

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÉCNICA D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EUGENOL INMOVILIZADO EN MICROPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS.

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA

ALUMNO/A: Adrián Corrales Guerrero

TUTOR/A ACADEMICO: D. José Manuel Barat Baviera

COTUTOR/A: Dña. Ana Fuentes López

DIRECTOR/A EXPERIMENTAL: Susana Ribes Llop

Curso Académico: 2016/2017
VALENCIA, 7 de septiembre del 2017

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EUGENOL INMOVILIZADO EN MICROPARTÍCULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS

Corrales Guerrero, Adrián; Barat Baviera, José M; Fuentes López, Ana; Ribes Llop, Susana

RESUMEN

Los aceites esenciales y sus compuestos activos poseen una reconocida actividad antifúngica; sin embargo, su utilización en alimentos es limitada debido al impacto sensorial que ocasionan en el producto final. Una de las estrategias para reducir la volatilidad de este tipo de compuestos y atenuar su impacto sensorial es la inmovilización en partículas de sílice porosas. En este estudio, se ha evaluado la actividad antifúngica del eugenol libre e inmovilizado en la superficie de micropartículas de sílice mesoporosas (familia MCM-41). La actividad antifúngica de este compuesto se ha evaluado frente a los mohos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* y las levaduras *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii*.

Los resultados obtenidos mostraron que el eugenol libre e inmovilizado en las micropartículas de MCM-41, presentaron una buena actividad antifúngica, siendo el efecto inhibitorio del crecimiento de los mohos y levaduras estudiados mayor en el caso del eugenol inmovilizado. En el caso de las levaduras *Z. rouxi* y *Z. bailii* el valor de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) para el compuesto inmovilizado fue 0,2 mg/mL frente a los 0,4 mg/mL del compuesto libre, lo que supone una reducción del 50% de la concentración necesaria para la inactivación completa de estos microorganismos. En el caso de los mohos evaluados, en general, la inmovilización también consiguió mejorar el efecto antifúngico del compuesto libre. Los resultados obtenidos confirman que el uso del eugenol inmovilizado en la superficie de las micropartículas de MCM-41 podría ser empleado como un agente antifúngico interesante en la industria de alimentos frente a contaminaciones producidas por el desarrollo de mohos y levaduras.

Palabras clave: Actividad antifúngica, eugenol, partículas mesoporosas de sílice, MCM-41

RESUM

Els olis essencials i els seus compostos actius posseïxen una reconeguda activitat antifúngica; no obstant això, la seua utilització en aliments és limitada a causa de l'impacte sensorial que ocasionen en el producte final. Una de les estratègies per a reduir la volatilitat d'aquest tipus de compostos i atenuar el seu impacte sensorial és la immobilització en partícules de sílici poroses. En aquest estudi, s'ha evaluat l'activitat antifúngica de l'eugenol lliure i immobilitzat en la superfície de micropartícules de sílici mesoporoses (família MCM-41). L'activitat antifúngica d'aquest compost s'ha avaluat front les floridures *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* i els rents *Zygosaccharomyces bailii* i *Zygosaccharomyces rouxii*. Els resultats obtinguts van mostrar que l'eugenol lliure i immobilitzat en les micropartícules de MCM-41, van presentar una bona activitat antifúngica, sent l'efecte inhibitori del creixement de les floridures i rents estudiats major en el cas del eugenol immobilitzat. En el cas dels rents *Z. rouxi* i *Z. bailii* el valor de la Concentració Mínima Fungicida (CMF) per al compost immobilitzat va ser 0,2 mg/mL front els 0,4 mg/mL del compost lliure, el qual suposa una reducció del 50% de la concentració necessària per a la inactivació completa d'aquests microorganismes. En el cas de les floridures evaluats, en general, la immobilització també va aconseguir millorar l'efecte antifúngic del compost lliure. Els resultats obtinguts confirmen que l'ús de l'eugenol immobilitzat en la superfície de les micropartícules de MCM-41 podria ser empleat com un agent antifúngic interessant en la indústria d'aliments front les contaminacions produïdes pel desenrotllament de floridures i rents.

Paraules clau: Activitat antifúngica, eugenol, partícules mesoporoses de sílice, MCM-41.

ABSTRACT

Essential oils and their active compounds have a recognized antifungal activity; however, their use in food is limited to the sensorial impact they cause in the final product. One of the strategies to reduce the volatility of this type of compounds and to attenuate their sensorial impact is the immobilization in porous silica particles. In this study, the antifungal activity of free and immobilized eugenol on the surface of mesoporous silica microparticles (MCM-41 family) has been evaluated. The antifungal activity of this compound has been evaluated against the molds *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* and the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. The results showed that free eugenol and immobilized in MCM-41 microparticles showed good antifungal activity and the inhibitory effect of growth of molds and yeasts studied was higher in the case of immobilized eugenol. In the case of yeasts *Z. rouxi* and *Z. baili* the value of the Minimum Fungicide Concentration (CMF) for the immobilized compound was 0.2 mg / mL versus 0.4 mg / mL of the free compound, which is a reduction of 50% of the concentration necessary for the complete inactivation of these microorganisms. In the case of molds evaluated, in general, immobilization also succeeded in improving the antifungal effect of the free compound. The results obtained confirm that the use of immobilized eugenol on the surface of MCM-41 microparticles could be used as an interesting antifungal agent in the food industry against contaminations caused by the development of molds and yeasts.

Key words: Antifungal activity, eugenol, mesoporous silica particles, MCM-41.

1. INTRODUCCIÓN

El reino Fungi es el grupo de organismos eucariotas donde se incluyen microorganismos unicelulares como levaduras y mohos. Estos microorganismos son los principales responsables del deterioro de frutas y verduras, así como de otros productos como zumos, mermeladas, quesos, etc (*Gammariello et al.*, 2014). Entre los diferentes mohos filamentosos responsables del deterioro de materias primas y/o alimentos procesados, caben destacar los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* por su ubicuidad y su fácil propagación (*Yiannikouris & Jouany*, 2002; *Rodríguez et al.*, 2015). El género *Aspergillus* ocasiona grandes pérdidas económicas por provocar la alteración de los alimentos que invade y por su capacidad para producir micotoxinas (*Samson et al.*, 2014). Por otro lado, el género *Penicillium* se caracteriza por su capacidad para descomponer la materia orgánica, dando lugar a la putrefacción de productos pre- y post-cosecha (*Frisvad & Samson*, 2004, *Pitt & Hocking*, 2009, *Samson et al.*, 2010).

Las levaduras también son responsables de la alteración de una gran variedad de alimentos como zumos de frutas, refrescos, bebidas alcohólicas, alimentos altamente azucarados, verduras, productos fermentados, productos lácteos y de panadería, además de carnes y pescados (*Fleet*, 1992; *Deak & Beuchat*, 1996). Un ejemplo de levaduras alterantes de alimentos es el género *Zygosaccharomyces*, caracterizado por su capacidad para crecer en productos con un elevado nivel de azúcar y valores de pH bajos y por la generación de CO₂, que ocasiona la deformación y explosión de los envases alimentarios (*Stratford et al.*, 2013).

Con el fin de proteger a los alimentos frente a este tipo de contaminaciones, la industria de alimentos emplea diferentes aditivos conservantes como sorbatos y benzoatos. Sin embargo, la percepción negativa de los aditivos sintéticos por parte de los consumidores (*Tawfik et al.*, 2015) ha llevado a la industria alimentaria a buscar alternativas naturales (*Guynot et al.*, 2003). El uso de extractos naturales, como los aceites esenciales (AEs) o sus principios bioactivos han demostrado poseer una buena actividad frente a mohos, levaduras y bacterias (*Wilson et al.*, 1997; *Gogoi et al.*, 1997; *Pitarokili et al.*, 1999; *Meepagala et al.*, 2002). El eugenol, componente mayoritario del AE de clavo (*Ribes et al.*, 2016), es una sustancia reconocida como segura (GRAS) por la FDA (*Food and Drug Administration*, 2015) y ha mostrado tener una buena actividad antifúngica frente a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Emericella* y *Fusarium* spp (*Faria et al.*, 2006; *Campanniello et al.*, 2010). Sin embargo, su volatilidad, carácter lipófilo y su marcado sabor y olor dificultan su incorporación a alimentos (*Perdonés et al.*, 2012).

Con el fin de reducir la volatilidad y mejorar la solubilidad de los AEs y sus componentes bioactivos, se han investigado diferentes estrategias, lo que permitiría mejorar su capacidad antifúngica (*Manso et al.*, 2013) y reducir su impacto en las propiedades sensoriales del producto final. Entre estas estrategias cabe destacar: i) las emulsiones y nanoemulsiones como sistemas de liberación de antimicrobianos naturales (*Donsì et al.*, 2011; *Ribes et al.*, 2016); ii) las películas comestibles (*Sánchez-González et al.*, 2011); iii) los envases activos (*Manso et al.*, 2013) y; iv) los materiales porosos para el encapsulado, cargado o inmovilización de los antimicrobianos naturales (*Bernardos et al.*, 2014).

Entre los materiales que han sido estudiados para la inmovilización de AEs o sus principios bioactivos cabe destacar el uso de las partículas de sílice mesoporosas y, en concreto, dentro de este grupo la familia de las partículas MCM-41 (Mobil Composition of Matter). Las partículas MCM-41 son estructuras de dióxido de silicio (SiO₂), que permiten el anclado de moléculas bioactivas en su superficie y son especialmente interesantes por su estabilidad, biocompatibilidad y elevada capacidad de carga. Existen estudios que han demostrado que la inmovilización de los AEs o sus principios bioactivos en la superficie de las partículas de sílice mesoporosas podría mejorar la actividad antimicrobiana de estos compuestos y reducir su impacto sensorial en el producto final (*Ruiz-Rico et al.*, 2015; 2017).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antifúngica del eugenol libre e inmovilizado en la superficie de micropartículas de MCM-41 frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii* con el fin de ser utilizado en la industria alimentaria para evitar el deterioro causado por contaminación por mohos y levaduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 MICROORGANISMOS, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Aspergillus flavus (CECT 2685), *Aspergillus niger* (CECT 20156), *Penicillium expansum* (CECT 20140), *Zygosaccharomyces bailii* (CECT 12001), y *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT 1229) fueron suministradas por el Centro Español de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, España).

Los medios de cultivo empleados en el estudio fueron los siguientes: Potato Dextrose Broth (PDB), Potato Dextrose Agar (PDA), Yeast Peptone Dextrose Broth (YPDB) y Agar (YPDA), todos ellos suministrados por Scharlab S.A. (Barcelona, España). Como dispersante se utilizó Tween 80 (Scharlab S.A., Barcelona, España).

La síntesis de las micropartículas MCM-41 se realizó empleando los siguientes reactivos: trietanolamina (TEA), tetraetilortosilicato (TEOS), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTABr), hidróxido sódico (NaOH), y etanol (C₂H₆O). Para llevar a cabo la derivatización del eugenol se utilizó hidróxido de potasio (KOH), cloroformo (CHCl₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄) y 2-butanona (C₄H₈O). En la inmovilización del eugenol en las partículas MCM-41 se empleó (3-Aminopropyl) triethoxysilano (APTES), diclorometano (CH₂Cl₂), sulfato de magnesio (MgSO₄) y acetonitrilo (C₂H₃N).

El eugenol empleado en el presente trabajo, así como los reactivos y disolventes utilizados en las etapas de síntesis, derivatización e inmovilización fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2 Evaluación de la actividad antifúngica del eugenol libre

La metodología empleada para determinar la actividad antifúngica del eugenol libre frente a *A. flavus*, *A. niger* y *P. expansum* fue adaptada del trabajo llevado a cabo por Manso *et al.* (2013). Las 3 cepas se incubaron en PDA a 25 °C durante 7 días, y a partir de ellas se prepararon inóculos de 10⁶ UFC/mL de cada uno de los mohos estudiados, en tubos de agua estéril con 0,7% (p/v) NaCl y 0,1% (p/v) Tween 80.

En este trabajo se estudiaron concentraciones de eugenol libre de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mg/mL. Para ello se prepararon matraces Erlenmeyers con 15 mL de PDB, el eugenol necesario para alcanzar la concentración establecida y un 1% (p/v) de Tween 80. Los matraces Erlenmeyers fueron inoculados con 0,1 mL de la suspensión de esporas (10⁶ UFC/mL). Como control positivo, se utilizaron matraces con 15 mL de PDB inoculados (0,1 mL del inóculo) y un 1% (p/v) de Tween 80; y como control negativo la misma preparación, pero libre de inóculo. Las muestras fueron incubadas a 25 °C durante 3 días, en un agitador orbital (180 rpm). Tras la incubación, 0,1 mL de las suspensiones de cada uno de los matraces se sembraron en placas de PDA e incubaron a 25 °C durante 3 días. Los resultados obtenidos de estos recuentos se expresaron como log UFC/mL.

Con el fin de evaluar la actividad del eugenol libre frente a *Z. bailii* y *Z. rouxii*, se adaptó la metodología descrita por Chang *et al.* (2015). Las 2 cepas se incubaron en YPDB a 25 °C durante 2 días. Inóculos de 10⁶ UFC/mL, para cada una de las levaduras estudiadas, fueron preparados en tubos de agua estéril con 0,1% (p/v) Tween 80. En este ensayo se emplearon las mismas concentraciones de eugenol libre descritas con anterioridad, las cuáles fueron incorporadas a matraces Erlenmeyers con 15 mL de YPDB y un 1% (p/v) de Tween 80. Los matraces Erlenmeyers, fueron inoculados con 0,1 mL (10⁶ UFC/mL) de la suspensión de células. En este caso, se emplearon también controles positivos y negativos, tal y como se ha descrito anteriormente. Las muestras fueron incubadas a 25 °C durante 2 días, en un agitador orbital (180 rpm). Tras la incubación, se realizaron las siembras de las suspensiones de cada uno de los matraces en placas de YPDA que fueron incubadas a 25 °C durante 2 días.

A partir de los resultados obtenidos se estableció para cada microorganismo la Concentración Mínima Fungicida (CMF) ya que la estimación más común de la actividad fungicida de cualquier sustancia. El valor de CMF se define como la concentración más baja del agente antifúngico necesaria para matar el 99,9% del inóculo final después de la incubación

bajo las condiciones establecidas. En este sentido, CMF fue establecida para cada microorganismo como la concentración de eugenol más baja utilizada en la que no hubo crecimiento de colonias tras incubación (CLSI, 1998).

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

2.3 Síntesis y caracterización de las micropartículas MCM-41 con eugenol inmovilizado. Evaluación de su actividad antifúngica

2.3.1 SÍNTESIS DE MCM-41

La síntesis de las micropartículas MCM-41 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por *Pérez-Esteve et al.* (2015) empleando TEA como agente estructurante, TEOS como precursor inorgánico y fuente de sílice, y CTABr como surfactante catiónico.

La obtención de las micropartículas MCM-41 se realizó siguiendo la denominada “*Ruta de los atranos*”. Para ello, se pesaron 52,4 g de TEA que se adicionaron a 0,98 g de NaOH disueltos en 2 mL de agua y 11 mL de TEOS. La temperatura de mezcla se aumentó hasta los 118 °C y, una vez alcanzada esta temperatura, se añadieron 9,36 g de CTABr con el fin de conseguir la formación de las micelas a partir de las cuales se forma la estructura de sílice. A continuación, la temperatura se disminuyó de nuevo la temperatura hasta 70 °C y se añadieron 180 mL de H₂O destilada. La mezcla se mantuvo en agitación a 700 rpm y temperatura ambiente durante 1 h. Tras una filtración, se recogió el polvo resultante y se realizaron lavados con agua y etanol para eliminar el surfactante. A continuación, el sólido se secó a 70 °C durante 24 h. y finalmente se calcinó a 550 °C durante 5 h, para eliminar los restos de surfactante.

2.3.2 DERIVATIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN DEL EUGENOL EN MCM-41

La derivatización del eugenol se llevó a cabo con el objetivo de mantener el grupo hidroxilo del compuesto activo libre, siendo este crucial en el desarrollo de la actividad antifúngica (*Ben Arfa et al., 2006; Gill & Holley, 2006*). Para ello, se utilizó la reacción “*Reimer-Tiemann*” donde 22 mmol de eugenol se disolvieron en 150 mL de agua a 80 °C. A continuación, se bajó la temperatura de la mezcla hasta 60 °C, y se adicionaron 400 mmol de KOH y 88 mmol de cloroformo. El cloroformo se añadió a lo largo de 7 h (1 mL/h) puesto que se trata de una reacción exotérmica. A continuación, se mantuvo la temperatura a 60 °C durante 8 h más. Transcurrido este tiempo, la disolución fue acidificada con 50 mL de H₂SO₄ al 10% (v/v) y la mezcla fue extraída empleando 2-butanona.

Para la inmovilización del eugenol en las partículas MCM-41, el aldehído obtenido tras la derivatización se hizo reaccionar con el APTES, con el fin de sintetizar los derivados alcóxidosilanos, que permitirán la funcionalización del eugenol en las micropartículas de MCM-41. Para ello, 2 mL del aldehído de eugenol junto con 20 mL de diclorometano fueron tratados con 10 mmol de APTES y 0,5 mg de MgSO₄. La mezcla fue agitada a 38 °C durante 1 h, filtrada y, posteriormente, la fase orgánica fue eliminada a baja presión obteniendo de este modo el correspondiente derivado alcóxidosilano de eugenol.

Finalmente, 1 g de MCM-41 junto con 30 mL de acetonitrilo y el compuesto derivatizado obtenido, se agitaron a temperatura ambiente durante 5.5 h. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo un filtrado, lavado con acetonitrilo y secado durante 24 h a baja presión hasta conseguir un sólido de color amarillo.

2.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS MCM-41

La caracterización de las micropartículas MCM-41, se realizó siguiendo los métodos descritos por *Pérez-Esteve et al.* (2016). El análisis del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante el uso de un difractómetro láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las muestras se diluyeron en agua destilada a 2000 rpm hasta alcanzar

un rango de obscuración del 10%. La teoría de Mie fue aplicada considerando un índice de refracción de 1,45 y un índice de absorción de 0,001.

Para llevar a cabo el análisis del potencial- ζ de las muestras, éstas fueron diluidas con agua destilada y se llevaron a un baño de ultrasonidos durante 2 min con el objetivo de impedir la agregación de las micropartículas. El equipo empleado para determinar el potencial- ζ de las muestras fue el Zetasizer nano-Z (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El modelo matemático de Smoluchowsky fue empleado con el fin de convertir las medidas de la movilidad electroforética en valores de potencial- ζ (Sánchez-González *et al.*, 2010).

Las imágenes microscópicas de las micropartículas control y funcionalizadas con eugenol (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy) fueron adquiridas con un Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania) y se observaron en el modo de electrones secundarios.

Con el objetivo de determinar la cantidad de eugenol inmovilizado en las micropartículas se llevó a cabo un análisis multielemental y termogravimétrico (TGA). El análisis elemental para C, H y N se llevó a cabo mediante un análisis de combustión en un modelo CHNOS Vario EL III (Elemental Analyses System GMHB, Langensfeld, Germany). El análisis TGA de las micropartículas MCM-41 con y sin eugenol inmovilizado se llevó a cabo en una balanza TGA/SDTA 851e Mettler Toledo (Mettler Toledo Inc., Schwarzenbach, Suiza), utilizando una atmósfera oxidante (aire, 80 mL/min) con un programa de calentamiento (rampa de calentamiento de 10 °C/min desde 25 °C hasta 1000 °C) y una etapa de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 30 min. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la concentración del aldehído de eugenol inmovilizado en las micropartículas de sílice.

Todas estas determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

2.3.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS MICROPARTÍCULAS MCM-41 FUNCIONALIZADAS CON EUGENOL

El estudio de la actividad antifúngica del eugenol inmovilizado en las micropartículas MCM-41 frente a *A. flavus*, *A. niger*, *P. expansum*, *Z. bailii* y *Z. rouxii* se realizó siguiendo el método descrito en la sección 2.2 (Evaluación de la actividad antifúngica del eugenol libre).

Las concentraciones de eugenol inmovilizado en las MCM-41 fueron establecidas en base a los resultados del análisis termogravimétrico y el análisis elemental, con el fin de emplear concentraciones del eugenol inmovilizado equivalentes a 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 mg/mL de eugenol libre. En este estudio se emplearon controles positivos y negativo, empleando el mismo procedimiento descrito en la sección 2.2. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el estudio referente a la actividad antifúngica del eugenol libre e inmovilizado en la superficie de las micropartículas MCM-41, fueron analizados mediante un ANOVA simple. Los datos fueron procesados con Statgraphics Centurion XVI (Statpoint. Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la actividad antifúngica del eugenol libre

La actividad antifúngica del eugenol libre frente a *A. flavus*, *A. niger*, *P. expansum*, *Z. bailii* y *Z. rouxii* se presenta en la Figura 1. Tal y como se observa en la figura, la actividad antifúngica del eugenol libre fue dependiente de la concentración, de forma que a mayor concentración de eugenol libre, los recuentos de los diferentes microorganismos fueron más bajos. Asimismo, la utilización de 0,4 mg/mL de eugenol libre permitió inhibir completamente el crecimiento de *A. flavus*, *A. niger*, *Z. bailii* y *Z. rouxii*, considerando esta concentración con la CMF para estos microorganismos. Sin embargo, *P. expansum*

fue más sensible a este compuesto, produciéndose la inhibición total con el uso de 0,2 mg/mL de eugenol libre (CMF). *Abbaszadeh et al. (2014)* al evaluar la actividad antifúngica de eugenol frente a *A. flavus* y *A. niger* encontraron valores de CMF ligeramente superiores a los obtenidos en este estudio (0,5 mg/mL y 0,45 mg/mL para *A. flavus* y *A. niger*, respectivamente); mientras que *Kumar et al. (2010)*, empleando concentraciones de eugenol libre de 0,2 µL/mL consiguieron la inhibición de *Penicillium spp.* En otro estudio, *Monu et al. (2016)* mostraron la inhibición de *Z. bailii* mediante la utilización de 0,2 mg/mL de eugenol, siendo en este caso, la concentración de compuesto antifúngico requerida para inhibir el crecimiento de la levadura, la mitad que la establecida en el presente trabajo. La diferencia entre los resultados obtenidos en todos estos estudios podría deberse a el empleo de diferentes condiciones de estudio y tipo de ensayo.

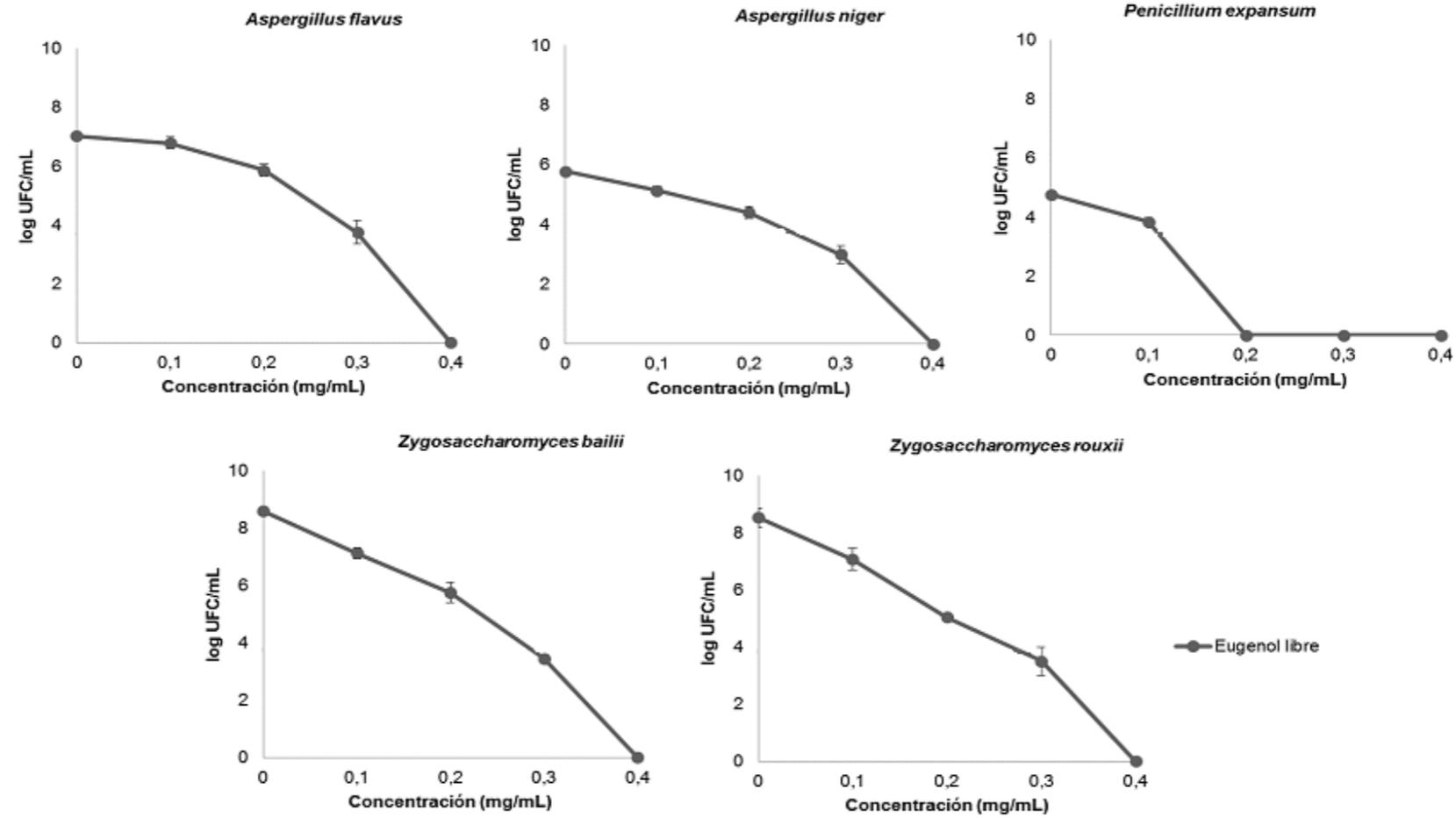


FIGURA 1. Actividad antifúngica del eugenol libre frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *P. expansum* tras la incubación a 25 °C durante 3 días y frente a *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii* tras la incubación a 25 °C durante 2 días. Valores medios (n=3) y desviación estándar.

Asimismo, hay que señalar que todos los microorganismos estudiados fueron sensibles, en mayor o menor medida, al eugenol libre, ya que incluso las concentraciones más bajas de eugenol estudiadas consiguieron inhibir el crecimiento respecto a los controles empleados en cada caso (figura 1)

3.2 Caracterización de las micropartículas MCM-41

Las micropartículas MCM-41 fueron caracterizadas mediante diversas técnicas analíticas. Los resultados del análisis del tamaño de partícula y del potencial- ζ para las micropartículas MCM-41 sin funcionalizar (Control MCM-41) y las micropartículas MCM-41 con eugenol inmovilizado (Eugenol-MCM-41) se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Tamaño de partícula ($d_{0.5}$) y potencial- ζ de las micropartículas MCM-41 sin funcionalizar (Control MCM-41) y las micropartículas MCM-41 con eugenol inmovilizado (Eugenol-MCM-41).

Muestra	$d_{0.5}$ (μm)	Potencial- ζ (mV)
Control MCM-41	$3,1 \pm 0,1^a$	$-35,9 \pm 1,4^a$
Eugenol-MCM-41	$4,4 \pm 0,2^b$	$-0,4 \pm 0,4^b$

Las muestras sin funcionalizar (Control MCM-41) y las muestras de eugenol inmovilizado (Eugenol-MCM-41) mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tamaño de partícula como consecuencia de la inmovilización del eugenol en la superficie de la MCM-41. En cuanto al potencial- ζ , las muestras control presentaron valores de potencial- ζ de $-35,9 \pm 0,1$ mV, mientras que las micropartículas con eugenol inmovilizado en su superficie mostraron valores de potencial- ζ de $-0,4 \pm 0,4$ mV. Este cambio en el potencial de las muestras confirma el anclaje del eugenol a las partículas MCM-41. Este efecto también fue observado por Pérez-Esteve *et al.* (2015) tras la funcionalización de soportes de MCM-41 con ácido fólico.

La Figura 2 muestra las imágenes de las partículas MCM-41 sin funcionalizar y funcionalizadas con eugenol obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM). La inmovilización del agente bioactivo en la superficie de la micropartícula de sílice no produjo cambios en la misma, indicando que la inmovilización del eugenol a las partículas MCM-41 no afecta a su integridad. Estos resultados coinciden con los mostrados por Pérez-Esteve *et al.* (2015), en un estudio con micropartículas de MCM-41 funcionalizadas con ácido fólico.

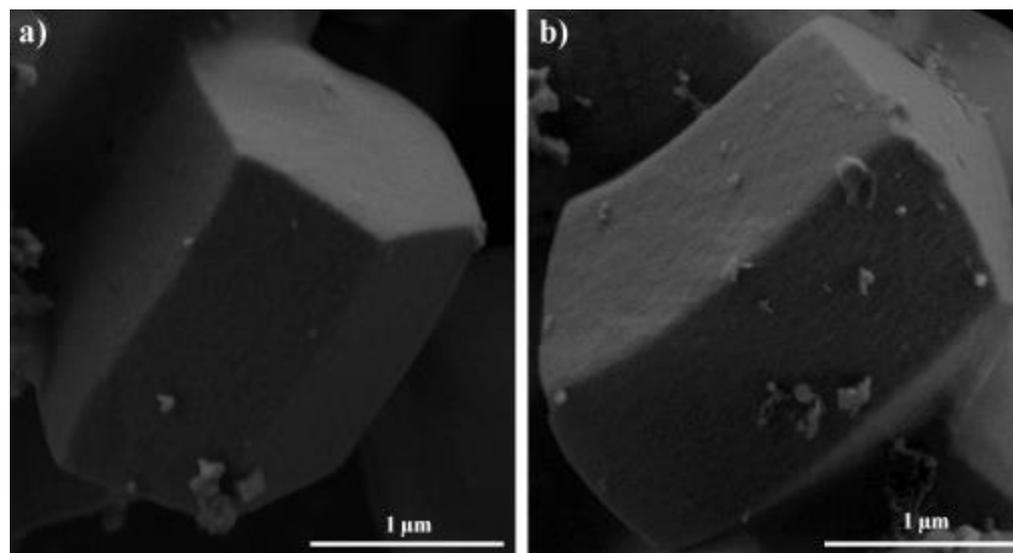


FIGURA 2. Imágenes de FESEM de (a) micropartículas MCM-41 sin funcionalizar (Control MCM-41) y (b) funcionalizadas (Eugenol-MCM-41).

Por último, los resultados obtenidos en el análisis termogravimétrico (TGA) mostraron que la concentración del aldehído de eugenol inmovilizado en las micropartículas de sílice fue de 65 mg/g.

3.3 Evaluación de la actividad antifúngica de las micropartículas MCM-41 funcionalizadas con eugenol

La actividad antifúngica de las micropartículas funcionalizadas con eugenol frente a *A. flavus*, *A. niger*, *P. expansum*, *Z. bailii* y *Z. rouxii* se presenta en la Figura 3.

El empleo de 0,2 mg/mL de eugenol inmovilizado en la superficie de MCM-41, produjo la inactivación (CMF) de *P. expansum*, *Z. bailii* y *Z. rouxii*, mientras que el efecto fungicida del eugenol inmovilizado frente a *A. flavus* y *A. niger* se consiguió a la concentración de 0,3 y 0,4 mg/mL, respectivamente.

Las muestras control-MCM-41 originales (sin funcionalizar) no presentaron inhibición del crecimiento, lo que indicaría que estos materiales no provocan por si solos efecto sobre el crecimiento de los microorganismos estudiados. Estos resultados coinciden los resultados obtenidos por *Wehling et al* (2013) los cuales demostraron que las partículas de sílice no presentan actividad antimicrobiana.

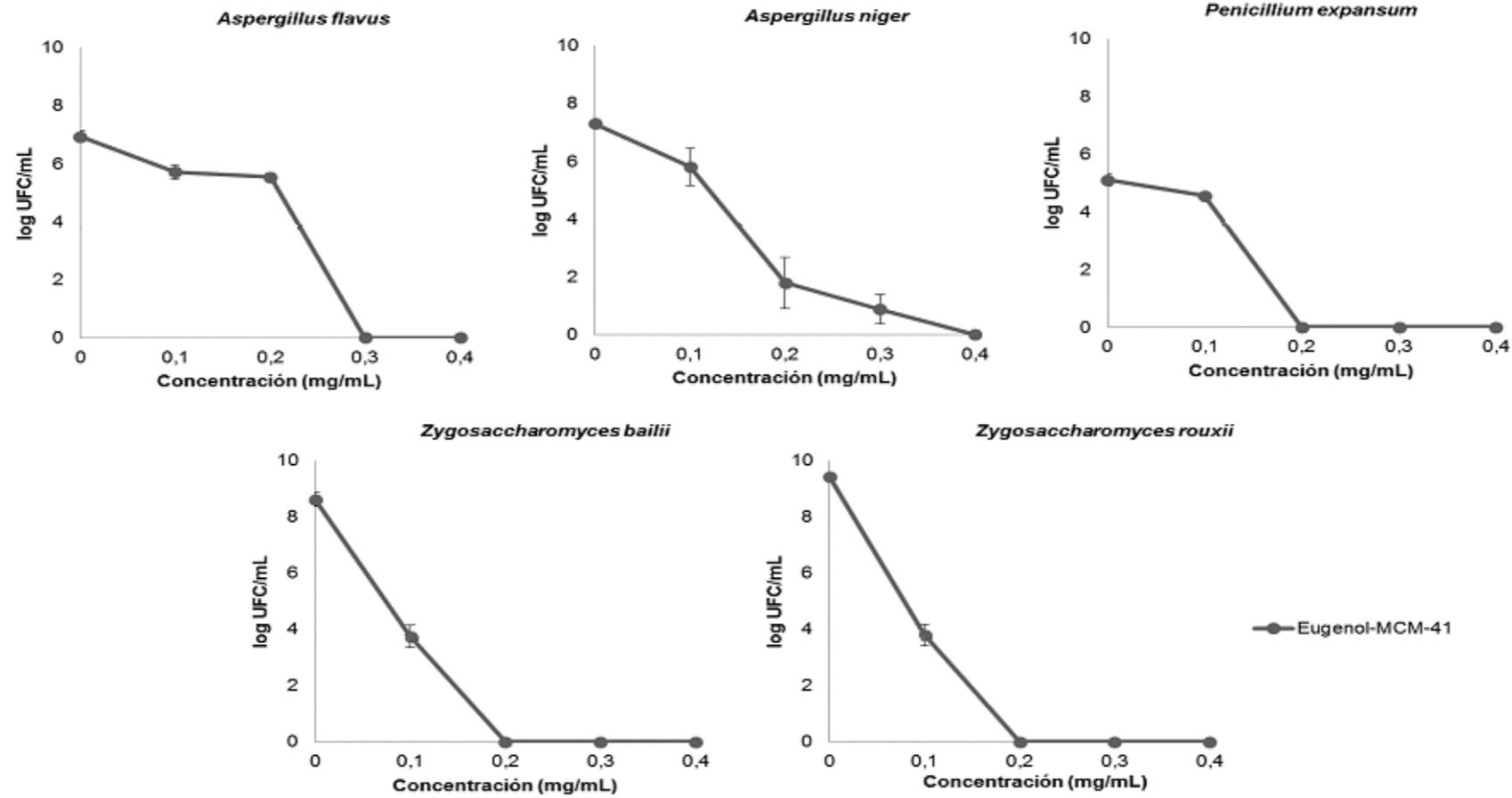


FIGURA 3. Actividad antifúngica de las micropartículas funcionalizadas frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *P. expansum* tras la incubación a 25 °C durante 3 días y frente a *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii* tras la incubación a 25 °C durante 2 días. Valores medios (n=3) y desviación estándar.

En la Figura 4 podemos comparar el efecto del eugenol libre y del eugenol inmovilizado sobre la superficie de las micropartículas MCM-41 que sobre los mohos y levadura estudiados en este trabajo. Estos resultados confirmarían que el proceso de inmovilización del eugenol en las micropartículas MCM-41 permitiría reducir a la mitad la concentración de eugenol necesaria para conseguir un efecto fungicida sobre *Z. bailii* y *Z. rouxii*; mientras que en el caso de *A. flavus* esta cantidad sería un 25% inferior a la necesaria con respecto al eugenol libre. Sin embargo, en el caso de *A. niger* y *P. expansum* la concentración necesaria para alcanzar este efecto fungicida es la misma para el compuesto libre e inmovilizado. En el caso de *A. niger*, concentraciones inferiores a la CMF el compuesto inmovilizado ejerce una mayor inhibición del crecimiento que el compuesto libre por lo que podríamos afirmar que el compuesto funcionalizado presentaría una mayor antifúngica que en forma libre. Este efecto no fue observado para *P. expansum* donde los porcentajes de inhibición del crecimiento fueron en ambos casos similares.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los obtenidos por *Vazquez et al. (2001)* quienes comprobaron que la inmovilización de eugenol y timol en la superficie de partículas MCM-41 mejoró la eficacia antifúngica de estos compuestos frente a *Penicillium citrinum*. Estos autores establecieron que esta mejora en la actividad antifúngica podría deberse a que la inmovilización podría aumentar la densidad del compuesto antifúngico sobre la superficie del material mesoporoso y/o a la reducción de la volatilidad de agentes bioactivos cuando se inmovilizan en la superficie de las micropartículas MCM-41.

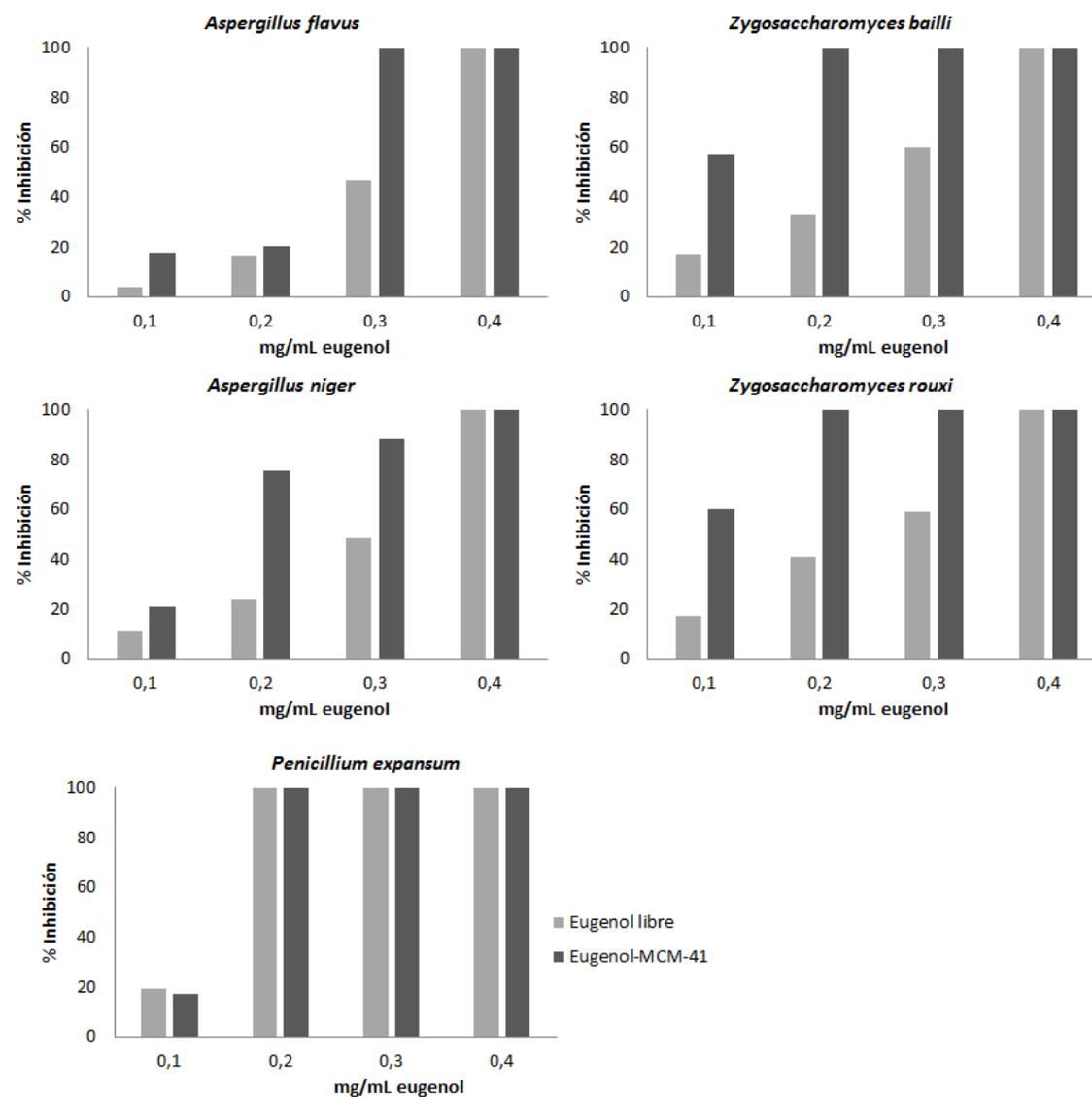


FIGURA 4. Efecto del eugenol libre e inmovilizado en micropartículas de sílice MCM-41 sobre la inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *P. expansum*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii*

4. CONCLUSIONES

El eugenol libre presenta una buena actividad antifúngica frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii*. La caracterización de las micropartículas MCM-41 confirma la funcionalización de las mismas con el compuesto antifúngico evaluado, el eugenol. Además, ningún cambio en la estructura de las partículas ha sido observado tras la funcionalización de las mismas.

La actividad antifúngica del eugenol inmovilizado en las micropartículas MCM-41 demuestra una mejora en la actividad antifúngica del compuesto activo respecto al libre. Estos resultados ponen de manifiesto las micropartículas MCM-41 funcionalizadas con eugenol son prometedores agentes antifúngicos. Sin embargo, para asegurar este uso son necesarios todavía estudios *in vivo* donde se evalúe la actividad antifúngica, la

estabilidad de estas sustancias durante el procesado y almacenamiento, así como el impacto sensorial de estos agentes en los alimentos.

5. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor D. José Manuel Barat Baviera y co-tutora académica Dña. Ana Fuentes López la oportunidad de haber podido trabajar en proyecto de investigación novedoso, adquiriendo las habilidades técnicas y conocimientos necesarios para su desarrollo. Pero sobretodo, quiero agradecer a mi directora experimental, Dña. Susana Ribes Llop, su esfuerzo y dedicación hacia mí. Sus conocimientos, consejos y su forma de trabajar han sido de gran utilidad para el desarrollo del trabajo y para mi desarrollo personal.

6. REFERENCIAS

- ABRIL, B. 2015. Desarrollo de sistemas microestructurados de sílice como soporte con función antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*
- BAKKALI, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- BECK, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., & Sheppard, E. W. 1992. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834-10843..
- BERNARDOS, A., Aznar, E., Coll, C., Martínez-Mañez, R., Barat, JM., Marcos, M.D., Sancenón, F., Benito, A., & Soto, J. (2008) Controlled release of vitamin B2 using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffoldings. *Journal of Controlled Release*, 131, 181-189.
- BERNARDOS, A., Marina, T., Žáček, P., Pérez-Esteve, E., Martínez-Mañez, R., Lhotkag, M., Kouřimská, L., Pulkrábek & J., Klouček, P. 2014. Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- CAILLET, S. Shareck, F. & Lacroix, M. 2005. Effect of gamma and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal and Food Protection. International Association for Food Protection*. (68, 12) 2571-2579.
- CAMACHO, A.; giles, M.; ortegón, A.; palao, M.; serrano, B. & Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM.
- CARRILLO, L. & CARINA, M. 2007. Levaduras. Manual de microbiología de los alimentos. capítulo 4, 40-46.
- CASAS, E. 1999. Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos altamente azucarados. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias biológicas. Departamento de Microbiología.
- CAMPANNIELLO, D. Corbo, M.R. & Sinigaglia, M. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species. *J Food Protect*, 73, pp. 1124–1128
- CLSI (1998). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA,
- FARIA, T. Ferreira, R. Yassumoto, L. Pinto De Souza, J. Ishikawa, N. & De Melo Barbosa, A. 2006. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Braz Arch Biol Technol*, 49, pp. 867–871
- FERNANDEZ-SERRANO, P. 2015. Emulsiones como sistema de liberación de antimicrobianos naturales en alimentos.
- FERRER, D. 2012. Materiales Mesoporosos MCM-41 y SBA-15. Instituto tecnológico de ciudad de Madero.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2015. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Clove Bud Extract, Clove Bud Oil, Clove Bud Oleoresin, Clove Leaf Oil, Clove Stem Oil, Eugenol. Visto el 6 de Octubre de 2016. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261254.htm>
- GAMMARIELLO, D., Conte, A., Lucera, A., Mastromatteo, M. & Del Nobile, M. A. (2014). Anti-yeast activity of natural compounds: In vitro and in vivo tests. *Food Packaging and Shelf Life*. 1:30–37.
- GAYSINSKY, S. Davidson, P. Bruce, B. & Weiss, J. 2005. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *Journal and Food Protection. International Association for Food Protection*. (68, 12), 2559-2556.
- GOGOI, R., Baruah, P. & Nath, S. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. *J. Essential Oils Res.* 9, 213-215.

- GUPTA, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C. & Gupta, S. (2009). Comparison of antimicrobial activities of clove oil and its extraction some food borne microbes. *The Internet Journal of Microbiology*, 7.
- GUYNOY, M. Ramos, A. Setó, L. Purroy, P. Sanchos, V & Marín, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing.
- HIGUERAS, L. López-Carballo, G. Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. 2015. Reversible Covalent Immobilization of Cinnamaldehyde on Chitosan Films via Schiff Base Formation and Their Application in Active Food Packaging. *Food Bioprocess Technol.* 8, 526–538
- HUA, H., Xing, F., Selvaraj, J. N., Wang, Y., Zhao, Y., Zhou, L. & Liu, Y. 2014. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and Ochratoxin A production. *PLoS One*, 9(9), e108285. 1–10.
- JAMES, S. A. & M. S TRATFORD 2003. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeasts in food*. 171-191
- JAYASHREE, T., & Subramanyam, C. 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 179–183.
- KRESGE, C.T., Leonowicz, M.E., Roth, W.J., Vartuli, J.C. & Beck, J.S. 1992. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid crystal template mechanism. *Nature*, 359, 710-712
- KUMAR A, Shukla R, Singh P & Dubey NK. 2010. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology*. 48:539-543
- LIANG, D., Xing, F., Selvaraj, J. N., Liu, X., Wang, L., Hua, H. & Zhou, L. 2015. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, citral, and eugenol on aflatoxin biosynthetic gene expression and Aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Science*, 80(12), 2917–2924.
- MEEPAGALA, K. M., Sturtz, G. & Wedge, D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Agric. Food. Chem.* 50, 6989-6992.
- MOURA, J. Sarmento, F.Q., de Oliveira, F., Pereira J., Nogueira, V. & de Oliveira, E. 2012. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Especies Medicinales y Aromáticas*, 11. 208-217.
- OMIDBEYGI M., Barzegar M., Hamidi Z. & Naghdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518–1523.
- ORBERA, T. M. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. Facultad de Ciencias Naturales. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. *Revista Cubana Salud Pública*, 30(3).
- PERDONES, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. 2012. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41.
- PEREZ-ESTEVE, E., Barat, J.M. & Martínez, R. 2015. Encapsulation of Folic Acid in Mesoporous Silica Supports: A Nutritional and Technological Approach. Article 2.
- PHILLIPS, C.A., Laird, K. & Allen, S.C. 2011. The use of Citri-V. An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium Chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. *Food Research International*. 0: 1-5.
- PITAROKILI, D., Tzakou, O, Couladis, M. & Verykokidou, E. 1999. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *calycina* growing wild in Greece. *Essential Oil Res.* 11, 655-659.
- RIBES, S., Fuentes, A. Talens, P & Barat, J.M. 2016. Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams. *Food Chemistry*, 211: 92-99.
- RUIZ-RICO, M., Pérez-Esteve, E., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Mañez, R., Marcos, M.D. & Barat, J.M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233:228-236.
- RUIZ-RICO, M., Fuentes, C., Pérez-Esteve, E., Jimenez-Belenger, A., Quiles, A., Marcos, M.D., Martínez-Mañez, R. & Barat, J.M. (2015). *Food Control*, 56: 77-85.
- SALVIA-TRUJILLO, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. 2014. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37, 292–297.
- SANTOYO, S; Cavero, S; Jaime, L; Ibáñez, E; Señorans, F; & Reglero, G. 2006. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of optimal extraction parameters. *Journal and Food Protection. International Association for Food Protection.* (69, 2), 369-375.
- SEETHA, B., & NAIDU, K. (2010). Antimicrobial efficacy of essential oil *Syzygium aromaticum* against common infectants of storage cereals and fruits. *Journal of Pharmacy Research*, 3(10), 2544-2545
- SETHI, S. Dutta, A., Gupta, B. L. & Gupta, S. 2013. Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5, 260-262.
- TYAGI, A. K.; Gottardi, D.; Malik, A. & Guerzoni, M.E. 2014. Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT-Food Science and Technology*, 57: 731 – 737.



- THOMAS, D.S & Daveport, R.R. 1985. *Zygosaccharomyces bailii*, a profile of characteristics and spoilage activities. *Food microbiology* 2, 157-169
- VARGA, J.; Houbraken, J.; Samson, R.A. & Frisvad, J.C. 2008. Molecular Diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* Species on Fruits and Vegetables, en: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, 1ª Ed. (Barkai-Golan R, Paster N) Academic Press: 205 – 223.
- VELLUTI, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Egido, J., & Marín, S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 145–154.
- WANG, H.; HU, Z.; LONG, F.; GUO, C.; NIU, C.; YUAN, Y. & YUE, T. 2016. Combined effect of sugar content and pH on the growth of a wild strain of *Zygosaccharomyces rouxii* and time for spoilage in concentrated apple juice. *Food Control*, 59: 298 – 305.
- WILSON, C. L.; Solar, J., El Ghaouth, A. & Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Oryctolyma*. *Plant Disease* 81, 204-210.
- YANAGISAWA, T., Shimizu, T., Kuroda, K., & Chuzo, K. 1990. The preparation of alkyltrimethylammonium kanemite complexes and their conversion to microporous silica. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63, 988-992.
- ZABKA, M & Pavela, R. 2013. La eficacia antifúngica de algunos compuestos fenólicos naturales contra hongos filamentosos patogénicos y toxigénicos importantes. *Chemosphere* 93, 1051-6.
- ZHAO, X. S. 2006. Novel porous materials for emerging applications. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 623-625.