

# Actividad bactericida del aceite esencial de orégano y dos derivados fenólicos sobre *Listeria innocua*

José Mendoza, Adriana Ganem, Brigida Camacho y Clara Álvarez

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Universidad Nacional Autónoma de México

Cuautitlán Izcalli, Méx.; México

delbertmz@gmail.com, ganemq@hotmail.com, bcamachoe@gmail.com, claramorama@gmail.com

**Abstract**— Control of bacteria in the food industry has guided the research towards alternative methods, including natural products, such as essential oils, some of which have antimicrobial activity. Nanotechnology presents several advantages in relation to “bulk” materials. In the case of antimicrobials, their inclusion in a nanoparticulate delivery system has shown sustained release and protection against possible degradation. The purpose of this article was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of oregano and its phenolic derivatives (carvacrol and thymol), included in zein nanoparticles. The results showed that encapsulation efficiencies from 42 to 62 % were able to reduce the inhibitory concentrations against *L. innocua*, by at least 66 %, in relation to the free form.

**Keyword**— *L. monocytogenes*, oregano essential oil, carvacrol, thymol, nanoparticles

**Resumen**— El control de bacterias en la industria de alimentos ha guiado la investigación hacia métodos alternativos, entre ellos productos naturales como los aceites esenciales, algunos de los cuales tienen actividad antimicrobiana. La nanotecnología presenta ventajas en relación a los materiales a granel. En cuanto a los antimicrobianos, su inclusión en sistemas nanoparticulados ha mostrado una liberación sostenida y protección contra posible degradación. El propósito de este artículo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano y de sus derivados fenólicos (carvacrol y timol), incluidos en nanopartículas de zeína. Los resultados mostraron que eficiencias de encapsulación del 42 al 62%, reducen la concentración inhibitoria contra *L. innocua*, por al menos 66 % en relación al activo en su forma libre.

**Palabras claves**— *L. monocytogenes*, aceite esencial de orégano, carvacrol, timol, nanopartículas

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA'S), son causadas por aquellos alimentos que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud [1]. En las áreas donde se procesan alimentos se pueden encontrar *L. monocytogenes*, principalmente en el suelo, desagües, paredes, charcas sanitizantes, equipos de procesamiento y cámaras de frío. Su crecimiento se ve favorecido por la humedad y presencia de nutrientes que proporcionan nichos donde pueden desarrollarse biopelículas [2]. La contaminación por *L. monocytogenes*, es causa de graves enfermedades, representando el 3.8% de las ETA'S, y 27.6% de muertes, afectando principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos, y adultos mayores [3]. Algunos aceites esenciales han adquirido interés por poseer actividades biológicas diversas. Distintos estudios han demostrado sus efectos antimicrobianos [4]. Muchos de ellos son reconocidos, como GRAS (Generally Recognized as Safe). Los aceites esenciales se obtienen a partir de materia prima vegetal, principalmente por hidrodestilación [5]. Entre ellos, el aceite de orégano (AEO) suele contener un 80-90% de fenoles, sustancias con gran poder desinfectante [6]. Desafortunadamente el AEO tiene propiedades indeseables como: poca solubilidad en agua, alta volatilidad, y fuertes aromas, que limitan sus aplicaciones; sin embargo este aspecto se puede mejorar a través de técnicas de encapsulación. La

nanotecnología ofrece una plataforma sólida para generar compuestos antimicrobianos eficaces [7]. La capacidad de liberar a los aceites esenciales, de forma sostenida y controlada, le confiere una eficacia mejorada, asegurando una mayor estabilidad protegiéndolos contra la degradación térmica y fotodegradación, además de facilitar su actividad antimicrobiana al mejorar su capacidad de difusión ante membranas biológicas. Varios estudios reportan el uso de zeína como un material para generar partículas cargadas con compuestos antimicrobianos, facilitando su administración y eficacia a lo largo de tiempo. Los principales intereses en la utilización de la zeína, surgen por ser reconocida como GRAS, por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y baja toxicidad [8]. En el presente trabajo se evaluó el efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano, así como de los compuestos carvacrol y timol, incluidos en nanopartículas de zeína, encontrando que la nanoencapsulación, logra disminuir la concentración inhibitoria en al menos 66%, además de que le otorga atributos especiales de los que carecen los compuestos en forma libre, como mayor solubilidad, disminución de fuertes aromas, y la liberación sostenida de los activos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. *Materiales*

Los reactivos que se utilizaron fueron: Etanol (Meyer, México), zeína (Sigma-Aldrich, USA), carvacrol (Symrise, México) y timol (Symrise, México), agua destilada y desionizada obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore, Alemania) y el extracto de aceite esencial de orégano que se obtuvo por hidrodestilación.

### B. *Extracción del aceite esencial de orégano*

La obtención del aceite esencial de orégano *Lippia graveolens Kunth* perteneciente a la familia botánica VARBANACEAE, se llevó a cabo por hidrodestilación. El principio se basa en la destilación azeotrópica, siguiendo el método de Sánchez Barrera [9] con modificaciones. Se pesaron 100 g del orégano molido, y se midieron 700 ml de agua destilada, se llevó a ebullición con agitación constante, el vapor generado fue arrastrado hacia la trampa Clevenger y precipitado mediante una columna de refrigeración, por alrededor de 3 a 4 horas. Se obtuvo una mezcla heterogénea aceite/agua, donde por diferencia de densidad se separó el aceite esencial mediante decantación.

### C. *Caracterización del aceite esencial de orégano*

Del aceite esencial obtenido se evaluaron sus características físicas (índice de refracción y densidad), y organolépticas (color y olor), y espectro infrarrojo como requisito de calidad. Para determinar el índice de refracción NMX-F-074-SCFI-2011 [10] se empleó un refractómetro Abbe. La densidad se determinó siguiendo el método según la norma NMX-F-075-SCFI-2012 [11]. Para evaluar el color se emplearon las cartas de color de Munsell [9], las cuales consisten en distintas notaciones que combinadas forman el símbolo del color. Para el olor se utilizaron los parámetros de las notas olfativas (mentolado-balsámico, afrutado, floral, especiado, herbáceo-verde, otros aromas) en base a los compuestos volátiles de especias y aceites esenciales de *Mentha piperita* [12]. El espectro infrarrojo se determinó en un espectrofotómetro de infrarrojo (Nicolet iS10FT, USA). Se utilizó la punta cóncava para líquidos, colocando una gota del aceite esencial en la celda para realizar la lectura.

#### *D. Nanoencapsulación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol*

La obtención de las nanopartículas de zeína cargadas de aceite esencial de orégano, timol y carvacrol, y una muestra control de zeína sin activos, se basó en el método de nanoprecipitación de acuerdo a Goncalves da Rosa et al. [13] con modificaciones. El método consistió en elaborar una solución de zeína, la cual se obtuvo al disolver 20 mg en una solución de 10 ml de etanol-agua (85% v/v) manteniéndose en agitación por 5 h. Para nanoencapsular el AEO, carvacrol, timol, y la mezcla timol (25%)-carvacrol (75%), se agregaron concentraciones correspondientes a 0.4% de AEO y 0.5% para los activos restantes. Posteriormente la solución de zeína con activo se dispersó por goteo a 12.7 ml/h con un inyector (Cole Parmer Modelo Vernon 60061, USA) en 30 ml de agua durante 8 min. homogeneizándose con un Ultra Turrax Modelo T 18 (IKA, Alemania) a 3,000 rpm. Las nanopartículas obtenidas, se mantuvieron en suspensión acuosa y se almacenaron a 3 °C.

#### *E. Caracterización de las nanopartículas*

Se evaluaron las propiedades y características de las nanopartículas: tamaño, índice de polidispersión (PDL), potencial Z ( $\zeta$ ), eficiencia de encapsulación y cinética de liberación de los compuestos.

#### *F. Microscopía de las nanopartículas*

La morfología de las nanopartículas se observó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las muestras se diluyeron en agua destilada en la relación 1:100 para timol y carvacrol y 1:120 para el aceite esencial de orégano, se dejaron secar y se obtuvieron las correspondientes micrografías [9].

#### *G. Determinación de tamaño, índice de polidispersión y potencial Z*

El tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z se determinaron por dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA). Las muestras (1.0 ml) se diluyeron con agua desionizada y se colocaron en las celdas de apertura cuadrada y en la celda de potencial Z respectivamente. Las condiciones empleadas para la medición fueron 25 °C y un ángulo de 90°. Todas las formulaciones de nanopartículas se evaluaron cada mes en un periodo de 4 meses, para comprobar su estabilidad, siendo conservadas a 3°C [13].

#### *H. Determinación de la eficiencia de encapsulación*

La eficiencia de encapsulación se determinó basándose en el método de Yunpeng et al. [14] con modificaciones, mediante la diferencia entre la totalidad del activo en una muestra y la fracción contenida en el sobrenadante. Para ello se tomó una muestra de 2 ml, la cual se centrifugó para separar las nanopartículas de la fase continua mediante una centrífuga EBA 12 (Alemania) a 15,000 rpm por 45 min. Una vez separadas las nanopartículas del sobrenadante, se tomó una muestra, la cual se diluyó en una relación 1:10 en una solución etanol/agua al 20% (v/v), y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Hitachi U-5100 (Japón). Por interpolación en una curva de calibración previamente preparada, se calculó la eficiencia de encapsulación, (%E.E = cantidad de activo encapsulado/cantidad de activo añadido para preparar el sistema), y la capacidad de carga (% Carga = cantidad de activo encapsulado/peso total del sistema).

### I. Estudio de la liberación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol

Se determinó en base a Parris et al. [15] y Goncalves da Rosa et al. [13] con modificaciones. Se usaron membranas de diálisis de 6 – 8 KD, donde el transporte del activo se produce por la diferencia de concentración a través de la membrana mediante transporte por difusión. El procedimiento consistió en colocar un volumen de 0.25 ml de la suspensión de nanopartículas en bolsas de diálisis y consecutivamente en vasos de precipitados de 100 ml, usando como medio receptor 50 ml de solución agua-etanol (80-20 % v/v), manteniendo una agitación constante a temperatura ambiente, tomando muestras en periodos de 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas. Se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Hitachi U-5100 (Japón), y se determinó la cantidad de activo liberado interpolando la absorbancia en la curva de calibración correspondiente.

### J. Prueba para la actividad bactericida del AEO, carvacrol y timol

Se empleó el método de gota [16] con distintas concentraciones, para encontrar aquella en donde se presente la inhibición de *L. innocua*. Las concentraciones utilizadas fueron 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000, y 30000 ppm. Debido a la poca solubilidad de los activos, fue necesario el uso de un tensoactivo (Tween 20) a una concentración del 6% (v/v) en agua. Las diferentes concentraciones se probaron en cultivos de *L. innocua* con aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFC/ml. Se sembró la bacteria de forma masiva en medio de cultivo Trypticase de Soya Agar (TSA), se inocularon 25µl de las soluciones de los tres diferentes activos y se dejaron secar, incubando a 37 °C por 48 horas. Los resultados se reportaron por la ausencia o presencia de inhibición del crecimiento del organismo de prueba.

### K. Prueba para la actividad bactericida de las nanopartículas

La actividad antibacteriana de las nanopartículas se basó en el método de Goncalves da Rosa et al. [13] con modificaciones. Este consistió en inocular de manera masiva *L. innocua* en medio de cultivo Trypticase de Soya Agar (TSA) con aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFC/ml. Se colocaron 25 µl de la suspensión de nanopartículas y se incubaron a 37 °C. La actividad antibacteriana se evaluó por el diámetro de las zonas de inhibición (mm) en periodos de 24, 48 y 72 horas

### L. Prueba para comprobar la liberación controlada de los activos de las nanopartículas.

Para realizar esta prueba se utilizaron las condiciones de Parris et al. [15] con modificaciones. Se inocularon en tubos 2.5 ml de agua destilada estéril, 100 µl de bacteria concentrada en caldo infusión cerebro corazón (BHI), así como 150µl de nanopartículas cargadas. Se tomaron muestras en periodos de tiempo de 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas manteniéndose a 37 °C en un Baño María con agitación axial, tomando 0.5 ml de muestra y realizando 3 diluciones decimales para las nanopartículas con activos y 6 para la muestra control. Posteriormente se inocularon 30 µl en medio de cultivo Trypticase de Soya Agar (TSA). Se incubaron a 37 °C por 48 horas y se realizó el conteo en placas, graficando la disminución de bacterias contra tiempo.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. Caracterización del aceite esencial de orégano

1) *Índice de refracción.* Los intervalos de referencia del índice de refracción del aceite esencial, tienen un valor promedio de 1.47 reportado por Corella & Ortega, [17], los resultados obtenidos en este trabajo promedian 1.4736.

2) *Densidad.* Valores de la densidad del AEO se encuentra entre 0.842 y 1.172 (g/cm<sup>3</sup>) [18]. El aceite empleado en este trabajo tuvo una densidad de 0.9561 (g/cm<sup>3</sup>). Debido a que los aceites esenciales tienen una composición variable, la densidad cambia dependiendo del origen de la materia prima.

3) *Espectroscopía infrarroja* La identidad del aceite esencial de orégano se verificó por espectroscopía infrarroja, encontrando grupos funcionales característicos, entre ellos fenoles con las bandas usuales entre 3200 y 3500 cm<sup>-1</sup> del grupo -OH, además de las bandas aromáticas usuales entre 1500 y 1600 cm<sup>-1</sup> (figura 1).

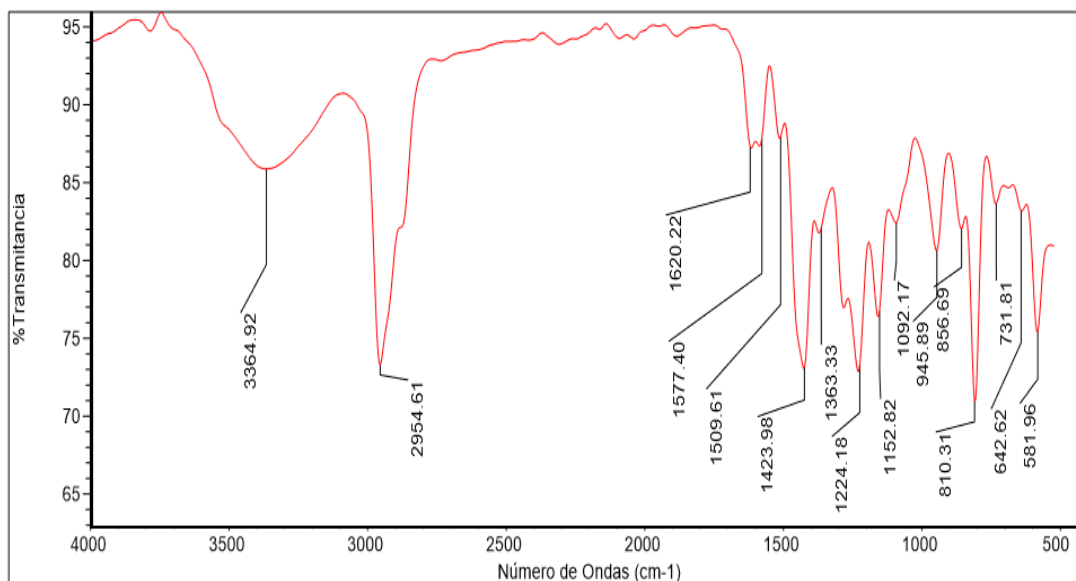


Fig. 1. Espectro infrarrojo del AEO

4) *Color.* El color en base a la notación de Munsell es 10Y 5/6, es decir color amarillo (oliva ligero), con una claridad de 5 y un croma de 6. Se determinó que el olor del AEO es “característico, fuerte, peculiar especiado, no desagradable, exento de olores extraños o rancios”.

#### B. Caracterización de las nanopartículas

Con el fin de conocer las propiedades y características de las nanopartículas, se evaluó su tamaño, índice de polidispersión (PDL), potencial Z ( $\zeta$ ), eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación de los compuestos.

1) *Determinación de las dimensiones y morfología de las nanopartículas mediante microscopía.* Se obtuvieron micrografías de nanopartículas con cada uno de los activos, con aumentos de 10,000X. En la figura 2 se muestran las imágenes de las partículas, las cuales en base a la escala, se encuentran entre 100 y 200 nm y la morfología que presentan es semiesférica.

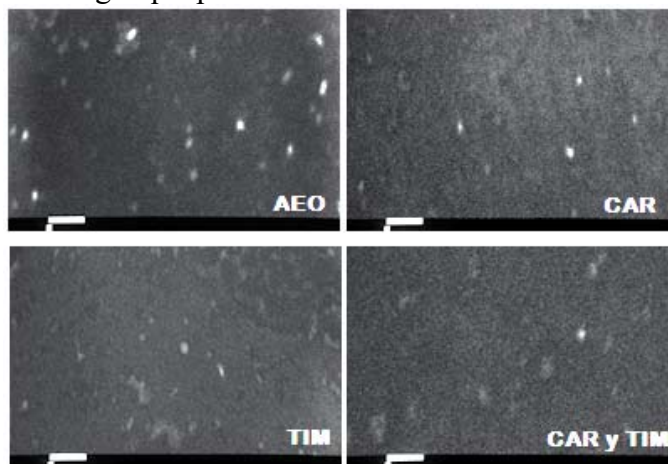


Fig. 2. MEB para nanopartículas con AEO; carvacrol (CAR); timol (TIM) y mezcla CAR y TIM (10,000X).

Yunpeng et al. [14] obtuvo imágenes con morfología esférica y tamaños mínimos de 160 nm y máximos de 300 nm encapsulando carvacrol y timol en zeína, mientras que Parris et al. [15] que encapsuló aceites esenciales, entre ellos el de orégano, reporta que las partículas parecen tener un arreglo donde las esferas se encuentran agregadas, y presentan una distribución de tamaños mayores a 100 nm.

## 2) *Determinación de tamaño, índice de polidispersión y potencial Z*

**Tamaño.** Comparando la variación del tamaño de las nanopartículas en un periodo de cuatro meses, se encontró una desviación que no supera los 10 nm, con respecto al valor medio de cada una de las nanopartículas. El control y las nanopartículas que contienen AEO, son las que presentan mayor tamaño, mientras que las que contienen timol registran los menores tamaños (figura 3). En cuanto al tamaño, se ha reportado un incremento cuando se aumenta la concentración del polímero [19], en este caso, en general se observa una ligera disminución del tamaño en relación al tiempo cero, lo cual puede atribuirse por un lado, a una posible degradación de la zeína, por acción del agua en que se encuentran suspendidas las nanopartículas, y por otro lado, a la alta volatilidad de los activos durante el periodo que fueron evaluados.

**Índice de polidispersión (IPD).** En un periodo de cuatro meses, mediante un análisis de varianza, con un 95% de confianza, se demostró que la polidispersión media de todas las nanopartículas no difiere, con un promedio general de 0.23 además de que la variación a través del tiempo fue de cero para todas las nanopartículas con activos, y solo de 0.001 para el control. Yunpeng et al. [14] señala que valores menores a 0.3 se consideran estables. Los resultados tienen un comportamiento con una pendiente de cero, e indican estabilidad, lo que otorga buenas características a las nanopartículas (figura 3).

**Potencial Z.** La estabilidad de las nanopartículas depende en buena medida de la carga superficial, un conjunto de nanopartículas en suspensión se mantienen unidas por fuerzas como las de Van der Waals, electrostáticas, y por su hidrofobicidad. La aglomeración, estabilidad y dispersión están directamente relacionadas con el potencial Z [20]. Valores menores a (+/-) 30 mV, comprometen la estabilidad,



tendiendo a aglomerarse y a formar estructuras más grandes. Los datos obtenidos muestran una disminución significativa a través del tiempo. Es posible que el carvacrol y timol juntos presenten antagonismo en la estabilidad, ya que estos compuestos unidos intencionalmente y naturalmente en el AEO, presentan la menor estabilidad, mientras que individualmente estos compuestos fenólicos, son más estables, siendo el timol el que mejores condiciones de estabilidad presenta (figura 3).

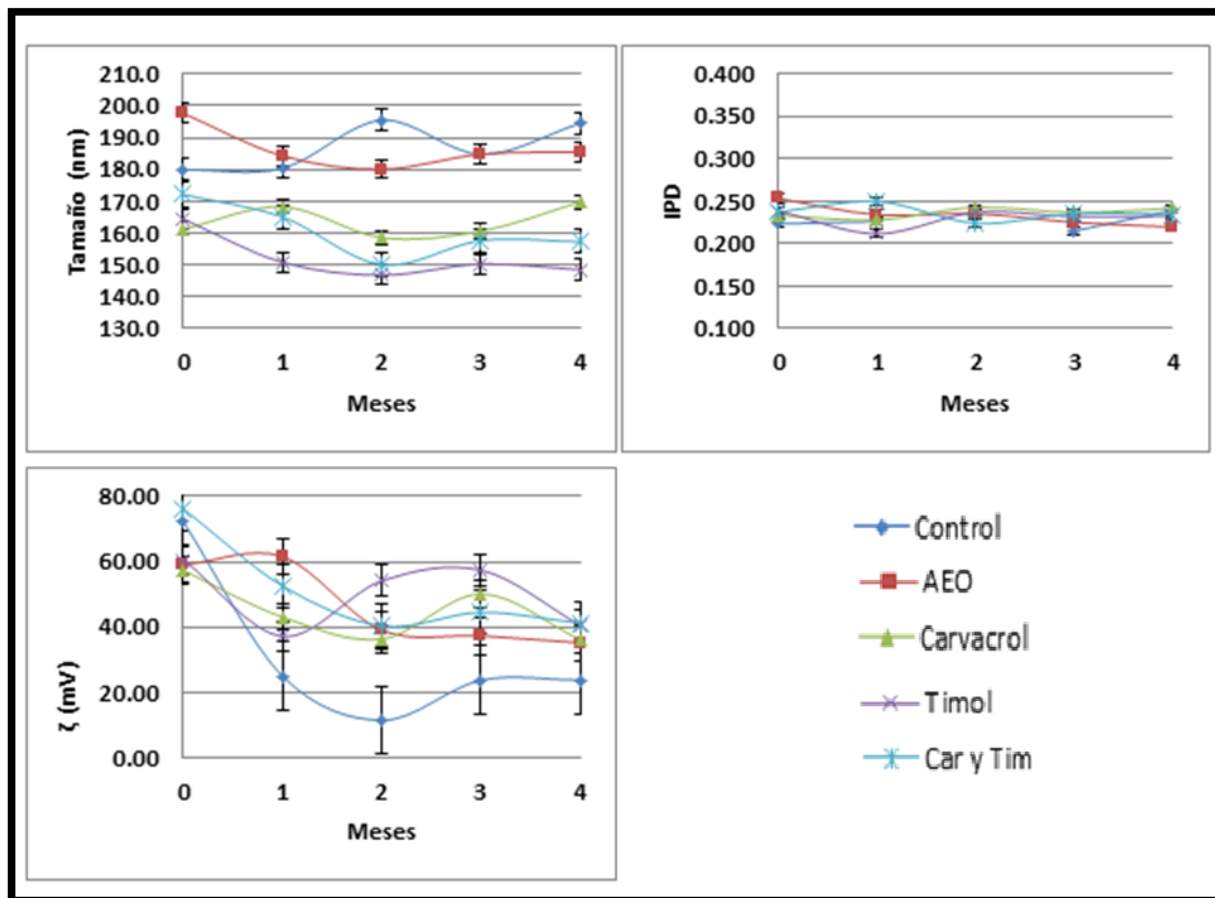


Fig. 3. Comportamiento en función del tiempo de tamaño, índice de polidispersión (IPD) y potencial Z ( $\zeta$ )

3) *Determinación de la eficiencia de encapsulación.* Diferentes estudios acerca de nanopartículas elaboradas con zeína, reportan eficiencias de encapsulación altas, entre 85 a 90% [19], mientras que Yunpeng et al. [14] reporta para timol y carvacrol eficiencias superiores a 50%. En la figura 4 se muestra la eficiencia de encapsulación (cantidad de fármaco encapsulada/cantidad inicial de fármaco), y la carga de fármaco (expresada como cantidad de fármaco/peso del sistema). El timol presenta la mayor eficiencia de encapsulación (E.E.) con 62.37%; mientras que para carvacrol la E.E. es de 54.37%. Yunpeng et al. [14] mencionan que el carvacrol es ligeramente más soluble en agua que el timol, esto pudiera provocar que, al estar suspendidas en agua, se de una mayor migración del activo nanoencapsulado, hacia el agua, esta característica puede ser la que favorezca una mayor encapsulación del timol. Por otro lado, los valores más altos de capacidad de carga se obtuvieron con el AEO y el carvacrol, ambos con valores cercanos al 46 %.

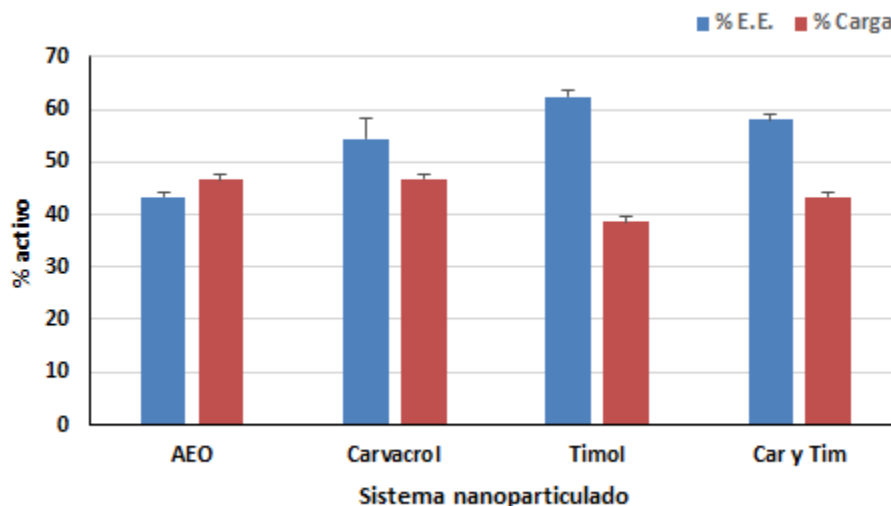


Fig. 4. Comparativo de la eficiencia de encapsulación (%E.E.) y capacidad de carga (% carga)

4) *Estudio de la velocidad de liberación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol a partir de las nanopartículas.*

La liberación de los activos contenidos en las nanopartículas se siguió empleado membranas de diálisis, durante un periodo total de 48 horas. No obstante, fue en un lapso de 4 horas donde se registró la mayor liberación de los activos. Como se muestra en la figura 5, a los 15 min, que se realizó la primera medición, se liberó más del 20% de los activos, lo que puede representar la fracción no encapsulada y por tanto libre en el sobrenadante. Al cumplirse una hora, se registró una liberación de poco más del doble con casi el 50% de los activos liberados. A partir de dos horas, la liberación se redujo registrando un aumento de una tercera parte de lo ya liberado, alrededor de 63%, y fue hasta las 4 horas que se liberó la mayor cantidad de los activos. El timol presentó la mayor cantidad liberada con un promedio de 906.78  $\mu\text{g}$  (72.54%), le siguió la mezcla carvacrol-timol con un 868.55  $\mu\text{g}$  (69.48%), el carvacrol registró una liberación máxima en el mismo periodo de 841.86  $\mu\text{g}$  (67.34%), por último el AEO registro su liberación máxima con 638.93  $\mu\text{g}$  (60.68%). Goncalves da Rosa et al. [13], quienes igualmente estudiaron la liberación con membranas de diálisis, registraron una rápida liberación de los activos entre 5 y 10 horas, y fue el timol el que mayor porcentaje de activo liberado presentó en relación al carvacrol. En la figura 5, se muestra el perfil de liberación de las nanopartículas donde se observa la cantidad liberada [ $\mu\text{g}$ ] y en el eje secundario el porcentaje de liberación, además en el recuadro se muestra la liberación para el periodo de cuatro horas que comprende la mayor liberación de los activos, donde se aprecia mejor la tendencia de liberación. Después de las cuatro horas hay incluso una disminución en la cantidad encontrada en el medio receptor, esto se puede atribuir a la rápida reducción en la cantidad del activo dentro de la bolsa de diálisis y la dilución del medio receptor.



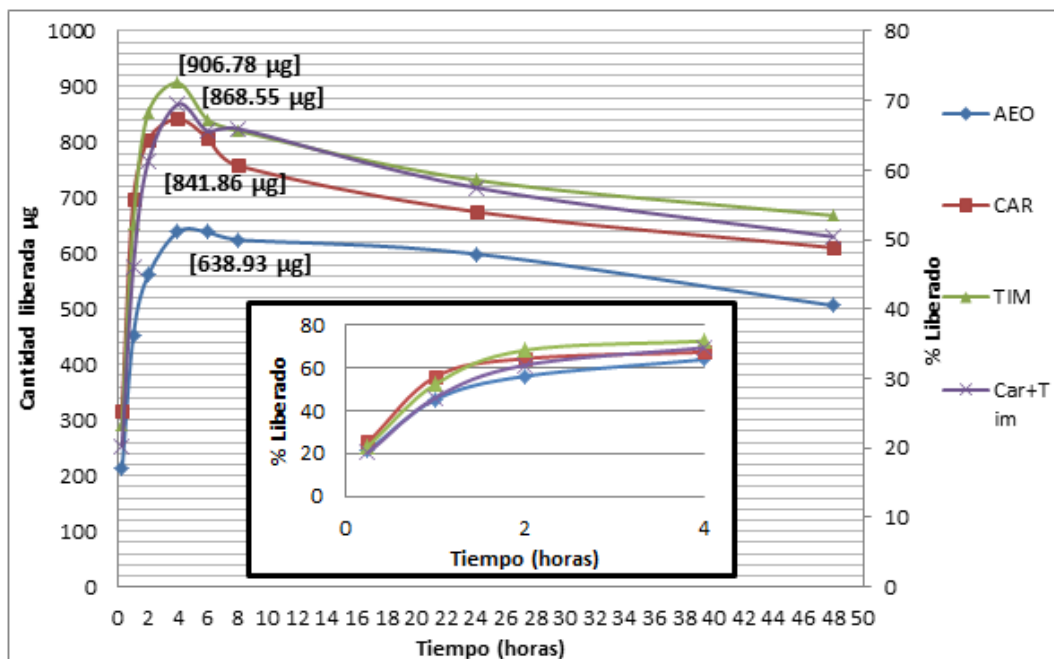


Fig. 5. Perfil de liberación de las nanopartículas mediante difusión a través de membranas de diálisis.

C. Pruebas de la actividad bactericida.

1) Prueba para la actividad bactericida del AEO, Carvacrol y timol. Los resultados muestran inhibición para el AEO con una concentración de hasta 30,000 ppm, El carvacrol inhibió a partir de la concentración correspondiente a 20,000 ppm, mientras que el timol inhibió a partir de una concentración de 15,000 ppm. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano es debida al carácter lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contiene; estos actúan rompiendo el flujo de electrones de los contenidos celulares, conduciendo a la muerte de los microorganismos [21]. La mayor actividad antimicrobiana radica en los compuestos fenólicos carvacrol y timol, ambas sustancias parecen tener mayor actividad afectando la permeabilidad de la membrana, pudiendo provocar que se alteren los procesos de difusión y de transporte de activos, además de que se modifica la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal [22].

2) Prueba para la actividad bactericida de las nanopartículas. Los comparativos de las zonas de inhibición de las nanopartículas se muestran en la figura 6. El AEO registra una inhibición ligeramente inferior a sus compuestos fenólicos puros (carvacrol y timol), de estos, el timol registra una mayor inhibición en comparación al carvacrol.

La forma en que estos compuestos nanoencapsulados mejoran la actividad antimicrobiana depende de las características que la nano-escala otorga a estos compuestos, ya sea por el aumento del área superficial que se expone hacia los microorganismos o la liberación de los activos con propiedades antimicrobianas [23]. Dentro de los múltiples efectos de inhibición, uno de ellos es el del sobrenadante, ya que en él se encuentra libre la parte no encapsulada de los compuestos, y propicia la eliminación de la bacteria de manera inicial. Estudios *in vitro* de nanopartículas de zeína realizados por Kaihara y Numata

[24] demostraron que tienen un perfil de liberación sostenida y controlada además de que tienen la capacidad de penetrar en el citoplasma de las células. Otro hipotético mecanismo de acción que presentan las nanopartículas, es la permeabilidad de la célula en contacto con las nanopartículas, reportándose daños que se categorizan como hoyos o poros en las membranas [25]. Son el tamaño y el patrón de entrega de los compuestos antimicrobianos los que principalmente mejoran el efecto antimicrobiano, ya que la interacción de las nanopartículas con las bacterias, es consecuencia de su tamaño y forma [26]. Comparando la actividad antimicrobiana del AEO, carvacrol y timol nanoencapsulados, contra aquellos en su estado libre, se encontró que nanoencapsulados se requiere de una menor concentración de los activos para lograr una inhibición visible. La concentración del AEO disminuyó de 30,000 ppm a 4,000 ppm es decir que se redujo un 86.6%. El carvacrol de 20,000 ppm a 5,000 ppm, logrando una reducción de 75%, mientras que el timol disminuyó de 15,000 ppm a 5,000 ppm lo que corresponde a un 66.6%. Las características que otorga la nanoencapsulación benefician la actividad antimicrobiana, logrando controlar su liberación, lo que proporciona diversas propiedades de difusión en membranas biológicas, entregando los compuestos de manera directa sobre las bacterias, logrando que los mecanismos de acción operen contra el crecimiento de las bacterias.

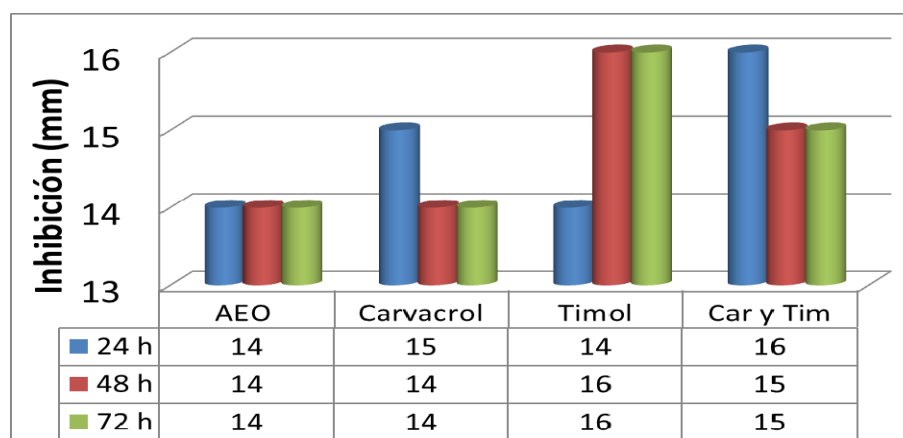


Fig. 6. Diámetro de inhibición de *L. innocua* para nanopartículas con los distintos activos en función del tiempo.

3) *Prueba para comprobar la liberación controlada de los activos a partir de las nanopartículas.* Se evaluó la liberación a través del tiempo, para comprobar la disminución del número de bacterias, por la acción de los compuestos liberados. En la tabla I se muestra la disminución del número de bacterias con respecto del tiempo, para las diferentes nanopartículas. Las nanopartículas control de zeína, sin carga de activos, no afectaron el crecimiento de *L. innocua*, encontrando valores que oscilaron entre  $1 \times 10^7$  y  $4.67 \times 10^7$  UFC/ml durante las 48 horas en que se realizó la prueba.

El carvacrol nanoencapsulado presentó una buena inhibición en la prueba de la actividad bactericida, sin embargo su liberación parece ser menos eficiente. Factores tales como la volatilidad del activo después de liberarse, una mayor solubilidad al encontrarse con etanol en la fracción del sobrenadante, y ser ligeramente más soluble en agua [14], resultaron en una menor inhibición. El timol fue el compuesto que más rápidamente logró inhibir a *L. innocua*, pues desde los primeros 15 min se registró una disminución en el crecimiento en un ciclo logarítmico y después de 1 hora no se registró crecimiento de la bacteria, inhibiéndola por completo en este lapso de tiempo. Las nanopartículas con timol fueron las que mayor actividad presentaron en la prueba para la actividad bactericida de los activos, al requerir una menor concentración para inhibir a la bacteria, tener el menor tamaño, menor índice de polidispersión, ser el más estable de acuerdo al potencial Z, y el de mayor eficiencia de

encapsulación. El solo hecho de presentar mejor actividad antibacteriana y contar con las mejores características de nanoencapsulación, pudo traducirse en una mejor inhibición. La mezcla de carvacrol-timol, que contiene mayor cantidad de carvacrol (75%) tuvo un comportamiento similar al carvacrol, presentó un comportamiento más regular, pero la disminución del crecimiento llevó más tiempo. Al tener mayor concentración de carvacrol, es predecible un comportamiento similar, no obstante, aunque la acción de estos compuestos combinados no fue como se esperaba, su liberación prolongada puede ser útil en casos en los que se requiera mayor tiempo para menores cargas bacterianas.

Hola

Tabla I. Inhibición de *L. innocua* por acción de la liberación de los activos a partir de las nanopartículas.

Nanopartículas	Control	AEO	Carvacrol	Timol	Car y Tim
Tiempo (horas)	UFC/ml				
0.25	1.0 x 10 <sup>7</sup>	5.0 x 10 <sup>5</sup>	1.77 x 10 <sup>6</sup>	1.57 x 10 <sup>6</sup>	1.37 x 10 <sup>6</sup>
1	4.67 x 10 <sup>7</sup>	1.33 x 10 <sup>5</sup>	3.33 x 10 <sup>3</sup>	0	6.0 x 10 <sup>4</sup>
2	3.0 x 10 <sup>7</sup>	3.33 x 10 <sup>4</sup>	6.67 x 10 <sup>4</sup>	0	2.67 x 10 <sup>4</sup>
4	1.33 x 10 <sup>7</sup>	0	3.33 x 10 <sup>4</sup>	0	2.0 x 10 <sup>3</sup>
6	1.67 x 10 <sup>7</sup>	0	3.0 x 10 <sup>3</sup>	0	3.33 x 10 <sup>3</sup>
8	1.67 x 10 <sup>7</sup>	0	0	0	6.67 x 10 <sup>3</sup>
24	3.33 x 10 <sup>7</sup>	0	3.33 x 10 <sup>2</sup>	0	3.33 x 10 <sup>2</sup>
48	1.0 x 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0

El control, muestra la presencia de bacterias dentro del mismo ciclo logarítmico de manera constante, por lo que se puede decir, que la formulación placebo, no influye en la inhibición del crecimiento de la bacteria, y que ninguno de los componentes altera su crecimiento; incluso, es factible que la zeína otorgue nutrientes, a pesar de no contener varios de los aminoácidos esenciales, dado que Yunpeng et al. [14] mencionan que la rápida liberación de las nanopartículas cargadas de carvacrol y timol, se debió a la digestión de la zeína por *E. coli*, También Lambert et al. [27] mencionan que daños en la membrana pueden ser mayores en la presencia de nutrientes. Las nanopartículas de zeína presentan un perfil de liberación bifásico, los autores creen que la primera fase es rápida, y representa la porción de timol que se encontraba en la fase externa de las nanopartículas; la segunda fase es más lenta y representa el timol que estaba contenido en las nanopartículas de zeína [28].

#### IV. CONCLUSIONES

- Se prepararon nanopartículas de zeína incluyendo AEO, carvacrol, timol y mezclas carvacrol-timol, con eficiencias de encapsulación superiores al 60% en el caso de timol.
- Las nanopartículas mostraron una morfología casi esférica con tamaños inferiores a 200 nm y potenciales Z lo suficientemente elevados como para asegurar la estabilidad física de las

nanopartículas, las cuales fueron estables, sin variaciones significativas de tamaño e IPD durante los 4 meses en que se les dio seguimiento.

- Los resultados mostraron una mayor inhibición del crecimiento de *L. innocua* para los principios activos nanoencapsulados, que en su estado libre. El timol encapsulado presenta una inhibición total a partir de 1 hora en contacto con la bacteria.
- Las nanopartículas placebo o control (sin principio activo) no inhiben el crecimiento de la bacteria. Estos activos encapsulados, en particular el timol, constituyen una excelente alternativa como sistemas antimicrobianos con aplicaciones en distintas áreas.

## RECONOCIMIENTOS

Se agradece el apoyo para la realización de este trabajo, al proyecto PAPIIT 216016 y a las cátedras PIAPI 1638 y PIAPI 1641, por los recursos otorgados.

## REFERENCIAS

- [1] Marriott, N. G. (2003). *Principios de higiene alimentaria*. España: Acribia.
- [2] Schöbitz, R., Ciampi, L., Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* Un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, pp. 1-8.
- [3] Ryser, E. T. & Marth, E. H. (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. s.l.:CRC Press pp. 279-297.
- [4] El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Ait, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220-243.
- [5] Olivares, M. A., López, A. (2013). Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor. *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 7(1), 78-86.
- [6] Ryman, D. (1994). *Aromaterapia. Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales*. Barcelona: Kairós.
- [7] Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., Hazan R. (2015). *Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-16.
- [8] Yangchao, L., Qin, W. (2014). Zein-Based Micro - and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery : A Review. *Journal of Applied Polymer Science*, 10(2), 1-12.
- [9] Sánchez Barrera, A. (2015). Toxicidad aguda en *Artemia franciscana* Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especias, Tesis, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, México.
- [10] NMX-F-074-SCFI-2011 (2011). Alimentos para Humanos-Aceites esenciales, aceites y grasas vegetales o animales - Determinación del índice de refracción con el refractómetro de ABBE - Método de prueba. s.l.:s.n.
- [11] NMX-F-075-SCFI-2012 (2012). Alimentos-Aceites y grasas vegetales o animales Determinación de la densidad relativa - Método de prueba. s.l.:s.n.
- [12] Díaz Morato, C., Pérez Coello, S. (2006). Análisis de los compuestos responsables del aroma de las especias. *Investigación Química*, 3(102), 31-35.
- [13] Goncalves da Rosa, C., Vinicius de Oliveira, M., Matos de Carvalho, S., Zapelini de Melo, A., Jummes, B., da Silva, T., Martelli Silvia, M., Villetti Marcos, A., Cleber Bertoldi, .F, Manique Barreto, P. (2015). Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolic monoterpenes. *Colloids and Surfaces A: Physicochem and Engineering Aspects*, 4(481), 337-344.

- [14] Yunpeng, W., Yaguang, L., Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, 10(48), 283-290.
- [15] Parris, N., Cooke, P. H., Hicks, K. (2005). Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4788-4792.
- [16] Miles, A., Mirsa, S. (1938). *The estimation of the bactericidal power of the blood*. Department of Pathology, British Postgraduate Medical School, 37(6), 732- 749.
- [17] Corella, R., Ortega, M. (2013). Importancia del aceite esencial y la producción de orégano en el estado de Sonora. *Revista de Ciencias Biológicas y de la salud*, 15(1), 57-64.
- [18] Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera ed. España: AIYANA.
- [19] Ravishankar, R. (2016). *Advances in food Biotechnology*. Primera ed. Mysore: Wiley Blackwell, pp 504-506.
- [20] Asmatulu, R. (2013). *Nanotechnology Safety*. Primera ed. San Diego : Elsevier. pp. 40.
- [21] Denyer, S., Hugo, B. (1991). *Mechanisms of action of Chemical Biocides: Their Study and Exploration*. Primera ed. s.l.:Wiley. pp 261-268.
- [22] Calvo, J., Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.
- [23] Castrillón, L., Palma, A. (2014). Actividad antimicótica de nanopartículas. *Mundo Nano*, 7(12), 6-18.
- [24] Kaihara, S., Numata, K. (2013). Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 1629-1654.
- [25] Santos, C., Albuquerque, J., Sampaio, F., Keyson, D. (2013). Nanomaterials with Antimicrobial Properties: Applications in Health Sciences. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Microbiology Book Series, 4, pp. 143-154.
- [26] Suresh, A. (2015). *Co-Relating Metallic Nanoparticle Characteristics and Bacterial Toxicity*. Primera ed. New York: Springer, pp 4-6.
- [27] Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- [28] Bilia, A., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, F., Bergonzi M. (2014). Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 25, 1-14.