



Evaluación de mezclas binarias y ternarias de carvacrol, timol y eugenol para la inhibición de *Listeria innocua*

R. M. García – García*, E. Palou – García, A. López – Malo

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

Resumen

La investigación de agentes antimicrobianos naturales como conservadores de alimentos cada día toma más auge. Por tal motivo, en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de carvacrol, timol y eugenol así como de sus mezclas binarias y ternarias sobre *Listeria innocua* en sistemas modelo líquidos. Para ello, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de estos agentes en forma individual y después se evaluaron sus mezclas binarias y ternarias. Los sistemas fueron inoculados con *L. innocua* y se incubaron durante 72 horas a 35°C. Se determinó el desarrollo microbiano a través de la turbidez de cada uno de ellos cada 24 horas. De los resultados obtenidos, se observó que el agente antimicrobiano más efectivo en forma individual es carvacrol, seguido de timol y finalmente eugenol en concentraciones de 150, 250 y 450 ppm respectivamente. Se observó que la mezcla binaria más efectiva es la que contiene 75 ppm de carvacrol y 62.5 ppm de timol. Así mismo, la mezcla ternaria conteniendo 75 ppm de carvacrol, 31.25 ppm de timol y 56.25 ppm de eugenol fue la más efectiva. Se concluye que las combinaciones de carvacrol, timol y eugenol funcionan adecuadamente para inhibir el crecimiento de *L. innocua*.

Palabras clave: mezclas antimicrobianas, carvacrol, timol, eugenol, *L. innocua*.

Abstract

Nowadays the investigation of natural antimicrobial agents as food preservatives, takes an important role in food processing. By such reason in this work, the antimicrobial effect of three natural agents (carvacrol, thymol and eugenol) was evaluated as well as their binary and ternary mixtures on *Listeria innocua* inhibition in liquid model systems. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of these agents were determined and binary and ternary mixtures were evaluated. The culture media were inoculated with *L. innocua* and were incubated for 72 hours at 35°C. The turbidity of each system was determined every 24 hours. From the obtained results, it was observed that the most effective antimicrobial individual agent was carvacrol, followed by thymol and finally eugenol in concentrations of 150, 250 and 450 ppm, respectively. It was observed that the most effective binary mixture was 75 ppm of carvacrol and 62.5 ppm of thymol. Also, the ternary mixture carvacrol-thymol-eugenol in concentrations of 75, 31.25 and 56.25 ppm respectively, was the most effective for *L. innocua* inhibition. We conclude that the mixtures of these three natural antimicrobial agents work adequately to inhibit *L. innocua* growth.

Key words: antimicrobial mixtures, carvacrol, thymol, eugenol, *L. innocua*.

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

Introducción

La presencia de microorganismos patógenos y deteriorativos en los alimentos, así como la exigencia de los consumidores por ingerir alimentos lo más naturales posibles, ha provocado que la investigación sobre el uso de agentes antimicrobianos naturales aumente considerablemente.

Los agentes antimicrobianos son compuestos presentes o añadidos a los alimentos para causar la muerte de los microorganismos o retardar su crecimiento ([López-Malo *et al.*, 2000](#)). El uso de agentes antimicrobianos es una de las técnicas más antiguas para conservar los alimentos ([López-Malo *et al.*, 2005](#)).

Tradicionalmente, sólo un agente antimicrobiano era utilizado para conservar un alimento ([Busta y Foegeding, 1983](#)); sin embargo, recientemente el uso de mezclas de agentes para la conservación de los alimentos han sido utilizadas. Teóricamente, el uso de mezclas de agentes antimicrobianos provee un mayor espectro de actividad provocando un incremento en la acción antimicrobiana sobre microorganismos patógenos o deteriorativos. Se cree que la mezcla de agentes antimicrobianos puede actuar sobre diferentes especies de una mezcla de microorganismos, o actuar sobre diferentes puntos vitales dentro de especies similares, lo cual resulta en un mejor control de los microorganismos presentes en el alimento, en comparación a que si se utilizara de manera individual un agente antimicrobiano ([Santiesteban-López *et al.*, 2006](#)).

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 agente antimicrobiano. Sin embargo, al ser expuesto a una combinación de agentes, el

microorganismo se vuelve menos resistente provocando su inhibición o muerte ([León, 2002](#)).

Los métodos para evaluar las mezclas de agentes antimicrobianos generalmente incluyen: difusión en agar, dilución en agar o caldo o curvas de muerte. Los métodos de dilución producen datos cuantitativos obtenidos frecuentemente de la combinación de diferentes concentraciones de dos agentes antimicrobianos siguiendo el diseño tipo tablero de ajedrez. Este diseño es la técnica utilizada con mayor frecuencia para evaluar las mezclas de agentes antimicrobianos *in vitro*, debido a que ([Eliopoulos y Moellering, 1991](#)):

- a) Es fácil de entender.
- b) Los cálculos matemáticos necesarios para entender e interpretar los resultados son fáciles.
- c) Se puede llevar a cabo en el laboratorio de manera sencilla utilizando sistemas de dilución.
- d) Ha sido la técnica más utilizada en estudios que han investigado interacciones sinérgicas de antibióticos en tratamientos clínicos.

Los estudios de las mezclas de agentes antimicrobianos también tienen como propósito determinar el tipo específico de interacción que ocurre entre los agentes combinados. Tradicionalmente, los términos aditivo, antagonista y sinérgico son usados para describir la posible interacción de dichos agentes. Para interpretar el tipo de interacción generalmente se utiliza la concentración fraccional inhibitoria (CFI), la cuál se define como la concentración que se requiere de un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de un microorganismo cuando está combinado con una concentración conocida de otros agentes ([López-Malo *et al.*, 2005](#)). Para obtener los valores de CFI se utilizan las fórmulas reportadas por [Davidson y Parish \(1989\)](#).

$$CFI\ A = (CMI\ de\ A\ en\ presencia\ de\ B\ y\ C) / (CMI\ de\ A\ individualmente) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$CFI\ B = (CMI\ de\ B\ en\ presencia\ de\ A\ y\ C) / (CMI\ de\ B\ individualmente) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$CFI\ C = (CMI\ de\ C\ en\ presencia\ de\ A\ y\ B) / (CMI\ de\ C\ individualmente) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\text{Índice CFI} = CFI\ A + CFI\ B + CFI\ C \quad (\text{Ec. 4})$$

Una vez obtenidos los valores de CFI, se determina el índice CFI mediante la ecuación 4.

Teóricamente, un índice CFI igual o próximo a uno indica un efecto aditivo, < 1 indica un efecto sinérgico y > 1 indica un efecto antagonista ([Davidson y Parish, 1989](#)).

Los mecanismos aceptados sobre el sinergismo que produce la interacción de agentes antimicrobianos son mencionados por [Eliopoulos y Moellering \(1991\)](#). Entre estos mecanismos se encuentran:

1. La inhibición secuencial de una ruta bioquímica.
2. La inhibición de enzimas protectoras.
3. La combinación de agentes activos de paredes celulares para incrementar el daño de la misma.

Existen algunos trabajos realizados como los de [Santiesteban-López *et al.* \(2006\)](#) y [García \(2005\)](#) en donde se evalúan los efectos de mezclas de agentes antimicrobianos naturales (carvacrol, timol y eugenol) y sintéticos (sorbato de potasio) sobre diferentes bacterias de interés en alimentos como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *L. innocua* y *Escherichia coli*. Sin embargo, debido a que

no es fácil anticipar los efectos o la interacción de mezclas de agentes antimicrobianos sobre los microorganismos, surge el interés de este trabajo, cuyo objetivo primordial fue evaluar mezclas binarias y

ternarias de agentes antimicrobianos naturales tales como carvacrol, timol y eugenol en sistemas modelo líquidos para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua*.

Materiales y métodos

Microorganismos

Se utilizó la cepa de *Listeria innocua* ATCC 51742 obtenida del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, la cual se hizo crecer en cuñas de agar soya tripticaseína (CASOY) (Merck, México) a 35°C por 48 horas para después mantenerlas en refrigeración a 4°C; dicha cepa se resembró continuamente ([López-Malo, 1995](#)).

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se tomó una asada de la cepa mantenida en cuña de agar CASOY y se hizo crecer en caldo soya tripticaseína (CASOY) (Merck, México) a las condiciones óptimas de temperatura (35°C). Los inóculos se resembraron cada 24 horas para mantener la fase exponencial de crecimiento.

Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon sistemas modelo líquidos en tubos de vidrio con una capacidad de 10

Tabla I. Concentraciones evaluadas de los agentes antimicrobianos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Carvacrol (ppm)	Timol (ppm)	Eugenol (ppm)
100	150	250
150	200	350
250		450

ml utilizando como base caldo soya tripticaseína (CASOY), estos sistemas se esterilizaron a 121°C por 15 minutos.

Para la adición de los diferentes antimicrobianos, se prepararon soluciones alcohólicas al 0.5% p/v de carvacrol, timol y eugenol. Estas soluciones se esterilizaron por filtración en membrana de celulosa con tamaño de poro de 0.45 micras (Micro Filtration Systems, Dublín, CA); se almacenaron en refrigeración (4°C) en frascos forrados con papel estaño. Los agentes antimicrobianos se añadieron a los sistemas modelo líquidos en las concentraciones correspondientes.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los agentes antimicrobianos individuales.

La determinación de la CMI de los agentes antimicrobianos timol, carvacrol y eugenol de manera individual, se realizó mediante una cinética de muerte. Para lo cuál se tomó una asada del microorganismo y se hizo crecer a 35°C por 24 horas en 100 ml de caldo soya tripticaseína (CASOY). Una vez obtenida la fase exponencial, se adicionó el agente antimicrobiano al medio de cultivo en las concentraciones señaladas (Tabla I). De este medio, se tomó una muestra cada hora durante las primeras 6 horas, después a las 24 y 48 horas. La muestra tomada se sembró en cajas Petri de 100 ml por la técnica de vertido en placa utilizando como base agar soya tripticaseína (Merck, México). Estas

cajas se incubaron por 48 horas a 35°C y se realizó el recuento.

Evaluación de mezclas binarias y ternarias de los agentes antimicrobianos carvacrol, timol y eugenol

Una vez determinada la CMI de los agentes antimicrobianos de manera individual, se evaluó el efecto de las mezclas binarias carvacrol-timol, timol-eugenol y carvacrol-eugenol; así mismo se evaluó el efecto de la mezcla ternaria carvacrol-timol-eugenol a diferentes concentraciones de cada uno de los agentes siguiendo un diseño tipo tablero de ajedrez (Davidson y Parish, 1989). Las combinaciones de las concentraciones de los agentes antimicrobianos para las mezclas binarias se muestran en la tabla II y para las mezclas ternarias en la tabla III. En estas tablas, el valor de CMI es el obtenido previamente.

Inoculación del sistema modelo para la evaluación de las mezclas binarias y ternarias

Los sistemas modelo líquidos con 9 ml de caldo CASOY y con la cantidad de antimicrobianos correspondientes, se inocularon por triplicado con una población de 10⁹ UFC/ml de *L. innocua*. Los sistemas se incubaron 72 horas a 35°C y cada 24 horas se determinó turbidez a cada uno de ellos mediante comparación con un control para identificar crecimiento (G) o no crecimiento (NG) del microorganismo. Los sistemas modelo que presentaron turbidez se consideraron con crecimiento microbiano. A ellos se les determinó la carga microbiana, tomando una muestra de un mililitro y sembrándola en cajas Petri por la técnica de vertido en placa utilizando como base agar soya tripticaseína. Las cajas se incubaron a 35°C por 24 horas.

Tabla II. Combinaciones de los agentes antimicrobianos utilizados para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas binarias.

		AGENTE ANTIMICROBIANO 1				
AGENTE	CMI	CMI / CMI	1/2 CMI	1/4 CMI	1/8 CMI	0
		1/2CMI / CMI	1/2CMI / 1/2CMI	1/2CMI / 1/4CMI	1/2CMI / 1/8CMI	CMI / 0
ANTIMICROBIANO 2	1/4 CMI	1/4CMI / CMI	1/4CMI / 1/2CMI	1/4CMI / 1/4CMI	1/4CMI / 1/8CMI	CMI / 0
	1/8 CMI	1/8CMI / CMI	1/8CMI / 1/2CMI	1/8CMI / 1/4CMI	1/8CMI / 1/8CMI	CMI / 0
	0	0 / CMI	0 / 1/2CMI	0 / 1/4CMI	0 / 1/8CMI	CMI / 0

Tabla III. Combinaciones de los agentes antimicrobianos utilizados para evaluar la capacidad antibacteriana de las mezclas ternarias.

		AGENTE ANTIMICROBIANO 1 (CMI, 1/2CMI, 1/4CMI, 1/8CMI, 0)				
		AGENTE ANTIMICROBIANO 2				
AGENTE	CMI	CMI / CMI	1/2 CMI	1/4 CMI	1/8 CMI	0
		1/2CMI / CMI	1/2CMI / 1/2CMI	1/2CMI / 1/4CMI	1/2CMI / 1/8CMI	CMI / 0
ANTIMICROBIANO 3	1/4 CMI	1/4CMI / CMI	1/4CMI / 1/2CMI	1/4CMI / 1/4CMI	1/4CMI / 1/8CMI	CMI / 0
	1/8 CMI	1/8CMI / CMI	1/8CMI / 1/2CMI	1/8CMI / 1/4CMI	1/8CMI / 1/8CMI	CMI / 0
	0	0 / CMI	0 / 1/2CMI	0 / 1/4CMI	0 / 1/8CMI	CMI / 0

Determinación del efecto bactericida o bacteriostático

De los sistemas modelo líquido que no presentaron turbidez se tomó una muestra y se hicieron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . De cada dilución se tomó una muestra de un mililitro y se sembró en cajas Petri por la técnica de vertido en placa utilizando como base agar soya tripticaseína (Merck, México); la determinación se hizo por duplicado a las 24, 48 y 72 horas después de haber inoculado los sistemas modelo líquidos. Las cajas se incubaron por 48 horas a 35°C y se realizó el recuento.

Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en aquellos sistemas líquidos en donde no se detectó crecimiento al final de las 72 horas. Esto se llevó a cabo mediante el cálculo de los valores de CFI utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3. Así mismo, se determinó el índice CFI

mediante la ecuación 4 para observar efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos.

Resultados y discusión

Determinación de las CMI individuales de carvacrol, timol y eugenol sobre *L. innocua*

La CMI es definida como el nivel mínimo de las concentraciones evaluadas del agente antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento microbiano (Skandamis y Nychas, 2001).

Carvacrol

En el caso de carvacrol se estudiaron dos concentraciones: 100 y 150 ppm, determinando que a 100 ppm no se inhibe el crecimiento de *L. innocua* después de 48 horas a 35°C , en cambio, a 150 ppm (Figura 1) después de 4 horas ya no se observa crecimiento manteniéndose en estas condiciones a las 24 y 48 horas respectivamente.

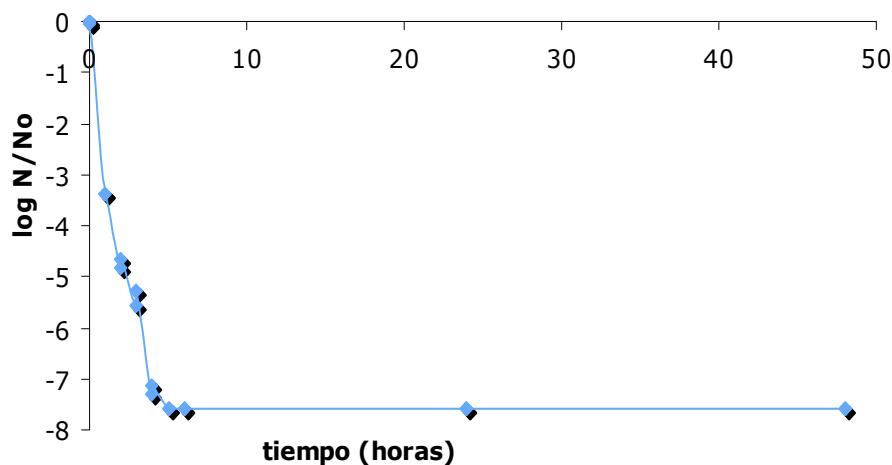


Fig. 1. Cinética de muerte de *Listeria innocua* en presencia de 150 ppm de carvacrol en caldo CASOY a 35°C.

Estudios realizados por Santiesteban-López *et al.* (2006) señalaron que la CMI de carvacrol para *L. innocua* a pH de 4.5 y una actividad de agua (a_w) de 0.97 es de 100 ppm en medios de cultivo sólidos. De la misma manera García (2005) señaló en estudios realizados en medios de cultivo líquidos que la CMI para *L. innocua* era de 150 ppm. Es importante señalar que en medios líquidos las bacterias tienen la capacidad de movilizarse y estar en contacto directo con los agentes antimicrobianos (Pelczar *et al.*, 1995).

De acuerdo con Quinn (1986) y Suutari y Laakso (1994), en general se pueden distinguir 3 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 óptima, la membrana debe estar mantenida en el estado fluido líquido cristalino (Ingram, 1976), 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 (Suutari y Laakso, 1994). El carácter hidrofóbico de carvacrol interactúa

con la membrana celular del microorganismo, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática.

A concentraciones menores de carvacrol (100 ppm en este estudio), los microorganismos poseen algunos mecanismos de adaptación contra los efectos dañinos de los componentes citotóxicos, (Bygraves y Russell, 1988; Russell y Fukunaga, 1990; Weber y De Bont, 1996), tales como (Bolhius *et al.*, 1994):

- Mantener una adecuada proporción de los lípidos de la fase líquida-cristalina en la membrana (restauración de la fluidez de la membrana).
- Mantener un balance apropiado entre la bicapa y la no bicapa de fosfolípidos (manteniendo la integridad de la membrana).
- Expulsión por los sistemas de materia extraña.

Es importante mencionar, que cuando la concentración de carvacrol aumenta, mayor cantidad de este componente es acumulado

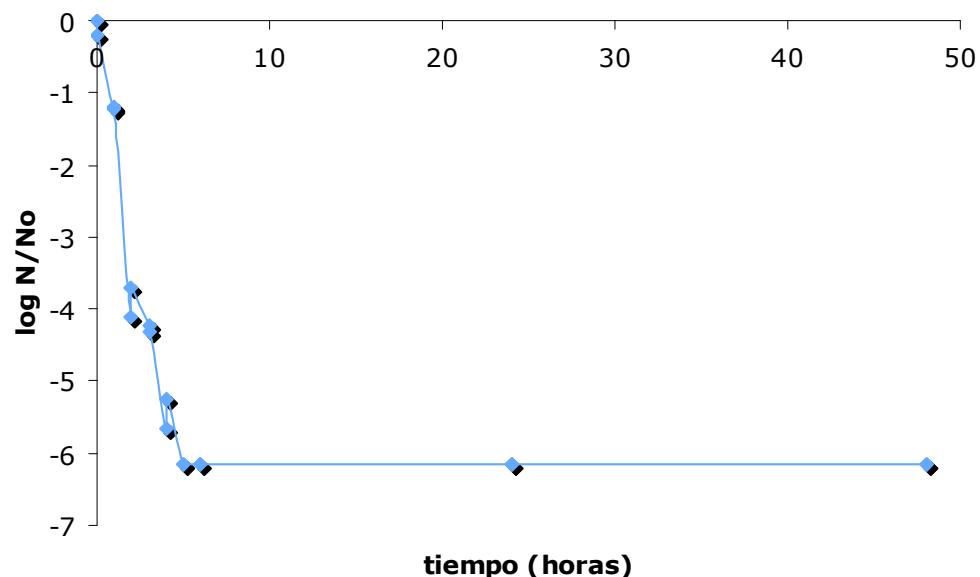


Fig. 2. Cinética de muerte de *Listeria innocua* en presencia de 250 ppm de timol en el caldo CASOY a 35°C.

en la membrana y por consiguiente el daño en la misma es mayor ([Ultee *et al.*, 2002](#)).

Timol

En lo que respecta a timol, se estudiaron 3 concentraciones: 150, 200 y 250 ppm. Estableciendo que a 150 y 200 ppm de timol, no se logra inhibir a *L. innocua* ya que después de las primeras seis horas, el microorganismo se recupera presentando crecimiento microbiano a las 24 y 48 horas posteriores (Figuras no mostradas). Sin embargo a 250 ppm *L. innocua* se ve inhibida evitando el crecimiento microbiano (Figura 2). Por lo tanto, en este estudio, el valor de CMI de timol para dicho microorganismo es 250 ppm. Es importante señalar que la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol (al igual que cualquier agente antimicrobiano) es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, el pH del medio y la temperatura de incubación ([Falcone *et al.*, 2005](#)). Es por ello que se pueden encontrar

estudios como el realizado por [García \(2005\)](#), en donde el valor del CMI para *L. innocua* en medios de cultivo líquido es 162.5 ppm, siendo menor al obtenido en este trabajo. Esta diferencia en el valor del CMI también se puede deber al pH del medio ya que según lo reportado por [Juven *et al.* \(1994\)](#), 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 está no disociada, logrando unir mejor las partes hidrofóbicas de las proteínas y por lo tanto, facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana. En este estudio el pH de los medios de cultivo fue de 7.

El mecanismo de acción del timol es semejante al de carvacrol, ya que su estructura química es similar, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo dentro del anillo, por lo que ambas sustancias hacen permeable la membrana celular ([Lambert *et al.*, 2001](#)). [Helander *et al.* \(1998\)](#) señalaron que timol libera lipopolisacáridos (LPS) incrementando la permeabilidad de la

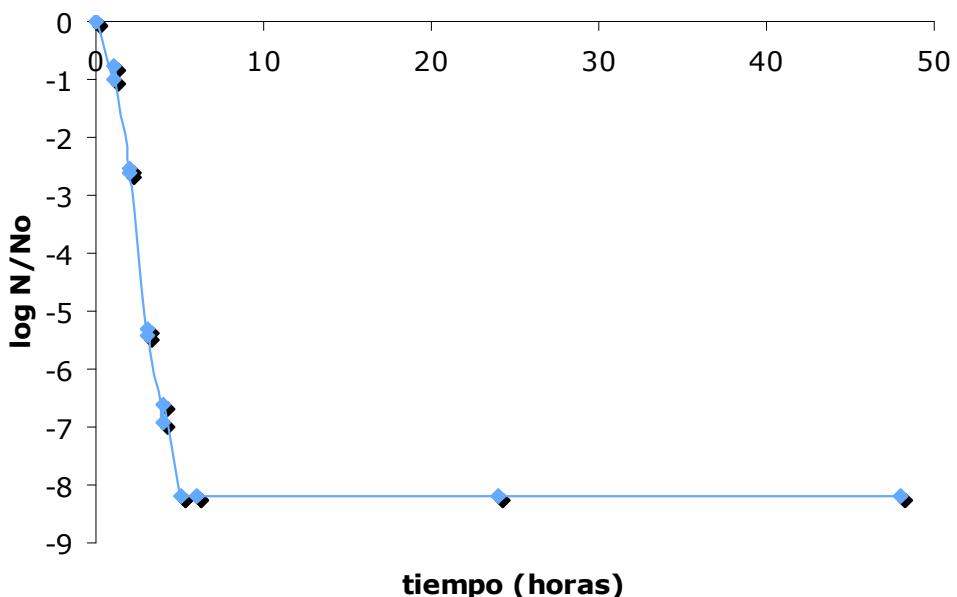


Fig. 3. Cinética de muerte de *Listeria innocua* en presencia de 450 ppm de eugenol en caldo CASOY a 35°

membrana. Juven *et al.* (1994) estudiaron el efecto del timol contra *S. typhimurium* y *S. aureus* concluyendo que este agente antimicrobiano une, mediante puentes de hidrógeno, las proteínas hidrofóbicas de la membrana cambiando las características de permeabilidad de la misma. Helander *et al.* (1998), al probar el efecto del carvacrol y el timol sobre *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium*, notaron que la manera de actuar de estos agentes antimicrobianos era disminuyendo el contenido de ATP intracelular de los microorganismos al mismo tiempo que incrementaba el ATP extracelular, lo que provocaba el rompimiento de la membrana plasmática.

Eugenol

En lo que respecta a eugenol, se estudiaron 3 concentraciones: 250, 350 y 450 ppm; estableciendo que a concentraciones de 250 y 350 ppm *L. innocua* no se ve inhibida por el agente antimicrobiano eugenol; sin embargo a 450 ppm de este agente (Figura

3), dicho microorganismo se ve inhibido desde las primeras horas. Este resultado nos indica que, en este estudio, 450 ppm de eugenol fue la CMI para *L. innocua* en el sistema modelo evaluado.

Existen pocos estudios sobre el mecanismo de acción de eugenol, sin embargo se sabe que actúa inhibiendo la producción de ciertas enzimas como amilasas y proteasas (Farag *et al.*, 1989). En algunos estudios sobre *Enterobacter aerogenes* se ha observado que el grupo hidroxilo de la molécula de eugenol se une a las proteínas para prevenir la acción de las enzimas (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). De la misma manera, Gill y Holley (2004) señalaron que el agente antimicrobiano eugenol tiene efecto bactericida sobre *Listeria monocytogenes*, observando que este agente actúa como transportador de iones, impidiendo el aumento de los niveles de ATP celular. Walsh *et al.* (2003) reportaron que células de *E. coli* y de *S. aureus* tratadas con eugenol presentaron cambios en la

Tabla IV. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *L. innocua* en caldo CASOY con diversas concentraciones de la mezcla binaria carvacrol-timol.

		TIMOL (ppm)				
		250	125	62.5	31.25	0
CARVACROL (ppm)	150	NG ^a				
	75	NG ^a	NG ^a	NG ^a	NG	NG
	37.5	NG ^a	NG ^a	NG	G	G
	18.75	NG ^a	NG	NG	G	G
	0	NG ^a	NG	NG	G	G

NG ^a Mezclas binarias con actividad bactericida

permeabilidad de la membrana debido a la salida de iones potasio. [Wendakoon y Sakaguchi \(1995\)](#), encontraron que eugenol a concentraciones mayores a 6 mM inhibe la enzima histidina decarboxilasa de *E. aerogenes*; por lo que señalan que el eugenol inhibe la síntesis de enzimas teniendo efecto directo sobre la energía metabólica.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que las concentraciones mínimas inhibitorias en este estudio para inhibir a *L. innocua* en medios de cultivo líquidos son: 150 ppm para carvacrol, 250 ppm para timol y 450 ppm para eugenol. Estos resultados son similares a los mostrados por [Santiesteban-López *et al.* \(2006\)](#) en estudios sobre *S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli* y *S. typhimurium*, en dónde señalan que carvacrol es el agente antimicrobiano más efectivo para inhibir el crecimiento de dichas bacterias seguido de timol y eugenol.

*Efecto de las mezclas binarias y ternarias de los agentes antimicrobianos sobre *L. innocua*.*

El efecto bactericida se refiere a la muerte de bacterias, mientras que el efecto bacteriostático se refiere a la supresión del desarrollo de las mismas ([Pelczar *et al.*, 1995](#)). Esto indica que si el efecto fue bactericida no hubo crecimiento microbiano en la caja Petri, mientras que si el efecto fue

bacteriostático, el tubo no presentó turbidez pero en el momento de sembrarlo en caja Petri hubo crecimiento de *L. innocua*, ya que el agente antimicrobiano únicamente evitó el crecimiento del microorganismo pero no provocó la muerte celular.

La respuesta crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *L. innocua* en la combinación de la mezcla binaria carvacrol-timol se observa en la Tabla IV. En dónde de 25 combinaciones evaluadas, 19 (el 76%) no presentaron crecimiento microbiano en medio líquido. De estas 19 combinaciones, 12 presentaron efecto bactericida mientras que solamente 7 presentaron efecto bacteriostático.

De la misma manera, los resultados obtenidos para la mezcla binaria carvacrol-eugenol son presentados en la Tabla V. Observándose que de 25 combinaciones evaluadas, únicamente 13 (el 52%) fueron efectivas para inhibir a *L. innocua* y de estas 13, únicamente 9 presentaron efecto bactericida.

Los resultados de la evaluación de la mezcla binaria timol-eugenol se observan en la Tabla VI, en dónde de 25 combinaciones evaluadas, 16 (el 64%) fueron efectivas para inhibir a *L. innocua*, de las cuales 12 presentaron efecto bactericida.

Analizando las 3 mezclas binarias evaluadas, con base en los resultados del efecto bactericida, se puede concluir que la mezcla más efectiva para inhibir el crecimiento de *L. innocua* en sistemas modelo líquidos, es aquella que contiene 75 ppm de carvacrol y 62.5 ppm de timol, seguida de la mezcla binaria timol-eugenol en una concentración de 125 ppm de timol y 56.25 ppm de eugenol. La mezcla menos efectiva fue carvacrol-eugenol.

Los resultados obtenidos para las mezclas ternarias, se observan en la Tabla VII; en dónde se puede ver que de 36 combinaciones probadas, 31 (el 86.11%) son efectivas para inhibir el crecimiento de *L. innocua* en medios de cultivo líquidos. Sin embargo de estas 31 combinaciones, únicamente 14 presentan efecto bactericida. La CMI de la mezcla ternaria establecida para *L. innocua* en este estudio es: 75 ppm de carvacrol -

31.25 ppm de timol – 56.25 ppm de eugenol.

[García \(2005\)](#) señala que de 125 combinaciones evaluadas entre mezclas binarias y ternarias de carvacrol, timol y sorbato de potasio, únicamente 40 fueron efectivas para inhibir a *L. innocua*, y de éstas, 29 presentaron efecto bactericida y 11 efecto bacteriostático. Estos resultados corroboran los obtenidos en este trabajo, en dónde existen mezclas binarias y ternarias de agentes antimicrobianos naturales efectivas para inhibir a dicho microorganismo. De la misma manera [Santiesteban-López *et al.* \(2006\)](#) señalaron, en estudios realizados con *L. innocua*, *S. typhimurium* y *E. coli*, que existen combinaciones binarias y ternarias de carvacrol, timol, eugenol y sorbato de potasio, efectivas para inhibir a dichos microorganismos. Así mismo, señalaron de manera general, que los antimicrobianos naturales (carvacrol, timol y eugenol) son

Tabla V. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *L. innocua* en caldo CASOY con diversas concentraciones de la mezcla binaria carvacrol-eugenol.

		EUGENOL (ppm)				
		450	225	112.5	56.25	0
CARVACROL (ppm)	150	NG ^a				
	75	NG ^a	NG	NG	NG	NG
	37.5	NG ^a	G	G	G	G
	18.75	NG ^a	G	G	G	G
	0	NG ^a	G	G	G	G

NG ^a Mezclas binarias con actividad bactericida

Tabla VI. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *L. innocua* en caldo CASOY con diversas concentraciones de la mezcla binaria timol-eugenol.

		EUGENOL (ppm)				
		450	225	112.5	56.25	0
TIMOL (ppm)	250	NG ^a				
	125	NG ^a	NG ^a	NG ^a	NG ^a	NG
	62.5	NG ^a	NG	NG	NG	G
	31.25	NG ^a	G	G	G	G
	0	NG ^a	G	G	G	G

NG ^a Mezclas binarias con actividad bactericida

Tabla VII. Respuesta de crecimiento (G) o no crecimiento (NG) de *L. innocua* en caldo CASOY con diversas concentraciones de la mezcla ternaria carvacrol-timol-eugenol

Carvacrol (ppm)	Eugenol 225 (ppm)		
	125	62.5	31.25
75	NG ^a	NG ^a	NG ^a
37.5	NG ^a	NG ^a	NG
18.75	NG ^a	NG	NG

Carvacrol (ppm)	Eugenol 112.5 (ppm)		
	125	62.5	31.25
75	NG ^a	NG ^a	NG ^a
37.5	NG ^a	NG	NG
18.75	NG ^a	NG	NG

Carvacrol (ppm)	Eugenol 56.25 (ppm)		
	125	62.5	31.25
75	NG ^a	NG ^a	NG ^a
37.5	NG	NG	G
18.75	NG	NG	G

Carvacrol (ppm)	Eugenol 28.125 (ppm)		
	125	62.5	31.25
75	NG	NG	NG
37.5	NG	NG	G
18.75	NG	G	G

NG ^a Combinaciones con efecto bactericida

más efectivos que el sorbato de potasio a las condiciones de pH y a_w estudiadas, de tal manera que estos agentes antimicrobianos son menos dependientes de los factores mencionados.

De todas las combinaciones binarias y ternarias efectivas para inhibir el crecimiento del microorganismo en estudio, se determinaron las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) y el índice de las concentraciones fraccionales inhibitorias (índice CFI). Si el efecto es aditivo indica que la actividad antimicrobiana de un

compuesto no aumenta ni disminuye con la presencia de otro agente antimicrobiano; si el efecto es antagonista, indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto es reducida con la presencia de los otros agentes antimicrobianos y si el efecto es sinérgico indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto se ve incrementada con la presencia de otro agente antimicrobiano (Barry, 1976).

En la Tabla VIII se muestran los CFI, los índices CFI y el tipo de efecto que generaron las diferentes combinaciones binarias

Tabla VIII. Concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de las combinaciones binarias efectivas de carvacrol, timol y eugenol para inhibir el crecimiento de *L. innocua*.

EFFECTO BACTERICIDA						
CARVACROL TIMOL		CFI CARVACROL	CFI TIMOL	ÍNDICE CFI	EFFECTO	
TIMOL (ppm)	CARVACROL (ppm)					
75.00	62.50	0.50	0.25	0.75	SINERGICO	
37.50	125.00	0.25	0.50	0.75	SINERGICO	
18.75	250.00	0.13	1.00	1.13	ANTAGONICO	
TIMOL EUGENOL		CFI TIMOL	CFI EUGENOL	ÍNDICE CFI	EFFECTO	
(ppm)	(ppm)					
125.00	56.25	0.50	0.13	0.63	SINERGICO	
31.25	450.00	0.13	1.00	1.13	ANTAGONICO	
CARVACROL EUGENOL		CFI CARVACROL	CFI EUGENOL	ÍNDICE CFI	EFFECTO	
(ppm)	(ppm)					
150.00	56.25	1.00	0.13	1.13	ANTAGONICO	
18.75	450.00	0.13	1.00	1.13	ANTAGONICO	
EFFECTO BACTERIOSTATICO						
CARVACROL TIMOL		CFI CARVACROL	CFI TIMOL	ÍNDICE CFI	EFFECTO	
(ppm)	(ppm)					
75.00	31.25	0.50	0.13	0.63	SINERGICO	
18.75	62.50	0.13	0.25	0.38	SINERGICO	
TIMOL EUGENOL		CFI TIMOL	CFI EUGENOL	ÍNDICE CFI	EFFECTO	
(ppm)	(ppm)					
62.50	56.25	0.25	0.13	0.38	SINERGICO	
CARVACROL EUGENOL		CFI CARVACROL	CFI EUGENOL	ÍNDICE CFI	EFFECTO	
(ppm)	(ppm)					
75.00	56.25	0.50	0.13	0.63	SINERGICO	

efectivas para inhibir a *L. innocua*. Se observa que con base en el efecto bactericida, la combinación carvacrol-timol es la que presenta mayor número de combinaciones sinérgicas (dos de tres efectivas), mientras que la combinación de carvacrol-eugenol genera un efecto antagónico.

De las combinaciones que presentaron efecto bacteriostático, se observa que todas las mezclas presentan efecto sinérgico, no importando el agente antimicrobiano del que se trate.

Con lo que respecta a las combinaciones ternarias, en la Tabla IX se observan los

resultados obtenidos. De tres mezclas bactericidas efectivas, dos presentan efecto sinérgico y únicamente una presenta efecto aditivo, mientras que de las combinaciones con actividad bacteriostática todas presentan efecto sinérgico.

García (2005), señaló que de 12 combinaciones ternarias efectivas para inhibir a *L. innocua* 10 son sinérgicas mientras que dos son aditivas. Los estudios realizados por Santiesteban-López *et al.* (2006) señalan que existen mezclas sinérgicas de carvacrol, timol y sorbato de potasio efectivas para inhibir el crecimiento de *L. innocua* y que en la mayoría de los

Tabla IX. Concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) de las combinaciones ternarias efectivas de carvacrol, timol y eugenol para inhibir el crecimiento de *L. innocua*.

EFECTO BACTERICIDA							
CARVACROL (ppm)	TIMOL (ppm)	EUGENOL (ppm)	CFI CARVACROL	CFI TIMOL	CFI EUGENOL	ÍNDICE CFI	EFECTO
37.50	62.50	225.00	0.25	0.25	0.50	1.00	ADITIVO
18.75	125.00	112.50	0.13	0.50	0.25	0.88	SINERGICO
75.00	31.25	56.25	0.50	0.13	0.13	0.76	SINERGICO

EFECTO BACTERIOSTATICO							
CARVACROL (ppm)	TIMOL (ppm)	EUGENOL (ppm)	CFI CARVACROL	CFI TIMOL	CFI EUGENOL	ÍNDICE CFI	EFECTO
18.75	31.25	112.50	0.13	0.13	0.25	0.51	SINERGICO
18.75	62.50	56.25	0.13	0.25	0.13	0.51	SINERGICO
75.00	31.25	28.13	0.50	0.13	0.06	0.69	SINERGICO
37.50	62.50	28.13	0.25	0.25	0.06	0.56	SINERGICO
18.75	125.00	28.13	0.13	0.50	0.06	0.69	SINERGICO

casos, las combinaciones binarias sinérgicas favorecen que las mezclas ternarias con los mismos agentes antimicrobianos sean también sinérgicas.

[Santiesteban-López *et al.* \(2006\)](#) señalaron que en una mezcla las concentraciones inhibitorias de los agentes antimicrobianos dependen de la a_w , del pH y del tipo de bacteria que se quiere inhibir. Así mismo mencionaron que los agentes antimicrobianos tienen mayor potencial para eliminar una gran diversidad de bacterias cuando se combinan que cuando actúan de manera individual.

Es importante señalar que los estudios previos sobre las actividades antimicrobianas de los compuestos fenólicos, se han dirigido más hacia el potencial inhibidor de los compuestos individuales que de las mezclas. Sin embargo, en todos ellos se señala que la concentración requerida para inhibir a los microorganismos, es menor cuando se combinan que cuando se utilizan de manera individual ([Santiesteban-López *et al.*, 2006](#)).

Conclusiones

A pesar del escaso conocimiento científico sobre los mecanismos de interacción de los agentes antimicrobianos, muchas de sus combinaciones sinérgicas pueden ser útiles para inhibir microorganismos patógenos y deteriorativos de interés en alimentos. Así mismo, el interés por encontrar mezclas sinérgicas efectivas debe ir en aumento, ya que el uso de la mayoría de los aceites esenciales con actividad antimicrobiana, se ve limitado debido a que tienen afectación directa en el sabor de los alimentos. Las concentraciones efectivas para inhibir a los microorganismos exceden los niveles sensoriales aceptables. Es por ello, que es importante continuar con las investigaciones para determinar las CMI de los agentes antimicrobianos en mezclas sinérgicas, para establecer un balance entre la eficacia antimicrobial y la aceptación sensorial. En este estudio se determinaron mezclas binarias y ternarias sinéricamente efectivas para la inhibición de *L. innocua* en sistemas modelo líquidos, sin embargo, es importante que estas combinaciones antimicrobianas se evalúen a diferentes valores de pH y a_w así como directamente en alimentos y con cada tipo de microorganismo, ya que en ocasiones la efectividad de los agentes antimicrobianos

puede verse afectada por los componentes de los alimentos así como la resistencia que presentan algunos microorganismos a determinados agentes antimicrobianos.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen el apoyo y financiamiento recibido por el CONACyT y a la UDLAP para la realización del mismo.

Referencias

- Barry, A. L. 1976. *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices*. Lea & Febiger. Filadelfia. 335 p.
- Bolhuis, H., Molenaar, D., Poelarends, G., Van Veen, H. W., Poolman, B., Driessen, A. J., Konings, W N. 1994. Proton motive force-driven and ATP-dependent drug extrusion systems in multidrugresistant *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 176:6957-6964.
- Busta, F. F. y Foegeding, P. M. 1983. Chemical food preservatives. En: S. S. Block (Ed). *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Tercera Edición. Lea & Febiger. Filadelfia. pp. 656-675.
- Bygraves, J. A. y Russell, N. J. 1988. Solute tolerance and membrane lipid composition in some halotolerant food-spoilage bacteria. *Food Microbiology*. 5:109-116.
- Davidson, P.M. y Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*. 43(1):148-155.
- 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.
- 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.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M. y El-Baroty, G. S. A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52(9):665-667.
- 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.
- Gill, A. y Holley R. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(10):5750-5755.
- 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.
- Ingram, L. O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohol. *Journal of Bacteriology*. 125:670-678.
- 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., 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. 1995. *Efecto de diversos factores sobre la capacidad antimicótica de vainillina*. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla. México.
- 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. Nueva York. pp. 237-264.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M. y Palou, E. 2005. Naturally occurring compounds-plant sources. En: P. M. Davidson, J. N. Sofos, y A. L. Branen (Eds).

- Antimicrobials in Food.* Tercera Edición. CRC Press. Nueva York. pp. 429-451.
- Pelczar, M., Reid, R. y Chan, E. C. S. 1995. *Microbiología.* Cuarta Edición. Mc. Graw-Hill. E.U.A. 364 p.
- Quinn P. J. 1986. Models of haloadaptation in bacterial membranes. *FEMS Microbiology Letters.* 39:87-94.
- Russell, N. J. y Fukunaga, N. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 75:171-182.
- Santiesteban-López, A., Palou, E. y López-Malo, A. 2006. 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.
- Suutari M y Laakso S. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* 20:285-328.
- 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.
- 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.
- Weber, F. J. y De Bont, J. A. M., 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents of membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1286:225-245.
- Wendakoon, C. N. y Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection.* 58:280-283.