



Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos

R. M. García-García*, E. Palou-García

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas – Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México.

Resumen

Existe actualmente una gran variedad de agentes antimicrobianos que se utilizan para la conservación de alimentos; sin embargo, la demanda de los consumidores por adquirir productos alimenticios con ingredientes lo más naturales posibles, ha llevado a la investigación de sustancias naturales que posean actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés en alimentos. Entre estas sustancias se encuentran el carvacrol y el timol, los cuales provienen de especias como el orégano y el tomillo, contando con un gran poder antimicrobiano. Para conocer su funcionamiento es importante conocer sus mecanismos de acción dentro de la célula microbiana, con el objetivo de ser utilizados de manera segura y confiable en la elaboración de alimentos. En este artículo se hace una revisión de los mecanismos de acción de carvacrol y timol en diferentes microorganismos de importancia en alimentos, permitiendo conocer sus alcances y limitaciones.

Palabras clave: agentes antimicrobianos, carvacrol, timol, mecanismos de acción.

Abstract

There is a great variety of natural and synthetic antimicrobial agents which are used for food preservation; nevertheless the demand of the consumers to acquire nutritional products with ingredients as natural as possible has taken to the investigation of natural substances that have antimicrobial activity against microorganisms of interest in foods. Among these substances are carvacrol and timol, which come from spices like oregano and thyme and have great antimicrobial power. In order to be able to know their operation it is important to know their mechanisms of action within the microorganism's cell with the objective to be used in a safe and reliable way in foods. This article presents a review of the mechanisms of action of carvacrol and tymol against different microorganisms of importance in foods as well as their limits of both as microbial agents.

Keywords: antimicrobial agents, carvacrol, thymol, mechanisms of action.

Introducción

La inocuidad de los alimentos se incrementa y garantiza con el uso de compuestos

llamados antimicrobianos (Davidson, 1997), ya que estas sustancias se añaden a los alimentos para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos; sin embargo, la demanda de los

* Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: grebecag@yahoo.com.mx

consumidores por adquirir compuestos más naturales y sin tantos conservadores químicos ha hecho que aumente la investigación y el uso de agentes antimicrobianos naturales. Dentro de éstos, los más estudiados son los que se encuentran presentes en hierbas y especias, a partir de las cuales se pueden extraer aceites esenciales que poseen actividad antimicrobiana (Ultee *et al.*, 1998).

Entre las sustancias activas presentes en los aceites esenciales de hierbas y especias, se encuentran diversos compuestos fenólicos como es el caso del carvacrol y el timol, que poseen actividad antifúngica y antibacteriana. Estos compuestos han sido probados en diferentes microorganismos de importancia en alimentos como por ejemplo: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizobium leguminosarum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thipymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio vulnificus*, y *Bacillus cereus*, entre otros (Ultee *et al.*, 1998).

En específico, los estudios demuestran que carvacrol y timol tienen varios sitios de acción dentro de las células y dependiendo de las concentraciones utilizadas pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (Eklund, 1989). Los blancos o puntos de ataque de estos agentes antimicrobianos dentro de las células incluyen la pared y membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistema genético (Davidson y Branen, 1993).

En este trabajo se realizó una investigación bibliográfica sobre el mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos timol y carvacrol de manera individual, así como de sus mezclas sobre microorganismos de interés en alimentos, para conocer de manera específica sus efectos, ventajas y limitaciones.

Revisión bibliográfica

Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son compuestos químicos presentes o añadidos en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o causan la muerte de los microorganismos (López-Malo *et al.*, 2000). Muchos de los agentes antimicrobianos producidos actualmente en forma sintética se encuentran también en forma natural como componentes de ciertos alimentos. Estos compuestos químicos con acción antimicrobiana pueden clasificarse como aditivos tradicionales con acción directa o indirecta. Entre los aditivos antimicrobianos con acción directa aprobados para ser utilizados en alimentos se incluyen nitratos y nitritos, sorbatos, benzoatos así como ésteres, fenoles, ácidos orgánicos y sus derivados. Los agentes antimicrobianos con acción indirecta son sustancias químicas añadidas con otros objetivos diferentes a la acción antimicrobiana, como por ejemplo fosfatos y antioxidantes fenólicos (Davidson y Branen, 1993).

Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) son: ácido propiónico y propionatos, ácido sóblico y sorbatos, ácido benzoico y benzoatos, parabenos, sulfitos, óxido de etileno y propileno, diacetato de sodio, nisina y nitrito de sodio, entre otros (Jay, 2002).

Entre los antimicrobianos naturales más estudiados se encuentran los presentes en plantas, hierbas y especias, los cuales son utilizados en alimentos tratando de sustituir los antimicrobianos sintéticos, debido a la tendencia de los consumidores por consumir

productos lo más naturales posibles (Holley y Patel, 2005).

muerte (curva de supervivencia), en el cual el número de células viables en el medio de

TABLA I. Componentes de aceites esenciales que presentan propiedades antimicrobianas^a

| Nombre común de la planta | Nombre científico de la planta | Componente | % máximo presente en el aceite esencial |
|---------------------------|--------------------------------|--|---|
| Cilantro | <i>Coriandrum sativum</i> | Linalool E-2-decanal | 26% 20% |
| Canela | <i>Cinnamomum zeylandicum</i> | Trans-cinnamaldehido | 65% |
| Orégano | <i>Origanum vulgare</i> | Carvacrol Timol Terpineno Cymeno | 80% 64% 2-52% 52% |
| Romero | <i>Rosmarinus officinalis</i> | Pineno Acetato de bornil Canfor 1,8 Cineolo | 2-25% 0-17% 2-14% 3-89% |
| Clavo | <i>Syzygium aromaticum</i> | Eugenol Acetato de eugenil | 75-85% 8-15% |
| Tomillo | <i>Thymus vulgaris</i> | Timol Carvacrol Terpineno Cimeno | 10-64% 2-11% 2-31% 10-56% |

Se reconoce que los compuestos activos de plantas, hierbas y especias son compuestos fenólicos. De acuerdo con Holley y Patel (2005), estos compuestos son probablemente los componentes antimicrobianos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de las especias. Bauer *et al.* (2001) señalaron que el mayor componente puede constituir el 85% del aceite esencial, mientras que otros componentes pueden estar presentes sólo en trazas. Los componentes de algunos aceites esenciales con propiedad antimicrobiana son presentados en la Tabla 1.

La rapidez del efecto bactericida o la duración del efecto bacteriostático de los agentes antimicrobianos puede ser determinada por el análisis de tiempo de

cultivo después de haber adicionado el aceite esencial es graficado contra el tiempo (Burt, 2004). Así mismo, el daño ocasionado a la pared celular y la pérdida del contenido celular puede ser estudiado por microscopía electrónica (Lambert *et al.*, 2001).

Mecanismos generales de acción de los agentes antimicrobianos naturales

Los aceites y extractos de plantas, principalmente de clavo, orégano, tomillo y algunos otros, presentan actividad inhibitoria contra ciertos microorganismos de importancia en alimentos (Holley y Patel, 2005). Considerando el gran número de diferentes grupos de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es importante decir que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un

mecanismo específico; sin embargo, existen algunos sitios de acción en la célula en dónde pueden ocurrir los siguientes efectos: daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz (Skandamis y Nychas, 2001).

Una característica importante de los componentes de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, la cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenando la estructura y haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares (Oosterhaven *et al.*, 1995). Burt *et al.* (2007), señalaron que al exponer las células a concentraciones subletales de agentes antimicrobianos naturales (como carvacrol y timol), hay cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados.

La estructura química de los componentes individuales de los aceites esenciales afecta su modo preciso de acción y su actividad antimicrobiana. La importancia de la presencia de los grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos ha sido confirmada (Dorman y Deans, 2000). Hay estudios que demuestran los efectos antimicrobianos que ejercen los compuestos aromáticos sobre la membrana citoplasmática, alterando su estructura y por consiguiente su función. Por ejemplo, Enomoto *et al.* (1991) en estudios con *E. coli* observaron una disminución en el potencial de membrana al exponer las células microbianas a algunos compuestos aromáticos como eugenol y carvacrol. Walsh *et al.* (2003), reportaron al realizar estudios con timol, eugenol y triclocarbón (TCC), que los dos primeros agentes antimicrobianos presentaban efecto bactericida contra microorganismos Gram negativos y positivos, provocando daño en la membrana

celular y salida de los componentes intracelulares, sin embargo, TCC no provocó efectos letales en las células.

Generalmente, el flujo de iones potasio es una muestra temprana del daño a la membrana citoplasmática y es seguido por el flujo de los demás constituyentes citoplasmáticos (Ultee *et al.*, 2002). La pérdida de la permeabilidad de la membrana es identificada como causa de la muerte celular y depende de la hidrofobicidad de los solutos que cruzan la membrana y de la composición de la misma. El coeficiente de partición de los aceites esenciales en las membranas celulares es un determinante crucial para su efectividad, por lo que se esperan variaciones cuantitativas en la actividad de los agentes antimicrobianos contra diferentes bacterias (Lambert *et al.*, 2001). Algunas investigaciones señalan que la pérdida de la funcionalidad de la membrana es sólo una parte de la explicación de la actividad antimicrobiana que presentan dichos agentes (Burt, 2004).

Los componentes de los aceites esenciales también parecen actuar sobre las proteínas de las células que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática. Las enzimas ATPasas que se encuentran localizadas en dicha membrana pueden ser alcanzadas por las moléculas lipídicas, viéndose afectada la regulación de energía y la síntesis de componentes estructurales (Elgayyar *et al.*, 2001).

Los componentes de los aceites esenciales, básicamente timol, carvacrol y eugenol, los cuales son compuestos fenólicos, poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos de interés en alimentos (Lambert *et al.*, 2001) y es razonable pensar que su mecanismo de acción es similar al de otros compuestos fenólicos, provocando desorden en la membrana citoplasmática,

rompimiento de la fuerza motriz del protón, flujo de electrones y coagulación del contenido celular (Davidson, 1997). Además, a diferencia de muchos antibióticos, los constituyentes hidrofóbicos de los aceites esenciales son capaces de entrar en el periplasma de las bacterias Gram negativas a través de las proteínas de la membrana externa (Lambert *et al.*, 2001).

Conner y Beuchat (1984) señalaron que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en levaduras se debe al daño ocasionado a algunos sistemas enzimáticos involucrados con la producción de energía y síntesis de componentes estructurales. Algunos compuestos fenólicos cruzan la membrana citoplasmática e interaccionan con proteínas y enzimas de membrana, causando un flujo opuesto de protones afectando la actividad celular.

Carvacrol

Carvacrol (o 2-metil-5-(1-metiletil) fenol) está presente en los aceites esenciales de orégano (entre 60-70%) y tomillo (en un 45%) (Ultee *et al.*, 2002). Su estructura química está representada por un grupo fenólico (Fig. 1), con un alto poder hidrofóbico. De todos los agentes antimicrobianos naturales, carvacrol es uno de los que más atención ha recibido en su mecanismo de acción; es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001), provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón (Burt *et al.*, 2007).

De acuerdo con Ultee *et al.* (2000), en general se pueden distinguir tres fases físicas de las membranas celulares: una bicapa en

fase gel (cadena de lípidos ordenada), una bicapa en fase líquida-cristalina (cadena de lípidos desordenada) y una estructura hexagonal. Para una funcionalidad biológica

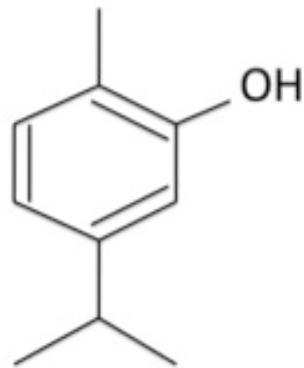


Fig. 1. Estructura química de carvacrol (López – Malo, 2000)

óptima, la membrana debe mantenerse en estado fluido líquido cristalino y la temperatura de transición (T_m) de la fase gel a la líquida-cristalina constituye la principal influencia sobre la flexibilidad y estabilidad de la membrana. Por lo que la actividad antimicrobiana del carvacrol probablemente tiene efectos sobre dichas propiedades. Es importante mencionar que cuando la concentración de carvacrol aumenta, mayor cantidad de este componente es acumulado en la membrana y por consiguiente el daño en la membrana es mayor (Ultee *et al.*, 2000).

Estudios con *B. cereus* han demostrado que el carvacrol interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolípídica, alineándose entre las cadenas de ácidos grasos. Esta distorsión de la estructura física puede causar la expansión y desestabilización de la membrana, incrementando la fluidez de la misma, provocando un aumento en la permeabilidad (Ultee *et al.*, 2002).

Las mediciones del potencial de membrana de las células de *B. cereus* en la fase exponencial de crecimiento, revelan una fuerte disminución en el momento de adicionar el carvacrol, lo que indica una debilitación de la fuerza motriz del protón. Además, los niveles intracelulares de iones potasio disminuyen mientras que los niveles extracelulares aumentan proporcionalmente (Ultee *et al.*, 2000). Esta manera de actuar, lleva a pensar que el carvacrol forma canales a través de la membrana por la separación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, permitiendo que los iones dejen el citoplasma (Ultee *et al.*, 2002).

Por otra parte, también es importante conocer el efecto de carvacrol sobre la toxina generada por *B. cereus*. Los estudios realizados por Ultee y Smid (2001) señalaron que la lisis celular provocada por carvacrol se lleva a cabo en la fase estacionaria. Sin embargo, la producción de la enterotoxina inicia en la fase exponencial obteniéndose los niveles máximos en la fase estacionaria; por lo que la lisis celular afecta los niveles finales de toxina, ya que son liberadas las proteasas y éstas degradan las proteínas de la enterotoxina. Durante la exposición de las células de *B. cereus* al carvacrol, la energía para la óptima secreción de la toxina no es suficiente, resultando en una acumulación de la misma en el interior de la célula y consecuentemente, la toxina intracelular inhibe su propia síntesis. No obstante, es posible que la disminución en la velocidad de crecimiento de la célula inhiba directamente la síntesis de la toxina. La producción de toxina requiere energía metabólica y con la presencia de carvacrol, las células usan su limitada energía para mantenerse viables y no para la producción de toxina (Ultee y Smid, 2001).

Estos mismos efectos fueron encontrados por Tassou y Nychas (1994) sobre células de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, estos

autores señalaron que este mecanismo no es válido para todos los microorganismos, ya que el daño ocasionado depende del agente antimicrobiano y del tipo de célula microbiana.

Lambert *et al.* (2001) mencionaron que carvacrol daña la membrana celular de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, provocando la disipación de dos componentes de la fuerza motriz del protón: el gradiente de pH y el potencial eléctrico; pudiendo ser mayor el daño a la membrana en presencia de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas ATPasas, entre otros. Así mismo, Conner *et al.* (1984) señalaron que carvacrol disminuye la actividad respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*.

Burt *et al.* (2007) señalaron que células de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración 1 mM sin síntesis de flagelos, provocando que el microorganismo crezca sin movilidad; al verse estresada, *E. coli* utiliza su energía en otras funciones vitales en vez de sintetizar flagelos. Sin embargo, a una concentración 5 mM cesa inmediatamente la movilidad y ocurre la muerte celular.

Timol

El timol (o isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol) ha sido reportado por varios autores (Falcone *et al.*, 2005; 2007; Lambertet *et al.*, 2001), como uno de los agentes antimicrobianos más activo de los constituyentes de los aceites esenciales. Se encuentra presente en el aceite esencial del tomillo (arriba del 50%), en el aceite esencial del orégano y en otras fuentes naturales como los aceites naturales de mandarina y tangerina (Falcone *et al.*, 2005). Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo (Fig. 2).

En particular el aceite esencial de tomillo es considerado GRAS, por lo que el timol no es considerado nocivo para la salud (Falcone *et al.*, 2005).

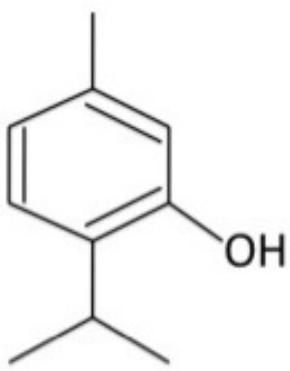


Fig. 2. Estructura química de timol (López – Malo, 2000)

El mecanismo de acción de timol es semejante al de carvacrol, ya que su estructura química es similar. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander *et al.*, 1998).

Juven *et al.* (1994) estudiaron el mecanismo de acción de timol contra *S. thiphymurium* y *S. aureus*, concluyendo que este agente antimicrobiano une las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, cambiando las características de permeabilidad de la misma. Así también, señalaron que el efecto inhibitorio de timol es mayor a un pH de 5.5 que a 6.5, ya que a bajos valores de pH la molécula del agente antimicrobiano no está disociada, logrando unir mejor las partes hidrofóbicas de las proteínas y, por lo tanto, facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana.

Lambert y Pearson (2000) señalaron que el timol cambia la permeabilidad de la

membrana de las células microbianas, dejando que se filtren los constituyentes químicos que son esenciales para el metabolismo, tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. Estos efectos causan un incremento de la fase lag, provocando una disminución en la carga celular total.

Es razonable suponer que las células microbianas formadoras de esporas pueden llegar a ser más resistentes al timol. Sin embargo, Chaibi *et al.* (1997) confirmaron sobre células de *B. cereus* y *Clostridium botulinum* que el timol puede inhibir algunos de los diferentes procesos involucrados en la transición de espora a célula, como la germinación, crecimiento y multiplicación celular. De igual manera, observaron que se requieren concentraciones más altas de timol para suprimir la multiplicación celular que para inhibir la germinación, probablemente por la naturaleza hidrofóbica de las esporas. Así mismo, Falcone *et al.* (2005) demostraron en sus estudios que las bacterias ácido lácticas son más resistentes al timol que las bacterias formadoras de esporas.

En los estudios realizados por Falcone *et al.* (2005) sobre *B. cereus*, se observa que a concentraciones entre 50 y 250 ppm de timol, el número de microorganismos alcanzados en la fase estacionaria disminuye de manera lineal con el incremento en la concentración del agente antimicrobiano. Así mismo, cuando la concentración es igual o mayor a 500 ppm, no se observa crecimiento, concluyendo que a altas concentraciones de timol el efecto es completamente inhibitorio.

Los estudios reportados por Falcone *et al.* (2005) señalaron que en presencia de timol algunos microorganismos deteriorativos como *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pichia subpelliculosa*, *Candida lusitaniae* y *S. cerevisiae*, cambian la permeabilidad de su membrana celular

permitiendo la salida de constituyentes químicos esenciales para su metabolismo, provocando un incremento de la fase lag y una disminución en la concentración microbiana de la fase estacionaria. Estos autores realizaron estudios de resistencia con diferentes cepas de *Bacillus* y *Lactobacillus*, observando que *L. curvatus* y *L. plantarum* presentan mayor resistencia al timol que las cepas de *Bacillus*. Similarmente, señalan que la susceptibilidad al efecto inhibitorio del timol es mayor en *B. subtilis* seguido de *B. cereus* y por último *B. licheniformis*. En lo concerniente a levaduras, observaron que *Candida lusitaniae* y *Saccharomyces cerevisiae* son menos sensibles a la acción del timol que *Pichia subpelliculosa*.

Es importante señalar que la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio, y temperatura de incubación (Falcone *et al.*, 2005).

Mezclas de antimicrobianos naturales

Existen varias razones que llevan a la combinación de agentes antimicrobianos para la inhibición de microorganismos. Entre ellas se encuentran (Eliopoulos y Mollering, 1991):

1. La probabilidad de que algunas colonias se vuelvan resistentes a algunos agentes antimicrobianos.
2. Algunos agentes sólo se pueden utilizar hasta ciertas concentraciones límites debido a regulaciones existentes, ya que pueden causar toxicidad si se utilizan por arriba de dichas concentraciones.
3. La presencia de sinergismo entre agentes.

Las mezclas de antimicrobianos en la industria alimentaria se utilizan con frecuencia; sin embargo, la forma en que

éstos interaccionan para proveer el efecto en contra de los microorganismos no ha quedado claramente dilucidada. Cuando dos antimicrobianos se usan en combinación pueden ocurrir alguna de las siguientes situaciones (Barry, 1976):

- Efecto aditivo. En el cual el efecto combinado es igual a la suma de los efectos observados con los dos agentes probados separadamente o es igual al efecto del agente más activo en la mezcla. Los efectos aditivos ocurren cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no mejora ni se reduce en presencia de otro agente.
- Efecto sinérgico. En el cual el efecto observado en combinación es mayor a la suma de los efectos observados con los dos agentes de manera independiente. Hay una mayor actividad antimicrobiana.
- Efecto antagónico. Esto ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto se reduce con la presencia del segundo agente.

La evaluación de la combinación de agentes antimicrobianos es necesaria debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo antimicrobiano, pero al ser expuesto a una combinación de agentes se puede vencer su resistencia (Eliopoulos y Mollering, 1991).

Burt y Reinders (2003) propusieron que los aceites esenciales (de orégano, tomillo y clavo, entre otros) ejercen su efecto antimicrobiano sobre los fosfolípidos en la capa externa de la membrana celular de las bacterias, provocando la formación de poros y afectando la permeabilidad de la membrana. Hay algunos mecanismos aceptados sobre la interacción antimicrobiana que producen sinergismo; entre ellos se

encuentran: la inhibición de una vía bioquímica, la inhibición de enzimas protectoras, la combinación de agentes activos de la célula y el uso de agentes activos de la célula para aumentar la acción de otros agentes antimicrobianos (Eliopoulos y Mollering, 1991).

Lambert *et al.* (2001) reportaron que la mezcla antimicrobiana de carvacrol y timol desintegra la membrana externa de *E. coli* y *S. typhimurium* a concentraciones cercanas a las mínimas inhibitorias; así mismo, señalaron que esta misma combinación de agentes antimicrobianos presenta un efecto aditivo sobre la inhibición de *P. aeruginosa* y *S. aureus* permitiendo la fuga de iones fosfato y potasio, provocando problemas en la permeabilidad de la membrana de dichos microorganismos. Por lo que concluyen que carvacrol y timol son permeabilizadores de membrana.

A pesar de que no hay suficiente información sobre el efecto combinado de agentes antimicrobianos naturales en alimentos, Santiesteban-López *et al.* (2007) señalaron que una mezcla sinérgica en contra de *Listeria innocua* incluye 50 ó 100 ppm de carvacrol, timol o eugenol con 100 ó 200 ppm de sorbato de potasio, dependiendo de la actividad de agua y del pH del medio. De la misma manera, León (2002) demostró en estudios realizados sobre *S. aureus* y *E. coli*, que en medios de cultivo sólidos existen mezclas ternarias sinérgicas de sorbato de potasio, carvacrol y timol. Así mismo, García (2005) al evaluar mezclas ternarias de carvacrol, timol y sorbato de potasio en medios líquidos, reportó de forma general 28 combinaciones sinérgicas, 15 aditivas y 9 antagónicas para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *L. innocua*, *S. typhimurium* y *E. coli*, siendo estos dos últimos microorganismos más sensibles a la acción de las mezclas de agentes antimicrobianos que los primeros.

Trabajos realizados por Basílico y Basílico (1999), señalaron que la producción de ocratoxina A producida por *Aspergillus ochraceus* es inhibida con 1000 mg/L de aceite esencial de orégano, que equivale a una mezcla de 50 mg/L de timol y 250 mg/L de carvacrol. Así mismo, señalan que *Aspergillus niger* es inhibido por una mezcla de carvacrol y timol a 200 mg/L.

A pesar de que existen varios estudios sobre mezclas de antimicrobianos, hay poca información sobre el mecanismo de acción de la combinación de agentes en diferentes microorganismos, por lo que es necesario seguir investigando los mecanismos de acción de las mezclas antimicrobianas, para poder utilizar esta alternativa de conservadores en la industria de alimentos.

Conclusiones

El carvacrol y el timol, los cuales están presentes de manera natural en algunas especies como el orégano y el tomillo, 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. Estos agentes antimicrobianos son efectivos para inhibir un gran número de microorganismos de interés en alimentos; sin embargo, es necesario seguir profundizando en el conocimiento de su mecanismo de acción para poder utilizarlos de manera segura como conservadores naturales. De igual manera, el uso de las mezclas de agentes antimicrobianos se ve limitada al existir pocos estudios que expliquen sus mecanismos de acción sobre los microorganismos patógenos y deteriorativos.

Por lo tanto, se recomienda profundizar en el mecanismo de acción de las mezclas decarvacrol y timol, así como de sus mezclas con otros agentes antimicrobianos, para entender de manera clara el efecto sinérgico, aditivo o antagónico. A medida que se conozcan los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos y sus mezclas, podrán ser utilizados de mejor manera en la industria de alimentos, logrando cumplir con las exigencias de los consumidores que requieren alimentos más saludables con la menor cantidad de conservadores químicos.

Referencias

- Barry, A. L. 1976. *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices*. Lea & Febiger. Filadelfia. 335 p.
- Basílico, M. Z. y Basílico, J. C. 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxinA production. *Letters in Applied Microbiology*. 24(4):238-241.
- Bauer, K., Garbe, D. y Surburg, H. 2001. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. Wiley-VCH. Weinheim. 293 p.
- Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223-253.
- Burt, S. A. y Reinders, R. D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36:162-167.
- Burt, S. A., Van der Zee, R., Koets, Ad. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. y Veldhuizen, J. A. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(14):4484-4490.
- Conner, D. E. y Beuchat, L. R. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *Journal of Food Science*. 49:429-434.
- Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E. y Hitchcock, H. L. 1984. Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 1:63-74.
- Chaibi, A., Ababouch, L. H., Belasri, K., Boucetta, S. y Busta, F. F. 1997. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*. 14:161-174.
- Davidson, P. M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville (Eds). *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington D.C. pp. 520-556.
- Davidson, P. M. y Branen, A. L. 1993. *Antimicrobials in Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 95-136.
- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308-316.
- Eklund, T. 1989. Organic acids and esters. En: G.W. Gould (Ed). *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science. Londres. pp. 161 - 200.
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A. y Mount, J. R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 64(4):1019-1024.
- Eliopoulos, G. M. y Moellering, R. C. 1991. Antimicrobial combinations. En: V. Lorian (Ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Tercera Edición. Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 406-432.
- Enomoto, S., Kashiwayanagi, M. y Kurihara, K. 1991. Liposomes having high sensitivity to odorants. *Biochimica et biophysica acta*. 1062(11):7-12.
- Falcone, P., Mastromatteo, M., Del Nobile, M., Corbo, M. y Sinigaglia M. 2007. Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*. 70(2):425-431.
- Falcone, P., Speranza B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R. y Sinigaglia M. 2005. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a

- natural preservative. *Journal of Food Protection*. 68(8):1664-1670.
- García, R. M. 2005. *Agentes bactericidas / bacteriostáticos a partir de sorbato de potasio, carvacrol y timol*. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.
- Helander, I. M., Alakomi, H-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I. Smid, E. J., Gorris, L. G. M. y Wright, A. V. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3590-3595.
- Holley, R. y Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essentials oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22:273-292.
- Jay, J. 2002. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Cuarta Edición. Editorial Aciriba, S.A. Zaragoza, España. 239 p.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F. y Weissolowics, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oils and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:626-631.
- Lambert, R. J. W. y Pearson, J. 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*. 88:784-790.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91:453-462.
- León, R. 2002. *Espectro de acción de mezclas ternarias de agentes antimicrobianos*. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.
- López-Malo, A. 2000. *La preservación multiobjetivo de alimentos: Efectos de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de Aspergillus flavus*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M. y Guerrero, S. 2000. Natural antimicrobials from plants. En: S. M. Alzamora, M. S. Tapia, y A. López-Malo (Eds). *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications*. Aspen Publishers, Inc. New York. pp 201-215.
- Oosterhaven, K., Poolman, B. y Smid, E. J. 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*. 4:23-31.
- Santiesteban-López, A., Palou, E. y López-Malo A. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a_w and pH. *Journal of Applied Microbiology*. 102(2):486-497.
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J-E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91:1011-1022.
- Tassou, C. C. y Nychas, G. J. E. 1994. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in a model food system. *Journal of Food Protection*. 59:412-415.
- Ultee, A. y Smid, E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 64:373-378.
- Ultee, A., Bennink, M.H.J. y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4):1561-1568.
- Ultee, A., Gorris, L. G. M. y Smid, E. J. 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*. 85(2):211-218.
- Ultee, A., Kets, E.P.K., Alberda, M., Hoekstra F.A. y Smid, E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*. 174:233-238.
- Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneaus, D. L. y Bartolo R. G. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 94:240-247.