

## Efecto del aceite esencial de orégano y sus fracciones concentradas en el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* (*niger*)

A.G. Cazares-Rodríguez<sup>1</sup>, J. Rodríguez-Rodríguez<sup>\*\*2</sup>, E. Sánchez-García<sup>3</sup>, J. De Lara-Novella, K. García-Alanís<sup>1</sup>, C. Leos-Rivas<sup>3</sup> y S. Castillo-Hernández<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencia de Alimentos; <sup>3</sup> Departamento de Química; Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Pedro de Alba S/N, Niños Héroes, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. CP 66455. <sup>2</sup> Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico C.P. 64849, Monterrey, Nuevo León, México.

\*[sandra.castillohohn@uanl.edu.mx](mailto:sandra.castillohohn@uanl.edu.mx); \*\*[jrr@itesm.mx](mailto:jrr@itesm.mx)

### RESUMEN

La inocuidad de los alimentos es una necesidad crítica a nivel mundial. Algunos hongos deteriorantes como *Aspergillus brasiliensis* (*niger*) producen micotoxinas en las materias primas (granos principalmente) y esto llega al alimento terminado, provocando complicaciones en la salud. La incidencia de brotes en los alimentos obliga a investigar nuevos métodos para la conservación alimentaria, por otro lado, también existe una gran demanda de productos naturales, es por esto, que el uso de aceites esenciales como conservadores naturales cobra especial importancia en la industria alimenticia, ya que éstos son reconocidos como seguros (GRAS) para ser usados en alimentos. Los aceites esenciales de orégano constituyen una alternativa como potenciales agentes antioxidantes y antimicrobianos prolongando la vida útil. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de las fracciones concentradas de orégano sobre el crecimiento de *A. brasiliensis* (*niger*). Se realizaron pruebas de difusión en disco, determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima fungicida (CMF) y evaluación morfológica del hongo a concentraciones menores a la CMF. Los resultados muestran una actividad antimicrobiana con halos de inhibición en rangos de 3.6-5.8 cm. La CMI y CMF mostraron rangos de 6 a 600 ppm, mientras que la evaluación morfológica, evidenció una alta inhibición de la conidiogénesis.

**Palabras claves:** Antifúngica, aceites esenciales, conidiogénesis, fracciones concentradas, sustancias GRAS.

### ABSTRACT

Food safety is a critical need globally. Some spoilage fungi such as *Aspergillus brasiliensis* (*niger*) produce mycotoxins in raw materials (mainly grains) and this reaches the finished food, causing health complications. The incidence of outbreaks in food forces to investigate new methods for food preservation, on the other hand, there is also a great demand for natural products, which is why the use of essential oils as natural preservatives is especially important in the food industry since these compounds are recognized as safe (GRAS) to be used in food. Oregano essential oils are an alternative as potential antioxidant and antimicrobial agents, prolonging shelf life. The objective of the present study was to evaluate the effects of concentrated fractions of oregano on the growth of *A. brasiliensis* (*niger*). Disk diffusion tests, determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and morphological evaluation of the fungus were carried out at concentrations lower than the MFC. The results show a preliminary activity in ranges of 3.6-5.8cm. The MFC was in ranges of 6 to 600 ppm, while the morphological evaluation showed a high inhibition of conidiogenesis.

**Keywords:** Conidiogénesis, GRAS, essential oils, spoilage fungi, carvacrol, thymol and conidia or spore suspension.

## INTRODUCCIÓN

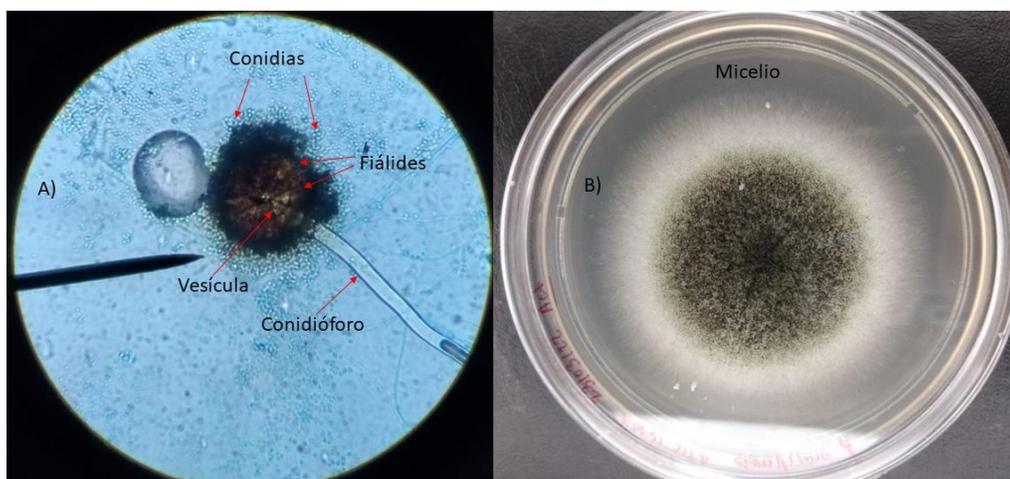
Uno de los principales géneros asociados en la contaminación de alimentos es *Aspergillus* spp., se considera de gran interés científico y de importancia en la salud pública (González, 2009). Para la economía agrícola representa un gran reto debido a que este género fúngico provoca serios problemas durante la producción y almacenamiento de granos, generando así, pérdidas económicas graves, también llegando a ocasionar intoxicaciones de gravedad, debido a la producción de micotoxinas; se ha demostrado que en casos que no son diagnosticados a tiempo pueden causar la muerte o en su defecto cáncer de hígado por acumulación crónica de las mismas (De Menezes *et al.*, 2020).

La especie *A. niger* se conoce como “moho negro” se encuentra distribuido en el medio ambiente, en suelo, en frutas y verduras, pero principalmente en los cereales y granos (Carrillo, 2003). En cuanto a su morfología microscópica (Fig. 1) presenta una cabeza aspergilar de tonos negro a negro grisáceo, negro café, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas, así mismo, los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos, las vesículas son globosas, hialinas o de color café claro a oscuro, los conidios son elípticos, lisos o espinosos, mientras que la morfología macroscópica, el micelio es aéreo, algodonoso o lanoso de color verde negruzco (Vega *et al.*, 2002). La característica más importante es que produce una micotoxina llamada ocratoxina A, esta toxina ha sido estudiada por su capacidad patogénica en humanos, ya que tiene actividad nefrotóxica, inmunotóxica, neurotóxica y cancerígena (Young *et al.*, 2019).

El desarrollo de procesos de conservación de los alimentos surge de la necesidad de extender su vida útil debido a que los microorganismos deteriorantes no solo alteran las propiedades organolépticas, sino que también hacen peligroso su consumo (Gramajo, 2019). Los recientes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos han potenciado la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para inhibir el crecimiento tanto de hongos como de bacterias en los alimentos (Vignola *et al.*, 2020). Dentro de estas nuevas formas se encuentran los aceites esenciales (AE), los cuales se obtienen de diferentes partes de la planta como metabolitos secundarios mediante procesos distintos ya sea por pulverización, destilación, arrastre en corriente de vapor o el uso de disolventes orgánicos, además se encuentran conformados por compuestos orgánicos volátiles y según las propiedades de cada aceite la susceptibilidad de los microorganismos variará (Rueda *et al.*, 2018).

Se considera que el aceite esencial de orégano es uno de los antisépticos naturales altamente efectivos, además, su uso no potencia mutaciones que dan lugar a cepas resistentes. Entre los compuestos fenólicos que componen parte del aceite de orégano y que le otorgan sus propiedades se encuentran el carvacrol y el timol (Evangelista *et al.*, 2018). El carvacrol es el responsable del olor, así como de evitar la proliferación de bacterias, mientras que el timol actúa como desinfectante y fungicida. La composición del aceite puede variar dependiendo de diversos factores como tipo de cultivo, época del año del cultivo, tipo de suelo, además del tipo de orégano en cuestión (Rostro-Alanís *et al.*, 2019). Existen diversas especies de orégano originarios de diversos lugares como Asia o Europa. El orégano mexicano *Poliomintha longiflora*, es una de las especies más importantes en nuestro país. A pesar de existir algunos estudios sobre la actividad antifúngica del orégano, existen muy pocos sobre el orégano mexicano fraccionado. Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo evaluar el

efecto del aceite esencial de *Poliomintha longiflora* y sus fracciones concentradas sobre el crecimiento de *A. brasiliensis (niger)* y de esta forma, aportar datos para determinar la interacción de los compuestos presentes sobre la actividad antifúngica.



**Figura 1.** A) Morfología típica microscópica de *A. brasiliensis (niger)* 40x con la técnica de la cintilla en tinción de azul de lactofenol. B) Morfología macroscópica de 5 días de incubación en PDA a 27°C (Fotografías originales obtenidas en el laboratorio de alimentos funcionales).

## Materiales y métodos.

### Aceites esenciales (AE).

El aceite esencial de orégano y las fracciones concentradas fueron obtenidas mediante tecnología de arrastre de vapor, y fueron proporcionados por la empresa Or-Lag. La solución madre de AE fue preparada con Dimetil sulfóxido (DMSO, 60/40 v/v respectivamente) para solubilizarlo. Para los ensayos se utilizó el aceite esencial de orégano puro (AEP) como punto de comparación con las fracciones obtenidas F1, II, III, IV, FR (fracción residual).

### Cepa fúngica, inóculo y condiciones de cultivo.

La cepa fúngica que se utilizó en este estudio fue *Aspergillus brasiliensis (niger)* ATCC 16404 que fue obtenida de la colección American Type Culture Collection (ATCC). La cepa fue conservada a 27°C en medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Para su activación se sembró por picadura central en placas Petri conteniendo agar PDA incubándose durante 5 días (para su esporulación) a la temperatura arriba mencionada. Posteriormente las conidias fúngicas fueron extraídas con un asa y suspendidas en solución salina conteniendo 0.05% de tween 80 (v/v). Finalmente, las conidias fúngicas se contabilizaron en una cámara de Newbauer y fueron ajustadas a una concentración de  $3 \times 10^6$  conidias/mL para posteriores análisis (Torres-Alvarez *et al.*, 2020).

### **Prueba de difusión en disco.**

La prueba de difusión en disco se realizó de acuerdo con Torres-Alvarez *et al.*, 2020, utilizando placas petri conteniendo agar PDA estéril. Primeramente, se inoculó la placa petri con 100 $\mu$ L de las conidias suspendidas y ajustadas a 3x10<sup>6</sup> conidias/mL. Posteriormente se colocó en el centro de la placa papel filtro estéril impregnado con la fracción de AE de orégano. Las placas se incubaron durante 5-7 días a 27°C y se midieron los halos de inhibición en centímetros (cm).

### **Concentración mínima inhibitoria (CMI) y fungicida (CMF).**

El ensayo de CMI y CMF, se realizó en placas de 96 pozos de acuerdo con la metodología reportada por Rosas-Taraco *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se colocaron 270  $\mu$ L de caldo PDA en cada pozo previamente inoculado al 1% (v/v) con las conidias previamente ajustadas a 3x10<sup>6</sup>. Posteriormente se colocaron 30  $\mu$ L del aceite esencial diluido en DMSO (60/40 v/v). Se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones que variaron desde 6 hasta 0.000006% (60,000-0.06 ppm). Las placas de 96 pozos se incubaron a 27°C/5 días. Para confirmar la ausencia de crecimiento, se sembró una alícuota de cada pozo mediante la técnica de goteo reportada por Miles and Misra y se incubó de la misma manera antes mencionada. Como control se utilizó caldo con DMSO sin adición del orégano. La CMI se consideró como aquella concentración menor que causara un daño visible en la morfología macroscópica y microscópica del hongo, mientras que la CMF aquella que inhibiera completamente el crecimiento fúngico. Los resultados derivados de estos análisis se reportan de forma preliminar, ya que en estos momentos nos encontramos acortando rangos de concentraciones puntuales para obtener las desviaciones estándar y diferencias significativas. Es por ello, que los resultados obtenidos no presentan desviaciones estándar.

### **Morfología Macroscópica y Microscópica.**

Para la determinación de la morfología macroscópica, se consideraron cambios en la coloración del hongo, mientras que para la microscópica se observó mediante una tinción de azul de lactofenol observándose en un microscopio Leica a una amplitud de 40x. Como control se utilizó la morfología macroscópica y microscópica del hongo sin ningún tratamiento, incubado en agar PDA durante 5 días a 27°C (Figura 1).

### **Análisis estadístico.**

Los datos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 22, con un nivel de confianza del 95% y un test post-hoc de Tukey.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Actividad antifúngica.**

Las pruebas preliminares de difusión en disco indicaron que las fracciones III, IV y FR, presentaron actividad antifúngica, siendo la FIV aquella significativamente mayor (58  $\pm$ 0.0 mm) comparada con el AEP (54.5 $\pm$ 0.15) (Tabla I). La FIII y FR presentaron actividad significativamente menor comparadas con el AEP y FIV (Tabla I).

**Tabla I.** Diámetros de inhibición obtenidos como resultado de la actividad antifúngica del AE de orégano y sus fracciones concentradas.

Fracción	Identificación	Inhibición en (mm)
Aceite de orégano puro	AEP	54.5±0.15 <sup>a</sup>
Fracción 1	FI	NI
Fracción 2	FII	NI
Fracción 3	FIII	36.5±1.35 <sup>c</sup>
Fracción 4	FIV	58±0.0 <sup>b</sup>
Fracción residual	FR	42.5±0.75 <sup>c</sup>

De acuerdo con (Borrego *et al.*, 2012) para considerar que los AEs presentan actividad antifúngica el diámetro de los halos de inhibición deben ser superiores a 11 mm. En el caso de las fracciones III, IV y FR, los diámetros se encuentran por encima de esta medida, por lo que se consideraron para análisis posteriores, de CMI y CMF.

Los resultados preliminares de la CMI y CMF reportados en ppm se encuentran en la Tabla II. La CMI definida como la concentración mínima que causó cambios macroscópicos en coloración, y reducción del crecimiento estuvo en rangos de 60-6 ppm, mientras que la CMF definida como aquella concentración que inhibió por completo el crecimiento, varió en rangos de 600-60 ppm. De acuerdo con los resultados preliminares observados, la FIV y FR mantienen la misma actividad que el AEP, mientras que la FIII es menor. De acuerdo a Torres-Alvarez *et al.*, (2020), la actividad antifúngica puede estar influenciada por los compuestos presentes en cada fracción, los cuales pueden interactuar sinérgicamente. Al fraccionar el AEP se producen cambios en la composición de cada fracción obtenida y esto puede influir en su actividad antifúngica. Rostro-Alanís *et al.* (2019) reportan diferencias importantes en el contenido de compuestos al fraccionar aceite esencial de orégano, en donde las principales diferencias es la variación en los compuestos mayoritarios de cada fracción, así mismo de los monoterpenos oxigenados. Estos hallazgos reportados previamente podrían estar relacionados con la variabilidad en los efectos antifúngicos reportados en este estudio.

**Tabla II.** Resultados preliminares de la concentración fúngica inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).

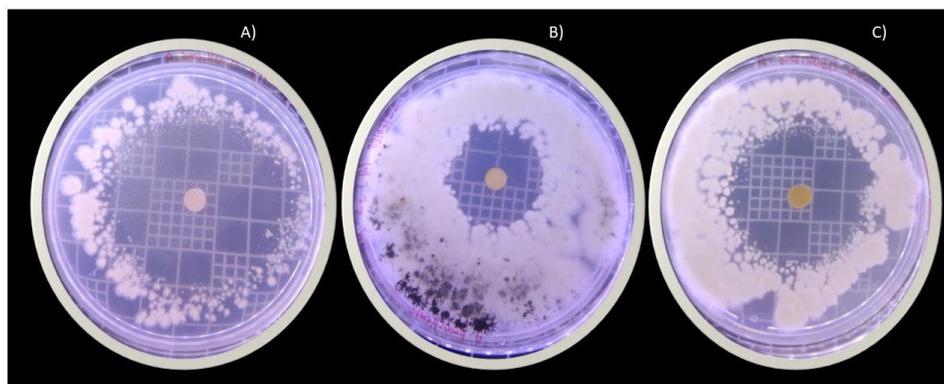
Fracción	CMI (ppm)	CMF (ppm)
AEP	6	60
FI	ND	ND
FII	ND	ND
FIII	60	600
FIV	6	60
FR	6	60

Los resultados son preliminares, por lo que no se reportan desviaciones estándar.

ND: No determinado

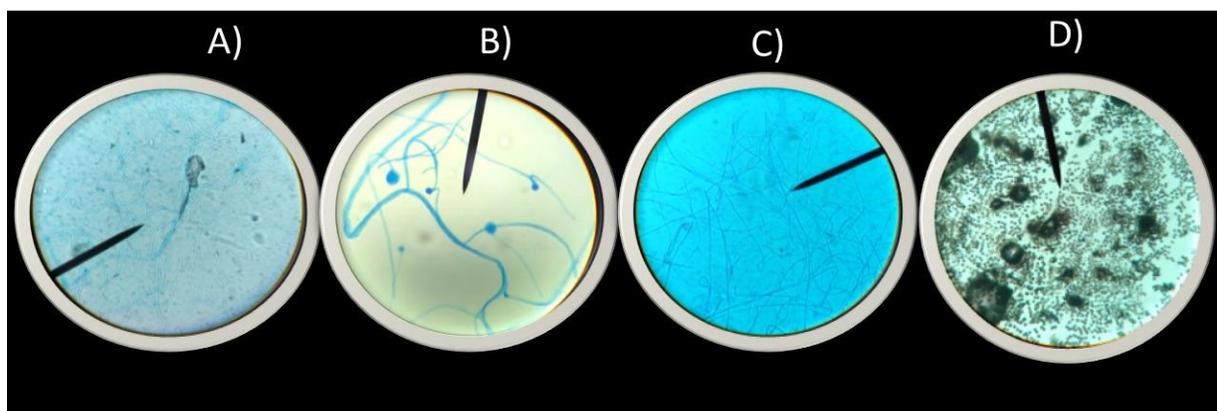
**Efectos en la morfología macroscópica y microscópica.**

Tomando como base la morfología original y típica de *Aspergillus brasiliensis* (*niger*) sin adición de AEs (Fig. 1), uno de los cambios macroscópicos más importantes, fue un crecimiento pobre no homogéneo además de la ausencia de la coloración típica del hongo alrededor de los halos de inhibición en la prueba de difusión en disco (Fig. 2), así como en la CMI. Esto podría indicar una inhibición de la conidiogénesis. Al realizar el análisis microscópico se comprobó este hallazgo (Fig. 3). Resulta de interés dicha inhibición porque la germinación de los conidios es la manera más común de reproducción, pues a través de este mecanismo los hongos son capaces de colonizar otras partes del sustrato dañado ya que los conidios son esparcidos por el aire con mayor facilidad y pueden viajar de esta forma largas distancias (Cepero de García, 2012). Esto podría indicar que los compuestos volátiles tienen un efecto importante sobre el hongo, que, a pesar de presentar crecimiento macroscópico, no tiene la capacidad de producir conidias.



**Figura 2.** Halos de inhibición obtenidos de la prueba de difusión en disco. A) FIV, B) FR, C) AEP. Nótese la morfología macroscópica: ausencia de coloración, crecimiento pobre y no-homogéneo.

Se ha reportado que el carvacrol y el timol, podrían interferir en alguna etapa del ciclo replicativo del hongo (Ramos & Rojas, 2020). Sin embargo, podría existir una sinergia en los compuestos presentes en cada fracción aquí estudiada, las cuales serán analizadas próximamente para confirmar esta teoría.



**Figura 3.** Morfología microscópica analizada mediante tinción de lactofenol con la técnica de cintilla. Los resultados presentados corresponden al quintodía de incubación en PDA a 27°C. A) FIV, B) FR, C) AEP D) Control (sin tratamiento). Nótese la ausencia total de conidias, fiálides y vesícula en A) y C), mientras que en B) se observan muy pocas vesículas sin conidias. Por otra parte, obsérvese en D) conidias, conidióforos, vesículas y fiálides.

### CONCLUSIÓN

El AEP y las FIV, FR de *Poliomintha longiflora* inhiben el desarrollo de *A. brasiliensis (niger)*, afectando el ciclo de reproducción de dicho organismo. El grado de inhibición varió de acuerdo con el tipo de fracción, siendo la FIV la que presentó mayor actividad antifúngica, por lo que futuros estudios serán llevados a cabo para la identificación de los compuestos presentes en dichas fracciones.

### BIBLIOGRAFÍA

- Borrego, S. (2012). *Factores externos del deterioro en el patrimonio documental*. Editorial Académica Española, España.
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 118, 20.
- Cepero de García, M. C. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.
- Evangelista-Martínez, Z., Reyes-Vázquez, N., & Rodríguez-Buenfil, I. (2018). Evaluación antimicrobiana de aceites esenciales de plantas contra microorganismos patógenos: Estudio in vitro del aceite de orégano combinado con conservadores alimenticios convencionales. *Acta universitaria*, 28(4), 10-18.
- De Menezes Filho, A. C. P., de Sousa, W. C., de Oliveira Filho, J. G., & de Souza Castro, C. F. (2020). Efecto antifúngico por el aceite esencial de las hojas y tallos de *Schinus molle* sobre las cepas de *Aspergillus* sp. *Revista Cubana de Farmacia*, 53(3), 1-14.
- González Salgado, A. (2009). Diagnóstico y control de especies de " *Aspergillus*" productoras de ocratoxina A.
- Gramajo, M. G. P. (2019). Aplicación de los métodos de conservación de alimentos. *Revista Ingeniería y Ciencia*, 1(15).
- Ramos-Velasquez, D. A., & Rojas-Bustamante, L. (2020). Revisión sistemática: actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre fitopatógenos.
- Rosas-Taraco, A., Sánchez, E., García, S., Heredia, N., & Bhatnagar, D. (2011). Extracts of *Agave americana* inhibit aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *World Mycotoxin Journal*, 4(1), 37-42.

- Rostro-Alanis, M. D. J., Báez-González, J., Torres-Alvarez, C., Parra-Saldívar, R., Rodríguez-Rodríguez, J., & Castillo, S. (2019). Chemical composition and biological activities of oregano essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation. *Molecules*, 24(10), 1904.
- Rueda-Puente, E. O., Juvera-Bracamontes, J. J., Romo-López, I. G., & Holguín-Peña, R. J. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9 (SPE20), 4251-4261.
- Torres-Alvarez, C., Castillo, S., Sánchez-García, E., Aguilera-González, C., Galindo-Rodríguez, S. A., Gabaldón-Hernández, J. A., & Báez-González, J. G. (2020). Inclusion complexes of concentrated orange oils and  $\beta$ -cyclodextrin: Physicochemical and biological characterizations. *Molecules*, 25(21), 5109.
- Vega, A. S., Valdés, L. F., & Rendón, A. C. (2002). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT*, 38(128), 33-42.
- Vignola, M. B., Serra, M. A., & Andreatta, A. E. (2020). Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos. *Revista Tecnología y Ciencia*, (37), 92-100.
- Young, G. D., Rodríguez, F. J., & Piedra, J. M. S. (2019). Ocratoxina A en café. *Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos*, 3(3), ág-21.