containing cinnamon EO behaves in vapour phase as inhibitor of aflatoxin B1, which is a well known carcinogenic mycotoxin. The variables under study revealed that the closure of the Petri dish and the composition of the substrate (culture medium) clearly influenced the production of aflatoxin B1.

As a final conclusion, and in addition to the antifungal properties, we have seen that a series of variables, such as the concentration of both the mould and the active agent, the packaging material, the speed of release of active agents, the mechanism of diffusion, the composition of the substrate (culture medium), the incubation conditions and the moment of application, among others, affected the antifungal activity.

For all these reasons, the work here presented, as a Doctoral Thesis, has served for deeping in a profound study of mechanism of action of antigungal packaging materials, which is necessary for better optimization of the active material and thus providing a garantie an efficient, stable and reliable active packaging material.

**SECCIÓN V:**  
**BIBLIOGRAFÍA**



---

## BIBLIOGRAFÍA

- 10/2011. COMMISSION REGULATION (EU) Nº 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- 165/2010. COMMISSION REGULATION (EU) Nº 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) Nº 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins.
- 450/2009. COMMISSION REGULATION (EC) Nº 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food.
- 466/2001. COMMISSION REGULATION (EC) Nº 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- 872/2012. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) Nº 872/2012 adopting the list of flavouring substances provided for by Regulation (EC) Nº 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) Nº 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) Nº 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC.
- 1331/2008. REGULATION (EC) Nº 1331/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings.
- 1334/2008. REGULATION (EC) OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) Nº 1601/91, Regulations (EC) Nº 2232/96 and (EC) Nº 110/2008 and Directive 2000/13/EC. In).
- 1881/2006. COMMISSION REGULATION (EC) Nº 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- 1935/2004. REGULATION (EC) Nº 1935/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC.
- 2232/96. REGULATION (EC) Nº 2232/96 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 28 October 1996 laying down a Community procedure for flavouring substances used or intended for use in or on foodstuffs.
- Abrunhosa, L., Calado, T., Resende, T., & Venancio, A. (2011). A fluorescence-LC method with NDA pre-column derivatization for fumonisin B-2 determination in black *Aspergilli* cultures. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34(15), 1594-1603.

- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., et al. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(1), 41-50.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). Cómo se estudian las células (parte I, Capítulo 4). In *Biología Molecular de la Célula* 2 ed.): Ediciones Omega, S.A.
- Aliagiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168-4170.
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Manes, J., & Soler, C. (2014). Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food Chemistry*, 157, 111-118.
- Alpsoy, L. (2010). Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. *African Journal of Biotechnology*, 9(17), 2474-2481.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.
- Arraiza Bermúdez-Cañete, M. P. Universidad Politécnica de Madrid. Ingeniería Agroforestal. Disponible en <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales> (consultado el 12/04/2014 a las 19 h).
- Ashiq, S., Hussain, M., & Ahmad, B. (2014). Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 1-10.
- Aucejo, S., Catalá, R., & Gavara, R. (2000). Interactions between water and EVOH food packaging films. *Food Science and Technology International*, 6(2), 159-164.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Waomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Balaguer, M. P., Cerisuelo, J. P., Gavara, R., & Hernandez-Muñoz, P. (2013b). Mass transport properties of gliadin films: effect of cross-linking degree, relative humidity, and temperature. *Journal of Membrane Science*, 428, 380-392.
- Balaguer, M. P., Gómez-Estaca, J., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2011). Functional properties of bioplastics made from wheat gliadins modified with cinnamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6689-6695.
- Balaguer, M. P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2013c). Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 369-377.

- Balkis, M. M., Leidich, S. D., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Mechanisms of fungal resistance - An overview. *Drugs*, 62(7), 1025-1040.
- Bartnicki-García, S. (2006). Chitosomes: past, present and future. *Fems Yeast Research*, 6(7), 957-965.
- Başer, H. C. K., & Buchbauer, G. (2010a). Chemistry of Essential Oils (Chapter 5). In L. CRS Press.Taylor & Francis Group (Ed.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications.*
- Başer, H. C. K., & Buchbauer, G. (2010b). Production of Essential Oils (Chapter 4). In L. CRS Press.Taylor & Francis Group (Ed.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications.*
- Başer, H. C. K., & Buchbauer, G. (2010c). Sources of Essential Oils (Chapter 3). In L. CRS Press.Taylor & Francis Group (Ed.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications.*
- Becerril, R. (2011). Estudio de las alteraciones producidas por un envase activo antimicrobiano en bacterias mediante técnicas microbiológicas y analíticas. *Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica. Zaragoza.*
- Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P., López, P., & Nerín, C. (2007). Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5-6), 1003-1011.
- Bezerra da Rocha, M. E., Oliveira Freire, F. d. C., Feitosa Maia, F. B., Florindo Guedes, M. I., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165.
- Bigelis, R. (1992). Flavor Metabolites and Enzymes from Filamentous Fungi. *Food Technology*, 46(11), 151-&.
- Bluma, R., Amaiden, M. R., Daghero, J., & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 203-214.
- Bluma, R., Landa, M. F., & Etcheverry, M. (2009). Impact of volatile compounds generated by essential oils on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1473-1480.
- Bordin, K., Sawada, M. M., da Costa Rodrigues, C. E., da Fonseca, C. R., & Fernandes Oliveira, C. A. (2014). Incidence of aflatoxins in oil seeds and possible transfer to oil: a review. *Food Engineering Reviews*, 6(1-2), 20-28.



- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., et al. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1-+.
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
- Boyras, N., & Özcan, M. (2006). Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 238-242.
- Brul, S., Nussbaum, J., & Dielbandhoesing, S. K. (1997). Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 28(3), 169-178.
- Buonocore, G. G., Conte, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2005). Mono and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 459-464.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cantu, D., Carl Greve, L., Labavitch, J. M., & Powell, A. L. T. (2009). Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 113(12), 1396-1403.
- Carmo, E. S., Lima, E. d. O., de Souza, E. L., & de Sousa, F. B. (2008). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 91-97.
- Catalá, R., Hernández-Muñoz, P., López-Carballo, G., & Gavara, R. (2009). Materiales para el envasado de frutas y hortalizas con tratamientos mínimos. *Horticultura Internacional*, 69.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., & Marin-Iniesta, F. (2007). Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of food protection*, 70(12), 2757-2763.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2008). Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 271-278.
- Cerisuelo, J. P., Alonso, J., Aucejo, S., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012a). Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging. *Journal of Membrane Science*, 423, 247-256.

- Cerisuelo, J. P., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2013). Describing and modeling the release of an antimicrobial agent from an active PP/EVOH/PP package for salmon. *Journal of Food Engineering*, *116*(2), 352-361.
- Cerisuelo, J. P., Muriel-Galet, V., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., Catala, R., Gavara, R., et al. (2012b). Mathematical model to describe the release of an antimicrobial agent from an active package constituted by carvacrol in a hydrophilic EVOH coating on a PP film. *Journal of Food Engineering*, *110*(1), 26-37.
- Cordeiro, S. Z., Sato, A., de Oliveira Arruda, R. d. C., & Simas, N. K. (2012). Volatile compounds of *Mandevilla guanabarica* (Apocynoideae, Apocynaceae) from three restingas in Rio de Janeiro, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, *45*, 102-107.
- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Durán, C., Stashenko, E., & Mesa-Arango, A. (2010). *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *20*(5), 734-741.
- Chalier, P., Ben Arfa, A., Guillard, V., & Gontard, N. (2009). Moisture and temperature triggered release of a volatile active agent from soy protein coated paper: effect of glass transition phenomena on carvacrol diffusion coefficient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(2), 658-665.
- Chaliha, M., Cusack, A., Currie, M., Sultanbawa, Y., & Smyth, H. (2013). Effect of packaging materials and storage on major volatile compounds in three australian native herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(24), 5738-5745.
- Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Bouchikhi, T., & Remmal, A. (2005). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Phytotherapy Research*, *19*(5), 405-408.
- Chen, G., Zhang, B., Zhao, J., & Chen, H. (2014). Development and characterization of food packaging film from cellulose sulfate. *Food Hydrocolloids*, *35*, 476-483.
- da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(1), 1-14.
- Dagnas, S., & Membré, J.-M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of food protection*, *76*(3), 538-551.
- Dague, E., Alsteens, D., Latgé, J.-P., & Dufrêne, Y. F. (2008). High-Resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophysical Journal*, *94*(2), 656-660.

- David, J. R. D., Steenson, L. R., & Davidson, P. M. (2013). Expectations and applications of natural antimicrobials to foods: a guidance document for users, suppliers, research and development, and regulatory agencies. *Food Protection Trends*, 33(4), 241-250.
- Davidson, P. M., Critzer, F. J., & Taylor, T. M. (2013). Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods. In *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 4, vol. 4 (pp. 163-190).
- de Groot, P. W. J., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F. J., de Koster, C. G., & Klis, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, S72-S81.
- Delattin, N., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2014). Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Medicinal Chemistry*, 6(1), 77-90.
- Demirel, R., & Sariozlu, N. Y. (2014). Mycotoxigenic moulds and mycotoxins in flours consumed in Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1577-1584.
- Denning, D. W., & Perlin, D. S. (2011). Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiology*, 6(11), 1229-1232.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745-2749.
- Diéguez-Urbeondo, J., Gierz, G., & Bartnicki-García, S. (2004). Image analysis of hyphal morphogenesis in Saprolegniaceae (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, 41(3), 293-307.
- Doell-Boscardin, P. M., Farago, P. V., Nakashima, T., dos Santos, P. E. T., & de Paula, J. d. F. P. (2010). Anatomical study and phytochemical screening of leaves from *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(1), 94-101.
- Doyle, M. P., & Beuchat, L. R. (2007). Fruits and Vegetables (Chapter 8). In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 3 ed.): ASM Press. Washington, D.C.
- Duran, A., & Nombela, C. (2004). Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology-Sgm*, 150, 3099-3103.
- Dutton, M. F. (1988). Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 52(2), 274-295.
- ECDC. (2013). European Centre for Disease Prevention and Control. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species.

- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
- EFSA. (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products.
- EFSA. (2011). SCIENTIFIC REPORT OF EFSA. Shiga toxin-producing E. coli (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock., 9(10).
- Esper, R. H., Gonçalves, E., Marques, M. O. M., Felício, R. C., & Felício, J. D. (2014). Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Espinelngroff, A., Dawson, K., Pfaller, M., Anaissie, E., Breslin, B., Dixon, D., et al. (1995). Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), 314-319.
- Espinelngroff, A., & Kerkering, T. M. (1991). Spectrophotometric method of inoculum preparation for the invitro susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), 393-394.
- FAO. (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *Food and Nutrition Papers*, 81.
- FAO. (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cereal supply and demand brief. Released date 03/07/2014. Disponible en <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>. (Consultado el 22/07/2014 a las 13:15h).
- Farkas, V. (1979). Biosynthesis of cell-walls of fungi. *Microbiological Reviews*, 43(2), 117-144.
- Fernández-Pan, I., Royo, M., & Ignacio Maté, J. (2012). Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 77(7), M383-M390.
- Fiddy, C., & Trinci, A. P. J. (1976). Mitosis, septation, branching and duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 97(DEC), 169-184.
- Filténborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 85-102.
- Firdous, S., Ashfaq, A., Khan, S. J., & Khan, N. (2014). Aflatoxins in corn and rice sold in Lahore, Pakistan. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, 7(2), 95-98.

- Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., & Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 63-77.
- Fontaine, T., Beauvais, A., Loussert, C., Thevenard, B., Fulgsang, C. C., Ohno, N., et al. (2010). Cell wall  $\alpha$ 1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(8), 707-712.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., et al. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27594-27607.
- Frisvad, J. C., Andersen, B., & Thrane, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112, 231-240.
- Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., & Pitt, J. I. (2006). Understanding the fungi producing important mycotoxins. In *Advances in Food Mycology*.
- Garcés, O., & Nerín, C. (2004). Antimicrobial packaging based on the use of natural extracts and the process to obtain this packaging. *European Patent 1657181*.
- Gazi, E., Dwyer, J., Lockyer, N. P., Miyan, J., Gardner, P., Hart, C., et al. (2005). Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*, 77(1), 18-30.
- Gehrt, A., Peter, J., Pizzo, P. A., & Walsh, T. J. (1995). Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1302-1307.
- Gelbke, H.-P., Banton, M., Faes, E., Leibold, E., Pemberton, M., & Duhayon, S. (2014). Derivation of safe health-based exposure limits for potential consumer exposure to styrene migrating into food from food containers. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 258-269.
- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501-517.
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Poulos, P. G. (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 11-19.
- Gohil, R. M. (2012). Designing polyethylene terephthalate-based barrier resins. *Journal of Applied Polymer Science*, 126(1), 260-272.

- Gómez-Ramírez, C., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). *Aspergillus niger* time to growth in dried tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 23-25.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 69-91.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2), 142-150.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, R. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91-97.
- Gutiérrez, L. (2010). Estudio analítico, microbiológico, sensorial de un nuevo envase activo y desarrollo de un nuevo envase inteligente. *Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica. Zaragoza*.
- Gutiérrez, L., Batlle, R., Sánchez, C., & Nerín, C. (2010). New approach to study the mechanism of antimicrobial protection of an active packaging. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(9), 1063-1069.
- Gutiérrez, L., Escudero, A., Batlle, R., & Nerín, C. (2009a). Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8564-8571.
- Gutiérrez, L., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2009b). New antimicrobial active package for bakery products. *Trends in Food Science & Technology*, 20(2), 92-99.
- Guynot, M. E., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marin, S. (2003). Mold-free shelf-life extension of bakery products by active packaging. *Journal of Food Science*, 68(8), 2547-2552.
- Hanusová, K., Stastná, M., Votavová, L., Klauisová, K., Dobiás, J., Voldrich, M., et al. (2010). Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering*, 99(4), 491-496.
- Hao, B. H., Cheng, S. J., Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2013). Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 326-332.

- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641-655.
- Hertlein, J. (1995). Characteristics profile of plastics packaging materials and packs. *Brauwelt*, 135(4), 140-142, 144-150.
- Hickey, P. C., & Read, N. D. (2009). Imaging living cells of *Aspergillus* in vitro. *Medical Mycology*, 47, S110-S119.
- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G., & Read, N. D. (2005). Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. In T. Savidge & C. Pothoulakis (Eds.), *Microbial Imaging*, vol. 34 (pp. 63-+).
- Higueras, L., Lopez-Carballo, G., Hernandez-Munoz, P., Gavara, R., & Rollini, M. (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N alpha-dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 339-345.
- Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., & Thrane, U. (2006). *Advances in Food Mycology*. (Vol. 571): *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Holmes, R. A., Boston, R. S., & Payne, G. A. (2008). Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 559-572.
- Holmquist, G. U., Walker, H. W., & Stahr, H. M. (1983). Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48(3), 778-782.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
- Hottle, T. A., Bilec, M. M., & Landis, A. E. (2013). Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 98(9), 1898-1907.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2001). Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology*, 45(3), 201-208.
- Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y., et al. (2000). Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43(1-2), 17-23.
- Inouye, S., Uchida, K., & Abe, S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 12(4), 210-216.

- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., & Jinap, S. (2014). Aflatoxins in dates and dates products. *Food Control*, 43, 163-166.
- Jeong, H. Y., Chae, K. S., & Whang, S. S. (2004). Presence of a mannoprotein, MnpAp, in the hyphal cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*, 96(1), 52-56.
- Jilkine, K., Gough, K. M., Julian, R., & Kaminskyj, S. G. W. (2008). A sensitive method for examining whole-cell biochemical composition in single cells of filamentous fungi using synchrotron FTIR spectromicroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(3), 540-546.
- Johnson, C. B., Kazantzis, A., Skoula, M., Mitteregger, U., & Novakz, J. (2004). Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. *Phytochemical Analysis*, 15(5), 286-292.
- Juglal, S., Govinden, R., & Odhav, B. (2002). Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of food protection*, 65(4), 683-687.
- Junqueira-Gonçalves, M. P., Alarcon, E., & Niranjana, K. (2013). Development of antifungal packaging for berries extruded from recycled PET. *Food Control*, 33(2), 455-460.
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kamika, I., Mngqawa, P., Rheeder, J. P., Teffo, S. L., & Katerere, D. R. (2014). Mycological and aflatoxin contamination of peanuts sold at markets in Kinshasa, Democratic Republic of Congo, and Pretoria, South Africa. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, 7(2), 120-126.
- Kaminskyj, S. G. W., & Dahms, T. E. S. (2008). High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. *Micron*, 39(4), 349-361.
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148, 162-169.
- Kawamura, Y., & Whitehouse, B. (2008). Ethyl Lauroyl Arginate. Chemical and Technical Assessment. 69th JECFA.
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2011). *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*, *Syzygium* and *Cymbopogon* species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*, 19(1), 48-55.
- Kitic, D., Pavlovic, D., & Brankovic, S. (2013). The role of essential oils and the biological detoxification in the prevention of aflatoxin borne diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21), 2767-2790.



- Kocevski, D., Du, M., Kan, J., Jing, C., Lacanin, I., & Pavlovic, H. (2013). Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. *Journal of Food Science*, 78(5), M731-M737.
- Kocic-Tanackov, S., Dimic, G., Levic, J., Tanackov, I., Tepic, A., Vujicic, B., et al. (2012a). Effects of Onion (*Allium cepa* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) Essential Oils on the *Aspergillus versicolor* Growth and Sterigmatocystin Production. *Journal of Food Science*, 77(5), M278-M284.
- Kocic-Tanackov, S., Dimic, G., Tanackov, I., Pejin, D., Mojovic, L., & Pejin, J. (2012b). The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. *Lwt-Food Science and Technology*, 49(1), 14-20.
- Kocic-Tanackov, S. D., Dimic, G. R., Tanackov, I. J., Pejin, D. J., Mojovic, L. V., & Pejin, J. D. (2012c). Antifungal activity of Oregano (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. *Hemijska Industrija*, 66(1), 33-41.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Muller, W. H., Dijksterhuis, J., et al. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*(74), 1-29.
- Kurowska, A., & Gafazka, I. (2006). Essential oil composition of the parsley seed of cultivars marketed in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1), 143-147.
- Landis, A. E., Miller, S. A., & Theis, T. L. (2007). Life cycle of the corn-soybean agroecosystem for biobased production. *Environmental Science & Technology*, 41(4), 1457-1464.
- Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39.
- Lass-Flörl, C., Speth, C., Kofler, G., Dierch, M. P., Gunsilius, E., & Wurzner, R. (2003). Effect of increasing inoculum sizes of *Aspergillus hyphae* on MICs and MFCs of antifungal agents by broth microdilution method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(3), 229-233.
- Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., et al. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of Food Microbiology*, 168-169(0), 32-41.
- Li, W.-R., Shi, Q.-S., Ouyang, Y.-S., Chen, Y.-B., & Duan, S.-S. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7483-7492.

- López-Malo, A., Alzamora, S. M., & Palou, E. (2002). *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 213-218.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M., & Palou, E. (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99(2), 119-128.
- López-Malo, A., Barreto-Valdivieso, J., Palou, E., & Martín, F. S. (2007). *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control*, 18(11), 1358-1362.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & 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*, 53(17), 6939-6946.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007a). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8814-8824.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007b). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348-4356.
- Luo, X., Wang, R., Wang, L., Li, Y., Wang, Y., & Chen, Z. (2014). Detoxification of aflatoxin in corn flour by ozone. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2253-2258.
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162(3), 245-253.
- Mahalik, N. P., & Nambiar, A. N. (2010). Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. *Trends in Food Science & Technology*, 21(3), 117-128.
- Manso, S., Cacho-Nerín, F., Becerril, R., & Nerín, C. (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30(2), 370-378.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- Mascheroni, E., Guillard, V., Gastaldi, E., Gontard, N., & Chalier, P. (2011). Antimicrobial effectiveness of relative humidity-controlled carvacrol release from wheat gluten/montmorillonite coated papers. *Food Control*, 22(10), 1582-1591.

- Matan, N., & Matan, N. (2008). Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(1), 75-78.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 180-185.
- Milani, J. M. (2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinarni Medicina*, 58(8), 405-411.
- Milhome, M. A. L., Lima, C. G., de Lima, L. K., Lima, F. A. F., Sousa, D. O. B., & Nascimento, R. F. (2014). Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern Brazil. *Food Control*, 42, 34-37.
- Minelli, M. (2014). Modeling CO<sub>2</sub> solubility and transport in poly(ethylene terephthalate) above and below the glass transition. *Journal of Membrane Science*, 451, 305-311.
- Mitchell, T. C., Stamford, T. L. M., de Souza, E. L., Lima, E. D., & Carmo, E. S. (2010). *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 30(3), 755-760.
- Momany, M., & Taylor, I. (2000). Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology-Uk*, 146, 3279-3284.
- Montero-Prado, P., Rodriguez-Lafuente, A., & Nerin, C. (2011). Active label-based packaging to extend the shelf-life of "Calanda" peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 211-219.
- Mortensen, K. L., Mellado, E., Lass-Floerl, C., Luis Rodriguez-Tudela, J., Johansen, H. K., & Arendrup, M. C. (2010). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergilli* in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4545-4549.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfäuer, M. A. (2006). *Microbiología Médica* (5 ed.): GEA Consultoría Editorial S.L.L., Madrid ( España).
- Naumann, A. (2009). A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Analyst*, 134(6), 1215-1223.
- Navarro, D., Díaz-Mula, H. M., Guillén, F., Zapata, P. J., Castillo, S., Serrano, M., et al. (2011). Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with *Aloe vera* gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 241-246.

- NCCLS. (2003). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard M7-A6., 23(2).
- NCCLS. (2012). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antifungal susceptibility testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) methods.
- Ndhkala, A. R., Ncube, B., Okem, A., Mulaudzi, R. B., & Van Staden, J. (2013). Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. *Food and Chemical Toxicology*, 62(0), 609-621.
- Nielsen, P. V., & Ríos, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3), 219-229.
- Noble, L. M., & Andrianopoulos, A. (2013). Reproductive competence: a recurrent logic module in eukaryotic development. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280(1766), 20130819-20130819.
- Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., et al. (2012). Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 1029-1038.
- Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., et al. (2013). Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9515-9523.
- O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T., & Frisvad, J. C. (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9268-9276.
- Oakley, B. R., & Rinehart, J. E. (1985). Mitochondria and nuclei move by different mechanisms in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, 101(6), 2392-2397.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010a). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193-198.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010b). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166.

- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., & Naghdibadi, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, *18*(12), 1518-1523.
- Oshero, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *Fems Microbiology Letters*, *199*(2), 153-160.
- Owolabi, M. S., Olowu, R. A., Lajide, L., Oladimeji, M. O., Padilla-Camberos, E., & Miguel Flores-Fernández, J. (2013). Inhibition of potato tuber sprouting during storage by the controlled release of essential oil using a wick application method. *Industrial Crops and Products*, *45*, 83-87.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., & Etcheverry, M. (2012). Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology*, *159*(3), 198-206.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., & Etcheverry, M. (2013). Antifungal and antiaflatoxic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *Lwt-Food Science and Technology*, *53*(2), 434-444.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., Ferrand, C. A., & Etcheverry, M. (2012b). *In vitro* evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *70*, 82-88.
- Patil, R. P., Nimbalkar, M. S., Jadhav, U. U., Dawkar, V. V., & Govindwar, S. P. (2010). Antiaflatoxic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(4), 608-614.
- Pawar, V. C., & Thaker, V. S. (2007). Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *23*(8), 1099-1106.
- Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., et al. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, *32*(2), 128-141.
- Pena, R., Lang, C., Naumann, A., & Polle, A. (2014). Ectomycorrhizal identification in environmental samples of tree roots by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Frontiers in plant science*, *5*, 229-229.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., et al. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, *59*, 53-66.

- Pezo, D., Salafranca, J., & Nerin, C. (2008). Determination of the antioxidant capacity of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1178(1-2), 126-133.
- Pinto, E., Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., & Goncalves, M. J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 135-141.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(11), 1454-1462.
- Plaza, P., Usall, J., Teixido, N., & Vinas, I. (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 549-554.
- Ponton, J. (2008). The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Revista Iberoamericana De Micología*, 25(2), 78-82.
- Pothakamury, U. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6(12), 397-406.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology*: McGraw-Hill Higher Education.
- Prosser, J. I., & Trinci, A. P. J. (1979). Model for hyphal growth and branching. *Journal of General Microbiology*, 111(MAR), 153-164.
- Rammanee, K., & Hongpattarakere, T. (2011). Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1050-1059.
- RASFF. (2013). The Rapid Alert System for Food and Feed. 2013 Annual Report. Disponible en [http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2013.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2013.pdf) (consultado el 21/07/2014 a las 14 h).
- Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 135-139.
- Rasooli, I., & Owlia, P. (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66(24), 2851-2856.

- Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. (2006). Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. *Food Control*, *17*(5), 359-364.
- Rhim, J.-W., Park, H.-M., & Ha, C.-S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, *38*(10-11), 1629-1652.
- Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. In S. Gottesman (Ed.), *Annual Review of Microbiology*, Vol 67, vol. 67 (pp. 587-609).
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., Gonzalez-Prieto, J. M., Sanchez-Leon, E., Verdin-Ramos, J. A., Beltran-Aguilar, A., et al. (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, *6*(10), 1853-1864.
- Riquelme, M., Fischer, R., & Bartnicki-García, S. (2003). Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma*, *222*(3-4), 211-215.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-García, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., et al. (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, *115*(6), 446-474.
- Rocha, M. E. B. d., Freire, F. d. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, *36*(1), 159-165.
- Rodríguez-Lafuente, A., Nerín, C., & Batlle, R. (2010). Active paraffin-based paper packaging for extending the shelf life of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(11), 6780-6786.
- Rodríguez, Á. (2009). Desarrollo, optimización y evaluación de nuevos envases activos de papel y cartón. *Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica. Zaragoza*.
- Rodríguez, A., Nerín, C., & Batlle, R. (2008). New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6364-6369.
- Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2010). Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *Fems Yeast Research*, *10*(3), 225-243.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2013). *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, *30*(2), 386-392.

- Samson, R. A., Hoekstra E.S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to Food and Airborne Fungi* (7 ed.): Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht (The Netherlands).
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2010). *Food and Indoor Fungi* (1 ed.): Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht (The Netherlands).
- Saulou, C., Jamme, F., Maranges, C., Fourquaux, I., Despax, B., Raynaud, P., et al. (2010). Synchrotron FTIR microspectroscopy of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to plasma-deposited nanosilver-containing coating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(4), 1441-1450.
- Scaffaro, R., Morreale, M., Mirabella, F., & La Mantia, F. P. (2011). Preparation and recycling of plasticized PLA. *Macromolecular Materials and Engineering*, 296(2), 141-150.
- Schatzmayr, G., & Streit, E. (2013). Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal*, 6(3), 213-222.
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.
- Shao, X., Cheng, S., Wang, H., Yu, D., & Mungai, C. (2013). The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1642-1649.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337-344.
- Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Muralidhar, S., Manzoor, N., & Khan, L. A. (2013). Influences of cinnamic aldehydes on H<sup>+</sup> extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 232-240.
- Siegel, D., & Babuscio, T. (2011). Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control*, 22(8), 1145-1153.
- Skotti, E., Kountouri, S., Bouchagier, P., Tsitsigiannis, D. I., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). FTIR spectroscopic evaluation of changes in the cellular biochemical composition of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* induced by extracts of some Greek medicinal and aromatic plants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 127(0), 463-472.
- Soto Eguibar, E. (1993). La microscopía confocal. *Elementos*, 17, 35-39.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: antimicrobial



activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *Lwt-Food Science and Technology*, 54(2), 346-352.

Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18(5), 409-413.

Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., & Kurt, S. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1021-1030.

Stuart, B. (2004). *Spectroscopy: Fundamentals and Applications*.

Suhr, K. I., & 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(4), 665-674.

Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2005). Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *Journal of Food Science*, 70(1), M37-M44.

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68(2), 408-420.

Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S. W., & Miltz, J. (2011). Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 270-276.

Szeghalmi, A., Kaminskyj, S., & Gough, K. M. (2007). A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(5), 1779-1789.

Thembo, K. M., Vismer, H. F., Nyazema, N. Z., Gelderblom, W. C. A., & Katerere, D. R. (2010). Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1479-1486.

Thrane, U., Andersen, B., Frisvad, J. C., & Smedsgaard, J. (2007). The exo-metabolome in filamentous fungi. *Topics in Current Genetics*, 18(235-252).

Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., et al. (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 127-133.

Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 52-55.

- Trinci, A. P. J. (1969). A kinetic study of growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology*, 57, 11-8.
- Trinci, A. P. J. (1978). Wall and hyphal growth. *Science Progress*, 65(257), 75-99.
- Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M. A., et al. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1544-1550.
- Vagi, E., Simandi, B., Suhajda, A., & Hethelyi, E. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38(1), 51-57.
- Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., et al. (2014). Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control*, 37, 165-170.
- Vasile, C., Darie, R. N., Cheaburu-Yilmaz, C. N., Pricope, G.-M., Bracic, M., Pamfil, D., et al. (2013). Low density polyethylene - Chitosan composites. *Composites Part B-Engineering*, 55, 314-323.
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1-4.
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., & Riquelme, M. (2009). Functional stratification of the Spitzkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1044-1053.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 77-86.
- Vermeulen, E., Lagrou, K., & Verweij, P. E. (2013). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(6), 493-500.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2007). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27(1), 91-101.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Spices as Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 13-28.
- Webster, J., & Weber, R. W. S. (2007). Introduction (Chapter 1). In CAMBRIDGE (Ed.), *Introduction to Fungi*.

- Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M., & McClements, J. (2009). Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. In *Global Issues in Food Science and Technology* 1 ed.): Elsevier.
- Wickman, G., Julian, L., & Olson, M. F. (2012). How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death and Differentiation*, 19(5), 735-742.
- Wickman, G. R., Julian, L., Mardilovich, K., Schumacher, S., Munro, J., Rath, N., et al. (2013). Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death and Differentiation*, 20(10), 1293-1305.
- Wihodo, M., & Moraru, C. I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review. *Journal of Food Engineering*, 114(3), 292-302.
- Wilkinson, H. H., Ramaswamy, A., Sim, S. C., & Keller, N. P. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 96(6), 1190-1198.
- Womack, E. D., Brown, A. E., & Sparks, D. L. (2014). A recent review of non-biological remediation of aflatoxin-contaminated crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1706-1714.
- Woodcock, N. H., Hammond, B. H., Ralyea, R. D., & Boor, K. J. (2009). N alpha-Lauroyl-L-arginine ethylester monohydrochloride reduces bacterial growth in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4207-4210.
- Wu, F., Groopman, J. D., & Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual review of food science and technology*, 5, 351-372.
- Wu, F., Jiaping, C., Xiaodong, Z., & Qing, L. (2011). Thyme oil to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo* as fumigant and contact treatments. *Food Control*, 22(1), 78-81.
- Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z., & Yun, J. (2012). Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* *in vitro* and in wounded fruit test. *Journal of Food Safety*, 32(1), 84-93.
- Yates, M. R., & Barlow, C. Y. (2013). Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers—A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*, 78(0), 54-66.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2010). Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 49-59.

- Zivoli, R., Gambacorta, L., Perrone, G., & Solfrizzo, M. (2014). Effect of almond processing on levels and distribution of aflatoxins in finished products and byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(24), 5707-5715.
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, J. M., & Costa, J. (2013). Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Lwt-Food Science and Technology*, 54(2), 564-569.



**SECCIÓN VI:**  
**PUBLICACIONES**



## PUBLICACIONES

- Becerril, R., **Manso, S.**, Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 32(2), 404-408.
- Manso, S.**, Becerril, R., Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2015). Influence of pH and temperature variations on vapor phase action of an antifungal food packaging against five mold strains. *Food Control*, 47(0), 20-26.
- Manso, S.**, Cacho-Nerín, F., Becerril, R., & Nerín, C. (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30(2), 370-378.
- Manso, S.**, Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2011). Antifungal activity of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), oregano (*Origanum vulgare*) and Lauramide Argine Ethyl Ester (Lae) against the mold *Aspergillus flavus* CECT 2949. *Italian Journal of Food Science*, 23, 151-156.
- Manso, S.**, Pezo, D., Gómez-Lus, R., & Nerín, C. (2014). Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*, 45(0), 101-108.
- Manso, S.**, Becerril, R., Nerín, C., Gómez-Lus, R. (2014). Similarities in the mode of action of cinnamon, oregano and clove essential oils in bacteria and moulds. *En proceso de redacción*.



