

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**Master Universitario Oficial de**  
**Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo**



**Control ecológico de levaduras alterantes en**  
**productos lácteos: ensayo de aceite esencial**  
**de *Origanum compactum*.**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**Convocatoria 2014**

AUTOR: César Augusto Parra Triviño

DIRECTOR/ES: Esther Sendra Nadal  
Estrella Sayas Barberá



## UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a **D. César Augusto Parra Triviño** a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Control ecológico de levaduras alterantes en productos lácteos: ensayo de aceite esencial de *Oreganum compactum*”, bajo la dirección de Dña. Esther Sendra Nadal y la codirección de Dña. Estrella Sayas Barberá, debiendo cumplir las directrices para la redacción del mismo que están a su disposición en la asignatura.

Orihuela, 6 de mayo de 2014

La Directora del Master Universitario en Agroecología, Desarrollo Rural y Agroturismo.



Fdo.: Gema Romero Moraleda



TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:



## MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLOR RURAL Y AGROTURISMO

### VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER CURSO 2013/2014

<b>Director/es del trabajo</b>
Esther Sendra Nadal Estrella Sayas Barberá

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

<b>Título del Trabajo</b>
Control ecológico de levaduras alterantes en productos lácteos: ensayo de aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> .
<b>Alumno</b>
César Augusto Parra Triviño

Orihuela, a 9 de septiembre de 2014

Esther Sendra Nadal

Estrella Sayas Barberá

Firma/s directores/es trabajo



## MASTER UNIVERSITARIO OFICIAL DE AGROECOLOGÍA, DESARROLLO RURAL Y AGROTURISMO

### REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Control ecológico de levaduras alterantes en productos lácteos: ensayo de aceite esencial de *Origanum compactum*.

Modalidad (proyecto/experimental/bibliográfico/caso práctico): Experimental

Autor: César Augusto Parra Triviño

Director/es: Esther Sendra Nadal y Estrella Sayas Barberá

Convocatoria: 2014

Número de referencias bibliográficas: 62

Número de tablas: 21

Número de figuras: 24

Palabras clave

AE, Agar, antimicrobiano, *Debaryomyces hansenii*, ecológico, *Kluyveromyces marxianus*, microdilución, MIC, *Origanum compactum*, *Pichia fermentans*.

## RESUMEN:

Se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum compactum*) proveniente de cultivo ecológico sobre las levaduras alterantes de productos lácteos: *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia fermentans*, en los medios de cultivo Agar de patata y dextrosa (PDA), leche desnatada (LD) (0,3% materia grasa) y leche entera (LE) (3,6% materia grasa). Para la evaluación se llevaron a cabo las pruebas de difusión en disco con contenidos de AE de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu$ l, para las cuales se realizaron mediciones del diámetro de los halos durante tres días consecutivos; y pruebas de microdilución en caldo donde se realizaron las siembras de los contenidos de los pocillos en placas de Petri; estos métodos se utilizaron con el fin de determinar la reacción de las levaduras en estos medios; los datos se analizaron con el programa SPSS y para determinar las diferencias entre las muestras se realizó test de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . El AE de *O. compactum* en la prueba de difusión en disco presentó acción antimicrobiana en las 3 levaduras en el medio PDA obteniéndose diámetros de 33,4 mm en *K. marxianus* (*K.m*); 36,3 mm en *D. hansenii* (*D.h*) y 29,7 mm en *P. fermentans* (*P.f*). En LD presentó efecto sobre *K.m*, *D.h* y algunos tratamientos en *P.f*, siendo los diámetros 21.8, 19.4 y 12.8 mm respectivamente. En LE no se presentó mucho efecto antimicrobiano, obteniéndose diámetros de 15.8, 16.4 y 13.3 mm en *K.m*, *D.h* y *P.f*, respectivamente. Para los volúmenes de 2,5 y 40  $\mu$ l de AE, los diámetros en *K.m* fueron 22,7 y 31,8 mm; en *D.h* 21,6 y 32,5 mm y en *P.f*, 19 y 26,5 mm. Por último las MIC obtenidas con el método de microdilución fueron 3,125  $\mu$ l de AE para *K.m* y *D.h* y 1,5625  $\mu$ l para *P.f*. Los resultados nos reflejan que el AE de *O. compactum* proveniente de cultivo ecológico puede ser utilizado como antimicrobiano en levaduras.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
1.1 Los aceites esenciales como conservantes naturales .....	13
1.2 El deterioro de productos lácteos .....	16
1.3 Alteraciones producidas por las levaduras en estudio .....	17
1.3.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 1043I .....	17
1.3.2 <i>Debaryomyces hansenii</i> CECT 11379.....	18
1.3.3 <i>Pichia fermentans</i> CECT 1455.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 Principal .....	22
2.2 Específicos.....	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Aceite esencial .....	23
3.1.1 Análisis del aceite esencial .....	23
3.1.1.1 Cromatografía de gases (GC).....	23
3.1.1.2 Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC-MS).....	24
3.2 Cepas de Levadura .....	24
3.2.1 Recuperación de cepas en estudio .....	24
3.3 Ensayos de actividad antimicrobiana mediante pruebas de difusión en disco ...	27
3.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	27
3.4.1 Método de dilución en caldo.....	27
3.4.2 Determinación de la MIC.....	28
3.5 Análisis estadístico.....	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
4.1 Composición del aceite .....	31
4.2 Actividad antimicrobiana determinada por prueba de difusión en disco.....	33
4.3 Actividad antimicrobiana en medio líquido.....	50

5. CONCLUSIONES .....	57
6. BIBLIOGRAFÍA .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Actividad antimicrobiana de aceites esenciales .....	<b>13</b>
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias (%v/v) de algunos aceites vegetales y extractos utilizados contra bacterias y levaduras en agar .....	<b>14</b>
<b>Tabla 3.</b> Características del código CECT, lugar de aislamiento, medio de cultivo ideal y nivel de riesgo de las 3 levaduras utilizadas en el ensayo.....	<b>20</b>
<b>Tabla 4.</b> Materias primas y cantidades utilizadas para la preparación de los diferentes medios de cultivo .....	<b>20</b>
<b>Tabla 5.</b> Medios de cultivo utilizados para cada levadura .....	<b>26</b>
<b>Tabla 6.</b> Composición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> determinado por cromatografía gaseosa .....	<b>31</b>
<b>Tabla 7.</b> Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> sobre <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 1043. Halos medidos durante 3 días de incubación, en medio de cultivo PDA, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco .....	<b>33</b>
<b>Tabla 8.</b> Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> sobre <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 1043. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE DESNATADA (0,3% materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco .....	<b>34</b>
<b>Tabla 9.</b> Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> sobre <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 1043. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE ENTERA (3,6 % materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco .....	<b>36</b>
<b>Tabla 10.</b> Resumen del análisis estadístico para <i>Kluyveromyces marxianus</i> de las pruebas post hoc de Tukey del diámetro del halo según el medio de cultivo, tiempo en días de la medición y la cantidad de aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> .....	<b>37</b>
<b>Tabla 11.</b> Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> sobre <i>Debaryomyces hansenii</i> CECT 11379. Halos medidos durante 3 días de incubación, en medio de cultivo PDA, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco .....	<b>38</b>
<b>Tabla 12.</b> Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Origanum compactum</i> sobre <i>Debaryomyces</i>	

*hansenii* CECT 11379. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE DESNATADA (0,3% materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco ..... 39

**Tabla 13.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Debaryomyces hansenii* CECT 11379. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE ENTERA (3,6 % materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco ..... 40

**Tabla 14.** Resumen del análisis estadístico para *Debaryomyces hansenii* de las pruebas post hoc de Tukey del diámetro del halo según el medio de cultivo, tiempo en días de la medición y la cantidad de aceite esencial de *Origanum compactum* ..... 42

**Tabla 15.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Pichia fermentans* CECT 1455. Halos medidos durante 3 días de incubación, en medio de cultivo PDA, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco 43

**Tabla 16.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Pichia fermentans* CECT 1455. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE DESNATADA (0,3% materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco ..... 44

**Tabla 17.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Pichia fermentans* CECT 1455. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE ENTERA (3,6 % materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco ..... 45

**Tabla 18.** Resumen del análisis estadístico para *Pichia fermentans* de las pruebas post hoc de Tukey del diámetro del halo según el medio de cultivo, tiempo en días de la medición y la cantidad de aceite esencial de *Origanum compactum*..... 47

**Tabla 19.** Prueba de sensibilidad del AE de *Origanum compactum* de origen ecológico frente a *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia fermentans*, bajo el método de difusión en disco, tomando como referencia la sensibilidad de especies de *Candida* ante Anfotericina B en concentración de 10 µg..... 47

**Tabla 20.** Resultados de las placas de Petri sembradas con el contenido de los pocillos de las 3 microplacas evaluadas para verificar la MIC de cada una de las levaduras ..... 51

**Tabla 21.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada una de las 3 levaduras evaluadas ..... 53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Medios de cultivo PDA y PDB .....	<b>25</b>
<b>Figura 2.</b> Tubos de ensayo y placas Petri con los medios de cultivo .....	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b> Siembra en tapizado .....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Levaduras recuperadas y sembradas en las placas Petri (primer pase).....	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> Levaduras de <i>Kluyveromyces marxianus</i> segundo pase .....	<b>26</b>
<b>Figura 6.</b> Siembra de <i>Debaryomyces hansenii</i> tercer pase .....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Adición de AE .....	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b> Adición de leche entera como medio.....	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b> Siembra de las levaduras.....	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b> Microplacas recién sembradas con las levaduras en cada uno de los medios de cultivo .....	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>K. marxianus</i> en medio PDA .....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>K. marxianus</i> en medio leche desnatada.....	<b>36</b>
<b>Figura 13.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>K. marxianus</i> en medio leche entera .....	<b>37</b>
<b>Figura 14.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>D. hansenii</i> en medio PDA .....	<b>39</b>
<b>Figura 15.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>D. hansenii</i> en medio Leche desnatada .....	<b>40</b>
<b>Figura 16.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>D. hansenii</i> en medio Leche entera.....	<b>42</b>
<b>Figura 17.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>P. fermentans</i> en medio PDA.....	<b>44</b>
<b>Figura 18.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>P. fermentans</i> en medio Leche desnatada .....	<b>45</b>
<b>Figura 19.</b> Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de <i>O. compactum</i> contra <i>P. fermentans</i> en medio Leche entera .....	<b>47</b>
<b>Figura 20.</b> Microplacas 2 horas después de la adición del colorante MTT.....	<b>50</b>

<b>Figura 21.</b> Turbidez de los pocillos de la Microplaca tras 72 horas de incubación, lo cual indica la presencia de microorganismos.....	<b>52</b>
<b>Figura 22.</b> Placas de Petri sembradas con <i>K. marxianus</i> para determinar la MIC del AE de <i>Origanum compactum</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 23.</b> Placas de Petri sembradas con <i>D. hansenii</i> para determinar la MIC del AE de <i>Origanum compactum</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 24.</b> Placas de Petri sembradas con <i>P. fermentans</i> para determinar la MIC del AE de <i>Origanum compactum</i> .....	<b>53</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la industria agroalimentaria ha venido cambiando debido al gran interés que están mostrando los consumidores en la demanda de productos cada vez más sanos y amigables con el medio ambiente; es así que se están realizando ensayos con productos naturales para controlar el deterioro de productos elaborados lácteos tales como el yogurt y los quesos. Entre los microorganismos que causan estos daños podemos encontrar hongos, bacterias y levaduras, los cuales han originado la búsqueda de nuevos compuestos que eviten la contaminación de los alimentos durante la manipulación y el almacenamiento (Badawy y Rabea, 2009). Uno de estos productos naturales son los aceites esenciales (AE) de diferentes plantas, los cuales tienen importantes propiedades antimicrobianas que los hacen ideales para ser utilizados en la industria agroalimentaria. Estos aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles los cuales son extraídos de diferentes partes de la planta como son hojas, tallos, raíces, flores y cáscaras de frutos; su obtención se realiza principalmente por hidrodestilación o arrastre con vapor, métodos industriales, relativamente económicos y fáciles de implementar (Vásquez, 2012). De igual manera, numerosos informes científicos han puesto de manifiesto una importante actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y que estas actividades biológicas depende de la composición química (Chun *et al.*, 2005), que varían según el origen geográfico, el medio ambiente y las condiciones agronómicas, la etapa de desarrollo del material vegetal y el método de extracción (Goodner *et al.*, 2006). Según otros estudios, los aceites procedentes de: clavo, canela, mostaza, orégano, romero y tomillo son los que poseen actividad antimicrobiana más acentuada (Burt, 2004).

Se sabe también que los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que pueden contener cerca de 20 a 60 componentes en concentraciones muy diferentes, lo que les provee de unas notables propiedades antimicrobianas. Se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones bastantes elevadas (20–70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza (Bakkali, Averbeck, Averbeck e Idaomar, 2008). Como ejemplos de estos componentes principales están el cinamaldehído que es obtenido de la canela, el eugenol obtenido del clavo de olor, el cineol obtenido del eucalipto, el timol obtenido del tomillo, entre otros (Miramont, 2012). Así mismo, Bakkali *et al.* (2008) informaron que el carvacrol (30%) y el timol (27%) eran los principales componentes del aceite esencial de *Origanum compactum*. El carvacrol, p-cimeno y timol son componentes volátiles y de alta actividad inhibitoria sobre bacterias, hongos y levaduras, siendo el timol el que se encuentra en mayor proporción en ambas especias (Castaño, 2012).

Por lo anterior y teniendo en cuenta la tendencia de la industria agroalimentaria como es la disminución o reemplazo de conservantes químicos por productos naturales, bien sea utilizándolos como recubrimientos superficiales o añadiendo un pequeño porcentaje de éste sin que se vea alterado sus características organolépticas, en el presente trabajo se va a evaluar el uso y efecto del aceite esencial de orégano (O.

*compactum*) proveniente de la producción ecológica como conservante o antimicrobiano, sobre levaduras alterantes de productos lácteos tales como *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia fermentans*.

### 1.1. Los aceites esenciales como conservantes naturales

Desde tiempos remotos, las especias y las hierbas se han añadido a alimentos como condimento, debido a sus propiedades aromáticas. En el desarrollo de películas comestibles y recubrimientos antimicrobianos, los aceites esenciales de hierbas y especias han sido ampliamente utilizados (Sánchez, 2010).

Algunos AEs de especias, son altos inhibidores de microorganismos patógenos. El fraccionamiento y aplicación prolongada de los aceites esenciales ayuda a mejorar el nivel de actividad en algunos casos. La actividad antimicrobiana de los AEs se puede atribuir a su contenido de estructuras terpenoides que, debido a su carácter lipofílico, actúan mediante la interrupción de la integridad de la membrana citoplasmática de los microorganismos, la que pierde así su alta impermeabilidad para los protones y otros iones. Las funciones de la membrana quedan comprometidas, no sólo como barrera, sino también como una matriz para las enzimas y como un transductor de energía (Campos *et al.*, 2011 citados por Miramont, 2012).

En la actualidad existe mucha información de investigadores que están retomando el uso de estos AEs como antimicrobianos para el control de patógenos, en donde han realizado ensayos de sus beneficios tanto en plantas y animales como en la industria agroalimentaria; y es de esta última que se traen a colación algunos de esos trabajos haciendo mayor hincapié en el uso del AE de orégano como antimicrobiano, pero en general de ensayos con AEs extraídos de diferentes plantas.

Los aceites esenciales tienen diferentes aplicaciones entre las cuales algunas se pueden observar en la tabla 1.

De igual manera, en la tabla 2 se pueden observar las concentraciones mínimas inhibitorias (%v/v) de algunos aceites vegetales y extractos utilizados contra bacterias y levaduras en agar, en donde Hammer, Carson y Riley (1999) encontraron que el aceite orégano fue uno de los más efectivos al inhibir todos los microorganismos que estudiaron.

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana de aceites esenciales.

Especie	Modo de aplicación	Actividad antibacteriana	Actividad antifúngica
Orégano y menta	Aceite esencial		<i>Aspergillus ochraceus</i>

<b>Orégano</b>	Aceite esencial o carvacrol		<i>Candida albicans</i>
<b>Orégano y Timol</b>	Aceite esencial o carvacrol	<i>Staphylococcus pneumoniae</i> R36A, <i>Bacillus cereus</i>	
<b>Orégano, Cilantro y Albahaca</b>	Aceite esencial	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Yersina enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Aspergillus niger</i>

Fuente: Adaptado de Miramont (2012).

**Tabla 2.** Concentraciones mínimas inhibitorias (%v/v) de algunos aceites vegetales y extractos utilizados contra bacterias y levaduras en agar.

Especie	Microorganismo					
	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Cándida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<b>Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)</b>	0,25	0,25	1	0,25	>2,0	1
<b>Limoncillo (<i>Cymbopogon citratus</i>)</b>	0,12	0,06	0,12	0,06	1	0,25
<b>Hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>)</b>	0,5	0,5	>2,0	0,5	>2,0	1
<b>Árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)</b>	0,5	0,5	2	0,25	>2,0	0,5
<b>Menta (<i>Mentha x piperita</i>)</b>	nd	0,5	2	0,5	>2,0	1
<b>Hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>)</b>	0,25	0,12	2	0,25	>2,0	0,5
<b>Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)</b>	0,5	0,5	>2,0	0,5	>2,0	2
<b>Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)</b>	0,12	0,12	0,25	0,12	2	0,12
<b>Pino (<i>Pinus sylvestris</i>)</b>	2	2	>2,0	2	>2,0	>2,0
<b>Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)</b>	0,5	1	>2,0	1	>2,0	>2,0
<b>Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)</b>	0,5	0,5	2	0,5	>2,0	2
<b>Clavo</b>	nd	0,12	0,5	0,25	>2,0	>2,0

<b>(<i>Syzygium aromaticum</i>)</b>						
<b>Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)</b>	0,12	0,12	0,5	0,12	>2,0	>2,0
<b>Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)</b>	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0

Fuente: Adaptado de Hammer *et al* (1999).

En la tabla anterior se resumen las concentraciones mínimas inhibitorias de 14 de los 52 aceites vegetales y extractos que fueron investigados por Hammer *et al*, 1999 para evaluar el efecto de éstas contra 10 microorganismos entre bacterias y levaduras, utilizando un método de dilución en agar, en donde encontraron que el Limoncillo, orégano y el laurel fueron los únicos que inhibieron todos los organismos a concentraciones de  $\leq 2,0\%$  (v/v). Seis aceites no inhibieron ningún organismo en la concentración más alta, que fue 2,0% (v/v) de aceite de hueso de albaricoque, de onagra, de macadamia, de calabaza, salvia y almendra dulce. Actividad variable se registró para los aceites restantes. Veinte de los aceites vegetales y los extractos se investigaron, utilizando un método de microdilución en caldo, para la actividad frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las concentraciones mínimas inhibitorias más bajas fueron de 0,03% (v/v) en el aceite de tomillo frente a *C. albicans* y *E. coli* y de 0,008% (v/v) del aceite de vetiver contra *S. aureus*. Para los investigadores, estos resultados apoyan la noción de que los aceites esenciales y extractos de plantas pueden tener un papel como farmacéuticos y conservantes.

Rojas *et al.*, (2007) evaluaron las actividades antimicrobianas frente a *E. coli* O157: H7 de varios AEs (el orégano, la canela y el limón) y de los compuestos activos de los aceites (carvacrol, cinamaldehído y citral) incorporados en películas comestibles de alginato-puré de manzana, mostrando que el carvacrol exhibía la mayor actividad antimicrobiana seguido por aceite de orégano, el citral, el aceite de hierba de limón, cinamaldehído y el aceite de canela.

Quintana, Plascencia, González, y Cortez (2010) evaluaron el efecto antifúngico de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus* sobre la germinación de esporas y el crecimiento radial del micelio de *Penicillium chrysogenum*, en donde determinaron que la concentración mínima inhibitoria que disminuye el crecimiento radial en un 50% (CR) fueron  $294 \pm 16$ ,  $152 \pm 7$  y  $112 \pm 3$  ppm para *C. zeylanicum*, *A. cepa* y *C. citratus*, respectivamente. Por lo anterior concluyeron que los tres aceites inhiben significativamente la germinación de esporas y el crecimiento radial del micelio con respecto a los testigos, por lo cual recomiendan su uso para posteriores estudios en protección de alimentos.

En la investigación llevada a cabo para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano, tomillo, canela, orégano mexicano, jengibre, salvia,

romero y albahaca contra *E. coli* aisladas de heces de aves de corral y ganado, Santurio *et al.* (2011) concluyeron que los aceites esenciales de orégano, orégano mexicano, tomillo y canela fueron la actividad bactericida satisfactoria, y los aceites esenciales de orégano presentaron actividad antimicrobiana superior a los demás.

Santurio *et al.* (2007), probando los aceites esenciales de orégano, tomillo y canela con 20 serovariedades de *Salmonella*, encontraron que el orégano mostró mayor actividad antimicrobiana en comparación con los otros aceites probados.

## 1.2. El deterioro de productos lácteos

Las levaduras poseen determinadas características particulares que les permiten crecer y contaminar en alimentos de origen lácteo, entre ellas la fermentación/asimilación de la lactosa, producción de enzimas proteolíticas extracelulares, por ejemplo: lipasas, asimilación de ácido láctico y cítrico, crecimiento a bajas temperaturas y halo tolerancia (Orberá, 2004). Así mismo, pueden crecer bien en el pH bajo de los productos cultivados como el suero de leche y la crema agria y pueden producir malos sabores descritos como fermentados o a levadura. Además, las levaduras pueden metabolizar diacetil en estos productos, lo que conduce a un sabor similar al yogur (Wang y Frank, 1981).

En la leche la contaminación por levaduras puede tener lugar después de la pasteurización y es una contaminación secundaria, en la cual participan las especies *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus diffluens*, *D. hansenii* y *K. marxianus*. La leche cruda refrigerada tolera el crecimiento de los grupos *Cryptococcus curvatus*, *Geotricum candidum*, *D. hansenii*, entre otros (Orberá, 2004).

Según Ledenbach y Marshall, (2009, p. 44-45), las levaduras son una causa importante de deterioro de yogur y las leches fermentadas en las que el pH bajo proporciona un entorno selectivo para su crecimiento. De igual manera Orberá (2004) comenta que los derivados lácteos mayormente alterados por la acción de levaduras es el yogurt, debido a la adición de frutos y saborizantes derivados de frutos. Los yogures producidos bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación no deben contener más de 10 células de levadura y deben tener una vida útil de 3-4 semanas a 5 °C. Sin embargo, los yogures que tienen conteos iniciales de > 100 UFC/g tienden a echarse a perder rápidamente. El aroma a levadura y la fermentación de malos sabores y la apariencia gaseosa se detectan a menudo cuando las levaduras crecen a  $10^5$  - $10^6$  UFC/g (Ledenbach and Marshall, 2009, p. 44-45). Los contaminantes de mayor incidencia son *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida versatilis* y *Peterozyma toletana*; en menor escala los géneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Debaryomyces* (Deak, 2007).

En los quesos las levaduras participan en la maduración metabolizando el ácido láctico por lo que elevan el pH y favorecen el crecimiento de bacterias proteolíticas. De forma general, la microflora es muy específica en cada lechería y se piensa contribuye al bouquet específico del producto. En los quesos conservados, incluso en refrigeración, predominan especies de *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula*

*minuta*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*; así como *D. hansenii* y *Yarrowia lipolytica* (Pereira *et al*, 2000). Debido a la cantidad de residuos que se generan en las lecherías, uno de los problemas que se le asocian es el tratamiento de estos; de ahí que el uso de estos grupos contaminantes de estos substratos para la obtención de biomasa y compuestos de valor añadido podría ser una opción. En los quesos las levaduras dañinas actúan mediante producción de fructificaciones, sabores levaduriformes indeseables y una textura desagradable para la apariencia del producto. Entre las características fisiológicas asociadas a los grupos de levaduras aisladas de quesos, están: actividad ureasa, alcalización, fermentación de la glucosa, crecimiento superficial, actividad esterasa y proteasa y resistencia a cicloheximida (Orberá, 2004).

De igual manera, el pH bajo y el buen perfil nutricional de la mayoría de los quesos son favorables para el crecimiento de las levaduras de degradación. La humedad de la superficie, a menudo contiene ácido láctico, péptidos y aminoácidos, lo que favorece el crecimiento rápido. Muchas levaduras producen alcohol y CO<sub>2</sub>, lo que resulta en el queso con sabor a levadura (Horwood, Stark, y Hull, 1987, citados por Ledenbach y Marshall, 2009, p. 44-45). Los paquetes de queso envasados al vacío o en atmósferas modificadas pueden sobresalir como resultado de la gran cantidad de CO<sub>2</sub> producido por las levaduras (Vivier *et al*, 1994). La lipólisis produce ácidos grasos de cadena corta que se combinan con etanol para formar ésteres frutales. Algunas cepas de levadura proteolíticas producen sulfuros, dando como resultado un olor a huevo. Las levaduras contaminantes comunes de quesos incluyen *Candida spp.*, *K. marxianus*, *G. candidum*, *D. hansenii*, y *Pichia spp.* (Johnson, 2001, citado por Ledenbach y Marshall, 2009, p. 44-45).

### 1.3. Alteraciones producidas por las levaduras en estudio

Las levaduras que se van a utilizar en el presente ensayo son *K. marxianus*, *D. hansenii* y *P. fermentans*, las cuales como se mencionó anteriormente se seleccionaron por ser alterantes de productos lácteos; aunque cabe mencionar que algunas de estas levaduras pese a ser contaminantes de algunos productos (lácteos), también ejercen cierta acción benéfica sobre otros, las cuales son aprovechadas por diferentes industrias; por lo tanto debe quedar claro que en el ensayo del presente trabajo solo se tuvo en cuenta su cualidad de alterante.

A continuación se presentan algunas de las características de las levaduras a estudio.

#### 1.3.1. *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043

Las levaduras del género *Kluyveromyces* pertenecen a la división Ascomycota. Históricamente algunos de los *Kluyveromyces* fueron clasificados como *Saccharomyces*, otro miembro de la clase Ascomycetes, Familia *Saccharomycetaceae*, y difieren principalmente en forma de esporas y la apariencia, así como su capacidad para aglutinar. Hay aproximadamente 17 especies dentro del género *Kluyveromyces*. Las especies se subdividen en base a su capacidad para formar ascas solas o multiesporas (Batt, 1999).

Como se menciona anteriormente, las levaduras de este género se reproducen por gemación multilateral, liberándose las esporas al llegar a su madurez (sus esporas son esféricas). En la actualidad, *K. marxianus* incluye las especies *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, *Saccharomyces lactis* y *S. fragilis*. La *K. marxianus* es una de las levaduras que más abunda en los productos lácteos. Los especies pertenecientes al género *Kluyveromyces* producen b-galactosidasa y son potentes fermentadoras de la lactosa. La *K. marxianus* contiene la coenzima Q-6 e interviene en la fermentación del kumis (bebida láctea). Asimismo, se utiliza para obtener células de levadura a partir del suero lácteo (Jay, 1994 citado por Petrenco, 2005, p. 15).

La capacidad de utilizar un azúcar particular es una función de la presencia o ausencia de una enzima crítica. Es notable la capacidad de ciertas especies de fermentar la lactosa, incluyendo *K. marxianus* y *K. lactis*. *K. lactis* y *K. marxianus* (antes *K. fragilis*) se encuentran entre los miembros más conocidos del género *Kluyveromyces*. Ellos son morfológicamente idénticas con la excepción de su forma de esporas y otras características, más notablemente la capacidad de fermentar la lactosa, lo que sugiere que *K. lactis* es similar a *K. fragilis* (ahora *K. marxianus*). Algunas referencias de ellos citan como subespecies, *K. marxianus var. lactis* y *var. marxianus* respectivamente (Batt, 1999).

En cuanto a las condiciones de crecimiento, son aeróbicas, los medios de cultivo donde se desarrollan son Caldo Extracto de Levadura-Manitol (LM), el cual una alternativa comercial es el medio CM920 y Agar Extracto de Levadura-Peptona-Glucosa (GPYA); la temperatura de crecimiento ideal es 26 °C y están clasificadas provisionalmente como grupo de riesgo 1 (CECT 1), los cuales según la Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo “son agentes biológicos que resulte poco probable que causen enfermedad en el hombre”.

### 1.3.2. *Debaryomyces hansenii* CECT 11379

*D. hansenii* es una levadura clasificada como no convencional, característicamente eurihalina y criotolerante, aislada originalmente del mar siendo clasificada como levadura marina. Sin embargo, es el contaminante más común de todos los tipos de quesos; coloniza jamones y salchichas, salmueras, mermeladas y toda clase de alimentos lácteos. En la naturaleza, esta levadura crece en el suelo, en maderas y frutas en descomposición, en el mar, ríos y lagunas, etc. Así, *D. hansenii* puede proliferar en una gran variedad de nichos ecológicos, para lo que necesariamente tiene que desplegar una respuesta fisiológica adaptativa (Segal et al, 2008).

En la actual clasificación taxonómica se aceptan 15 especies dentro de este género, aunque se ha propuesto una especie adicional como es *Debaryomyces prosopidis*, *D. hansenii* (forma imperfecta de *Candida famata*) es, con mucho, de las especies más significativas que se encuentran en los alimentos.

*D. hansenii* es considerado como no fermentativa. La característica más distintiva de *D. hansenii* es su capacidad para crecer en presencia de concentraciones extremadamente altas de sal (NaCl). Aunque la respuesta de crecimiento a NaCl varía con la cepa, la mayoría crece en presencia de 15% (w/v) de NaCl y existen algunas cepas que crecen a 20-24% (w/v) de NaCl. *D. hansenii* y *D. etchellsii*, por lo menos,

también son tolerantes a muy altas concentraciones de azúcares y crecer en la presencia de 60% (w / v) de sacarosa.

Muchos autores han hecho la observación cualitativa que *D. hansenii* exhibe un crecimiento más rápido a 1-5 °C en comparación con otras especies de levadura, y hay un informe de crecimiento a -12,5 °C. *D. hansenii* no es particularmente tolerante con conservantes o tratamiento térmico.

*D. hansenii* / *C. famata* ahora han surgido como las levaduras más importantes en la industria láctea. Especies débilmente fermentadores se han relacionado con el deterioro de los yogures, pero su mayor importancia es en la producción de queso, especialmente con los quesos blandos madurados con mohos como el Camembert, Brie y variedades de pasta azul. Muchas encuestas de estos y otros tipos de quesos han revelado una consistentemente alta incidencia de *D. hansenii*, a menudo a poblaciones de 106 -107 ufc g<sup>-1</sup> o superior. La levadura se origina como un contaminante natural de la salmuera del queso y crece en ambas partes exterior e interior de la cuajada de queso durante la etapa de maduración. Una vez más, la capacidad de la levadura para tolerar el ambiente de alto contenido de sal del queso, la utilización de ácido láctico, proteasa y lipasa de producción, el crecimiento a baja temperatura y, posiblemente, la producción de polioles tales como glicerol son factores clave que favorecen su crecimiento y la contribución a la bioquímica de la maduración del queso. Un vínculo claro entre dicha actividad y un resultado sensorial queda por establecer, pero se supone que la relación es positiva, ya que los cultivos iniciadores comerciales de *D. hansenii* están disponibles para impulsar el proceso de maduración. Una propiedad importante de estas cepas puede ser la capacidad de sus proteasas y lipasas para funcionar a altas concentraciones de sal y bajas temperaturas (Praphailong y Flota, 1999).

En cuanto a las condiciones de crecimiento, son aeróbicas, el medio de cultivo donde se desarrolla es el Agar Extracto de Levadura-Peptona-Glucosa (GPYA); la temperatura de crecimiento ideal es 25 °C y están clasificadas provisionalmente como grupo de riesgo 1 (CECT 2).

### 1.3.3. *Pichia fermentans* CECT 1455

El género *Pichia* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetales*, clase *Saccharomycetes*, filo *Ascomycota* (Poutou *et al*, 2005, p. 76). Así mismo, este género representa actualmente uno de los géneros más amplios de levaduras, compuesto por 91 especies diferentes, y uno de los más heterogéneos (Kurtzman, 2011). En la industria de la alimentación, la utilización de algunas de estas especies ha contribuido al correcto procesamiento de distintos tipos de quesos y al desarrollo apropiado de etapas tempranas en la maduración de ciertos vinos (Corsetti *et al*, 2001).

*P. fermentans* está clasificada como Ascomiceto, teleomorfo; las células se reproducen por gemación, tienen forma ovoide a elipsoidal, se encuentran en pares o en cadenas cortas y las pseudohifas son sencillas a complejas. La colonia es de color crema a amarillento; el crecimiento es rápido y pueden alcanzar la madurez en 72

horas. La conforman de 2 - 4 ascosporas por asca en forma de sombrero. Su crecimiento en líquido forma unas películas en escala que van de poco espesas a espesas. Fermentan la glucosa; asimilan la D-xilosa, el succinato, lactato, citrato, glicerol, etanol; no asimilan el nitrato, la etilamina, Lisina; no crecen en un medio libre de vitaminas y requiere de tiamina. Presenta crecimiento variable a 37 °C. Algunas cepas son resistentes a 10% de NaCl y a altas concentraciones de glucosa (Enology Access, 2010).

Las células están compuestas por la coenzima Q7 (Yamada *et al.* 1973 citados por CBS-Knaw). Esta levadura se encuentra en el suero de mantequilla y harina de papa en los Países Bajos, en la cerveza lambic en Bélgica, en el queso stracchino en Italia, en el jugo de naranja en mal estado en EE.UU., esputo en Noruega, en la levadura de cerveza en el Reino Unido, la alimentación del ganado en Dinamarca y en los granos kefir (CBS-Knaw).

En cuanto a las condiciones de crecimiento, son aeróbicas, el medio de cultivo donde se desarrollan es el Caldo Extracto de Levadura-Manitol (LM), el cual una alternativa comercial es el medio CM920; la temperatura de crecimiento ideal es 26 °C y están clasificadas provisionalmente como grupo de riesgo 1 (CECT 3).

En la tabla 3 se hace un resumen de algunas características de las 3 levaduras utilizadas en el ensayo y en la tabla 4 se describen las materias primas de los diferentes medios de cultivo que se prepararon durante el ensayo, los cuales eran los más recomendados para el buen desarrollo y crecimiento de las levaduras.

**Tabla 3.** Características del código CECT, lugar de aislamiento, medio de cultivo ideal y nivel de riesgo de las 3 levaduras utilizadas en el ensayo.

ESPECIE	CÓDIGO CECT	AISLADO DE	MEDIO DE CULTIVO	NIVEL DE RIESGO (GRAS*)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1043	Crema de levadura	LM/GPYA	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	11379	Baño de salmuera en la fábrica de queso	GPYA	1
<i>Pichia fermentans</i>	1455	Suero de leche	LM	1

\*GRAS (Generally Recognised As Safe): Generalmente reconocidos como seguros.

**Tabla 4.** Materias primas y cantidades utilizadas para la preparación de los diferentes medios de cultivo.

INGREDIENTES	MEDIO DE CULTIVO		
	LM (CM920)	GPYA	PDA
	CANTIDAD		

<b>Glucosa</b>	10 g	40 g	
<b>Mycopeptone</b>	5 g	5 g	
<b>Extracto de levadura</b>	3 g	5 g	
<b>Extracto de malta</b>	3 g	3 g	
<b>Agar en polvo (sólo para medio sólido)</b>	20 g	20 g	15 g
<b>Agua destilada</b>	1 L	1 L	1 L
<b>Dextrosa (glucosa)</b>			20 g

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Principal

El objetivo principal es evaluar el efecto que tiene el aceite esencial de orégano procedente de cultivo ecológico (*Origanum compactum*) en la inhibición de *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043, *Debaryomyces hansenii* CECT 11379 y *Pichia fermentans* CECT 1455, las cuales son levaduras que se caracterizan por ser alterantes de productos lácteos.

Se pretende contribuir al desarrollo de estrategias de conservación de productos lácteos mediante ingredientes de origen ecológico para permitir en el futuro reducir o sustituir conservantes químicos.

### 2.2. Específicos

Caracterizar la composición del aceite esencial de *Origanum compactum*.

Evaluar el efecto del aceite de orégano sobre las levaduras por el método de difusión en disco en medio de cultivo, leche desnatada de 0,3% de materia grasa y leche entera de 3,6% de materia grasa (mecanismo de acción por difusión al medio). Al ensayar en leche de diferente contenido en grasa pretendemos evaluar el posible efecto de la presencia de grasa en el medio en la capacidad antimicrobiana del aceite.

Evaluar la concentración mínima inhibitoria de este aceite sobre las cepas en estudio mediante método de microdilución (mecanismo de acción por contacto directo).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El plan de trabajo consistió primero en determinar la composición química del aceite esencial de *O. compactum* proveniente de cultivo ecológico; después se realizó la recuperación de las levaduras que se adquirieron en la empresa CECT (*K. marxianus* CECT 1043, *D. hansenii* var. *fabryii* CECT 11379 y *P. fermentans* CECT 1455), las cuales estaban en estado liofilizado.

Se realizó la prueba de actividad antimicrobiana por difusión en disco, donde se prepararon 4 medios de cultivo diferentes: Agar de patata y dextrosa (PDA), leche desnatada (0,3% grasa) y leche entera (3,6% grasa). En cada medio se evaluaron las tres levaduras con 3 repeticiones en placas de Petri, en donde en cada uno de ellos se evaluó el efecto antimicrobiano del AE adicionando diferentes cantidades de aceite en discos estériles de 9mm de diámetro (0, 2,5, 5, 10, 20 y 40 µl). Posteriormente se realizó la medición del diámetro de los halos durante 3 días consecutivos.

Seguidamente, se realizó el primer ensayo de microdilución en caldo donde se evaluaron los medios Mueller Hinton, leche desnatada (0,3% grasa) y leche entera (3,6% grasa) en microplacas individuales, donde se sembró cada levadura con 2 repeticiones; se llevó a incubación a 26 °C y 2 horas después se agregó el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cual debido a los resultados tan confusos se procedió a realizar un segundo ensayo, donde se siguió la misma técnica pero esta vez con algunas modificaciones, ya que solo se sembraron las levaduras en el medio de cultivo Caldo extracto de malta al 2% de glucosa; pasadas 24 h de incubación a 30 °C, se realizó la siembra del contenido de los pocillos en placas de Petri con medio de cultivo PDA para verificar la MIC de cada una de las levaduras y se llevaron a incubación a 26 °C por 3 días, obteniendo al final de éstos el dato exacto del volumen en µl de AE de *O. compactum* necesario para la inhibición de cada levadura.

#### 3.1. Aceite esencial

El aceite esencial de *O. compactum* fue suministrado por la empresa Herbes del Molí S.L. (Benimarfull, Alicante), el cual es un aceite procedente de agricultura ecológica.

##### 3.1.1. Análisis del aceite esencial

##### 3.1.1.1. Cromatografía de gases (GC)

El aceite esencial se analizó por cromatografía de gases (CG) con detector de ionización a la llama (FID) un equipo Shimadzu GC-17A. Los compuestos se separaron con una columna TRACSIL Meta X5 (Teknokroma S.A., Barcelona, Spain), de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0,25 µm. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron a 250 y 300 °C, respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante 5 minutos; se elevó hasta 200 °C (ratio de 3.0 °C/minuto), y se mantuvo durante 1 minutos; se elevó a 280 °C (ratio de 15 °C/minuto) y se mantuvo durante 10 minutos. Se utilizó helio como gas transportador, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las muestras diluidas en ciclopentano (1/10 v/v) se inyectaron (0,2 µl) automáticamente en modo split (relación

de split 1/44). Los datos cuantitativos se obtuvieron vía electrónica con los datos del área FID sin utilizar factores de corrección. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.1.1.2. Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC-MS)

Los compuestos volátiles fueron aislados, identificados y cuantificados en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu (GC-MS QP-5050A). El sistema GC-MS estaba equipado con la misma columna y el mismo programa de temperatura utilizadas en el FID. Los análisis se llevaron a cabo utilizando helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1mL/minuto, a una reacción de división 1:10. Se inyectaron las muestras diluidas de 0.2L del extracto (1/10 ciclopentano v/v). Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica (IE) a 70eV, utilizando una gama espectral de 45-450 *m/z*. La mayoría de los compuestos fueron identificados utilizando 3 métodos analíticos diferentes: (i) índices de retención (KI), los índices de Kovats en referencia a los n-alcanos (C8-C38); (ii) los tiempos de retención de GC-MS (productos químicos auténticos); y (iii) los espectros de masas (químicos auténticos y NIST05, colección de la biblioteca espectral). La identificación se considera provisional cuando se basa solamente en los datos del espectro de masas.

## 3.2. Cepas de Levadura

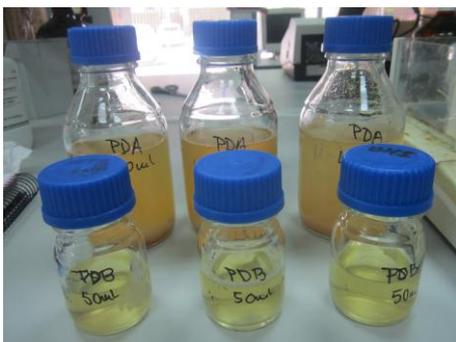
Las cepas de levadura utilizadas y probadas de forma individual para determinar la capacidad antimicrobiana que presenta el aceite de *O. compactum* fueron: *K. marxianus* CECT 1043, *D. hansenii* var. *fabryii* CECT 11379 y *P. fermentans* CECT 1455. Estas cepas proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia. Se seleccionaron estas levaduras debido a que son contaminantes muy comunes de los productos lácteos.

### 3.2.1. Recuperación de cepas en estudio

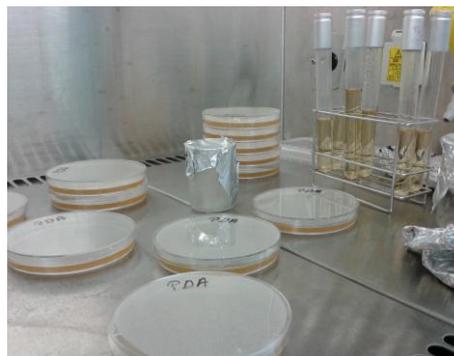
Las cepas se compraron en estado liofilizado. Para la recuperación de las cepas a estudiar se realizó el siguiente protocolo: se preparó el medio de cultivo caldo de dextrosa y patata (PDB) y se distribuyó en tubos de ensayo; así mismo, para la siembra de las levaduras en placas Petri se prepararon medios de cultivo sólidos como agar levadura y mohos (CM920) para las levaduras *K. marxianus* y *P. fermentans*, agar extracto de dextrosa-levadura-glucosa (GPYA) para *D. hansenii* y agar de dextrosa y patata (PDA) para las 3 levaduras; estos 3 medios de cultivo se sometieron a ebullición y posteriormente se llevaron junto con el medio PDB al autoclave a 121°C por 15 minutos. El objetivo de la preparación de los diferentes medios era determinar en cuál/es de estos medios se obtenía un crecimiento óptimo, en forma de tapizado, de cada una de las levaduras tras la siembra en superficie.

En las figuras 1 y 2 se muestran los medios de cultivo preparados y las placas Petri utilizadas durante el ensayo.

**Figura 1.** Medios de cultivo PDA y PDB



**Figura 2.** Tubos de ensayo y placas Petri con los medios de cultivo.



Teniendo los medios esterilizados se procedió a la recuperación de las levaduras liofilizadas donde con la ayuda de un mechero se calentó la punta de la ampolla que contiene las levaduras y con unas gotas de agua destilada se resquebrajó el vidrio dejando disponible los microorganismos para su posterior siembra; con la ayuda de una pipeta Pasteur se agregaron de 0,2 a 0,3 ml de PDB en la ampolla para rehidratar las levaduras y luego se pasó la suspensión a los tubos de ensayo que contenían el medio.

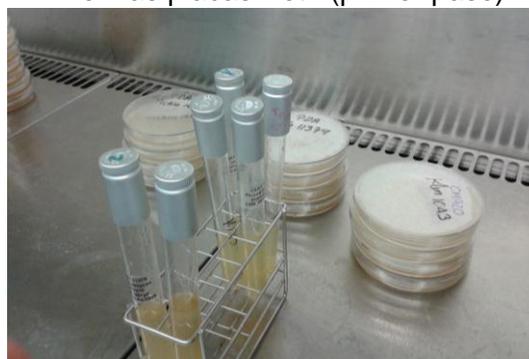
Por recomendación para la obtención de una buena concentración de microorganismos que puedan ser viables como cepas de trabajo, se subcultivaron las levaduras 3 veces, es decir se realizaron 3 pases de siembra de las levaduras en cajas Petri después de su recuperación (CECT, 2012); de la suspensión obtenida en los tubos se tomó 0,1 ml y se depositó en cada placa de Petri donde con la ayuda de un ansa de Digrafsky se esparció realizando de esta forma la siembra por tapizado (Figura 3), repitiéndose el procedimiento para cada levadura, donde posteriormente se llevaron a incubar a 26°C, completándose así el primer pase.

En la figura 4 se observan los tubos de ensayo con las levaduras recuperadas y las placas de Petri ya sembradas. Los tubos de ensayo que contenían las levaduras para su conservación se llevaron a refrigeración a 4°C.

**Figura 3.** Siembra en tapizado



**Figura 4.** Levaduras recuperadas y sembradas en las placas Petri (primer pase).



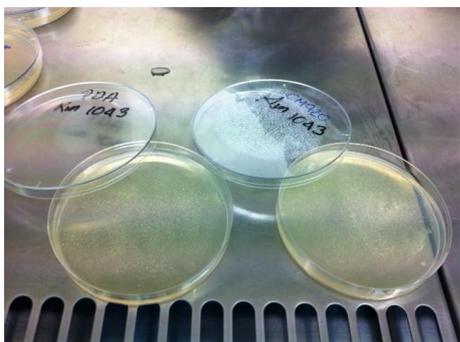
Para la siembra se utilizaron 2 medios de cultivo diferentes para cada levadura con el fin de poder observar en cuál de ellos se desarrollaban mejor, quedando distribuidas como se observa en la tabla 5.

**Tabla 5.** Medios de cultivo utilizados para cada levadura.

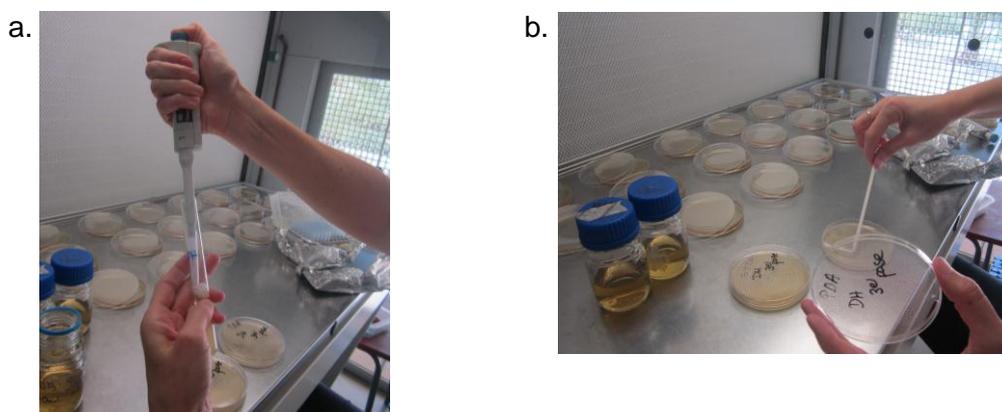
LEVADURA	PDA	CM920	GPYA
<i>Debaryomyces hansenii</i>	X		X
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	X	X	
<i>Pichia fermentans</i>	X	X	

Para el segundo y tercer pase (Figuras 5 y 6) el procedimiento que se siguió fue el siguiente: pasadas 24 horas de incubación de las levaduras en las placas Petri y previa preparación y esterilización en autoclave de tubos de ensayo con medio de cultivo PDB, se tomó una muestra de los microorganismos con la ayuda de un asa y se pasó a los tubos de ensayo. Seguidamente se tomó 0,1 ml de la suspensión y se depositó en placas de Petri nuevas, 0,1ml en cada una de ellas, donde con la ayuda de un asa de Digralsky se esparció realizando de esta forma la siembra por tapizado, repitiéndose el procedimiento para cada levadura, llevándolas posteriormente a incubar a 26°C.

**Figura 5.** Levaduras de *Kluyveromyces marxianus* segundo pase.



**Figura 6.** Siembra de *Debaryomyces hansenii* tercer pase.



a. Extracción de la levadura.; b. Siembra en tapizado.

Ya con los subcultivos de las levaduras obtenidos en el tercer pase, se realizan los ensayos de difusión en disco y de concentración mínima inhibitoria, garantizando de este modo que están en la fase de crecimiento apropiada para estas determinaciones.

### **3.3. Ensayos de actividad antimicrobiana mediante pruebas de difusión en disco**

Se utilizó el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos (Ramírez y Marín, 2009, p. 264). Este método se utilizó para determinar el potencial antibacteriano del aceite esencial de *O. compactum* sobre las 3 levaduras. A placas Petri con diferentes medios de cultivo sólido se les agregó una suspensión de 0,1 mL de  $10^6$  ufc/mL de cada microorganismo, las cuales se sembraron en superficie. Para los tres microorganismos (*K. marxianus*, *D. hansenii* y *P. fermentans*) se utilizaron para el ensayo tanto el medio PDA (Potato Dextrose Agar) como el medio agar y leche con 0% de grasa (mezcla de Agar Agar Polvo como agente gelatinizante + leche 0,3% de materia grasa como fuente de nutrientes) y el medio agar y leche con 3,6% de materia grasa, ambos con el mismo porcentaje de agar que PDA. Para la determinación se utilizaron discos estériles de 9mm de diámetro, los cuales se colocaron uno sobre cada placa, en donde se adicionó diferentes cantidades de aceite esencial de orégano. Posteriormente las placas se incubaron a 26 °C durante 72 horas. Finalmente se realizaron durante 3 días las mediciones en mm de los diámetros de los halos que se formaron a causa de la inhibición.

El efecto de la concentración (CE) se realizó para poder determinar qué volumen de AE tenía un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las levaduras en el ensayo de difusión en disco. Con esta técnica de cultivo se utilizaron cantidades de AE de 40, 20, 10, 5 y 2,5  $\mu$ L en cada uno de los medios y en los cuales se realizaron pruebas por triplicado.

### **3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)**

#### **3.4.1. Método de dilución en caldo**

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) (CLSI, 1999), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas.

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (Wilkinson, 2006). Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC en un gran número de muestras.

### 3.4.2. Determinación de la MIC

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La MIC se ha establecido como "gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (NCCLS, 1997). Se puede realizar en microdilución para lo cual se escogen las placas que tienen 96 pocillos (12 mm x 8 mm), en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. Las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica (Gil *et al*, 1999, p. 89).

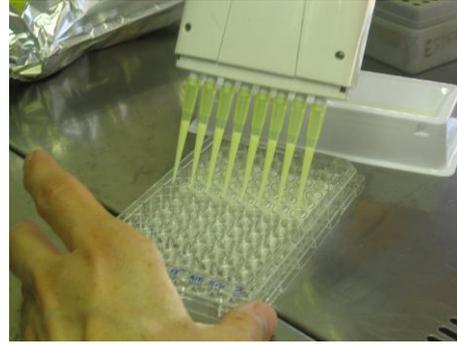
El MTT es usado en estudios de proliferación celular ya que es posible cuantificar la actividad de la deshidrogenasa presente en las células vivas, esta enzima reduce el Tetrazolio (MTT) a formazán, el cual es insoluble en agua y posee una coloración púrpura, permitiendo correlacionar la viabilidad en los cultivos (Martínez *et al*, 2013, p. 71).

- Se realizó un primer ensayo con esta técnica para evaluar el comportamiento de las levaduras frente al aceite esencial de orégano (en adelante AE) en medios de cultivo caldo Mueller-Hinton (MH), leche desnatada (0,3% grasa) y leche entera (3,6% grasa), 1 microplaca para cada medio, en donde el procedimiento que se siguió fue que en la primera columna de las 12 se adicionó 200 µl de AE disuelto en Dimetil sulfóxido (DMSO) (concentración de 40 µl/mL) en cada pocillo (figura 7), y en las 11 restantes se adicionó 100 µl de medio MH en cada pocillo (figura 8). Seguidamente se tomaron 100 µl de la solución de AE antes preparada y se mezclaron con los 100 µl de medio MH de la columna contigua al AE, de esta mezcla se toman 100 µl y se mezclan con la columna siguiente, repitiéndose el proceso hasta la columna 12, quedando disoluciones cada vez más pequeñas del AE. Posteriormente se adicionó nuevamente 95 µl de medio MH en cada pocillo, quedando un total de 195 µl en cada pocillo. Por último, de los 8 pocillos que hay en el ancho de la microplaca, se dejaron los extremos como testigos y los 6 restantes se utilizaron 2 para cada levadura, en donde a cada pocillo se le adicionó 0,5 µl del inóculo (figura 9) completándose un volumen total por pocillo de 200 µl; a continuación se llevan las microplacas a un agitador a 150 rpm por 2 minutos y después se llevan a incubar a 26°C durante 24 horas. Como se mencionó anteriormente, este procedimiento se realizó de la misma forma para las microplacas con leche 0,3% y 3,6% de grasa como medio de cultivo. las 3 microplacas sembradas se pueden observar en la figura 10.

**Figura 7.** Adición de AE



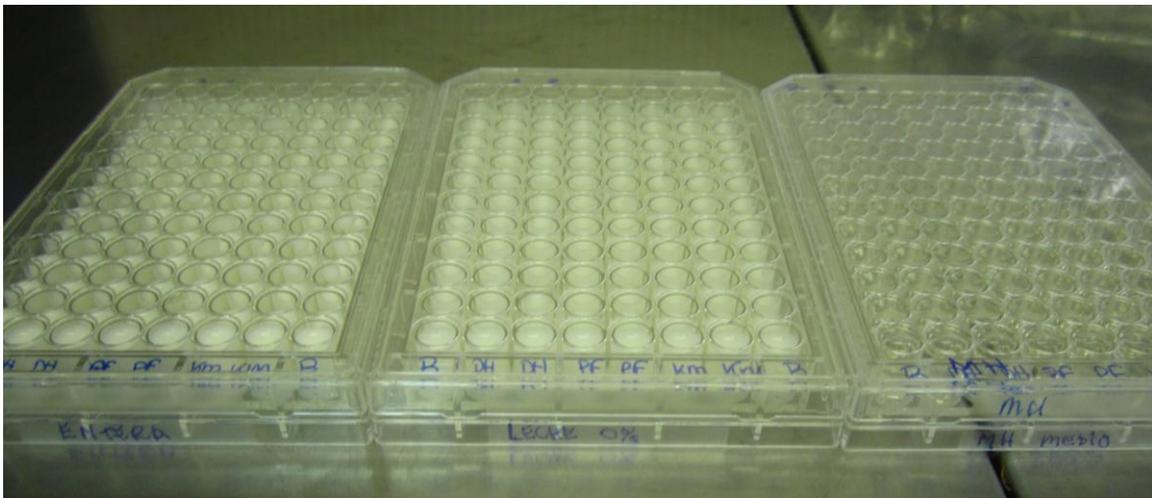
**Figura 8.** Adición de leche entera como medio



**Figura 9.** Siembra de las levaduras



**Figura 10.** Microplacas recién sembradas con las levaduras en cada uno de los medios de cultivo.



a.

b.

c.

a. Microplaca con medio de cultivo leche Entera (3,6% de grasa).

b. Microplaca con medio de cultivo leche desnatada (0,3% de grasa).

c. Microplaca con medio de cultivo caldo Mueller-Hinton.

Después de la incubación, se añadió a cada uno de los pocillos 25 ml de 3 - (4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) (Sigma Vida Ciencia), disuelto en dimetil sulfóxido (0,8 mg / ml) y se incubó durante 1 h con el fin de permitir que los microorganismos viables metabolizaran el colorante MTT de color amarillo a formazán, el cual se presenta como la formación de cristales color violeta. El MIC se considera a partir de la primera columna que no presente cambio de color (Ruiz *et al.* 2012). Para corroborar los resultados obtenidos se extrajeron 10  $\mu$ l de muestra de los pocillos que no tenían coloración y se sembraron en placas Petri.

- El segundo ensayo se realizó con algunas modificaciones como fueron la siembra de solo 1 microplaca en medio de cultivo caldo extracto de malta al 2% de glucosa, el cual no se esterilizó sino que se filtró de manera manual; se sembró en este caso 10  $\mu$ l de cada microorganismo, los cuales se mezclaron cada uno aparte con el medio antes de adicionarlos en cada pocillo. El procedimiento de siembra y diluciones del AE con el medio fue el mismo que se realizó en el primer ensayo. Por último se llevó a incubación por 48 h; después de la incubación no se adicionó ningún colorante (MTT) para observar los resultados sino que se realizó la siembra de cada uno de los pocillos de la microplaca en una sección de una placa Petri. Con la ayuda de un rotulador se realizaron marcas en la base de cada placa Petri para delimitar 6 secciones. De este modo para sembrar los 12 pocillos con las diluciones de cada microplaca se utilizaron 2 placas Petri por repetición. Este ensayo se realizó por duplicado para cada levadura.

### 3.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico IBM SPSS versión 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) con el cual se realizaron los test convencionales para determinar las medias y las desviaciones estándar; y para determinar las diferencias entre muestras se realizó el test de Tukey, utilizando un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . Así mismo, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) univariante para cada una de las levaduras.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Composición del aceite

En la tabla 6 se resume la composición del aceite esencial de *O. compactum* proveniente de la empresa Herbes del molí S.L. después de haber sido analizado por GC-MS y comparado los espectros obtenidos con la librería de identificación del software. En la tabla se muestra el tiempo de retención de cada uno de los componentes así como el porcentaje relativo del área de cada compuesto respecto al área total del cromatograma determinado por la inyección en el GC/FID.

**Tabla 6.** Composición del aceite esencial de *Origanum compactum* determinado por cromatografía gaseosa.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	% Área del perfil total
<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	9,091	0,51
<b>Trans-beta-ocimeno</b>	9,401	0,69
<b>Canfeno</b>	9,963	0,09
<b>3-octanona</b>	10,667	0,10
<b>Mirceno</b>	10,796	1,63
<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	11,629	0,23
<b>Trans-beta-ocimeno</b>	11,733	0,07
<b><math>\alpha</math>-terpineno</b>	11,986	2,10
<b>Para-cimeno</b>	<b>12,287</b>	<b>9,69</b>
<b>Limoneno</b>	12,444	0,33
<b>Sabineno</b>	12,579	0,20
<b>1,8-cineol</b>	12,665	0,08
<b>trans-beta-cimeno</b>	12,826	0,07
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	<b>13,530</b>	<b>16,31</b>
<b>Terpinoleno</b>	14,630	0,13
<b>Para-cymenil</b>	14,833	0,11
<b><math>\alpha</math>-terpinoleno</b>	15,018	1,34

<b>3,5-heptadien-2-uno</b>	15,884	0,05
<b>Acetato de cis-carvyl</b>	16,951	0,04
<b>4-terpineol</b>	18,944	0,39
<b>thimyl metil éter</b>	21,338	0,09
<b>Timol</b>	<b>23,750</b>	<b>16,76</b>
<b>Carvacrol</b>	<b>24,330</b>	<b>46,78</b>
<b>Trans-cariofileno</b>	30,259	1,93
<b><math>\alpha</math>-humuleno</b>	31,890	0,09
<b><math>\beta</math>-bisaboleno</b>	33,852	0,05
<b><math>\delta</math>-cadineno</b>	34,461	0,06
<b>Óxido de cariofileno</b>	37,600	0,08

Como se puede observar en la tabla anterior, en el análisis realizado al AE de *O. compactum* por cromatografía gaseosa se identificaron 28 compuestos diferentes los cuales representan el 100% del perfil total del AE. Los resultados nos reflejan que los componentes que se encuentran en mayor proporción o mayoritarios son el Carvacrol con 46,78% del área total del perfil, el Timol con 16,76%,  $\gamma$ -terpineno con 16,31% y el Para-cimeno con 9,69%. Estos valores coinciden con los conseguidos por Bouchraa, Achourib, Idrissi y Hmamouchi (2003, p. 166) al analizar químicamente por GC-MS el AE de *O. compactum* donde encontraron que los compuestos predominantes de éste eran el carvacrol (58,1%), p-cimeno (11,4%), timol (9,0%) y  $\gamma$ -terpineno (7,1%). Así mismo, estos resultados están en concordancia con Ribeiro (2011, p. 26) quien cita a Bouhdid, *et al.* (2008) los cuales evaluaron el AE de *O. compactum* como antimicrobiano y donde en su composición química encontraron que los valores de sus principales componentes eran carvacrol (30,53 %), timol (27,50 %) y  $\gamma$ -terpineno (18,20 %). De igual manera estos datos corresponden con Mezzoug *et al.* (2007, p. 102) quienes encontraron que el aceite esencial de *O. compactum* era particularmente rico en carvacrol (22%),  $\gamma$ -terpineno (22%), timol (19%) y p-cimeno (13%).

Las anteriores citas de diferentes trabajos científicos nos muestran que el resultado obtenido en cuanto a la composición química del AE de *O. compactum* fueron muy similares; las diferencias se podrían dar debido a que como menciona Viuda Martos *et al.* (2008) donde dice que esta variabilidad depende de varios factores, incluyendo las condiciones climáticas locales y ambientales (temperatura, duración del día, el sol, la lluvia, etc.), la temporada, la ubicación geográfica, la geología, los nutrientes, parte de la planta y el método utilizado para obtener el AE.

Por lo que podemos ver en los resultados anteriores, el AE de *O. compactum* y en general de la mayoría de especies de orégano, 2 de los componentes mayoritarios son

el carvacrol y el timol los cuales según son García y Palou (2008) son compuestos fenólicos que están presentes de manera natural en especies como el orégano y el tomillo; éstos presentan actividad antimicrobiana en ciertos microorganismos de interés en alimentos. Básicamente, su mecanismo de acción consiste en cambiar la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando la salida del material intracelular y por consiguiente provocando la muerte de los microorganismos.

#### 4.2. Actividad antimicrobiana determinada por prueba de difusión en disco

En las tablas 7, 8, y 9, se describen los datos de la media y desviación estándar de los diámetros de los halos de inhibición medidos durante 3 días consecutivos, obtenidos para *K. marxianus* ante las diferentes cantidades de aceite esencial y medios de cultivo.

**Tabla 7.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043. Halos medidos durante 3 días de incubación, en medio de cultivo PDA, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	36,33	5,26	32,55	3,77	21,66	2,91
5	42,22	1,39	39,66	1,32	35,33	1,80
10	40,44	3,64	42,33	4,09	38,00	4,24
20	47,55	2,45	48,22	2,43	41,44	3,04
40	45,44	4,33	47,11	5,71	43,33	5,67

**N=9**

$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

La tabla anterior nos muestra las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio PDA, en donde al realizar el análisis estadístico con el test de Tukey nos arrojó que las cantidades de AE de 10, 20 y 40 µl del día 1 al día 2 el diámetro del halo tendió a aumentar y en el tercero disminuyó; y en las cantidades de 2,5 y 5 µl de AE la tendencia fue a disminuir tanto del día 1 al día 2 como del 2 al 3. Dado que el tiempo recomendado de incubación de levaduras es de 3 días consideramos que es la medida que nos proporciona una mejor estimación de la capacidad conservante.

En la figura 11 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

Día 1



10 µl



20 µl

Día 2



2,5 µl



10 µl



40 µl

Día 3



2,5 µl



10 µl



40 µl

**Figura 11.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *K. marxianus* en medio PDA.

**Tabla 8.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE DESNATADA (0,3% materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	21,44	2,18	22,00	1,11	21,44	1,87
5	21,44	2,06	26,00	2,17	26,11	1,69
10	25,00	1,87	28,55	1,13	28,77	0,83

<b>20</b>	21,00	3,08	31,88	1,45	31,66	1,41
<b>40</b>	21,55	2,40	33,66	0,86	33,22	0,66

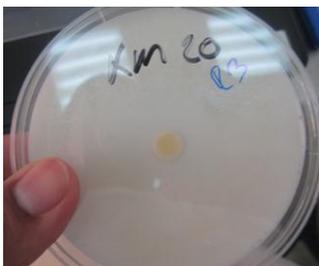
**N=9**

$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

En la tabla anterior se pueden ver las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio leche desnatada; después de realizar el test de Tukey se pudo observar que los diámetros de los halos de las diferentes cantidades de AE adicionadas a excepción del control, tendieron a aumentar su tamaño del día 1 al día 2, siendo las cantidades de 20 y 40  $\mu\text{l}$  las que tuvieron un mayor crecimiento; así mismo, del día 2 al día 3 solo las cantidades de 5 y 10  $\mu\text{l}$  siguieron teniendo un crecimiento muy leve, contrario a las otras que tendieron a disminuir su tamaño.

En la figura 12 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

**Día 1**

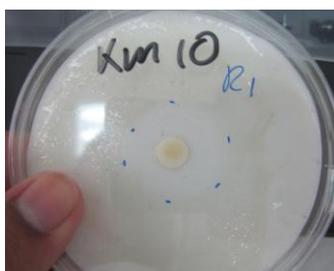


**20  $\mu\text{l}$**

**Día 2**



**2,5  $\mu\text{l}$**



**10  $\mu\text{l}$**



**40  $\mu\text{l}$**

**Día 3**



**2,5  $\mu\text{l}$**



**10  $\mu\text{l}$**



**40  $\mu\text{l}$**

**Figura 12.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *K. marxianus* en medio leche desnatada.

**Tabla 9.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Kluyveromyces marxianus* CECT 1043. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE ENTERA (3,6 % materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	16,22	0,66	16,66	0,70	16,55	0,52
5	17,66	0,86	17,55	0,88	17,44	0,72
10	20,55	1,42	20,33	1,11	20,11	1,05
20	20,22	0,66	20,00	0,50	20,00	0,50
40	20,55	1,50	21,11	1,05	21,00	0,86

**N=9**

$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

La tabla anterior resume las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio leche entera; al realizar el análisis estadístico se pudo observar que solo las cantidades de 2,5 y 40 µl de AE tuvieron un leve crecimiento del diámetro del halo entre los días 1 y 2, y en las dosis de 5, 10 y 20 µl de AE no se presentó crecimiento; de igual manera, del día 2 al día 3 ninguna de las cantidades de AE evaluadas mostraron crecimiento de sus halos, tornándose este constante.

En la figura 13 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

**Día 1**



2,5 µl

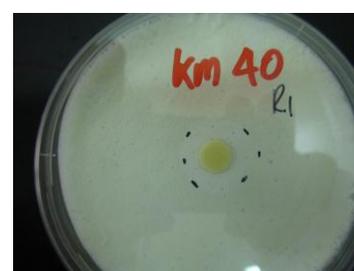
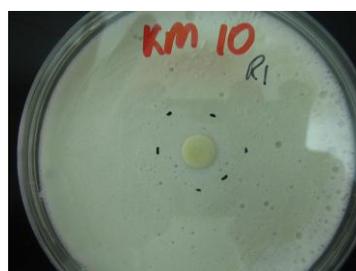


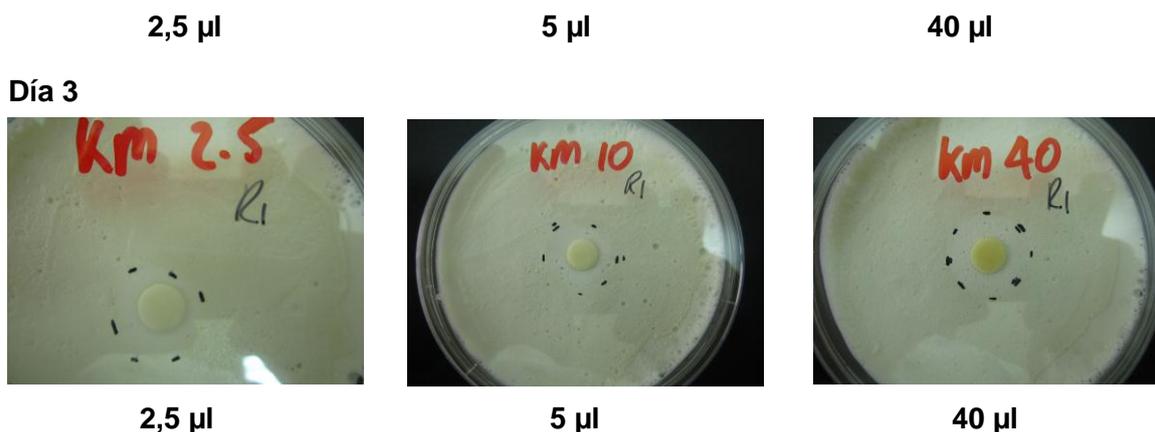
5 µl



40 µl

**Día 2**





**Figura 13.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *K. marxianus* en medio leche entera.

De forma global para los 3 diferentes medios de cultivo evaluados, después de realizar el análisis estadístico de Tukey para el tiempo o los días en que se hicieron las mediciones en los 3 medios, se pudo ver que si hubo diferencias significativas entre el día 2 y los días 1 y 3, los cuales estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí, en donde sus diámetros fueron de 23,2 y 23,1 mm respectivamente en comparación al día 2 que fue de 24,8 mm.

En cuanto al medio de cultivo si se presentaron diferencias significativas entre los 3, obteniéndose mayor diámetro de halo en el medio PDA con 33,4 mm, seguido del medio leche semidesnatada con 21,8 mm y por último el de leche entera con un diámetro de 15,8 mm. Estos resultados nos podrían señalar que la grasa de la leche puede causar cierta protección a los microorganismos haciendo que no les afecte mucho la acción antimicrobiana del AE de *O. compactum*.

Así mismo, para las diferentes cantidades de AE evaluadas también se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a excepción de los volúmenes de 20 y 40 µl que obtuvieron diámetros de 31,3 y 31,8 mm respectivamente, lo que estadísticamente nos dice que no se presentó diferencias significativas entre ellos; de igual manera estos dos volúmenes evaluados mostraron los mayores diámetros de halos seguidos de las cantidades de 10 µl con 29,3 mm, 5 µl con 27,0 mm y 2,5 µl con 22,7 mm; en cuanto al tratamiento control, no presentó ninguna formación de halo.

Los anteriores datos de las mediciones del diámetro del halo según el medio de cultivo, el día de medición y la cantidad de AE adicionado se resumen en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resumen del análisis estadístico para *Kluyveromyces marxianus* de las pruebas post hoc de Tukey del diámetro del halo según el medio de cultivo, tiempo en días de la medición y la cantidad de aceite esencial de *Origanum compactum*.

Medio			Tiempo (Días)			Cantidad de AE (µl)					
PDA	LD	LE	1	2	3	0	2,5	5	10	20	40

<b>Diámetro halo</b>	33,4 a	21,8 b	15,8 c	23,2 a	24,8 b	23,1 a	0,0 a	22,7 b	27,0 c	29,3 d	31,3 e	31,8 e
----------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

En las tablas 11, 12, y 13 se describen los datos de la media y desviación estándar de los diámetros de los halos de inhibición medidos durante 3 días consecutivos, obtenidos para *D. hansenii* ante las diferentes cantidades de aceite esencial y medios de cultivo.

**Tabla 11.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Debaryomyces hansenii* CECT 11379. Halos medidos durante 3 días de incubación, en medio de cultivo PDA, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Ø 1		Ø 2		Ø 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	38,55	3,35	33,11	2,42	20,88	3,78
5	44,77	1,78	44,55	2,29	39,33	1,87
10	49,66	4,30	49,77	4,35	44,33	4,50
20	49,77	2,68	50,33	3,12	46,44	3,50
40	48,66	3,46	49,00	2,34	44,55	1,87

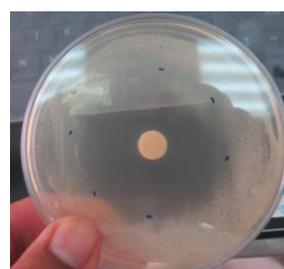
**N=9**

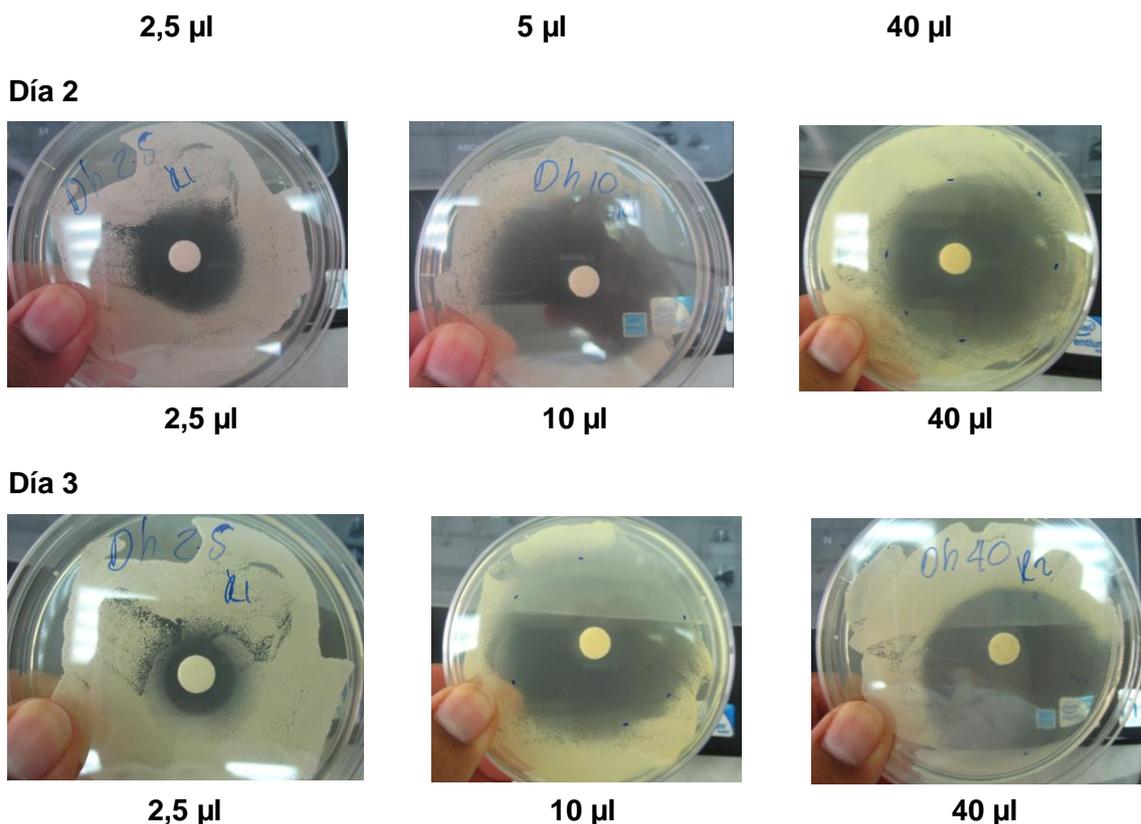
$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

La tabla anterior nos muestra las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio PDA, en donde al realizar el análisis estadístico con el test de Tukey nos arrojó que las cantidades de AE de 5, 10, 20 y 40 µl del día 1 al día 2 el diámetro del halo tuvo un muy leve crecimiento a excepción del de 2,5 µl que disminuyó; del día 2 al 3 la tendencia de todos los volúmenes evaluados fue a disminuir, notándose una reducción más fuerte en el de 2,5 µl de AE en comparación a las demás que tuvieron un descenso más leve.

En la figura 14 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

#### Día 1





**Figura 14.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *D. hansenii* en medio PDA.

**Tabla 12.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Debaryomyces hansenii* CECT 11379. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE DESNATADA (0,3% materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	̄x	ds	̄x	ds	̄x	ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	17,33	1,22	20,00	1,32	18,00	1,87
5	15,33	1,22	24,88	2,20	23,88	2,71
10	16,33	1,00	29,44	1,01	28,77	0,66
20	17,33	1,87	28,88	2,47	28,00	2,00
40	15,77	0,97	33,11	1,90	32,22	1,71

**N=9**

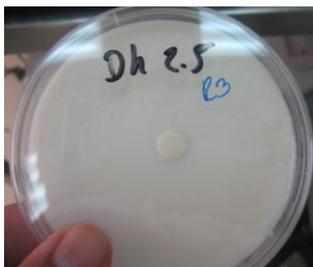
̄x: promedio, ds: desviación estándar

En la tabla anterior se pueden ver las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a

las placas Petri en medio leche desnatada; después de realizar el test de Tukey se pudo observar que los diámetros de los halos de las 5 cantidades de AE adicionadas a excepción del control, tendieron a aumentar el diámetro del halo del día 1 al día 2, notándose un crecimiento muy pronunciado en las cantidades de 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{l}$  de AE y un poco menos en el de 2,5  $\mu\text{l}$ ; del día 2 al día 3 todas las cantidades de AE evaluadas tendieron a disminuir su tamaño de forma leve.

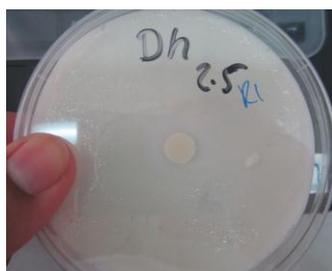
En la figura 15 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

#### Día 1



2,5  $\mu\text{l}$

#### Día 2



2,5  $\mu\text{l}$



10  $\mu\text{l}$



40  $\mu\text{l}$

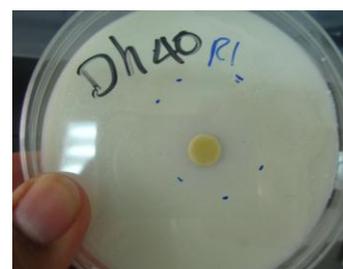
#### Día 3



2,5  $\mu\text{l}$



10  $\mu\text{l}$



40  $\mu\text{l}$

**Figura 15.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *D. hansenii* en medio Leche desnatada.

**Tabla 13.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Debaryomyces hansenii* CECT 11379. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE

ENTERA (3,6 % materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE ( $\mu$ l)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	16,11	0,60	15,66	0,50	15,33	0,50
5	18,88	1,05	18,00	1,11	17,22	0,97
10	22,55	1,13	20,11	0,60	19,22	0,66
20	22,33	1,11	21,11	0,78	20,33	0,50
40	26,22	1,20	21,88	0,60	21,33	0,70

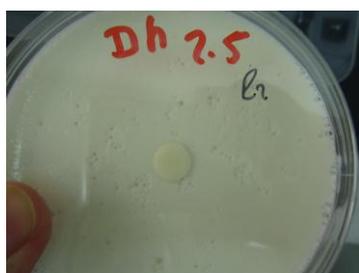
**N=9**

$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

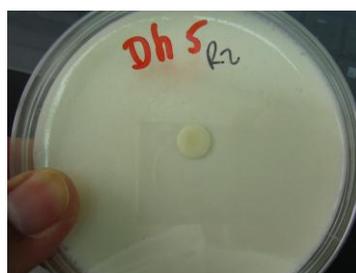
La tabla anterior resume las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio leche entera; al realizar el análisis estadístico se pudo observar que todas las cantidades de AE evaluadas tendieron a disminuir el diámetro del halo del día 1 al día 2, notándose más acentuado este descenso en las de 10 y 40  $\mu$ l; de igual manera, del día 2 al día 3 la tendencia fue a reducir de tamaño en todas los tratamientos pero de una manera muy atenuada.

En la figura 16 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

#### Día 1



2,5  $\mu$ l

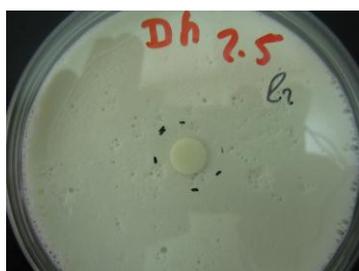


5  $\mu$ l



20  $\mu$ l

#### Día 2



2,5  $\mu$ l

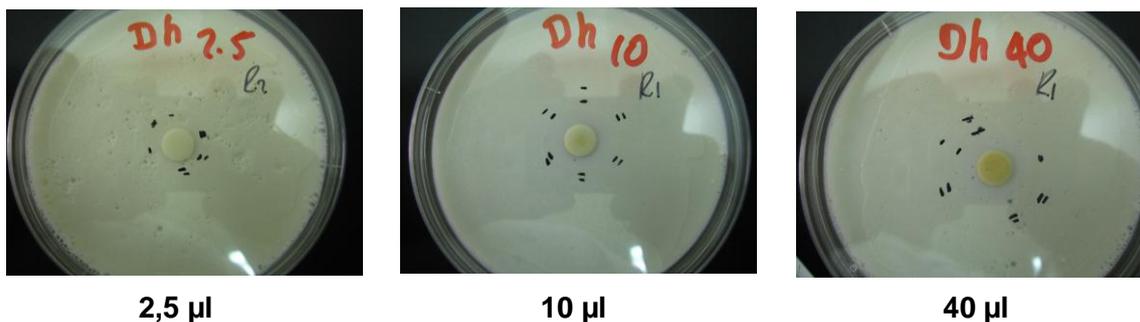


10  $\mu$ l



40  $\mu$ l

Día 3



**Figura 16.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *D. hansenii* en medio Leche entera.

De forma general para los 3 diferentes medios de cultivo evaluados, después de realizar el análisis estadístico de Tukey para el tiempo o los días en que se hicieron las mediciones en los 3 medios, se pudo ver que si hubo diferencias significativas entre el día 2 y los días 1 y 3, los cuales estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí, donde sus diámetros fueron de 23,31 y 23,32 mm respectivamente en comparación al día 2 que fue de 25,54 mm.

En cuanto al medio de cultivo si se presentaron diferencias significativas entre los 3, obteniéndose mayor diámetro de halo en el medio PDA con 36,3 mm, seguido del medio leche semidesnatada con 19,4 mm y por último el de leche entera con un diámetro de 16,4 mm. Estos resultados nos siguen señalando que la grasa de la leche puede causar cierta protección a los microorganismos reduciendo la acción antimicrobiana del AE de *O. compactum*.

Igualmente, para las diferentes cantidades de AE evaluadas también se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a excepción de los volúmenes de 10 y 20 µl que obtuvieron diámetros de 31,13 y 31,61 mm respectivamente, que no presentaron diferencias significativas entre ellos; el análisis estadístico también nos refleja que el mayor diámetro de halo se obtuvo con la adición de 40 µl de AE donde alcanzó un diámetro de 32,5 mm seguido de las cantidades de 10 µl y 20 µl mencionados sus diámetros anteriormente, 5 µl con 27,4 mm y 2,5 µl con 21,6 mm; en cuanto al tratamiento control, no presentó ninguna formación de halo.

Los anteriores datos de las mediciones del diámetro del halo según el medio de cultivo, el día de medición y la cantidad de AE adicionado se resumen en la tabla 14.

**Tabla 14.** Resumen del análisis estadístico para *Debaryomyces hansenii* de las pruebas post hoc de Tukey del diámetro del halo según el medio de cultivo, tiempo en días de la medición y la cantidad de aceite esencial de *Origanum compactum*.

	Medio			Tiempo (Días)			Cantidad de AE (µl)					
	PDA	LD	LE	1	2	3	0	2,5	5	10	20	40
<b>Diámetro halo</b>	36,3 a	19,4 b	16,4 c	23,3 a	25,5 b	23,3 a	0,0 a	21,6 b	27,4 c	31,1 d	31,6 d	32,5 e

En las tablas 15, 16, y 17 se describen los datos de la media y desviación estándar de los diámetros de los halos de inhibición medidos durante 3 días consecutivos, obtenidos para *P. fermentans* ante las diferentes cantidades de aceite esencial y medios de cultivo.

**Tabla 15.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Pichia fermentans* CECT 1455. Halos medidos durante 3 días de incubación, en medio de cultivo PDA, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	Ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	30,77	2,68	28,22	2,48	24,33	1,22
5	35,44	2,83	31,00	1,93	30,00	3,04
10	35,66	2,23	36,11	1,53	35,11	1,76
20	38,77	2,72	37,77	1,85	36,44	2,45
40	47,11	6,37	44,88	4,70	43,55	4,74

**N=9**

$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

La tabla anterior nos muestra las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio PDA; al realizar el análisis estadístico con el test de Tukey nos arrojó que en las cantidades de AE de 2.5, 5, 20 y 40 µl del día 1 al día 2 el diámetro del halo disminuyó y solo el de 10 µl de AE tuvo crecimiento; del día 2 al 3 el diámetro de los 5 volúmenes evaluados siguió disminuyendo, notándose una reducción un poco mayor en el de 2,5 µl de AE en comparación a los demás que tuvieron un descenso más leve.

En la figura 17 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

**Día 1**



2,5 µl



10 µl



40 µl

**Día 2**



2,5 µl



10 µl



40 µl

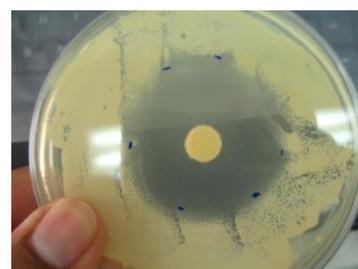
**Día 3**



2,5 µl



10 µl



40 µl

**Figura 17.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *P. fermentans* en medio PDA.

**Tabla 16.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Pichia fermentans* CECT 1455. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE DESNATADA (0,3% materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE (µl)	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	Ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	13,88	0,60	15,55	0,52	14,55	0,88
5	14,55	0,52	15,22	0,66	14,55	0,52
10	15,44	0,52	15,44	0,52	15,22	0,44
20	16,22	0,66	16,00	0,50	16,11	0,60
40	16,44	0,88	16,33	0,70	16,33	0,70

**N=9**

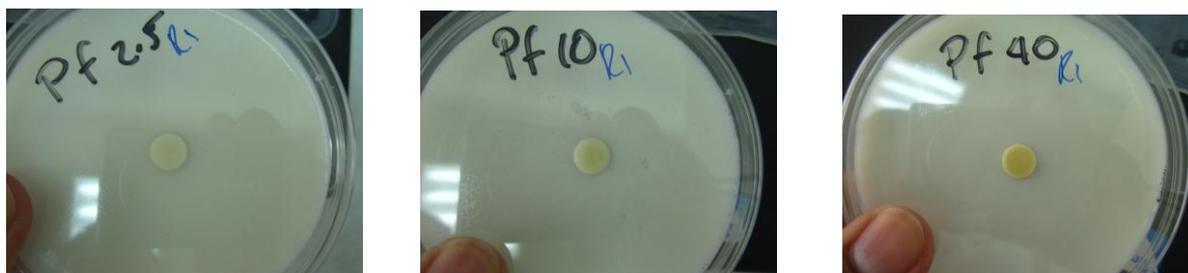
$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

En la tabla anterior se pueden ver las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio leche desnatada; después de realizar el test de Tukey se pudo observar que del día 1 al día 2 así como del día 2 al 3 los diámetros de los halos

donde se adicionó 10, 20 y 40  $\mu\text{l}$  de AE no tuvieron prácticamente ningún cambio en su tamaño, pero en los volúmenes de 2,5 y 5  $\mu\text{l}$  si hubo crecimiento entre el día 1 al 2, reflejándose un aumento más notable en el de 2,5  $\mu\text{l}$  que en el de 5  $\mu\text{l}$  de AE; de igual manera estos dos últimos del día 2 al día 3 reflejaron una disminución de sus diámetros de halo, siendo el de 2,5  $\mu\text{l}$  de AE el que tuvo un descenso más apreciable.

En la figura 18 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

#### Día 2



2,5  $\mu\text{l}$

10  $\mu\text{l}$

40  $\mu\text{l}$

#### Día 3



2,5  $\mu\text{l}$

10  $\mu\text{l}$

40  $\mu\text{l}$

**Figura 18.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *P. fermentans* en medio Leche desnatada.

**Tabla 17.** Datos de media y desviación estándar de los diámetros (mm) de los halos de inhibición del aceite esencial de *Origanum compactum* sobre *Pichia fermentans* CECT 1455. Halos medidos durante 3 días de incubación, en LECHE ENTERA (3,6 % materia grasa) como medio de cultivo, para cada cantidad de aceite esencial adicionado. El halo incluye los 9 mm del disco.

CANTIDAD de AE ( $\mu\text{l}$ )	Diámetro en mm					
	Día 1		Día 2		Día 3	
	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	ds	$\bar{x}$	Ds
0	0	0	0	0	0	0
2,5	15,11	0,33	15,11	0,33	13,77	1,20
5	14,44	0,52	14,44	0,52	14,44	0,52
10	15,22	0,44	15,22	0,44	15,22	0,44
20	17,33	0,70	17,55	0,72	17,55	0,72

40	17,88	0,60	18,11	0,78	18,00	0,86
<b>N=9</b>						

$\bar{x}$ : promedio, ds: desviación estándar

La tabla anterior resume las medidas promedio de los diámetros de los halos obtenidos en los 3 días de seguimiento según la cantidad de AE que se adicionaba a las placas Petri en medio leche entera; al realizar el análisis estadístico se pudo observar que las cantidades de 2,5, 5 y 10  $\mu\text{l}$  de AE, del día 1 al día 2 el diámetro del halo se mantuvo estable, pero el de los volúmenes de 20 y 40  $\mu\text{l}$  si presentaron un leve crecimiento; del día 2 al día 3 la tendencia del tamaño del halo de los volúmenes 5, 10 y 20  $\mu\text{l}$  fue a mantenerse sin ningún cambio, contrario a los de 2,5 y 40  $\mu\text{l}$  de AE que presentaron reducción de sus diámetros, siendo el de 2,5  $\mu\text{l}$  el que mostró un descenso más marcado que el de 40  $\mu\text{l}$  que fue muchísimo más leve.

En la figura 19 se muestran algunas imágenes de los halos formados durante los 3 días de seguimiento.

#### Día 1



2,5  $\mu\text{l}$



10  $\mu\text{l}$



40  $\mu\text{l}$

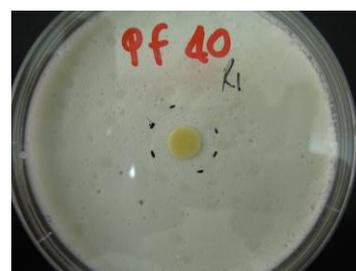
#### Día 2



2,5  $\mu\text{l}$

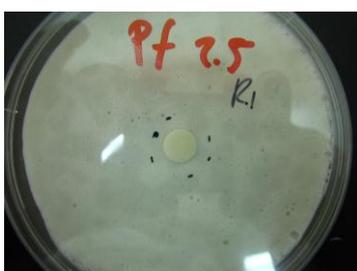


10  $\mu\text{l}$



40  $\mu\text{l}$

#### Día 3



2,5  $\mu\text{l}$



10  $\mu\text{l}$



40  $\mu\text{l}$

**Figura 19.** Imágenes de halos de inhibición del aceite esencial de *O. compactum* contra *P. fermentans* en medio Leche entera.

De forma general para los 3 diferentes medios de cultivo evaluados, después de realizar el análisis estadístico de Tukey para el tiempo o los días en que se hicieron las mediciones en los 3 medios, se pudo ver que si hubo diferencias significativas entre el día 3 y los días 1 y 2, los cuales estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí, donde sus diámetros fueron de 19,1 y 18,7 mm respectivamente en comparación al día 3 que fue de 18,0 mm; notándose que a medida que pasaron los días el diámetro del halo fue disminuyendo.

En cuanto al medio de cultivo se presentó una diferencia significativa muy notable entre los medios leche desnatada (LD) y leche entera (LE) frente a PDA, donde en este último se obtuvo un diámetro de halo de 29,7 mm, mucho mayor que los otros 2 medios, los cuales alcanzaron diámetros de 13,3 mm el de LE y 12,8 mm el de LD. Estos resultados nos terminan de señalar que la grasa de la leche puede causar cierta protección a los microorganismos haciendo que no les afecte mucho la acción antimicrobiana del AE de *O. compactum*.

Para las diferentes cantidades de AE evaluadas se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos, en donde el mayor diámetro de halo se obtuvo con el volumen de 40 µl de AE donde alcanzó un diámetro de 26,5 mm seguido de las cantidades de 20 µl con 23,7 mm, 10 µl con 22,0 mm, 5 µl con 20,4 mm y 2,5 µl con 19,0 mm; en cuanto al tratamiento control, no presentó ninguna formación de halo.

Los anteriores datos de las mediciones del diámetro del halo según el medio de cultivo, el día de medición y la cantidad de AE adicionado se resumen en la tabla 18.

**Tabla 18.** Resumen del análisis estadístico para *Pichia fermentans* de las pruebas post hoc de Tukey del diámetro del halo según el medio de cultivo, tiempo en días de la medición y la cantidad de aceite esencial de *Origanum compactum*.

	Medio			Tiempo (Días)			Cantidad de AE (µl)					
	PDA	LD	LE	1	2	3	0	2,5	5	10	20	40
<b>Diámetro halo</b>	29,7 a	12,8 b	13,3 b	19,1 a	18,7 a	18,0 b	0,0 a	19,0 b	20,4 c	22,0 d	23,7 e	26,5 f

Para tener una idea del grado de efecto antimicrobiano que tuvo el AE de *O. compactum* de origen ecológico frente a las 3 levaduras evaluadas, se tomó como referencia los test de susceptibilidad de las levaduras de la empresa Rosco Diagnostica, las cuales están basadas en los estándares de la CLSI, específicamente de la Anfotericina B sobre diferentes especies de *Candida*; estos resultados se pueden observar en la tabla 19.

**Tabla 19.** Prueba de sensibilidad del AE de *Origanum compactum* de origen ecológico frente a *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia fermentans*, bajo el método de difusión en disco, tomando como referencia la sensibilidad de especies de *Candida* ante Anfotericina B en concentración de 10 µg.

Anfotericina B como referencia (10 µg)					
	Medio	Halo en 10 µl de AE (mm)	Diámetro de la zona en mm		
			S	I	R
			≥ 15	14-10	≤ 10
<i>K. marxianus</i>	PDA	29	X		
	LD	19,77	X		
	LE	11,11		X	
<i>D. hansenii</i>	PDA	35,33	X		
	LD	19,77	X		
	LE	10,22		X	
<i>P. fermentans</i>	PDA	26,11	X		
	LD	6,22			X
	LE	6,22			X

S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente

PDA: Agar de patata y dextrosa; LD: leche desnatada; LE: leche entera

En la tabla anterior podemos ver que según los datos de referencia, el AE de *O. compactum* con el método de difusión en disco tuvo efecto antimicrobiano sobre *K. marxianus* y *D. hansenii* de grado sensible en los medios PDA y Leche Desnatada, pero en Leche Entera tuvieron una sensibilidad intermedia; para *Pichia fermentans* el AE tuvo efecto sensible en medio PDA pero en los medios Leche Desnatada y Leche Entera no presentó sensibilidad es decir demostró resistencia al aceite.

Con el uso del AE *O. compactum* de origen ecológico, los datos promedio obtenidos de los diámetros de los halos con 2,5 µl de AE en *K. marxianus* (22,7mm), *D. hansenii* (21,6 mm) y *P. fermentans* (19 mm), son menores en comparación a los obtenidos por CIANI, *et al.* (2000) quienes evaluaron el aceite esencial de *Satureja montana L.* en 46 especies de levaduras, entre ellas *K. marxianus* (6141), *D. hansenii* (4025) y *P. membranifaciens* (3810) en donde con volúmenes de 0,6 y 0,3 µl de AE obtuvieron diámetros de halo en mm de ++ y 16; 25 y 20; y 28 y 20 respectivamente (++: inhibición en todo el plato).

En otro ensayo realizado por Brr *et al.* Quienes aislaron e identificaron un total de 158 cepas de levadura de 23 especies provenientes de 60 muestras aleatorias de hamburguesa fresca de pollo, filete, y almuerzo (20 de cada uno), recuperaron especies de *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia* entre otras, con las cuales probaron los extractos de plantas de canela, clavo, ajo y tomillo; en donde en el ensayo para *D. hansenii* utilizaron concentraciones v/v de 5, 10 y 20 de cada AE, obteniendo diámetros de halo para canela de 8, 11 y 17 mm; clavo 0, 12 y 23 mm; Ajo 0, 3 y 11 mm y tomillo 12, 16 y 26 mm. Estos resultados son menores a los obtenidos con *O. compactum* para la misma levadura donde se obtuvieron diámetros de halo de 27.4, 31.1 y 31.6; también se puede notar que los diámetros del AE de tomillo fue el que más se acercó al de *O. compactum* posiblemente por contener en común uno de sus componentes mayoritarios como es el timol.

También podemos ver en diferentes estudios que el orégano ha sido utilizado como antibacteriano, resultando efectivo en muchas de estas, uno de ellos es el estudio realizado por Sađdiđ *et al.* (2005) quienes evaluaron 18 extractos de especias contra 23 cepas bacterianas entre patógenos y Lactobacilos. Entre los extractos estaba el *Origanum vulgare L.* con el cual en su estudio obtuvieron halos de inhibición de 21,3 mm contra *S. aureus* ATCC 28213 y 19 mm en ATCC 2392; para *E. coli* ATCC 25922 fue de 18 mm y para *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501 fue de 19,3 mm; diámetros de halo muy parecidos a los encontrados en las levaduras evaluadas en este ensayo las cuales estuvieron entre 19 y 32,5 mm.

En cuanto al uso de AE en general como antimicrobianos, un estudio realizado por Gulluce *et al.* (2007) al evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial y extracto metanol de *Mentha longifolia ssp. longifolia* frente a 38 microorganismos, 23 bacterias y 15 especies de hongos y levaduras, encontraron que las zonas de inhibición máxima y valores de MIC de las levaduras y hongos sensibles al aceite esencial de *M. longifolia ssp. longifolia* fueron 12-35 mm y 31,25 a 125 µl/ml, respectivamente; resultados similares en cuanto a diámetros de halos pero no mucho para la MIC a los obtenidos para las 3 levaduras evaluadas con *O. compactum*, donde se tuvieron datos de 19-32,5 mm y 1,5625 a 3,125 µl/ml respectivamente.

Como se pudo notar en términos generales, en los ensayos realizados con el método de dilución en agar, los medios que contenían leche desnatada (LD) (0,3% materia grasa) y leche entera (LE) (3,6% materia grasa) tuvieron diámetros de halo menores en las 3 levaduras evaluadas, especialmente en la LE, en comparación con el medio PDA; esto posiblemente se dio debido a la protección que ejerce la grasa a las levaduras ante la acción del AE; esto se puede confirmar con lo encontrado por Smith, Stewart y Fyfe (2001) quienes evaluaron la eficacia de los aceites esenciales de laurel, clavo, canela y tomillo como conservantes de alimentos naturales, en quesos bajos en grasa y queso de pasta blanda con toda la grasa contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*; en donde los cuatro aceites al 1%, en el queso bajo en grasa, redujeron a *L. monocytogenes*; En contraste, en el queso con toda su grasa, el aceite de clavo de olor fue el único que lo redujo; de igual manera, el AE de tomillo demostró ser ineficaz contra *S. enteritidis* en el queso con toda su grasa, sin embargo, fue igual de efectivo que los otros tres aceites en el queso bajo en grasa.

Igualmente, otro ensayo que confirma la protección que ejerce la grasa ante los AE es el de Tassou *et al.* (1995) quienes evaluaron el AE de menta en los productos con alta grasa como el paté y la ensalada con huevas de pescado, los cuales exhibieron poco efecto antibacteriano contra *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*, mientras que en pepino y ensalada de yogur (bajo en grasa) el mismo AE fue mucho más eficaz.

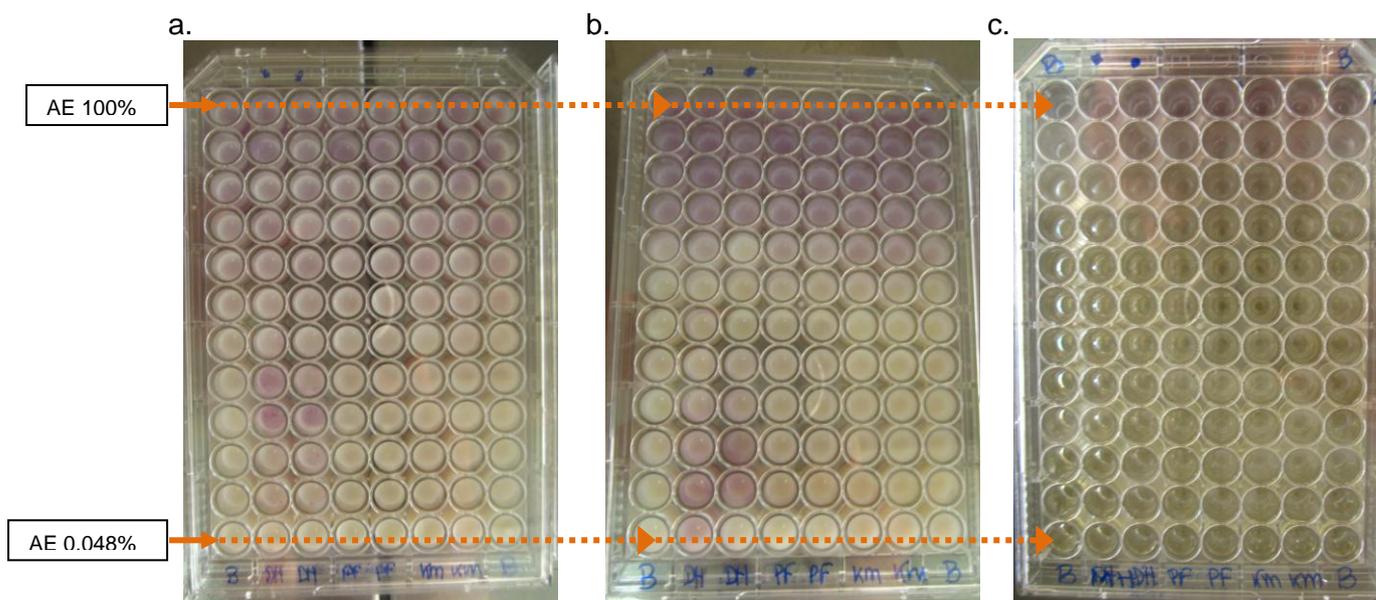
Por último en cuanto a este punto comentar que según Shelef, (1984), generalmente los altos niveles de grasa y/o proteína en los productos alimenticios protegen las bacterias de la acción de los AE de alguna manera, mientras que los niveles de sal y agua aumentan su acción.

Lo mencionado anteriormente pudo haber influenciado un poco en la toma de medidas de los diámetros de los halos de inhibición, especialmente en el ensayo con leche

entera y en las cantidades de 2.5, 5 y un poco en el de 10  $\mu$ l de AE, en donde fue muy difícil hacer la medición ya que también el medio al ser de color blanco y las colonias tener un color similar provocaron que se presentara este inconveniente y por lo tanto pudo influir en la precisión de toma de las mismas.

#### 4.3. Actividad antimicrobiana en medio líquido

Los resultados obtenidos en las microplacas en el primer ensayo realizado con la técnica de microdilución se pueden observar en la figura 20. Así mismo, en la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos en las placas de Petri sembradas con el contenido de los pocillos que delimitaban la MIC después de 6 días de incubación.



- Microplaca con medio de cultivo leche Entera (3,6% de grasa).
- Microplaca con medio de cultivo leche desnatada (0,3% de grasa).
- Microplaca con medio de cultivo caldo Mueller-Hinton.

**Figura 20.** Microplacas 2 horas después de la adición del colorante MTT.

Como se puede observar en la figura anterior, al adicionar el colorante se presentó tinción donde el AE de *O. compactum* estaba más concentrado y donde había menos concentración del aceite no se presentó cambio de color. Este resultado según Ruiz *et al.* 2012 nos indicaría que los microorganismos crecieron donde había mayor concentración de AE que donde había menor concentración, ya que éstos manifiestan que “se tiñen los pocillos donde hay actividad de los microorganismos debido a que éstos transforman el MTT de color amarillo a lila”. Un resultado muy dudoso y contradictorio después de conocer los resultados obtenidos con el método de difusión en disco donde nos refleja el efecto antimicrobiano que tiene éste aceite frente a las levaduras en estudio.

**Tabla 20.** Resultados de las placas de Petri sembradas con el contenido de los pocillos de las 3 microplacas evaluadas para verificar la MIC de cada una de las levaduras.

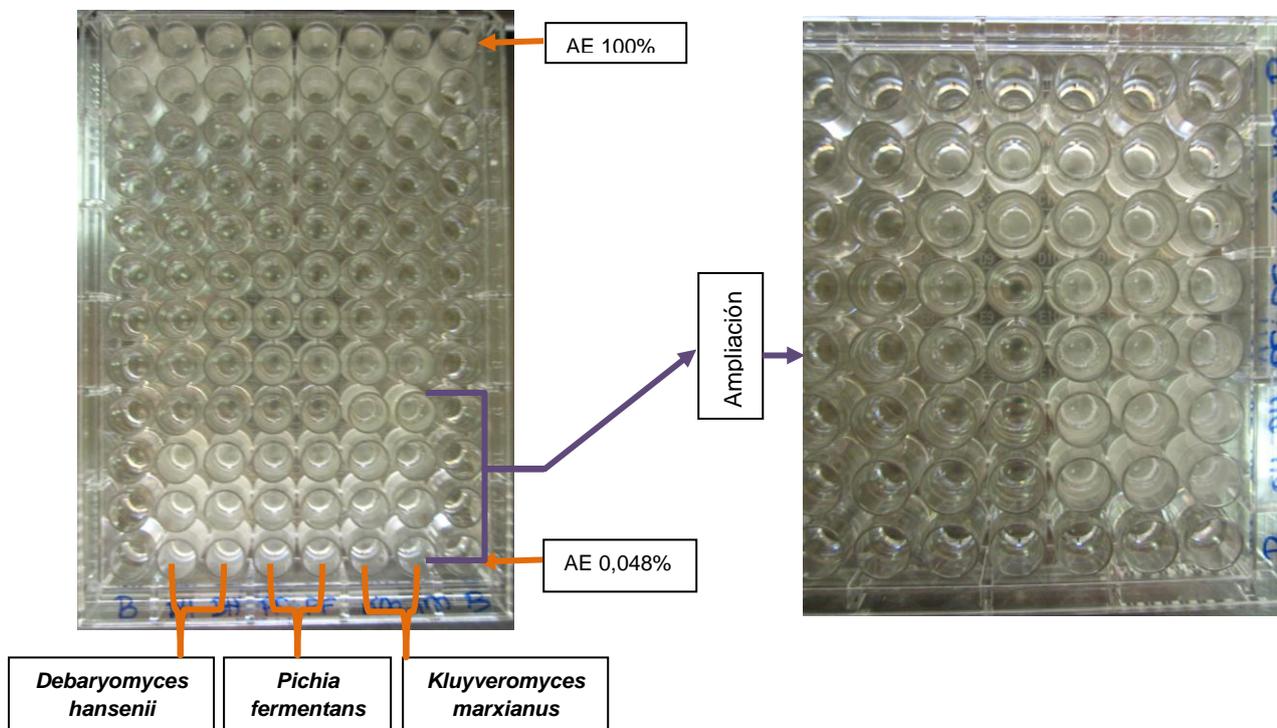
<b>CALDO MULLER HINTON</b>			
<b>Contenido</b>	<b>Pocillo</b>	<b>Concentración AE (µl/ml)</b>	<b>Crecimiento</b>
<b>Control</b>	2da fila	50	No
<b><i>K. Marxianus</i></b>	3ra fila	25	Si
<b><i>D. Hansenii</i></b>	3ra fila	25	Si
<b><i>P. fermentans</i></b>	3ra fila	25	Si
<b>LECHE DESNATADA (0,3% de materia grasa)</b>			
<b>Contenido</b>	<b>Pocillo</b>	<b>Concentración AE (µl/ml)</b>	<b>Crecimiento</b>
<b>Control</b>	5ta fila	6,25	No
<b><i>K. Marxianus</i></b>	6ta fila	3,125	No
<b><i>D. Hansenii</i></b>	5ta fila	6,25	Si
<b><i>P. fermentans</i></b>	6ta fila	3,125	Si
<b>LECHE ENTERA (3,6 % de materia grasa)</b>			
<b>Contenido</b>	<b>Pocillo</b>	<b>Concentración AE (µl/ml)</b>	<b>Crecimiento</b>
<b>Control</b>	4ta fila	12,5	No
<b><i>K. Marxianus</i></b>	7ma fila	1,562	Si
<b><i>D. Hansenii</i></b>	6ta fila	3,125	Si
<b><i>P. fermentans</i></b>	6ta fila	3,125	Si

Así mismo, en la tabla anterior podemos ver los resultados de las posibles MIC de las levaduras en los diferentes medios de cultivo, los cuales no se han podido determinar con exactitud en la mayoría de las pruebas debido a que se ha presentado crecimiento de microorganismos donde se creía que había inhibición por parte del AE, creándonos desconfianza de los resultados obtenidos.

Debido a los anteriores resultados que nos generaron muchas dudas, para resolverlas se tomó la decisión de realizar un nuevo ensayo en donde como se mencionó anteriormente se modificó el medio de cultivo para las levaduras, la cantidad de inóculo añadida (10 µl en vez de 5 µl por pocillo), no se esterilizó el medio sino que se filtró, se incubó a 30 °C, no se añadió ningún colorante sino que para determinar el MIC se sembraron los contenidos de los pocillos en placas de Petri, cada una dividida con rotulador en 6 secciones.

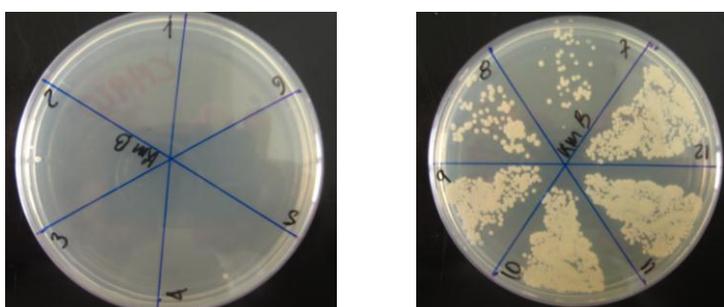
Teniendo en cuenta las modificaciones mencionadas para el segundo ensayo con la técnica de microdilución, la figura 21 nos permite observar un poco en los pocillos de la microplaca (según la turbidez) donde hubo y donde no crecimiento de las levaduras dependiendo de la concentración del AE de *O. compactum*, lo cual es lo que nos determina la MIC de cada uno de los microorganismos.

Por lo anterior y debido a que los resultados visuales de turbidez que se presentan en la microplaca no nos dan mucha seguridad de cuál es la MIC exactamente, en las figuras 22, 23 y 24 se muestra el crecimiento que tuvieron *K. marxianus*, *D. hansenii* y *P. fermentans* respectivamente, en medio PDA según las diferentes concentraciones del AE (siembra proveniente de los pocillos de la microplaca), las cuales fueron determinantes para confirmar la MIC de cada una de las levaduras.



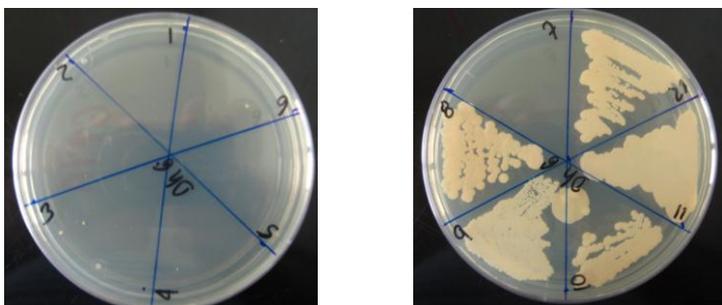
**Figura 21.** Turbidez de los pocillos de la Microplaca tras 72 horas de incubación, lo cual indica la presencia de microorganismos.

En la figura anterior se puede observar que algunos pocillos presentan turbidez y otros no, lo que nos indica que donde está más transparente es porque ha actuado el AE de *O. compactum* como antimicrobiano evitando el crecimiento de las levaduras, contrario donde se ve más turbio lo cual nos indica que hay presencia de los microorganismos y lo cual se pudo comprobar al hacer la siembra del contenido de cada pocillo en placas Petri, como se ve en las siguientes figuras.



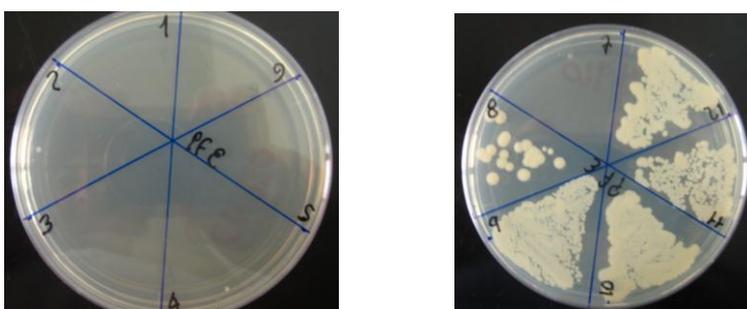
**Figura 22.** Placas de Petri sembradas con *K. marxianus* para determinar la MIC del AE de *Origanum compactum*.

En la figura anterior se puede observar que en la placa de Petri que contiene concentraciones de AE desde 100% hasta 3,125% no hubo crecimiento de microorganismos y en el segundo donde contiene concentraciones de aceite desde 1,562% hasta 0,048% si se presentó crecimiento de microorganismos, lo que nos indica que la MIC para esta levadura es de 3,125%.



**Figura 23.** Placas de Petri sembradas con *D. hansenii* para determinar la MIC del AE de *Origanum compactum*.

Se puede observar en la figura anterior que en las primeras 7 concentraciones diferentes de AE correspondientes desde 100% hasta 1,562% no se presentó crecimiento de microorganismos y en las restantes hasta 0,048% sí hubo crecimiento; lo que nos indica que la MIC para *D. hansenii* es de 1,562%.



**Figura 24.** Placas de Petri sembradas con *P. fermentans* para determinar la MIC del AE de *Origanum compactum*.

La figura anterior nos permite apreciar que se presentaron resultados de crecimiento de microorganismos en las concentraciones de AE desde 0,781% hasta 0,048% y en las de 100% hasta 1,562% no se presentó crecimiento, con lo que se deduce que la MIC para esta levadura es 1,562% de AE de *O. compactum*.

En la tabla 21 se resume los resultados de los datos de la concentración mínima que evita el crecimiento microbiano para cada una de las levaduras.

**Tabla 21.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada una de las 3 levaduras evaluadas.

LEVADURA	MIC en $\mu\text{l/ml}$
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	3,125
<i>Debaryomyces hansenii</i>	3,125

<b><i>Pichia fermentans</i></b>	1,5625
---------------------------------	--------

En cuanto a los resultados de la MIC vemos que los datos obtenidos para *D. hansenii* son más altos que el estudio hecho por D'auria *et al.* (2001) quienes evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial *Melaleuca alternifolia* Maiden (*Myrtaceae*) frente a levaduras (*Candida spp.*, *Schizosaccharomyces pombe*, *D. hansenii*) y 2 especies de dermatofitos, en donde encontraron que las MIC variaron de 0,12% a 0,50% (v/v) para las levaduras; datos menores que el obtenido con *O. compactum* contra *D. hansenii* que fue de 3,125 µl/ml.

Así mismo, Biavati, Özcan y Piccaglia (2004) evaluaron los AE de *Satureja cuneifolia* y *Thymbra sintonensis subsp. Isaurica* contra diversas bacterias (Gram+ y Gram-) y levaduras; entre estas últimas *K. marxianus* (6165) y *P. membrifaciens* (6215) las cuales obtuvieron datos de MIC de 1000 y 400 ppm para *S. cuneifolia* y 1200 y 600 ppm para *T. sintonensis subsp. Isaurica* respectivamente. Estos datos son también menores en comparación a los obtenidos con *O. compactum* de origen ecológico evaluado contra *K. marxianus* y *P. fermentans* donde se obtuvieron datos de 3,125 y 1,56 µl/ml respectivamente.

De igual forma, los resultados obtenidos son también mayores para *D. hansenii* y *Kluyveromyces marxianus* en comparación al ensayo llevado a cabo por Canillac y Mourey (1995) quienes evaluaron el poder antimicrobiano de los AE de abeto (*Abies alba* P. Miller) y pino (*Pinus pinaster* Sol.) contra 3 cepas de *Brevibacterium linens*, 1 de *Micrococcus*, 2 de *Debaryomyces hansenii* y 1 de *Kluyveromyces lactis*; en donde el método de dilución reveló que la MIC fue mucho más baja para las dos cepas de *D. hansenii* (0,02 a 0,04%) que para los otros microorganismos (MIC ≥ 0,25%).

En el ensayo realizado por Tyagi *et al.* (2014) al evaluar la actividad anti-hongos del aceite de hierba de limón (LGO) contra 8 levaduras contaminantes de alimentos entre ellas *P. fermentans*, obtuvieron de manera general para las levaduras valores de MIC de 0,28 hasta 1,3 mg/ml y específicamente para *P. fermentans* fue de 0,56 mg/ml. Este dato es menor en comparación al obtenido en este ensayo para *P. fermentans* donde la MIC fue de 1,56 µl/ml.

Los resultados de MIC para las 3 levaduras evaluadas obtenidos en el presente trabajo con *O. compactum* son similares a los obtenidos en el ensayo realizado por Prakash *et al.* al evaluar el AE de *Origanum majorana* y algunos conservantes orgánicos contra la cepa aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* (LHP-6), en donde los resultados de la MIC oscilaron entre 2,0 µl/ml y 3,0 µl/ml (3 µl/ml en *O. majorana*) y entre 3 y más de 10 µl/ml para los conservantes orgánicos; se puede ver que para *K. marxianus* y *D. hansenii* los resultados de la MIC son muy cercanos (3,125 µl/ml) pero para *P. fermentans* fueron mayores (1,56 µl/ml). El trabajo de los autores nos permite también confirmar la efectividad que tienen los AE, incluido el nuestro, como antibacterianos y que además presentan mejores resultados que los compuestos orgánicos.

Como es sabido y confirmado mediante el análisis de la composición química del AE de *O. compactum*, el carvacrol es uno de los componentes mayoritarios de este aceite

y el cual según Lambert *et al.* (2001) en una mezcla adecuada con timol puede ejercer una inhibición total en algunas bacterias y haciendo que el impacto del sabor sea más pequeño ya los AE de algunas especies de orégano tienden a ser muy fuertes organolépticamente. Lo anterior se confirma con un ensayo realizado por Burt (2004) quien evaluó el efecto antibacteriano del carvacrol contra *Listeria monocytogenes* en leche semi desnatada como medio de cultivo, obteniendo una MIC de 0,3-0,45 µl/ml. Un dato que nos permite deducir que el AE de *O. compactum*, debido a su composición química, puede ser utilizado como antibacteriano.

Sabiendo que dentro de los componentes mayoritarios del AE de *O. compactum* de origen ecológico se encuentran el carvacrol y timol, podemos asegurar que este AE puede ser utilizado como antifúngico, ya que la investigación llevada a cabo por Zabca y Pavela (2013) nos lo confirma debido a que evaluaron la eficacia antifúngica de 21 fenoles diferentes en 6 hongos filamentosos con el método de dilución en agar y encontraron que el timol y carvacrol fueron los más eficaces, en donde las MIC<sub>50</sub> de timol oscilaron entre 30 y 52 µg/ml<sup>-1</sup> y las MIC<sub>100</sub> entre 76 y 255 µg ml<sup>-1</sup>. Para carvacrol, los valores de las MIC<sub>50</sub> oscilaron entre 37 y 76 µg/ml<sup>-1</sup>, y las MIC<sub>100</sub> entre 131 y 262 µg/ml<sup>-1</sup>.

En general, en cuanto a la MIC para los diferentes AE contra bacterias y hongos según Arcila *et al.* los valores se han establecido entre 0.28-1.27 µg/ml y 0.65-1.27 µg/ml respectivamente. Datos que el AE de *O. compactum* de origen ecológico supera al ser utilizado en levaduras.

Se puede ver entonces que hay diferencias entre los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo en cuanto a la sensibilidad de los microorganismos, tal y como lo señala Hammer *et al.*, (1999) al decir que la MIC para un AE en particular, en un aislado bacteriano particular, generalmente ha demostrado ser ligeramente inferior en caldo que en agar. Pero hay que tener en cuenta que los mecanismos de acción de los 2 métodos son diferentes y por lo tanto hay que tener muy claro para que se está evaluando o como va ser la forma de uso del antimicrobiano, ya que este bien puede usarse mezclado con los ingredientes del alimento o bien utilizado como películas comestibles o como parte del empaquetado que no hace contacto con el alimento, como son los empaques al vacío en donde se adiciona una capa del aceite para que se vaya liberando poco a poco su acción antimicrobiana; es así que para este último, el método que más se adaptaría sería el de difusión en disco. En el presente trabajo se evaluaron los 2 métodos con el fin de conocer el comportamiento que tenían las 3 levaduras ante el AE de *O. compactum* en estos medios y así tener información amplia para futuros usos en la industria agroalimentaria.

Como se comentó anteriormente en los métodos utilizados, durante la prueba de microdilución en caldo en el primer ensayo los resultados no fueron los esperados, ya que cuando se adicionó el colorante MTT lo que se esperaba era que se tiñeran los pocillos en donde había actividad microbiana que se suponía eran donde el AE estaba menos concentrado, pero sucedió lo contrario ya que se tiñeron donde las concentraciones eran de 100, 50 y 25%, y hasta algunos de los pocillos testigo lo cual nos generó muchas dudas para la determinación de la MIC, por lo que se optó por un segundo ensayo en el cual se realizaron una serie de modificaciones como que solo

se realizó en un medio de cultivo (caldo de maltosa al 2% de glucosa), no se utilizó colorante, entre otras, pero la técnica fue la misma; una de las modificaciones que fue la que nos permitió determinar con mayor precisión la MIC fue el de sembrar en placas Petri previamente divididas en 6 con rotulador sobre el reverso, cada uno de los contenidos de los pocillos de la microplaca, realizando 2 repeticiones por levadura. Es así que para determinar la MIC de levaduras en las diferentes leches, para futuros ensayos se recomienda realizar el ensayo con las modificaciones realizadas en el segundo ensayo de microdilución en caldo del presente trabajo.

Por último comentar que debido a las características de los AE en cuanto a parte organoléptica, ya que son sustancias un poco fuertes de sabor y olor; que en el caso de *O. compactum* proveniente de cultivo ecológico utilizado en este trabajo, estas características están menos acentuadas que *O. vulgare*; y debido a que como el objetivo de este ensayo es el uso del AE de *O. compactum* en productos lácteos; las futuras utilidades de este aceite serían sobre alimentos que contengan especias, aromatizantes o películas biodegradables, tal como lo menciona Sánchez-González *et al.* (2011) donde comenta que una forma para paliar los intensos aromas de los aceites u otros efectos indeseables (toxicidad) es mediante la incorporación de estos compuestos naturales en películas biodegradables, ya que de este modo, se requiere menos cantidad de aceite que cuando se administran directamente en el alimento.

Lo anterior también coincide con Burt (2004) quien comenta que en vista de sus propiedades organolépticas, los AE más fácilmente se podrían incorporar en los alimentos manufacturados que se asocian tradicionalmente con hierbas (platos salados como carnes y pescados, quesos, platos de verduras, sopas y salsas) o con especias (bebidas y postres que contengan frutas y / o productos lácteos).

## 5. CONCLUSIONES

Mediante el análisis por cromatografía de gases pudimos ver que los componentes mayoritarios que tiene el aceite esencial de *Origanum compactum* proveniente de cultivo ecológico son Carvacrol con 46,78%, Timol 16,76%,  $\gamma$ -terpineno 16,31% y Para-cimeno 9,69%.

En la prueba de difusión en disco se constata que el AE de *O. compactum* es efectivo frente a las levaduras evaluadas: *Kluyveromyces marxianus* y *Debaryomyces hansenii* son sensibles en los medios PDA y Leche Desnatada; y en Leche Entera presentan sensibilidad intermedia; *Pichia fermentans* es sensible en medio PDA, pero es resistente al AE en leche Desnatada y Leche Entera.

En la prueba de microdilución en medio extracto de malta glucosado *D. hansenii* y *P. fermentans* son más sensibles al AE de *Origanum compactum* que *K. marxianus*.

La efectividad antimicrobiana del AE de *O. compactum* es excelente en medio de cultivo pero se reduce en leche y en especial en leche entera, esto indica que la grasa de la leche ejerce un efecto protector en las levaduras ante la acción del AE.

Las cantidades recomendadas de AE de *O. compactum* de origen ecológico para futuras aplicaciones en productos lácteos aromatizados o especiados (finas hierbas...) desnatados para la inhibición de *K. marxianus* es 2,5  $\mu$ l y para *D. hansenii* 5  $\mu$ l; en cuanto a productos con 3,6% de grasa para inhibir a *K. marxianus* 10  $\mu$ l y entre 10 y 20  $\mu$ l para la inhibición de *D. hansenii*. Se requieren más estudios por MIC para evaluar la efectividad de este AE para inhibir el crecimiento de *P. fermentans* pues a la vista de los ensayos por difusión en disco en productos lácteos el aceite esencial de *O. compactum* muestra escasa efectividad frente a esta levadura.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AGENCIA EUROPEA PARA LA SEGURIDAD Y LA SALUD EN EL TRABAJO. Los agentes biológicos y la agricultura. cop. 1998-2014. [en línea]. [Consulta de 17 Mayo de 2014]. Disponible en:

<https://osha.europa.eu/es/sector/agriculture/bio>

- ARCILA-LOZANO, C. C., LOARCA-PIÑA, G., LECONA-URIBE, S. y GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2004. vol. 54, N° 1, p. 100-111.

- BADAWY, M. y RABEA, E. *Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit*. Postharvest Biology and Technology. 2009. vol. 51, N° 1, p. 110-117.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521408001853>

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., y IDAOMAR, M. *Biological effects of essential oils – a review*. Food and Chemical Toxicology. 2008. vol. 46, p. 446–475.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>

- BALLESTER-COSTA, C., SENDRA, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A., y VIUDA-MARTOS, M. *Industrial Crops and Products*. 2013. vol. 50, p. 304-311.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013003890>

- BATT, C. A. *Kluyveromyces*. Encyclopedia of Food Microbiology. 1999. p. 1115-1118.

[www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270703008655#](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270703008655#)

- BIAVATI, B., ÖZCAN, M. y PICCAGLIA, R. Composition and antimicrobial properties of *Satureja cuneifolia* Ten. and *Thymbra sintenisii* Bornm. et Aznav. subsp. *isaurica* PH Davis essential oils. Annals of microbiology. 2004. vol. 54, N° 4, p. 393-401.

- BOUCHRAA, CH., ACHOURIB, M., IDRISSE HASSANIC, L.M. and HMAMOUCHE, M. *Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against Botrytis cinerea Pers: Fr*. Journal of Ethnopharmacology. 2003. vol. 89, No. 1, p. 165-169.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103002757>

- BRR, A. A. H. y MAHMOUD, Y. A. G. Anti-Yeast Effects of Some Plant Extracts on Yeasts Contaminating Processed Poultry Products in Egypt. Czech J. Food Sci. 2005. vol. 23, N° 1, p.12–19.

- BURT, Sara. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. International Journal of Food Microbiology. 2004. vol. 94, Nº 3, p. 223-253.
- CANILLAC, N., & MOUREY, A. *Effet des huiles essentielles de sapin et de pin sur quelques microorganismes d'affinage*. MAN Microbiologie, aliments, nutrition. 1995. vol. 13, Nº 3, p. 267-273.
- CASTAÑO SEPÚLVEDA, M. V. “Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada”. Director Víctor Higuera Marín. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín (Colombia). 2012.
- CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. *Pichia fermentans*. [en línea]. [Consulta de 17 Mayo de 2014]. Disponible en:  
  
<http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeast%20species&Name=Pichia%20fermentans&Fields=All&ExactMatch=T>
- CECT.org. Yeast. [en línea]. [Consulta de 17 Mayo de 2014]. Disponible en:
  1. <http://www.cect.org/vstrn2.php?cect=1043&lan=es>
  2. <http://www.cect.org/vstrn2.php?cect=11379&lan=es>
  3. <http://www.cect.org/vstrn.php?cect=1455&lan=es>
- CIANI, M., MENGHINI, L., MARIANI, F., PAGIOTTI, R., MENGHINI, A. y FATICHENTI, F. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts. *Biotechnology Letters*. 2000. vol. 22, Nº 12, p.1007-1010.
- CHUN, S. S., VATTEM, D. A., LIN, Y. T., y SHETTY, K. *Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori**. *Process Biochemistry*. 2005. vol. 40, Nº 2, p. 809-816.  
  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204001189>
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). "Methodology for the serum bactericidal test. Document M21-A. 1999. vol. 19, Nº 17. ISBN 1-56238-383-3. [Consulta de 24 Julio de 2014]. Disponible en:  
  
[http://shopping.sandbox.netsuite.com/c.1253739/site/Sample\\_pdf/M21A\\_sample.pdf](http://shopping.sandbox.netsuite.com/c.1253739/site/Sample_pdf/M21A_sample.pdf)
- COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT). Instrucciones para la recuperación de cultivos liofilizados. 2012. Ed. 09. [en línea]. [Consulta de 17 Mayo de 2014]. Disponible en:  
  
[http://www.cect.org/docs/recup\\_es.pdf](http://www.cect.org/docs/recup_es.pdf)

- CORSETTI, A., ROSSI, J. y GOBBETTI, M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International journal of food microbiology*. 2001. vol. 69, Nº 1, p. 1-10.
- D'AURIA, F. D., LAINO, L., STRIPPOLI, V., TECCA, M., SALVATORE, G., BATTINELLI, L. y MAZZANTI, G. *In vitro activity of tea tree oil against Candida albicans mycelial conversion and other pathogenic fungi*. *Journal of chemotherapy*. 2001. vol.13, Nº 4, p. 377-383.
- DEAK, Tibor. Yeasts in Specific Types of Foods. En: *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, second edition. CRC Press, 2007. p. 165-166.
- Enology Access. *Pichia fermentans*. 2010. [en línea]. [Consulta de 18 Mayo de 2014]. Disponible en:  
  
<http://enologyaccess.org/EA2/index.php/winemicrobes/918-yeastid/199-pichia-fermentans.html>
- GARCÍA GARCÍA, R. M. y PALOU GARCÍA, E. *Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos*. *Temas selectivos de Ingeniería de Alimentos*. 2008. vol.2, Nº. 2, p. 41-51.  
  
[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
- GIL M.J., MARTÍNEZ, V., GONZÁLEZ, A., ARTEAGA, C. y MIGLACCIO, M. *Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental*. *ANALES Sis San Navarra*. 1999. vol. 22(3), p. 88-92.  
  
[http://www.researchgate.net/publication/237753573\\_Nuevos\\_agentes\\_antineopl%C3%A1sicos\\_dise%C3%B1o\\_s%C3%ADntesis\\_y\\_determinaci%C3%B3n\\_experimental](http://www.researchgate.net/publication/237753573_Nuevos_agentes_antineopl%C3%A1sicos_dise%C3%B1o_s%C3%ADntesis_y_determinaci%C3%B3n_experimental)  
[New anti-neoplastic agents design synthesis and experimental determination](http://www.researchgate.net/publication/237753573_Nuevos_agentes_antineopl%C3%A1sicos_dise%C3%B1o_s%C3%ADntesis_y_determinaci%C3%B3n_experimental)
- GULLUCE, M., SAHIN, F., SOKMEN, M., OZER, H., DAFERERA, D., SOKMEN, A., POLISSIOU, M. ADIGUZEL, A. y OZKAN, H. *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia*. *Food Chemistry*. 2007. vol. 103, Nº 4, p. 1449-1456.
- HAMMER, K. A., CARSON, C.A. y RILEY, T.V. *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. *Journal of Applied Microbiology*. 1999. vol. 86, p. 985-990.  
  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x/pdf>
- KURTZMAN, C., FELL, J. W., y BOEKHOUT, T. (ED). *The yeasts: a taxonomic study* (Vol. 1). Elsevier. 2011.
- LAMBERT, R. J. W., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J., y NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*. 2001. Vol. 91, Nº 3, p. 453-462.

- LEDENBACH, L. H. and MARSHALL, R. T. Microbiological spoilage of dairy products. En *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer New York. 2010. p. 44-45.
- MARTÍNEZ FLORES, F., VÁZQUEZ BRAVO, J. J., GONZÁLEZ GONZÁLEZ, J. S., HERNÁNDEZ ROSAS, J., CASTRO BEAR, V. y ZUÑIGA LEMUS, O. *Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis (1-ciclohexiletíl) tiourea y (R,R)-N,N'-bis (1-feniletíl) tiourea*. *Avances en Biomedicina*. 2013. vol. 2, Nº. 2, p. 71.

<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4411293>

- MEZZOUG, N., ELHADRI, A., DALLOUH, A., AMKISS, S., SKALI, N.S., ABRINI, J., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., DIALLO, B., EL JAZIRI, M. e IDAOMAR, M. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007. vol. 629, Nº 2, p. 102.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571807000691#>

- MIRAMONT, Sofía. "Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos". Director Lía Noemí Gerschenson. [Tesis de Maestría]. Universidad Tecnológica Nacional de Buenos Aires. Tecnología de Alimentos. 2012.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY. "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard. Document M7-A4. "National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.1997.
- ORBERÁ RATÓN, Teresa de los Milagros. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Rev Cubana Salud Pública* [en línea]. 2004, vol.30, n.3. [Consulta de 23 de Mayo de 2014]. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662004000300016&script=sci\\_arttext#cargo](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662004000300016&script=sci_arttext#cargo)

- PARZANESE, Magali. Alimentos Argentinos, una elección natural. Tecnologías para la Industria Alimentaria. Liofilización de alimentos. Ficha Nº 3. [en línea]. [Consulta de 17 Mayo de 2014]. Disponible en:

[http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/ficha\\_03\\_liofilizados.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/ficha_03_liofilizados.pdf)

- PEREIRA-DIAS, S., POTES, M. E., MARINHO, A., MALFEITO-FERREIRA, M. y LOUREIRO, V. *Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese*. *International journal of food microbiology*. 2000. Vol. 60, Nº 1, p. 55-63.

- PETRENCO, Olena. Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo. Universidad de Belgrano. Buenos Aires (Argentina). 2005. p. 15.  
  
[http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/147\\_petrenko.pdf](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/147_petrenko.pdf)
- POUTOU, R. A., QUEVEDO, B. E., CÓRDOBA, H. A., SÁENZ, H. Y BARRERA, L. A. Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. Nova-Publicación Científica. 2005. p. 76.  
  
[http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREV1\\_3.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREV1_3.pdf)
- PRAKASH, B., SINGH, P., KEDIA, A. Y DUBEY, N.K. *Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system*. Food Research International. 2012. vol. 49, N° 1, p. 201-208.
- PRAPHAILONG, W y FLEET, G. H. *Debaryomyces*. Encyclopedia of Food Microbiology. . 1999. p. 515-520.  
  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227070300430X#>
- QUINTANA OBREGÓN, E. A., PLASCENCIA JATOMEA, M., GONZÁLEZ AGUILAR, G. A. Y CORTEZ ROCHA, M. O. Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. Revista Mexicana de Micología. 2010. vol. 32.  
  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-31802010000200007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-31802010000200007&script=sci_arttext)
- RAMÍREZ ARISTIZABAL, L. S. y MARIN CASTAÑO, D. Universidad Tecnológica de Pereira. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica, 2009, vol. 2, no 42, p. 264.  
  
<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/685/1/Metodologias%20para%20evaluar.pdf>
- RIBEIRO LACERDA, María Juliana. Alternativas de sanitização em ovos comerciais. Directora Nadja Susana Mogyca Leandro. [Tesis Doctorado]. Universidade Federal de Goiás. Programa de pós-graduação em ciência animal. 2011.  
  
[http://ppgca.evz.ufg.br/uploads/67/original\\_Seminario2011\\_Maria\\_Juliana\\_2c.pdf](http://ppgca.evz.ufg.br/uploads/67/original_Seminario2011_Maria_Juliana_2c.pdf)
- ROJAS-GRAÜ, M. A., AVENA-BUSTILLOS, R. J., OLSEN, C., FRIEDMAN, M., HENIKA, P. R., MARTÍN-BELLOSO, O., PAN, Z y MCHUGH, T. H. *Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films*. Journal of Food Engineering. 2007. Vol. 81, N° 3, p. 634-641.
- ROSCO DIAGNOSTICA. Susceptibility Testing of Yeasts 2011. Agar Diffusion Method with Neo-Sensitabs. [en línea]. [Consulta de 17 Agosto de 2014]. Disponible en:

<http://www.rosco.dk/gfx/yeasts.pdf>

- RUIZ NAVAJAS, Y., VIUDA MARTOS, M., SENDRA, E., PEREZ ALVAREZ, J. A. y FERNÁNDEZ LÓPEZ, J. Universidad Miguel Hernández. In Vitro Antioxidant and Antifungal Properties of Essential Oils Obtained from Aromatic Herbs Endemic to the Southeast of Spain. 2012.
- SAĐDIĐ, O., KARAHAN, A. G., ÖZCAN, M., & ÖZKAN, G. Efectos de algunos extractos de especias en la inhibición bacteriana. Tecnología. En: Mundo Alimentario. 2005.

[http://www.deltaenfoque.net/media/MA005\\_especiasWSF.pdf](http://www.deltaenfoque.net/media/MA005_especiasWSF.pdf)

- SÁNCHEZ GONZÁLEZ, Laura. "Caracterización y aplicación de recubrimientos antimicrobianos a base de polisacáridos y aceites esenciales". Directores Chelo González Martínez y Maite Cháfer Nácher. [Tesis Doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. 2010.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., VARGAS, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A., Y CHÁFER, M. *Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review*. Food Engineering Reviews. 2011. vol. 3, Nº 1, p. 1-16.
- SAN MAURO MARTÍN, Manuel. Respuesta transcripcional y celular asociada al mecanismo de acción de la toxina PMKT de *Pichia membranifaciens*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2009. p. 19.

<http://eprints.ucm.es/9470/1/T30986.pdf>

- SANTURIO, D. F., DA COSTA, M. M., MABONI, G., CAVALHEIRO, C. P., DE SÁ, M. F., DAL POZZO, M., ALVES, S. H. y MARTINS FRIES, L. L. *Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de Escherichia coli aisladas de aves e bovinos*. Ciencia Rural. 2011. vol. 41, Nº6.

<http://www.scielo.br/pdf/cr/2011nahead/a0511cr4430.pdf>

- SANTURIO, J. M., SANTURIO, D. F., POZZATTI, P., MORAES, C., FRANCHIN, P. R., & ALVES, S. H. *Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomillo e canela frente a sorovares de Salmonella enterica de origem avícola*. Ciência Rural. 2007. vol. 37, Nº 3, p. 803-808.

<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n3/a31v37n3.pdf>

- SEGAL KISCHINEVZKY, C., RODARTE MURGUÍA, B., VILCHIS PELUYERA, A., RODRÍGUEZ PONCE, B., VALDÉS LÓPEZ, V. y ALBA LOIS, L. Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM. Explorando las catalasas de *Debaryomyces hansenii*. 2008.

[http://www.smb.org.mx/smb-anterior/XXVIICONGRESO/Text/AREA-1/ORALES/1\\_A\\_49.pdf](http://www.smb.org.mx/smb-anterior/XXVIICONGRESO/Text/AREA-1/ORALES/1_A_49.pdf)

- SHELEF, L. A., JYOTHI, E. K., y BULGARELLII, M. A. *Growth of Enteropathogenic and Spoilage Bacteria in Sage-Containing Broth and Foods*. Journal of Food Science. 1984. Vol. 49, Nº 3, p. 737-740.

- SMITH-PALMER, A., STEWART, J. y FYFE, L. *The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese*. Food Microbiology. 2001. vol. 18, pp. 463-470.
- TASSOU, C. C., DROSINOS, E. H. Y NYCHAS, G. J. E. *Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 and 10 C*. Journal of Applied Bacteriology. 1995. vol. 78, Nº 6, p. 593-600.
- TYAGI, A. K., GOTTARDI, D., MALIK, A. y GUERZONI, M. E. *Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil*. LWT-Food Science and Technology. 2014. vol. 57, Nº 2, p. 731-737.
- VÁSQUEZ CARREÑO, D. R. 2012. El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos.
- VIVIER, D., RIVEMALE, M., REVERBEL, J. P., RATOMAHENINA, R. y GALZY, P. *Study of the growth of yeasts from feta cheese*. International journal of food microbiology. 1994. vol. 22, Nº 2, p. 207-215.
- WANG, J. J. y FRANK, J. F. *Characterization of psychrotrophic bacterial contamination in commercial buttermilk*. Journal of Dairy Science. 1981. vol. 64, Nº 11, p. 2154-2160.
- WILKINSON, J. M. *Methods for testing the antimicrobial activity of extracts*. Modern Phytochemistry: Turning Medicinal Plants into Drugs. 2006. P. 157-171.
- ZABKA, M., Y PAVELA, R. *Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi*. Chemosphere. 2013. vol. 93, Nº 6, p. 1051-1056.