



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Comparación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial
de orégano y sus derivados fenólicos nanoencapsulados sobre
Listeria innocua.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO EN
ALIMENTOS

P R E S E N T A

Mendoza Zavaleta José Delbert

Asesoras:

Dra. Clara Inés Álvarez Manrique.

Dra. Adriana Ganem Rondero

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano y sus derivados fenólicos nanoencapsulados sobre Listeria innocua.

Que presenta el pasante: **José Delbert Mendoza Zavaleta**
Con número de cuenta: 303851109 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Octubre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	I.A. Ana María Soto Bautista	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga

AGRADECIMIENTOS

Llevar adelante este proyecto se ha convertido en un verdadero trabajo en equipo, quisiera agradecer a las personas que me ayudaron a lo largo de esta última etapa y durante mis estudios.

A la UNAM, por transmitirme orgullo, identidad, enseñarme que siempre hay algo nuevo por aprender, y el privilegio de formar parte de su comunidad.

A mis asesoras.

A la Dra. Clara Inés Álvarez mi sincera gratitud, por la oportunidad de oro para la realización de este proyecto, ya que consistentemente permitió que fuera un mérito, guiándome en la dirección correcta durante la investigación.

A la Dra. Adriana Ganem por la oportunidad que me brindó para la realización de este estudio, por su paciencia, motivación, y hacer del desarrollo del proyecto una experiencia muy grata.

Quiero reconocer el apoyo de la profesora QFB. Brígida del Carmen Camacho artífice vital en la concepción del proyecto, ofreciéndome la oportunidad de aprender. Además del invaluable apoyo de la QFB. Alejandra Sánchez y al Sr. Rodolfo Robles, por sus recomendaciones, el interés, y el apoyo que me brindaron.

A los expertos integrantes del jurado, por su paciencia y apoyo para la culminación y validación de este proyecto, gracias por la retroalimentación y la consideración de mi trabajo.

A los profesores: I.A. Ana María, Dra. Gisela, al Sr. Alejandro quienes hicieron de este proyecto una experiencia inolvidable. A las Doctoras y Maestros integrantes del laboratorio de tecnología farmacéutica: Guadalupe, Rosario, Tere, Irene, Gisela y Sergio, por su colaboración y hacer amena mi estancia, así mismo a Lidia e Isaac integrantes del equipo de productos naturales.

A mis compañeros y amigos. Especialmente a Berenice por todo el apoyo durante la carrera, y ser promotora para la realización del proyecto. A Héctor, Edna, Daniel, Iván, Maricela, Mariana, Alejandro, Nora, Laura, Absalón y Liz por su invaluable apoyo, su motivación y su cariño.

Al Sr. Rubén García Sordo por sus puntuales consejos, enseñanzas, calidez humana y alentarme a lo largo de mi carrera.

A mi abuela. Por motivarme e impulsarme en cada momento, por sus sabios consejos, y su peculiar cariño.

A mis hermanas. Sara, por su sensacional forma de ser, por impulsarme a ser una mejor persona y el incomparable cariño que siempre me has brindado. A Dania, extraordinaria y especial persona, mi modelo a seguir, por mostrarme que con esfuerzo no hay límites.

A mi padre por motivarme, apoyarme en todo momento, por sus consejos y lecciones de vida, por alentarme día tras día.

A mi madre la persona más maravillosa, ejemplo de astucia, paciencia, lucha, y nobleza, gracias mamá este trabajo lo dedico a ti.

Gracias a todos. Este logro no habría sido posible sin cada uno de ustedes.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
1. ANTECEDENTES	19
1.1. Riesgos para la salud derivados del consumo de alimentos.....	19
1.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	20
1.1.2. Limpieza y desinfección.....	21
1.1.2.1. Limpieza.....	22
1.1.2.2. Desinfección.....	22
1.1.2.2.1. Métodos de desinfección.....	24
1.1.2.2.2. Mecanismos de la acción desinfectante.....	25
1.1.2.2.3. Desinfectantes	26
1.2. Aceites esenciales	27
1.2.1. Características	28
1.2.2. Métodos de obtención	29
1.2.3. Perfil antimicrobiano de los aceites esenciales	31
1.2.4. Aspectos legales y seguridad.....	36
1.3. Orégano.....	37
1.3.1. Descripción.....	37
1.3.2. Aceite esencial de orégano	38
1.3.3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano.....	39
1.4. Listeria	40
1.4.1. Listeria monocytogenes.....	40
1.4.2. Biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	50
1.4.2.1. Remoción de Biopelículas.....	51
1.4.2.2. Estrategias para el control de biopelículas	53

1.4.3. Listeria como indicador de limpieza	55
1.5. Nanotecnología	56
1.5.1. Nanotecnología en el área de los alimentos	57
1.5.2. Nanopartículas antimicrobianas	59
1.5.2.1. Nanopartículas en el control de biopelículas.....	59
1.5.2.2. Mecanismos de inhibición de las nanopartículas con sustancias antimicrobianas	60
1.5.2.3. Uso de la nanotecnología para la formulación de aceites esenciales como antimicrobianos	61
1.5.2.3.1. Métodos para obtener nanopartículas con aceites esenciales.	62
1.5.3. Zeína como biopolímero para la formación de nanopartículas	63
2. METODOLOGÍA.....	66
2.1. Problema y objetivos.	66
2.2. Cuadro metodológico	68
2.3. Materiales y métodos.....	69
2.3.1. OBJETIVO PARTICULAR 1:.....	69
2.3.1.1. Origen del material biológico	69
2.3.1.2. Identificación botánica de la especie de orégano	69
2.3.1.3. Acondicionamiento del orégano para su caracterización y la extracción del aceite esencial	69
2.3.1.4. Determinación de humedad del orégano	70
2.3.1.5. Determinación del tamaño de partícula del orégano molido.....	70
2.3.1.6. Extracción de aceite esencial de orégano	71
2.3.1.7. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del aceite esencial de orégano	73
2.3.1.7.1. Índice de refracción	73
2.3.1.7.2. Densidad.....	73
2.3.1.7.3. Espectroscopia infrarroja.....	74
2.3.1.7.4. Color.....	74

2.3.1.7.5. Olor.....	75
2.3.2. OBJETIVO PARTICULAR 2:.....	75
2.3.2.1. Nanoencapsulación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol.....	75
2.3.2.2. Caracterización de las nanopartículas	76
2.3.2.2.1. Microscopia de las nanopartículas.....	76
2.3.2.2.2. Determinación de tamaño, índice de polidispersión y potencial Z.....	77
2.3.2.2.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	77
2.3.2.2.4. Determinación de la liberación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol.....	78
2.3.3. OBJETIVO PARTICULAR 3:.....	79
2.3.3.1. Origen del material biológico	79
2.3.3.1.1 Tinción Gram	79
2.3.3.1.2 Prueba de oxidasa	80
2.3.3.1.3 Prueba de catalasa.....	80
2.3.3.2 Prueba para la actividad bactericida del AEO, Carvacrol y timol.....	81
2.3.3.3. Prueba para la actividad bactericida de las nanopartículas.....	81
2.3.3.4. Prueba para comprobar la liberación controlada de los activos de las nanopartículas..	82
3. RESULTADOS	83
3.1. Resultados del objetivo particular 1	83
3.1.1. Identificación botánica de la especie de orégano.	83
3.1.2. Acondicionamiento del orégano para su caracterización y la extracción de su aceite esencial	83
3.1.3. Determinación de humedad del orégano	84
3.1.4. Determinación del tamaño de partícula del orégano molido.....	85
3.1.5. Extracción de aceite esencial de orégano	86
3.1.6. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del aceite esencial de orégano	88
3.1.6.1. Índice de refracción	88

3.1.6.2. Densidad.....	89
3.1.6.3. Espectroscopia infrarroja.....	90
3.1.6.4. Color.....	92
3.1.6.5. Olor.....	93
3.2. Resultados del objetivo particular 2	93
3.2.1. Nanoencapsulación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol.....	93
3.2.2. Caracterización de las nanopartículas	95
3.2.2.1. Determinación de las dimensiones y morfología de las nanopartículas mediante microscopia	95
3.2.2.2. Determinación de tamaño, índice de polidispersión y potencial Z.....	96
3.2.2.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	104
3.2.2.4. Determinación de la liberación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol.....	105
3.3. Resultados del objetivo particular 3.....	107
3.3.1. Identificación del material biológico.....	107
3.3.1.1. Tinción Gram	107
3.3.1.2 Prueba de oxidasa.....	108
3.3.1.3 Prueba de catalasa.....	108
3.3.2 Prueba para la actividad bactericida del AEO, Carvacrol y timol.....	108
3.3.3. Prueba para la actividad bactericida de las nanopartículas.....	113
3.3.4. Prueba para comprobar la liberación controlada de los activos de las nanopartículas...	123
CONCLUSIONES.....	129
PROSPECTIVAS	130
BIBLIOGRAFÍA.....	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Costos de limpieza.....	22
Tabla 2 CMI de distintos aceites esenciales	34
Tabla 3 Contenido de aceites esenciales en el orégano	38
Tabla 4 Características del aceite esencial de orégano	38
Tabla 5 Composición del aceite esencial de orégano	39
Tabla 6 Síndromes por <i>L. monocytogenes</i>	48
Tabla 7 Propiedades de la Zeína (Esquivel 2013)	64
Tabla 8 Porcentaje de humedad, materia volátil y sólidos totales.....	84
Tabla 9 Tamizaje del orégano del análisis granulométrico.	85
Tabla 10 Análisis granulométrico del orégano molido	86
Tabla 11 Cantidad de aceite esencial de orégano extraído por hidrodestilación.....	87
Tabla 12 Índice de refracción del aceite extraído.....	88
Tabla 13 Densidad del aceite esencial de orégano	89
Tabla 14 Comparación de los compuestos de acuerdo al número de onda dentro de la composición del aceite esencial de orégano	91
Tabla 15 Valores de color mediante colorimetría.....	92
Tabla 16 Comparativo de los parámetros de tamaño Índice de polidispersión y potencial Z promedio para las nanopartículas del aceite esencial de orégano, carvacrol, timol y la mezcal carvacrol-timol.	99
Tabla 17 Pruebas para la identificación del género <i>listeria</i>	108
Tabla 18 Comparación de las inhibiciones del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente al AEO nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.	116
Tabla 19 Comparación de las inhibiciones del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente al carvacrol nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.	116
Tabla 20 Comparación de las inhibiciones del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente al timol nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.	118

Tabla 21 Comparacion de las inhibiciones del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente al carvacrol + timol (50/50) nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.	119
Tabla 22 Comparacion de las inhibiciones del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente al carvacrol + timol (75/25) nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.	120
Tabla 23 Comparacion de las inhibiciones del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente al carvacrol + timol (25/75) nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.	121
Tabla 24 Inhibición de <i>L. innocua</i> por acción de la liberación sostenida del AEO, carvacrol y timol, a partir de su encapsulación en nanopartículas.	120
Tabla 25 Prueba F para varianzas de dos muestras para el AEO	146
Tabla 26 Prueba t del AEO para dos muestras suponiendo varianzas desiguales	146
Tabla 27 Prueba F para varianzas de dos muestras para el carvacrol.....	146
Tabla 28 Prueba t del carvacrol para dos muestras suponiendo varianzas desiguales	147
Tabla 29 Prueba F para varianzas de dos muestras para el timol	147
Tabla 30 Prueba t del Timol para dos muestras suponiendo varianzas desiguales	148
Tabla 31 Prueba F para varianzas de dos muestras para el carvacrol + timol.....	148
Tabla 32 Prueba t del carvacrol + timol para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química del Carvacrol.....	33
Figura 2 Estructura química del Timol.....	34
Figura 3 Orégano (Spinridon E. Kintzios, 2003)	37
Figura 4 <i>L. monocytogenes</i> (Brooks, 2011).....	41
Figura 5 Formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	51
Figura 6 Representación de los efectos de las nanopartículas sobre las bacterias (Santos, Albuquerque, Sampaio, & Keyson, 2013).....	60
Figura 7 Ilustración esquemática de las plataformas de nanopartículas para aceites esenciales antimicrobianos: a) liposomas, b) nanopartículas lipídicas sólidas, c) nanoesferas poliméricas, d) nanocápsulas poliméricas, y e) Nanoemulsiones (P. São , y otros 2013)	62
Figura 8 Diagrama de tres fases para la solubilidad de la zeína en etanol y agua (Shukla y Cheryan 2001).	65
Figura 9 Termobalanza OHAUS MB-45	70
Figura 10 Tamizador ERWEKA AR 400.....	71
Figura 11 Aparato de hidrodestilación. Modificación de (El Asbahani et al., 2015).	72
Figura 12 Sistema de hidrodestilación de laboratorio (Indiamart 2016).	72
Figura 13 Espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet iS 10FT	74
Figura 14 Nanoprecipitación modificación de (Goncalves da Rosa et al., 2015)	76
Figura 15 Zetasizer Nano-ZS90	77
Figura 16 Centrifuga (Zentrifugen EBA 12).....	78
Figura 17 Espectro UV-Visible (Hitachi U-5100)	78
Figura 18 Esquema de las diluciones para la liberación controlada.....	82
Figura 19 Muestra integrada a la colección botánica	83
Figura 20 Selección del material biológico (A) Hojas de orégano, (B) Materia extraña	84
Figura 21 Extracción del aceite esencial de orégano mediante hidrodestilación.	87
Figura 22 Espectro infrarrojo del aceite esencial de orégano.....	90
Figura 23 Espectro infrarrojo característico de fenoles (McMurry 2012).....	91
Figura 24 Comparativo del color del aceite esencial de orégano con el sistema Munsell	92
Figura 25 Microscopia de las nanopartículas con aumento de 10,000X del aceite esencial de orégano (AEO), carvacrol (CAR), timol (TIM) y la mezcla carvacrol-timol (CAR y TIM)	95

Figura 26 Variación del tamaño de las nanopartículas en almacenamiento desde su elaboración y durante dos meses.....	96
Figura 27 Variación del Índice de polidispersión (IPD) de las nanopartículas en almacenamiento durante dos meses y desde su elaboración.	97
Figura 28 Variación del Potencial Z de las nanopartículas en almacenamiento durante dos meses y después de su elaboración.....	98
Figura 29 Variación en el tamaño de las nanopartículas en cuatro meses de almacenamiento.	101
Figura 30 Variación en el Índice de polidispersión (IPD) de las nanopartículas en cuatro meses de almacenamiento.	102
Figura 31 Variación en el Potencial Z de las nanopartículas en cuatro meses de almacenamiento.....	103
Figura 32 Comparativo de la Eficiencia de encapsulación de las distintas nanopartículas.....	104
Figura 33 Perfil de liberación de las nanopartículas, mediante permeación a través de membranas de diálisis (Total y en un periodo de 4 horas).....	106
Figura 34 Tinción Gram de <i>L. innocua</i> con aumento de 100X.....	107
Figura 35 Concentraciones en ppm de 1) AEO, 2) Carvacrol y 3) Timol.....	109
Figura 36 Prueba de inhibición para el AEO 1) Caja Petri, 2) Concentración donde se presentó la inhibición visible	110
Figura 37 Prueba de inhibición para el Carvacrol 1) Caja Petri, 2) Concentración donde se presentó la inhibición visible.....	111
Figura 38 Prueba de inhibición para el Timol 1) Caja Petri, 2) Concentración donde se presentó la inhibición visible	113
Figura 39 Prueba de las zonas de inhibición (mm) de <i>L. innocua</i> con las nanopartículas de los diferentes activos en suspensión, en tres días de evaluación.....	114
Figura 40 Prueba de las zonas de inhibición (mm) de <i>L. innocua</i> con las nanopartículas de los diferentes activos resuspendidas, en tres días de evaluación.	115
Figura 41 Comparación de la concentración requerida para inhibir visiblemente a <i>L. innocua</i>	122
Figura 42 Logaritmos linealizados de la cinética de disminución de las bacterias por la liberación de los activos nanoencapsulados a través del tiempo	126

Figura 43 Comparación de las liberaciones de los activos, a través de membrana de diálisis y por inhibición de carga bacteriana.....	128
Figura 44 Certificado de la identificación taxonómica del orégano.....	142
Figura 45 Tablilla de las cartas de Munsell.....	143
Figura 46 Espectrograma de absorción del AEO entre 250 y 310 nm. Longitud de onda máxima de absorción = 274.0 nm.	144
Figura 47 Espectrograma de absorción del Carvacrol entre 240 y 310 nm. Longitud de onda máxima de absorción = 273.0 nm.	144
Figura 48 Espectrograma de absorción del Timol entre 245 y 335 nm. Longitud de onda máxima de absorción = 275.0 nm.	145
Figura 49 Curvas patrón y la ecuación de la recta, para el cálculo de concentración por espectrofotometría UV, del: Aceite esencial de orégano1) AEO, Carvacrol 2) Car, Timol 3) Tim, y la mezcla carvacrol timol 4) Car-Tim.....	145

ABREVIATURAS

Å	Ångström
AEO	Aceite esencial de orégano
BHI	Caldo infusión cerebro corazón
°C	Grados Celsius
CAR	Carvacrol
cm	Centímetros
cm ⁻¹	Centímetros recíprocos
cm ²	Centímetros cuadrados
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DLS	Dispersión de luz dinámica
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
h	Horas
IR	Infra Rojo
kD	kiloDalton
kHz	kiloHertz
L	Litros
log	Logaritmo decimal
λ	Longitud de onda
m	Metros
min	minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	milivoltios
μg	Microgramos
μL	microlitos
μm	micrómetros
nm	Nanómetros
NR	Nanopartículas re-suspendidas

NS	Nanopartículas suspendidas
PDL	Índice de polidispersión
PLGA	poli- láctico-co-glicólico
ppm	partes por millón
rpm	revoluciones por minuto
C+T	Carvacrol + Timol
TIM	Timol
TSA	Tripticasa soya agar
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
v	Volumen
w	Peso
ζ	Potencial Zeta

RESUMEN.

El control de bacterias patógenas con interés en la industria de los alimentos, como *L. monocytogenes*, ha llevado a la investigación de métodos alternativos, entre ellos la utilización de productos naturales como el aceite esencial de orégano, y sus derivados fenólicos (carvacrol y timol), los cuales entre sus múltiples características, cuentan con actividad antimicrobiana, además de ser reconocidos como GRAS por la FDA, sin embargo cuentan con desventajas, como alta volatilidad, fuertes aromas, poca solubilidad en agua, fotodegradación y termodegradación. La nanotecnología es un método con diversas aplicaciones, que permiten encapsular distintos compuestos antimicrobianos, con múltiples ventajas: aumenta su actividad antimicrobiana, otorga un sistema de liberación sostenido y controlado, y proteger a los compuestos de una posible degradación. En el presente trabajo se extrajo el aceite esencial de orégano, y se evaluó su efecto inhibitorio, así como de sus derivados fenólicos carvacrol y timol, libres y nanoencapsulados, y se encontró que con la nanoencapsulación, se logra disminuir la concentración para lograr inhibir en al menos 66%, además de que le otorga especiales atributos que los compuestos en forma libre carecen; como mayor solubilidad, disminución de fuertes aromas, y la liberación periódica de los activos.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de las plantas de procesamiento de alimentos, las superficies de contacto son limpiadas y sanitizadas diariamente, sin embargo muchas otras superficies como los tanques de almacenamiento, los exteriores de las bombas, paredes y techos no presentan un plan de limpieza efectivo. Esto genera una oportunidad para la proliferación de bacterias y la formación de biopelículas en presencia de humedad. (Navia et al., 2010) Entre las bacterias patógenas con importancia en la industria de alimentos se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*, *Salmonella ssp*, *Campylobacter jejuni* entre otros (Vanegas et al., 2009).

La limpieza y desinfección de superficies, presenta dificultad, por la habilidad de microorganismos como *L. monocytogenes* de formar biopelículas; siendo las células más resistentes y con periodos de adhesión de tiempo de tan solo 2 horas en superficies como: tuberías, superficies de corte, cintas transportadoras y paredes (Beresford et al., 2001). La listeriosis es una de las enfermedades más importantes transmitidas por alimentos, las manifestaciones de la enfermedad comprenden septicemia, meningitis y encefalitis. En mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas pueden provocar abortos espontáneos (Castañeda et al., 2014). Aunque la morbilidad de la listeriosis es baja, la mortalidad de la enfermedad sistémica/encefálica puede ser alta. La letalidad de casos severos de listeriosis oscila entre el 20 al 30% (Carpentier y Cref 2011).

La contaminación bacteriana puede ser controlada por métodos químicos y físicos. Se pueden emplear métodos con desinfectantes comunes como es el uso de compuestos clorados, yodados, bromo, amonio cuaternario, desinfectantes ácidos y peróxido de hidrógeno (Marriott, 2003); o métodos alternativos como el uso de bacteriófagos, enzimas y nanopartículas, entre otros (Aswathanarayan y Vitt 2013). La nanotecnología es una metodología con varias aplicaciones que pueden permitir encapsular compuestos antimicrobianos, mediante encapsulación física, adsorción o conjugación química, que permite crear un sistema artificial con enorme potencial, y esto puede presentar varias ventajas, tales como mejorar significativamente la actividad del compuesto antimicrobiano,

en contraste con el producto libre, y la liberación de los antimicrobianos en una forma sostenida y controlada (Ferreira et al., 2010).

De acuerdo a un estudio de 3000 aceites esenciales de varias plantas solo el 10% tienen importancia en la industria cosmética, alimentaria o farmacéutica. Muchos de ellos son reconocidos como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA. Estos compuestos pueden ser letales para células microbianas, o inhibir su crecimiento. Los aceites esenciales de las plantas, principalmente son agentes inhibidores de bacterias Gram positivos. Aunque grupos como el orégano, clavo, canela, y cítricos son efectivos para ambos grupos de bacterias. Los mayores componentes con actividad antimicrobiana que se encuentran en estas plantas son: compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos, e isoflavonoides (Da-Wen Sun 2014).

1. ANTECEDENTES

1.1. Riesgos para la salud derivados del consumo de alimentos

Debido a la gran dimensión y diversificación que presenta la industria alimentaria, la protección al consumidor se ha convertido en una prioridad, para ello, es necesario tomar medidas higiénicas en todas las fases de la cadena de elaboración. La seguridad de los alimentos se consigue mediante prácticas sanitarias correctas, para lo que es fundamental, que en la industria alimentaria se tome conciencia y se apliquen medidas adecuadas. Para entender mejor el papel de la higiene de los alimentos, se debe conocer el mecanismo por el cual los alimentos pueden convertirse en vehículos de transmisión de enfermedades, así como cuales son los factores desencadenantes, para poder evitarlos (García, 2013).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Más de 250 enfermedades se han descrito, las cuales se producen por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos, parásitos o sustancias tóxicas. Los alimentos están expuestos a una infinidad de contaminantes, según la fuente de origen, se pueden diferenciar entre física, química y biológica (Corlett, 1998).

- **Riesgos biológicos.** Incluyen bacterias patógenas, parásitos, virus, toxinas de fuentes biológicas. Durante la producción, procesamiento, empaque, transporte, preparación y almacenamiento, cualquier alimento puede estar expuesto a la contaminación bacteriana. Los organismos patógenos más comunes que causan enfermedades son: *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Escherichia coli*. Los medios más comunes de esparcimiento de microorganismos son las manos, el contacto de alimentos con superficies contaminadas y utensilios.
- **Riesgos químicos.** Los químicos que causan enfermedades se dividen en dos categorías:
 - a) Químicos de origen natural: aquellas sustancias que se constituyen de forma natural en el alimento, como toxinas.
 - b) químicos añadidos intencional o involuntariamente a los alimentos en su cultivo, cosecha, almacenamiento, procesamiento, empaque o distribución. Estos químicos

pueden ser: pesticidas, fertilizantes, residuos de fármacos, antibióticos, aditivos, productos de limpieza, lubricantes y colorantes.

- **Riesgos físicos.** Son material físico que no se encuentra normalmente en los alimentos y que causa enfermedades. Los materiales u objetos que se identifican son, trazas de vidrio, metal, plástico, cabello, astillas de hueso, insectos etc.

Es esencial para la salud mantener la seguridad alimentaria, disminuyendo la contaminación y previniendo enfermedades a través de guías y prácticas para el aseguramiento de alimentos (Dando, 2012).

1.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son causadas por la ingestión de alimentos que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población. Aproximadamente el 66% de todos los brotes de enfermedades de origen alimentario son causados por bacterias patógenas (Marriott 2003). Las ETA están directamente relacionadas con la inocuidad alimentaria, la cual se refiere al conjunto de prácticas y comportamientos orientados a mantener las condiciones de limpieza y aseo que favorezcan la salud de las personas. La higiene de los alimentos abarca un amplio campo que incluye la manipulación de los alimentos de origen vegetal, la cría, la alimentación, la comercialización y el sacrificio de los animales así como todos los procesos sanitarios encaminados a prevenir que las bacterias de origen humano lleguen a los alimentos (Rosas et al., 2012). Las ETA pueden manifestarse a través de:

- **Infecciones transmitidas por alimentos:** son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos.
- **Intoxicaciones causadas por alimentos:** ocurren cuando las toxinas de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado.
- **Toxi-infección causada por alimentos:** es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales producen o liberan toxinas una vez que son ingeridos.

1.1.2. Limpieza y desinfección

Protocolos adecuados para las operaciones de la limpieza y desinfección en las industrias alimentarias tiene gran importancia, ya que se ha evaluado que cerca de un 30% de los brotes declarados de toxiinfecciones de origen alimentario, el factor responsable es la contaminación de equipamientos. El proceso de limpieza y desinfección debe realizarse de una forma ordenada para conseguir un buen resultado en un tiempo razonable, por ello, a la hora de realizar dicho proceso, es preciso llevar a cabo varias acciones (Puig-Durán, 1999):

1. Acondicionamiento en seco de las zonas a higienizar.
2. Prelavado.
3. Proyección de detergente, cepillado y aclarado.
4. Desinfección y aclarados finales.

El objetivo de la limpieza es eliminar de manera completa y permanente la suciedad de las superficies. La suciedad es materia que se encuentra en un sitio incorrecto, se compone de polvo con partículas sueltas de materia orgánica. Los residuos que persisten en la maquinaria, utensilios y depósitos en la preparación de alimentos, también reciben el nombre de suciedad (Wilbrett y Escobar, 2000).

El costo más elevado de la limpieza es el trabajo (mano de obra), 46.5% del importe se gasta en lavar, desinfectar y en el personal asignado de la calidad. El agua sigue en el valor del costo, las plantas de alimentos utilizan grandes cantidades de agua en la aplicación de compuestos limpiadores, además de incluir los costos por desagüe de aguas residuales y sobrecargas. La disponibilidad y el costo de la energía necesaria para producir agua caliente y vapor son factores importantes. Aunque los compuestos limpiadores y los desinfectantes son caros, su costo resulta razonable si se considera que estos últimos destruyen los microorganismos residuales y que los compuestos contribuyen a obtener una limpieza más completa con menor trabajo (Marriott, 2003) Una operación típica de limpieza tiene el siguiente desglose, que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Costos de limpieza

Coste	%
Mano de obra	46.5
Aguas/aguas residuales	19.0
Energía	8.0
Compuestos limpiadores y desinfectantes	6.0
Daños por corrosión	1.5
Varios	19.0

Fuente: (Marriott, 2003)

1.1.2.1. Limpieza

El cometido de la limpieza es separar sustancias indeseables (suciedad), sobre todo residuos de productos de las superficies que contienen alimentos. Con ella, las superficies sucias deben pasar a un estado en el que puedan volverse a utilizar sin limitaciones, lo que significa evitar la alteración del alimento en la producción siguiente (Wilbrett y Escobar 2000). Los requisitos más importantes que deben reunir los medios limpiadores son:

- Alta eficacia
- Ser tolerados por los materiales con los que presumiblemente vayan contactar.
- Buena solubilidad.
- Escasa o nula formación de espumas a excepción de la limpieza mediante espuma.
- Fáciles de eliminar mediante enjuagado.
- Cargar lo menos posible las aguas residuales.
- El menor peligro y contaminación para el personal.

1.1.2.2. Desinfección

De acuerdo con la FAO/OMS (2009), la desinfección significa la reducción del número de microorganismos presentes en el medio ambiente, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad del alimento. La desinfección, es el tratamiento de una superficie limpia con un agente químico o físico para reducir los microorganismos que causan las enfermedades. Desinfectar una superficie de contacto con alimentos, debe reducir la población de bacterias específicas en un 99,999% (una reducción de 5 log) en 30 segundos. Cuando las poblaciones microbianas se reducen a estos niveles,

las superficies se consideran microbiológicamente limpias. El único criterio válido de muerte microbiana es la pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse. Esto en general, está determinado por técnicas de siembra en placas, que cuantifican por medio de recuento de colonias y el número de sobrevivientes. (Puig-Durán 1999).

La utilización de un desinfectante en la producción de alimentos, debe cumplir con una extensa serie de requisitos:

1. El desinfectante como producto concentrado:
 - Alto contenido de principio activo.
 - Fácil de conseguir y económico.
 - Buena capacidad de transporte y estabilidad en el almacenado.
 - Buena solubilidad, miscibilidad y dosificación en la preparación de las diluciones habituales.
2. Propiedades del desinfectante en solución:
 - Breves plazos de destrucción de gérmenes con bajas concentraciones, también a bajas temperaturas.
 - Igual acción sobre todas las especies de microorganismos.
 - Ningún perjuicio para los procesos de limpieza, sino facilidad de dispersión para conseguir contactos complejos entre el principio activo y los gérmenes.
 - Control sencillo, y si es posible automatizado, de la concentración del principio activo.
 - Ningún ataque a los materiales tratados.
 - Seguridad y comodidad de empleo, con tolerancia para la piel y con olor neutro.
3. Comportamiento en lo referente a residuos y otras precauciones:
 - Prolongada acción protectora sobre las superficies tratadas.
 - Buena capacidad de enjuagado de las superficies de contacto con los alimentos.
 - Ninguna influencia sobre el olor y sabor del alimento.
 - Inocuidad de los residuos para el hombre, animal y entorno.
 - Inocuidad de las aguas residuales.

Todas estas especificaciones no pueden cubrirse a la vez, ya que algunas de ellas se contraponen entre sí, como por ejemplo capacidad de adherencia y facilidad de enjuagado y en lo referente a estabilidad y posibilidad de inactivación (Wilbrett y Escobar 2000).

1.1.2.2.1. Métodos de desinfección

La suciedad que queda en los equipos procesadores de alimentos y en las superficies de contacto, generalmente están contaminados con microorganismos que se alimentan de los nutrientes presentes en los depósitos de suciedad, de esta forma la suciedad constituye un medio para la proliferación microbiana. Un medio ambiente en buenas condiciones sanitarias se consigue eliminando a fondo la suciedad depositada y aplicando a continuación desinfectante que destruya los gérmenes residuales (Marriott 2003).

Desinfección por calor: La desinfección térmica es relativamente inadecuada, debido a la energía que precisa. Su eficiencia depende de la humedad, temperatura necesaria, y período de tiempo durante el cual debe mantenerse esta temperatura. Esta se realiza mediante la aplicación de vapor o en contacto con agua caliente a más de 80°C. Se estima que la acción microbicida obedece a la desnaturalización de algunas de las moléculas proteicas de los gérmenes.

Desinfección mediante radiación: La radiación con una longitud de onda aproximadamente a 2.500 Å en forma de luz ultravioleta o de rayos gama o catódicos de alta energía, destruye los microorganismos. Este método de desinfección se ha restringido y no resulta útil en muchas áreas dentro de la industria alimentaria. La tasa efectiva de destrucción de microorganismos utilizando luz ultravioleta es lo suficientemente escasa como para limitar su utilidad en operaciones con alimentos.

Desinfección química: Los desinfectantes químicos disponibles para utilizar en el procesamiento de alimentos, varían en su composición química y actividad, dependiendo de las condiciones de actuación. Por lo común, cuanto más concentrado está un desinfectante, más rápida y eficaz es su acción. La eficiencia de los desinfectantes se ve influenciada por factores físico-químicos como:

1. *Tiempo de exposición.* Diversos estudios han demostrado que la muerte de la población microbiana sigue un modelo logarítmico, indicando que el

90% de una población es destruida en una unidad de tiempo, el 90% de la población restante será destruida en la siguiente unidad, dejando solo el 1% de la cifra inicial.

2. *Influencia de la temperatura en la desinfección.* La destrucción de las bacterias por los agentes químicos aumenta junto con la temperatura. Una temperatura elevada disminuye generalmente la tensión superficial, por lo que el efecto final de incrementar la temperatura es favorecer la velocidad de destrucción de los microorganismos.
3. *Concentración.* Aumentando la concentración del desinfectante, se eleva la velocidad de destrucción de los microorganismos.
4. *Influencia del pH en la desinfección.* Cuando las bacterias están suspendidas en un medio de cultivo de pH 7 tienen una carga negativa. Un aumento del pH aumenta la carga y puede alterar la concentración efectiva del agente químico sobre la superficie de la célula.

1.1.2.2.2. Mecanismos de la acción desinfectante

Las sustancias desinfectantes tienen como misión matar los gérmenes. Deben contar por ello, con una suficiente capacidad de reacción con los componentes importantes para la vida de los microorganismos, es decir, desnaturalizar sus sustancias constitutivas o interrumpir sus procesos metabólicos (Wilbrett y Escobar 2000).

La acción microbicida de los desinfectantes puede ser debida a diversos fenómenos, los mecanismos que se pueden considerar son los siguientes (Puig-Durán 1999):

1. Por degeneración de la membrana citoplasmática, extrusión del citoplasma y deterioro de la pared celular. Los agentes desinfectantes que suelen utilizar este mecanismo son: tensoactivos anfotéricos y sales de amonio cuaternario.
2. Por desnaturalización o precipitación de las proteínas citoplasmáticas de las células. Los agentes utilizados son: fenoles, cresoles, y alcoholes.
3. Por inactividad de las enzimas. Agentes como: sulfamidas y metales pesados.
4. Por aumento de la concentración de iones hidrógeno o hidroxilos. Se utilizan: ácidos y álcalis.

5. Por acción oxidante o reductora. Se utilizan desinfectantes como: agua oxigenada, permanganato de potásico y productos halogenados.

1.1.2.2.3. Desinfectantes

El producto químico elegido como desinfectante debe cumplir con el test Chambers (test de eficiencia de desinfectante): los desinfectantes deben matar el 99.999% de 75 a 125 millones de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en 30 segundos después de aplicarse a 20 °C. Los desinfectantes químicos se dividen normalmente de acuerdo con el agente que mata los gérmenes Marriott (2003), describe los siguientes compuestos:

Compuestos clorados. Funcionan como desinfectantes el cloro líquido, hipocloritos, cloramina inorgánica y cloraminas orgánicas y dióxido de cloro. El ácido hipocloroso, el más activo de los compuestos clorados, parece que mata la célula microbiana impidiendo la oxidación de la glucosa. Otros métodos de acción del cloro que se han propuesto son: la interrupción de la síntesis proteica, descarboxilación oxidativa de aminoácidos a nitritos y aldehídos; el desequilibrio metabólico consecuente a la destrucción de enzimas claves; inductor de alteraciones del ADN; inhibición del aprovechamiento de oxígeno y de fosforilización oxidativa; y formación de derivados tóxicos. Estos desinfectantes son eficaces en la desactivación de células microbianas en suspensión acuosa y requieren un tiempo de contacto aproximado de 1.5 a 100 segundos.

Compuestos yodados. El yodo diatómico es el más importante agente antimicrobiano, rompe los enlaces que mantienen la proteína celular junta e inhibe la síntesis proteica. Por lo general, el yodo libre en forma de elemento y el ácido hipoyodoso son agentes activos en la destrucción microbiana.

Compuestos de amonio cuaternario. Llamados *quats*, se utilizan en suelos, paredes, utensilios y equipo. Tienen buena capacidad de penetración, la que les hace valiosos para superficies porosas. Los compuestos de amonio cuaternario son desinfectantes muy eficaces contra *L. monocytogenes*; también se manifiestan eficientes en frenar la proliferación de los mohos. Los *quats* son compuestos de amonio en los que cuatro grupos orgánicos se unen a un átomo de nitrógeno que origina un ion cargado positivamente.

Desinfectantes ácidos. Se consideran toxicológicamente seguros, biológicamente activos y con frecuencia se utilizan para combinar las fases de enjuagado y desinfección. Se emplean con máxima frecuencia ácidos orgánicos como los ácidos acéticos, peroxidacético, láctico, propionico y fórmico. Estos desinfectantes matan los microorganismos penetrando y rompiendo la membrana celular, disocian la molécula ácida y como consecuencia, acidifican el interior

Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). Un polvo a base de peróxido de hidrógeno en solución al 3 y 6% ha comprobado que es eficaz contra biopelículas. Puede utilizarse en toda clase de superficies, equipos, suelos y desagües, paredes, guantes de tejido de acero, cintas transportadoras y otros medios de trabajo en donde exista contaminación. Este desinfectante se ha mostrado eficaz contra *L. monocytogenes* cuando se aplica a guantes de goma. Una solución de peróxido de hidrogeno puede utilizarse como tal o en combinación con otros procesos para tratar superficies de contacto con los alimentos.

Ozono. Actúa como oxidante, desinfectante y puede utilizarse como medio de control de amenazas químicas y microbianas. El ozono está siendo considerado como sustituto del cloro y al oxidarse rápidamente, ejerce menos impacto ambiental.

1.2. Aceites esenciales

De acuerdo a la séptima edición de Farmacopea Europea, los aceites esenciales se definen como: "producto odorante, en general, de una composición compleja, obtenida de una materia prima vegetal, ya sea extraído por vapor de agua, por destilación seca o por un método mecánico adecuado sin calentamiento". Los aceites esenciales están compuestos de una mezcla homogénea de compuestos orgánicos que incluyen: fenoles, terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes, de los cuales un porcentaje alto es volátil. Generalmente los aceites esenciales contienen alrededor de 20 a 60 componentes, en muy diferentes concentraciones, pero solo son dos o tres los principales componentes que están en concentraciones relativamente altas (20-70%) en comparación con los otros componentes presentes.

Los aceites esenciales han adquirido un renovado interés en varias áreas. Tienen características fisicoquímicas interesantes con alto valor añadido, respetando el medio

ambiente, poseen actividades biológicas diversas. Numerosos estudios han demostrado que tienen efectos antimicrobianos contra bacterias resistentes (El Asbahani et al., 2015). Los aceites esenciales de las plantas generalmente inhiben a las bacterias Gram positivas que a las bacterias Gram negativas. Aunque grupos como el orégano, clavo, canela, y cítricos son efectivos para ambos grupos. El material vegetal del cual se extrae el aceite, puede afectar sus características antimicrobianas, así como el lugar y condiciones del cultivo afectará la composición del aceite y por lo tanto su actividad antimicrobiana (Olivares y López 2013).

De acuerdo a un estudio de 3000 aceites esenciales de varias plantas, solo el 10% tienen importancia en la industria cosmética, alimentaria o farmacéutica. Muchos de ellos son reconocidos, como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA.

Algunos ejemplos de fuentes de aceites esenciales son:

1. **Frutos cítricos.** Extractos de aceites de naranja, limón y mandarina, los cuales han mostrado actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.
2. **Hierbas.** Se ha reportado el efecto antimicrobiano de aceites esenciales de ajo, rábano, espírea azul, hisopo, menta, hierba gatea, mejorana, orégano, ajedrea y tomillo.
3. **Espicias.** Algunas especias han sido utilizadas para el control microbiano, como la canela y orégano. Además de presentar propiedades antimicrobianas se ha encontrado que inhiben aflatoxinas, hongos y también presentan actividad antioxidante.

1.2.1. Características

En condiciones ambientales, los aceites esenciales son líquidos aceitosos, volátiles, aromáticos, menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos. No son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides; son generalmente inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, aire, calor, ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros (número finito de monómeros) de naturaleza indeterminada. Son solubles en disolventes orgánicos comunes y casi inmiscibles en disolventes asociados

(agua y amoníaco). Tienen propiedades de solvencia para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena. (Vega y López, 2009).

Los aceites esenciales se sintetizan en todas las partes de las plantas, es decir, brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, o corteza, y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales y células epidérmicas. Se derivan de las vías metabólicas complejas, con el fin de proteger a las plantas de diversos microorganismos patógenos, para repeler insectos que actúan como vectores de la plagas, y para reducir el apetito de algunos herbívoros. Debido a la característica aromática de los aceites esenciales, han sido utilizados para la producción de jabones, perfumes y artículos de tocador. La gran bioactividad se ha confirmado por varios estudios, actividad antibacteriana, antiviral, anti-inflamatorio, antifúngico, anticancerígeno y antioxidante (Bilia et al., 2014).

1.2.2. Métodos de obtención

Más allá de las hojas y las flores, las extracciones se pueden llevar a cabo a partir de frutas, semillas, tallos, cortezas, raíces y exudaciones de oleorresinas. Teniendo en cuenta la variación estacional y las condiciones ambientales durante el año, es muy importante el período del año en que se cosecha el material vegetal para la extracción del aceite. Los nutrientes disponibles para el crecimiento de plantas tienen un papel crucial en la definición de las reacciones bioquímicas en los orgánulos de las plantas, así como la exposición a la luz, la temperatura ambiental y el suministro de agua (São et al., 2013).

Los aceites esenciales se obtienen a partir de materia prima vegetal mediante varios métodos de extracción. Estos métodos pueden clasificarse en dos categorías: convencionales/clásicos y los avanzados/innovadores. Los métodos convencionales basados en la destilación para recuperar los aceites esenciales de la matriz de la planta son (El Asbahani et al., 2015):

1. **Hidrodestilación:** Este método es el más simple y antiguo que se utiliza para la extracción de aceites. El material vegetal se sumerge directamente en el agua en el interior del alambique y el conjunto se lleva a ebullición. El principio de extracción se basa en la destilación azeotrópica. La ventaja del agua es que es inmiscible con la

mayoría de las moléculas de los aceites esenciales y por lo tanto, después de la condensación, es fácil separarlo del agua mediante simple decantación.

2. **Arrastre por vapor de agua:** Es uno de los métodos eficaces para la obtención de aceites esenciales. Se basa en el mismo principio que hidrodestilación con la diferencia de que no hay contacto directo entre la planta y el agua. La extracción tiene una duración corta y por lo tanto la reducción de alteraciones químicas.
3. **Extracción con disolvente orgánico:** El material vegetal se macera en un disolvente orgánico, el extracto se concentra por eliminación del disolvente a presión reducida. Esta técnica evita alteraciones, porque es una extracción en frío a comparación de la hidrodestilación.
4. **Prensado en frío:** El aceite se extrae mecánicamente por prensado en frío produciendo una emulsión acuosa, el aceite se recupera posteriormente por centrifugación.

Una de las desventajas de las técnicas convencionales está relacionada con la termolabilidad de compuestos de los aceites esenciales que sufren alteraciones químicas (hidrólisis, isomerización u oxidación) debido a las altas temperaturas aplicadas. La calidad de los aceites esenciales disminuye, sobre todo si el tiempo de extracción es largo. Investigación en nuevas tecnologías (ecografía y microondas) en las últimas décadas, ha dado lugar a la aparición de nuevos procesos de extracciones más eficientes (reducción del tiempo de extracción, emisiones de CO₂, el uso de solventes, consumo de energía, aumento de rendimiento de la extracción, y mejora de la calidad). Entre las técnicas innovadoras se encuentran (Olivares y López 2013):

1. **Extracción por fluidos supercríticos:** El principio se basa en el uso de un fluido mediante compresión/depresión. El fluido se comprime alcanzando un estado supercrítico y se hace pasar por el material vegetal, cargándose de los compuestos volátiles, posteriormente el fluido se descomprime gradualmente (perdiendo así su poder disolvente) para separar el extracto obtenido a partir del fluido.
2. **Extracción asistida por ultrasonido:** El ultrasonido permite la extracción de los aceites esenciales mediante la aceleración de su material vegetal, las ondas sonoras que se propagan en el medio líquido, resultan en ciclos de alta y baja presión,

cuando se utiliza en combinación con otras técnicas (hidrodestilación y extracción con solvente) se aumenta el rendimiento y se disminuyen los tiempos de extracción.

3. **Extracción asistida por microondas:** El uso de microondas evolucionó con el desarrollo del concepto de extracción verde y la necesidad de nuevos métodos de extracción y de ahorro de energía, de los cuales se derivan: La extracción por microondas sin disolventes, la destilación al vapor de microondas y la difusión de vapor de microondas.

El método más utilizado para la extracción de aceites esenciales es mediante destilación por arrastre con vapor, y recientemente se ha implementado extracción asistida por microondas. Otro método de obtención de los aceites, es por medio de solventes, este método puede influir en la acción antimicrobiana, ya que los aceites esenciales extraídos con hexano han demostrado mayor eficacia antimicrobiana que los destilados por arrastre de vapor (Olivares y López 2013).

1.2.3. Perfil antimicrobiano de los aceites esenciales

La evidencia sobre la capacidad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, de los aceites esenciales se han confirmado por estudios etnofarmacológicos y se ha encontrado que un enorme número de aceites esenciales poseen buena actividad frente a bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Pérez y López 2011). Aunque el mecanismo exacto de acción de los aceites no sea completamente claro, algunos autores lo han atribuido a su hidrofobicidad, lo que les permite crear particiones y desbalancear el equilibrio de los iones celulares, también se cree que los aceites esenciales al penetrar en la membrana celular, perturban la estructura y aumentar su permeabilidad y dan como resultado la fuga de iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. El modo de acción antibacteriano de los compuestos fenólicos es en gran medida relacionado con la interacción del grupo hidroxilo fenólico en los anillos, con la membrana celular. Por ejemplo, el carvacrol, un compuesto fenólico importante en el orégano y aceite de tomillo, puede romper la membrana de las bacterias Gram- negativas (Xue 2015). El conocimiento sobre la actividad bactericida de los aceites esenciales sobre los microorganismos es crucial para entender cómo se ven afectados, En base a este

conocimiento se puede emplear un sistema para una aplicación adecuada, Faleiro (2011) indica las siguientes acciones.

- 1. Pared celular y la alteración de la membrana.** La acción más esclarecida se refiere a los componentes del aceite esencial de orégano y tomillo (carvacrol y timol). Se reconoce que su acción resulta en la liberación de los lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas con el aumento de permeabilidad de la membrana celular y la consiguiente pérdida de ATP. La evaluación de la pérdida de constituyentes celulares contribuye a explicar la gravedad de los daños de la membrana celular.
- 2. Producción de ATP.** La disrupción de la membrana celular por cualquier agente antimicrobiano, incluyendo los aceites esenciales, comprometen una serie de funciones vitales, es decir, la energía para los procesos de conversión, el procesamiento de nutrientes, la síntesis de macromoléculas estructurales, y la secreción de muchas enzimas clave de crecimiento. La producción de ATP en procariontes se produce tanto en la pared celular y en el citosol por la glucólisis. Así se espera que las alteraciones en el equilibrio ATP intracelular y externa se verán afectados debido a la acción de los aceites esenciales en la membrana celular.
- 3. Síntesis de proteínas.** Los componentes de los aceites esenciales inducen la síntesis de proteínas mediante el choque térmico de proteínas “heat shock proteins” (HSP) cuando las células bacterianas fueron tratadas con estos dos componentes. El HSP se ve implicado en los diferentes procesos de montaje y liberación de los polipéptidos recién sintetizados que, en general, aumenta cuando las células bacterianas están en contacto con sustancias tóxicas u otras condiciones de estrés.
- 4. Alteración del pH.** La estabilidad del pH puede verse afectada por la acción de los aceites esenciales en la membrana que pierde su capacidad para bloquear los protones. Diversos experimentos han reportado una disminución significativa del pH en el interior de las células debido a la acción de los aceites esenciales. El mantenimiento del pH a niveles adecuados para lograr los diversos procesos celulares cruciales (transcripción del ADN, la síntesis de proteínas y la actividad enzimática) es crítico cuando la célula se expone a lesiones graves.

5. **Cambios intracitoplasmáticos.** Estudios con el aceite esencial de orégano exhibieron cambios intracitoplasmáticos, donde el material coagulado apareció en áreas específicas situadas en la pared celular y extremos apicales.
6. **Detección de quórum.** Las bacterias producen y utilizan pequeñas moléculas de señalización para evaluar su ambiente externo y el estado fisiológico interno para la comunicación celular (quorum sensing) modulando sus poblaciones. Diferentes estudios mediante el uso de un sistema bioinformador proteína fluorescente verde y el efecto sobre la bioluminiscencia han demostrado una disminución de la virulencia por efecto de aceites esenciales de rosa, geranio, lavanda, romero y clavo al parecer ser muy eficaces.

Los componentes de los aceites esenciales, como el de orégano y tomillo poseen timol y carvacrol, los cuales son compuestos fenólicos con fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos de interés en alimentos, y es razonable pensar que su mecanismo de acción es similar al de otros compuestos fenólicos, provocando desorden en la membrana citoplasmática (García y Palou, 2008):

Carvacrol. Carvacrol (2-metil-5-(1-metil) fenol) (figura 1) está presente en el aceite esencial de orégano entre 60-70 %. Su estructura química está representada por un grupo fenólico con un alto poder hidrofóbico. De todos los agentes antimicrobianos naturales, el carvacrol es uno de los que más atención ha recibido en su mecanismo de acción; es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ello la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la fuerza motriz del protón.

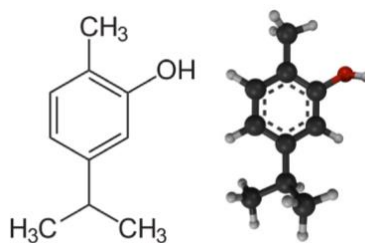


Figura 1. Estructura química del Carvacrol

Timol. El timol o isopropilmetacresol o (2-isopropil-5-metilfenol) (figura 2) ha sido reportado por varios autores, como un agente antimicrobiano muy activo de los aceites esenciales, se encuentra presente en el aceite esencial de orégano en un 50 % aproximadamente. Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición de grupo hidroxilo. El mecanismo de acción del timol es semejante al del carvacrol, ya que su estructura química es similar.

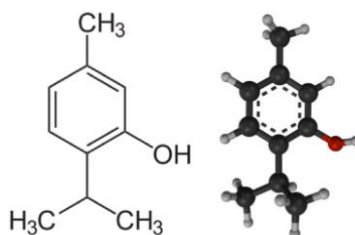


Figura 2. Estructura química del Timol.

La eficacia antimicrobiana y la evaluación del espectro antimicrobiano, a diferentes concentraciones, se muestra en la tabla 2 donde diferentes estudios muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), con diferentes métodos de evaluación.

Tabla 2. CMI (Concentración mínima inhibitoria) de distintos aceites esenciales.

Método utilizado	Aceite esencial	Nombre científico	Microorganismo	CMI
Difusión agar	Orégano	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	79-25 µg/mL
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	58 µg/mL
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Escherichia coli</i>	79-25 µg/mL
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Salmonella Thyphimurium</i>	64-25 µg/mL
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	4-5 µg/mL

(Continuación)

Método utilizado	Aceite esencial	Nombre científico	Microorganismo	CMI
Difusión en seriada	Canela	<i>Cinnamomun asmophloeum</i>	<i>Salmonella s,p</i>	500 µg/mL
		<i>Cinnamomun asmophloeum</i>	<i>Escherichaia coli</i>	250 µg/mL
		<i>Cinnamomun asmophloeum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/mL
Micro-dilución seriada	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03 % v/v
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	0.03 % v/v
Cámara hermética	Tomillo	<i>Thymus zygis</i>	<i>Escherichia coli</i>	12.5 µg/L de aires
		<i>Thymus zygis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25 µg/l de aires
	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µg/L de aires
	Naranja	<i>Citrus sinensis var. Valencia</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	800 µg/L de aires
Caja Petri invertida	Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	34.9 µg/L de aires
	Tomillo	<i>Thymus vulgaris L.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	26.2 µg/L de aires
	Orégano	<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	62.5 µg/L de aires
	Canela	<i>Cinamomum aromaticum nees</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/L de aires

Fuente: (Reyes et al., 2014)

En los últimos años, varios artículos han descrito la acción antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes contra la incrustación de bacterias productoras de biopelículas. Knowles y Roller (2001) fueron los primeros autores que mostraron las propiedades biocidas de los compuestos de los aceites esenciales. Encontraron que el carvacrol (componente principal del orégano y tomillo) es eficiente contra biopelículas de *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus* y *Saccharomyces cerevisiae* formadas en los discos de acero inoxidable. En ese estudio, la eficacia del carvacrol era, en algunos casos, equivalente o mejor que la de un desinfectante comercial común, basado en peróxido de hidrógeno y ácido peroxiacético (Giaouris et al., 2014).

El reto para aplicaciones prácticas de los aceites esenciales es el desarrollo y optimización en combinación con otros productos, de esa manera se minimiza los aromas indeseables y la adición de altas concentraciones. Desafortunadamente los aceites esenciales más efectivos tienen propiedades indeseables como pobre solubilidad en agua, alta volatilidad y fuertes aromas, que limita sus aplicaciones en alimentos. El impacto de los aceites esenciales en las propiedades sensoriales y la eficacia antimicrobiana se pueden mejorar por técnicas de encapsulación, especialmente en medios acuosos, la encapsulación puede reducir pérdidas, debido a la unión con otros constituyentes y se puede incrementar la eficacia antimicrobiana por la promoción de contacto con los componentes de las células bacterianas. La encapsulación de los aceites esenciales a nanoescala ha mostrado resultados positivos en medios acuosos. El efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en sistemas de entrega en nano escala dependen de la formulación, diámetro y del microorganismo (Da-Wen Sun 2014).

1.2.4. Aspectos legales y seguridad

A pesar del hecho de que un número considerable de los componentes de los aceites esenciales son GRAS, algunos datos reportan irritación y toxicidad. En cuanto al aspecto jurídico, la utilización de los aceites esenciales en los alimentos ha sido regulada por la Comisión Europea para su uso como aromatizantes en los productos alimenticios. No se consideran que presenten riesgo para la salud del consumidor e incluyen, entre otros, carvacrol, carvona, cinamaldehído, citral, p-cimeno, eugenol, limoneno, mentol y timol.

Estragol y metil eugenol, se borraron de la lista en 2001 debido a que se consideraron genotóxicos (Burt 2001).

1.3. Orégano

Su nombre viene del griego *oros*, montaña, y *ganos*, alegría. Por ser este su hábitat preferido. Crece silvestre por toda Europa, en especial en Italia y Grecia. Orégano (figura 3) es el nombre común para más de 60 especies de plantas aromáticas, la mayoría de ellas pertenecen a la familia de las *Lamiaceae* y *Verbenaceae*. La distinción más marcada se da entre el orégano europeo (*Origanum sp*) y el mexicano (*Lippia sp*). El género *Lippia* es el más conocido en México (Spinridon, 2003). El orégano mexicano comparado con el del mediterráneo es más resistente y con más sabor. Las hojas son más largas y oscuras y tienen alrededor de 3-4% mayor contenido de aceite esencial



Figura 3. Orégano (Spinridon E. y Kintzios, 2003)

1.3.1. Descripción

(*Lippia graveolens*): Es una especie arbustiva caducifolia (que tira sus hojas al no haber humedad en el suelo) perenne, con una altura que varía de 0.20 a 2m y 1m de diámetro de cobertura foliar, muy ramificado, con un crecimiento relativamente rápido y un ciclo de vida corto (de entre cinco y diez años). Presenta tallos leñosos muy ramificados desde la base, con hojas oblongas o elípticas, finamente crenadas, muy tomentosas y pilosas; sus flores están dispuestas en espigas subglobosas con corolas blancas zigomorfas y con cuatro estambres; sus frutos son dehiscentes. Se distribuye extensamente en los climas semiáridos

de México y de América Central y es resistente a la sequía (Comisión Nacional Forestal 2009).

Las especies de *Lippia* tienen alto contenido de aceites esenciales. Las especies conocidas como orégano tienen una distribución cosmopolita. Las especias utilizadas como orégano se distribuyen, en los estados de Durango, Chihuahua, Coahuila, Zacatecas, Jalisco, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Querétaro, Guerrero y Oaxaca. Las especias son de considerable importancia económica debido al volumen anual de exportación (Granados et al., 2013). Una cosecha normal en México es de alrededor de 3000 toneladas, la cosecha de la planta se realiza a mediados de septiembre, cuando la planta tiene la mayor exposición de follaje, hasta las primeras heladas a principios de noviembre. Las hojas son seleccionadas, y generalmente se depositan en el suelo cerca de los arbustos de orégano y se dejan secar al sol por 4-5 días (Padulosi, 1997).

1.3.2. Aceite esencial de orégano

El aceite de orégano contiene antisépticos de gran importancia, contiene fenol, la sustancia de mayor poder desinfectante. Los aceites de orégano suelen contener (Tabla 3) un 80-90% de fenoles, además un poco de borneol, pineno y terpineol, con rastros de ésteres (Ryman, 1994).

Tabla 3. Contenido de aceites esenciales en el orégano.

Etapas fenológicas	Aceites (%)	Timol (%)	Carvacol (%)
Brotación reciente	4.02	31.78	7.01
Inicio de floración	4.00	32.77	7.42
Plena floración	5.30	29.0	8.32
Producción de semillas	6.98	33.50	7.34

Fuente: Granados et al., (2013)

Tabla 4. Características del aceite esencial de orégano.

Densidad específica @ 20 °C	0.92324
Índice de refracción	1.4774

Fuente: Albado et al., (2001)

Tabla 5. Composición del aceite esencial de orégano.

Compuesto	%	Compuesto	%
Phellandrene OS	1.75	Carvacrol	1.18
p-cymenecoccus aureus	6.86	Trans-caryophyllene	2.76
Trans-sabinene hydrate	3.53	Spathulenol	2.26
Linalool	1.47	Caryophyllene oxide	2.21
Cis sabinene hydrate	18.66	Palmitic acid	8.39
4-terpineol	9.43	9, 12-octadecadinoic acid	8.29
Terpineol	2.76	9, 12, 15 octadecatrienal	5.08
Linalyl acetate	7.40	2-methyl-hexanal	1.74
Thymyl-metyl-eter	1.52	2-dodecanona	2.52
Thymyl-metyl-eter	2.07	1, 3, 3-trimethyl-2- (3methyl-2-methylene	2.4
Carvacrol	7.72		

Fuente: Albado et al., (2001)

1.3.3. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano

Basado en toda la extensión de la actividad antimicrobiana, el orégano parece ser una de las especies inhibitorias más probadas. Se encontró que el *O. vulgare* de origen australiano es uno de los más potentes agentes antimicrobianos, con una considerable inhibición de crecimiento para microorganismos. La mínima concentración inhibitoria de *O. vulgare* de aceite esencial fue de 0.12 % (v/v). Entre las bacterias que más se han estudiado se encuentra las *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. Alta actividad anti listeria (4 sepas de *L. monocytogenes* y una *Listeria innocua*) de aceite esencial (diluciones de 1:5 en etanol absoluto) tuvieron una considerable reducción cuando el aceite fue probado en carne. Una significativa actividad inhibitoria de 0.8 % (v/p) de aceite esencial de orégano contra *L. monocytogenes* en carne contaminada de bobino, se observó en condiciones de empaque a 5 °C. En base a estos descubrimientos (150 y 200 ppm) de aceite esencial de orégano se probaron contra *Clostridium botulinum* y tuvieron un potente efecto anti botulínico. El uso del extracto en productos cárnicos se cuestiona en concentraciones mayores a 400 ppm, debido a los posibles efectos en las características comerciales que podrían ser adversas (Sabor, color y estructura) (Kintzios E 2002).

La actividad biológica de una planta, reside en el conjunto de compuestos químicos que se encuentran en los tejidos. Sus componentes antimicrobianos están mayormente contenidos en el aceite esencial constituyendo hasta el 80% de los mismos, otros compuestos están solo en trazas. Las plantas tienen la capacidad para sintetizar compuestos aromáticos, y la mayoría son compuestos fenólicos o sus derivados y estas sustancias sirven a las plantas contra la depredación de microorganismos e insectos (Vega Portocarrero y López Malo 2009).

1.4. Listeria

El género *Listeria* consiste en bacterias con forma de bacilos regulares, Gram positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas. Durante muchos años el género *Listeria* consistió en ocho especies *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. denitrificans*, sin embargo este último ha sido excluido del género (Koneman 1997). Solamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se asocian a enfermedades humanas. *L. monocytogenes* es la especie de importancia médica aislada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos.

1.4.1. Listeria monocytogenes

Aunque *L. monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos sólo se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer en la literatura informes documentados de brotes de listeriosis, detectados por consumo de alimentos. Hoy en día, *L. monocytogenes* (figura 4) se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto del máximo interés de salud pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos. Aunque la listeriosis ocupa una pequeña fracción de patógenos por contaminación de alimentos, es una importante causa de graves enfermedades, representando el 3.8% de enfermedades transmitidas por alimentos, y 27.6% de muertes. *L. monocytogenes* afecta frecuentemente a mujeres embarazadas, recién nacidos, y adultos mayores (Ryser y Marth 2007).

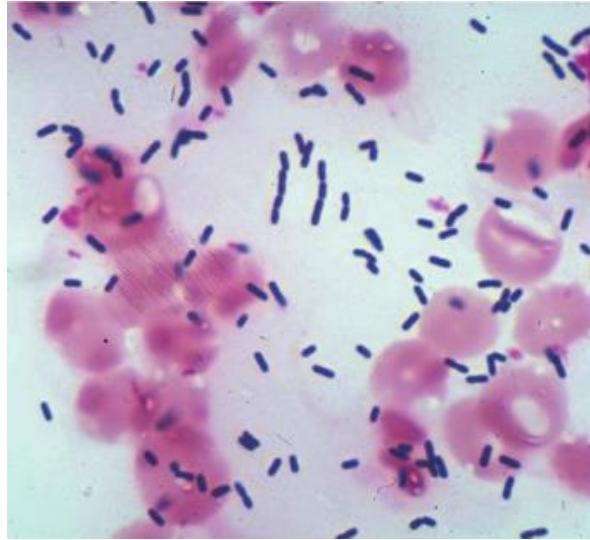


Figura 4. *L. monocytogenes* Brooks (2011).

Morfología: *L. monocytogenes* es un germen de forma bacilar, no esporulado, móvil, Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo, capaz de formar biopelículas. Es un bacilo corto y con extremos redondeados. Mide entre 0.5-2 μm de largo por 0.2-0.5 μm de grueso. Se presenta en unidades individuales, en parejas, cadenas cortas o agrupadas en forma de “V” o “Y”. A veces la célula toma forma de cocobacilo de 0.5 μm de diámetro y se puede confundir con estreptococos. En cultivos viejos, algunas células pierden la habilidad de retener la tinción Gram (Pascual y Calderón 1999).

Cultivo: En agar las colonias tienen un tamaño de 0.2 a 0.8 mm de diámetro, son lisas, puntiformes, grises azulado, translúcidas, y ligeramente elevadas con una superficie de textura fina con un margen de incubación de 24 horas. Después de 5 a 10 días las colonias bien separadas tienen diámetros de 5 mm o más. La *Listeria* crece bien en mayoría de los medios bacteriológicos, la tasa de crecimiento se incrementa con la presencia de glucosa. Una placa de cultivo de *Listeria* tiene un particular olor a ácido, resultado de la formación de ácido carboxílico, hidroxiácidos, y alcohol. En caldos como medio de crecimiento, la turbidez se presenta después de 8 a 24 h de incubación a 37 °C. Los pH óptimos para su crecimiento son entre 4.5 y 9.2 siendo 7 el pH óptimo. (Ryser y Marth 1999) *L. monocytogenes* crece bien en distintos medios no selectivos, como agar triptona de soya, agar sangre triptosa, y BHI.

Identificación: Las colonias típicas de *Listeria* una vez crecidas en el medio selectivo/diferencial, se seleccionan para su identificación a nivel de especie. Las pruebas comprenden la reacción a la tinción de Gram, la catalasa, ensayos de movilidad (en una muestra en fresco observada por microscopía de contraste de fases y después de su inoculación en un medio de prueba de movilidad), de hemólisis y de utilización de carbohidratos. Algunos protocolos emplean pruebas convencionales y no convencionales disponibles comercialmente, por ejemplo, los kits de Inmuno ensayo enzimático (ELISA) y los kits de ensayo de ácidos nucleicos que ayudan en la identificación de *L. monocytogenes* (Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004).

Crecimiento: Respecto a la temperatura de crecimiento, sus límites están entre -1.5 a 45 °C con una óptima de 30-37 °C. Es un germen psicrófilo, aunque a 4 - 5 °C su crecimiento es más lento, crece dos veces más rápido a 10 °C, en comparación de 4 °C y a temperaturas por debajo de 0 °C se preserva moderadamente el patógeno. Para que se destruya *L. monocytogenes* son necesarios 70 °C aplicados durante 2-3 minutos siempre que se alcance el centro térmico del producto. *L. monocytogenes* crece óptimamente en pH cercanos a la neutralidad, se ha reportado que se puede desarrollar entre valores de pH comprendidos entre 4.0-9.6, pasados estos límites se inhibe su crecimiento, pero sobrevive. Altas concentraciones de sal (>20%) reducen el crecimiento por la disminución de la actividad de agua, *L. monocytogenes* tolera condiciones extremas de concentración de sal, sobrevive en presencia de 16% de NaCl (Food & Agriculture Org. 2004) .

Metabolismo: *Listeria* es un microorganismo aerobio facultativo, catalasa-positiva, y oxidasa negativa. Crece en glucosa formando lactato, acetato, y acetonina como principales productos finales en condiciones aeróbicas, en condiciones anaerobias la acetonina no se produce. Anaerobiamente sólo hexosas y pentosas favorecen el crecimiento. El catabolismo de la glucosa se produce por la ruta Embden-Meyerhof aerobia y anaeróticamente (Ryser y Marth 1999).

Requerimientos nutricionales: Los factores de crecimiento incluyen cistina, isoleucina, leucina, arginina, metionina, valina, cisteína, riboflavina, biotina , tiamina, y ácido tióctico. El crecimiento es estimulado por Fe³⁺ y fenilalanina, en presencia de hierro el crecimiento

se acelera. Glucosa y glutamina son requeridos como fuente primaria de carbón y nitrógeno (Ryser y Marth 2007).

Movimiento: Presenta poca movilidad, se debe a flagelos peritricos y se manifiesta mejor entre 20 °C; a 37 °C llega a ser imperceptible o nula, reduciéndose el número de flagelos a uno o dos situados en la región polar, se mueve de forma característica mediante un lanzamiento rápido combinado con saltos y rotación. La movilidad es óptima entre 20-22 °C (Pascual y Calderón 1999).

Virulencia: *L. monocytogenes* es una bacteria invasora que tiene la capacidad de cruzar las membranas del intestino, placenta y cerebro, lo que da como resultado las formas gastrointestinal e invasiva de la listeriosis. Cuando *L. monocytogenes* es ingerida, tiene la capacidad de sobrevivir en el ambiente gástrico y entrar al intestino, es un residente temporal en el ser humano ya que el 5% al 10% de la población en algún momento es portadora sin presentar síntomas. La bacteria inicialmente se interna en los macrófagos y células no fagocíticas donde secreta la proteína listeriolisina “O” que rompe la pared de vacuola y permite que la bacteria se dirija hacia el citoplasma. Una vez localizada en el citoplasma de la célula del huésped, *L. monocytogenes* es capaz de replicarse, se transporta por el cuerpo a través de la sangre (Yates 2013). Normalmente este microorganismo prolifera a números potencialmente peligrosos de 1 a 35 días. El periodo de incubación tiene un intervalo de crecimiento de 1 a 91 días, sin embargo bajo condiciones ideales se ha informado que toma un tiempo pequeño de 1.75 a 2 horas. Varios factores de *L. monocytogenes* que median los pasos claves de la infección, han sido identificados (Callejo et al., 2013).

- a) Adhesión e invasión: las células de *Listeria* inicialmente se adhieren a los enterocitos intestinales y penetran la pared intestinal. La entrada de *L. monocytogenes* dentro de la célula humana es medida por la interacción de la proteína de superficie, internalina, con su receptor humano E-caderina.
- b) Vacuola primaria de lisis: La listerolisina O y la fosfolipasa C fosfatidil inositol específica lisan en fagosoma para permitir el escape de las bacterias de la vacuola fagocítica.

- c) Desarrollo intracelular: la propagación bacteriana dentro del citosol es medida por un transportador de fosfato hexosa bacteriano y una ligasa protein lipoato que permite que *L. monocytogenes* capte de la célula huésped fuentes de carbón.
- d) Diseminación de una célula a otra: Una vez que las bacterias se multiplicaron en el citosol de la célula huésped, se desplazan utilizando la nucleación de filamentos de una proteína, actina. Esto produce un movimiento dirigido de las bacterias hacia la membrana celular de la célula huésped y promueve estructuras semejantes a pseudopodos que se extienden dentro de las células vecinas.
- e) Lisis de la vacuola de doble membrana: la fosfolipasa C fosfatidicolina específica de *L. monocytogenes* junto con la listerosina “O”, lisan la vacuola de doble membrana y liberan las bacterias que infectan la célula vecina.

Seriovariedades: Pertenecen al género *Listeria*, además de *L. monocytogenes* otras cinco especies: *L.welshimeri* , *L.ivanovii* , *L.innocua* , *L.seeligeri* y *L.grayi*, están estrechamente relacionadas con las especies; *Bacillus* , *Staphylococcus* , *Streptococcus* y *Clostridium* de las seis especies sólo *Listeria monocytogenes* y *L.ivanovii* se consideran patógenas (Shahraz 2013). Eexisten hasta el momento 13 seriovariedades reconocidas de *L. monocytogenes*; 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7, clasificados en base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Sin embargo, tres de ellas (1/2a, 1/2b y 4b), han sido aisladas en más de 90 % de los casos humanos y animales. Otras seriovariedades, como 1/2c, han sido encontradas como contaminantes de alimentos (Callejo et al., 2013).

Listeria en el medio: *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en el ambiente, se encuentra en tierra, agua, vegetales y animales (incluyendo rumiantes, aves, insectos, pescados, crustáceos y en humanos), los vegetales llegan a ser contaminados directamente por la tierra o simplemente del estiércol usado como fertilizante (Abdalla 2013). Está presente en animales saludables, estos pueden llevar la bacteria sin parecer enfermos y contaminar productos cárnicos y lácteos. También está presente en el alcantarillado, la vegetación, forrajes conservado en silos y superficies de los equipos en plantas procesadoras. La fuente principal de *L. monocytogenes* es el suelo y vegetación en descomposición donde sobreviven como organismos saprófitos. Se cree que 5% de la población humana es portadora (Pino y Zamora 2006).

***L. monocytogenes* en la industria alimentaria:** En plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, desagües, paredes, baños, aguas estancadas, charcas sanitizantes, conductos de aire, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y presencia de nutrientes. Se ha determinado que *L. monocytogenes* ingresa a través de la vestimenta, el calzado, las manos de los operarios, utensilios, el equipamiento y los materiales utilizados. La contaminación cruzada, es decir, el contacto de los alimentos listos para el consumo con superficies o utensilios contaminados, es otra vía de contaminación (Schöbitz et al., 2009).

Desinfección: Dada la dificultad para impedir su ingreso a los lugares de procesamiento, es necesario tomar medidas rigurosas para su eliminación durante los procesos de limpieza e higienización y conocer los parámetros que limitan su desarrollo. La eliminación de *Listeria* es muy difícil y puede ser imposible. Sin embargo es susceptible al hipoclorito de sodio al 1 %, etanol al 70 % o glutaraldehído. También puede eliminarse por calor húmedo (121 °C durante mínimo 15 min) o calor seco a 160-170 °C durante 1 hora. En los alimentos *L. monocytogenes* es usualmente destruido por cocción o pasteurización, las cifras de población sobre los productos pueden ser reducidas por la exposición al ozono, dióxido de cloro, fosfato trisódico clorado, o ácido peroxidacético, así como 1.5% de peróxido de hidrogeno durante 15 min a 40 °C. También pH de 10.5 y 10% de NaCl reducen la población de la bacteria (The Center for Food Security & Public Health 2005). La industria, en estos días enfrenta el problema con desinfectantes que son de amplio espectro antimicrobiano, siendo poco efectivos en contra de *L. monocytogenes*. Es por ello, que se están estudiando nuevos productos como desinfectantes de superficie, con mayor especificidad frente a determinados patógenos comunes en alimentos, como son los extractos de aceites esenciales de plantas y el ácido hipocloroso (Schöbitz et al., 2009).

Epidemiología: Se estima que el índice de infecciones es de 7 casos por millón de personas, con individuos de algunos grupos de alto riesgo tienen más probabilidad de adquirir listeriosis. *L. monocytogenes* es un germen oportunista, porque no causa enfermedades en los individuos sanos con sistemas inmunitarios fuertes (Marriott 2003). En México, los estudios epidemiológicos sobre la incidencia y formas clínicas de la

listeriosis, y sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos. Aunque reflejan una prevalencia similar a la identificada en otros países. Se reportó la presencia de *L. monocytogenes* en 2% de las muestras de alimentos preparados de una planta congeladora en Nuevo León. En el mismo estado, se refieren aislamientos de *L. monocytogenes* en 20% de las muestras de carne de res cruda. A su vez, se registraron aislamientos de la bacteria en 5% de las muestras de pescado obtenidas de la laguna Pueblo Viejo, en Baja California. Respecto a productos lácteos, se detectaron *L. monocytogenes* en 3% de las muestras de leche cruda obtenidas de granjas del Distrito Federal. Por otro lado, se reportó la presencia de *L. monocytogenes* en el 15% en mercados del Distrito Federal, 3.4% en Sonora, 9% en Jalisco y 9% en Sinaloa a partir de muestras de queso fresco recolectadas. Este hecho muestra el riesgo que la bacteria representa para los consumidores de dichos productos, principalmente por la posible participación de algunas cepas en brotes de ETA (Castañeda et al., 2014).

Marco jurídico para la prevención y control de la transmisión de *L. monocytogenes*:

En México, las normas oficiales NOM-091-SSA1199439 y NOM-121-SSA1-199440 establecen tolerancia cero en quesos y leche pasteurizada, mientras que en otros alimentos no se aplica ninguna política. Aunque la NOM-143-SSA1-199541 contempla los procedimientos microbiológicos para la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos, no se han implementado, por parte del gobierno ni de la industria alimentaria, leyes o programas que regulen la inocuidad de los alimentos en relación con *L. monocytogenes*. De acuerdo con esto, la Comisión Europea, a través del Reglamento 2073/2005, establece dos criterios para el correcto manejo de los alimentos. El primero señala como límite la existencia de 100 UFC/g de *L. monocytogenes* en alimentos listos para comer, con vida útil menor o igual a 5 días. El segundo criterio es de tolerancia cero (ausencia en 25 g) en alimentos en los cuales la bacteria puede crecer en condiciones de almacenamiento o cuya vida de anaquel sea mayor 5 días. En Estados Unidos, el criterio es de tolerancia cero en los alimentos listos para comer. Los países que contemplan estos criterios, además de las medidas para asegurar la inocuidad alimentaria, exigen el apego de la industria a un marco legal, al sistema HACCP y a procedimientos de detección del patógeno, así como estimular las buenas prácticas para el manejo de alimentos por parte de los consumidores (Castañeda et al., 2014).

Patogenia e inmunidad: El motivo por el que *L. monocytogenes* produce una grave infección se debe a la capacidad que tiene de inducir su propia fagocitosis por células fagocíticas y no fagocíticas del huésped, seguido por la replicación en el interior de las mismas y su transferencia directa a otra célula. *L. monocytogenes* es un microorganismo intracelular y se disemina en el cuerpo a través del aparato digestivo tras la ingestión de alimentos contaminados. El microorganismo tiene varias proteínas de adhesina, que facilitan la fijación de las bacterias, células hospedadoras y que contribuyen a la virulencia. La inmunidad para *L. monocytogenes* es medida principalmente por células, según de muestra por la ubicación intracelular de la infección y por la notable relación de la infección con los estados que cursan con alteración de la inmunidad mediada por células como el embarazo, sida, linfoma y trasplantes de órganos. Hay evidencias que los bajos números de *L. monocytogenes* en un alimento pueden causar listeriosis, pero se piensa que menos de 1,000 organismos pueden causar la enfermedad en personas susceptibles (Brooks 2011).

Listeriosis: La listeriosis invasiva se presenta entre 20 y 30 días después de la ingestión del patógeno y afecta a personas inmunocomprometidas. *L. monocytogenes* ocasiona una amplia variedad de síndromes (Tabla 6), los cuales fluctúan desde una enfermedad leve similar a la influenza, como el caso de mujeres embarazadas, hasta listeriosis neonatal fulminante, asociada a tasas de mortalidad de 54 a 90%. En el adulto, las principales entidades clínicas son la meningitis (55%), bacteriemia primaria (25%), endocarditis (7%) y las infecciones no meníngeas del mismo sistema central (6%) (Garza et al., 2002). Las infecciones serias pueden producir septicemia (reproducción del microorganismo en la sangre), encefalitis, infección del sistema nervioso central, y posteriormente la muerte. Estos síntomas pueden precederse por síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarreas, fiebre o dolor de cabeza (Pino y Zamora 2006).

Existen dos formas de presentación clínica de la infección;

a) Listeriosis neonatal: La infección se produce por invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis. Como consecuencia, puede ocurrir el aborto, generalmente a partir de los 5 meses de embarazo, parto prematuro o el nacimiento a término con infección generalizada del neonato, síndrome conocido como granulomatosis infantiséptica.

b) Listeriosis en el adulto: La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central (55 al 70% de los casos). Se desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia, desórdenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base.

Tabla 6. Síndromes por *L. monocytogenes*.

Población	Presentación clínica	Diagnóstico
Mujeres embarazadas	Fiebre ± dolor muscular ± diarrea Parto prematuro Aborto Muerte fetal	Cultivo de sangre ± cultivo de líquido amniótico
Recién nacidos		
< 7 días	Septicemia, neumonía	Cultivo de sangre
≥ 7 días	Meningitis y septicemia	Cultivo de fluido cerebroespinal
Mujeres no embarazadas	Septicemia, meningitis, infecciones focales	Cultivo de sangre, cultivo de fluido cerebroespinal
Adultos sanos	Diarrea y fiebre	Cultivo de heces en caldo selectivo

Fuente: Pino y Zamora (2006)

Las formas clínicas predominantes corresponden en ambos casos a la infección diseminada o a la infección localizada en el sistema nervioso central. Es la infección de origen alimentario con mayor tasa de mortalidad en humanos (20 al 30% o mayor) a pesar del inicio del tratamiento antibiótico previo (Callejo et al., 2013).

Tratamiento y sensibilidad a antimicrobianos: *L. monocytogenes* es sensible a penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina, siendo elegidos para el tratamiento penicilina o la ampicilina solos o asociados a gentamicina. El tratamiento puede durar hasta seis semanas o más. Cabe señalar que algunas publicaciones subrayan la ineficacia de la penicilina, pero los reportes sólo están basados en fracasos terapéuticos; de hecho, los fármacos más utilizados para tratar la listeriosis son penicilina y la ampicilina: la combinación penicilina-gentamicina

logra efectos sinérgicos contra el microorganismo, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo cual representa el tratamiento estándar de la listeriosis humana. Adicionalmente, diversos autores recomiendan la asociación ampicilina-cotrimoxazol, subrayando que es aún superior a la anterior, ya que reduce la mortalidad y las secuelas cerebrales (Garza et al., 2002). En la actualidad, el tratamiento para cualquier tipo de listeriosis se realiza con una asociación sinérgica de dosis altas de β -láctamicos y gentamicina. Como antibiótico alternativo, se ha propuesto Trimetropim-sulfametoxazol-1. En años recientes se ha incrementado la emergencia de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a antibióticos de uso común y al ser ésta una bacteria transmitida por alimentos, se ha convertido en un problema para el tratamiento de las personas infectadas (Castañeda et al., 2014).

Transmisión: La listeriosis se contrae consumiendo alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Los bebés pueden nacer con listeriosis si sus madres comen alimentos contaminados durante el embarazo. Aunque las personas saludables pueden consumir alimentos contaminados sin llegar a enfermarse, en ellos el riesgo de infección es mayor y pueden contraer listeriosis probablemente después de volver a comer alimentos contaminados con incluso una pequeña cantidad de la bacteria. Los alimentos de alto riesgo como forma de transmisión si no fueron manipulados apropiadamente son: productos de carne pre cocida, vegetales crudos, alimentos de origen marino como mariscos, pescados ahumados, productos de leche sin pasteurizar y quesos suaves (Pino y Zamora 2006).

Síntomas: Ocurren aproximadamente 3-70 días después de la exposición. Los síntomas más comunes son: fiebre, dolor de cabeza, cansancio, dolor muscular, tensión en el cuello y gripe con dolores y molestias. Síntomas menos comunes (síntomas gastrointestinales) como: diarrea, náuseas y calambres abdominales. Si la infección abarca el sistema nervioso central los síntomas que se presenta son: infección del cerebro, envenenamiento de la sangre, convulsiones, confusión y pérdida del equilibrio. Las mujeres embarazadas infectadas pueden experimentar sólo una pequeña gripe, sin embargo, la infección durante el embarazo puede llevar a un parto prematuro o una infección del recién nacido (Pino y Zamora 2006).

Diagnóstico: Listeriosis sólo puede ser diagnosticada cultivando el organismo en el fluido sanguíneo, fluido cerebroespinal o excrementos (aunque este último es difícil y de valor

limitado). La bacteria se puede aislar fácilmente a partir de medios de cultivo de rutina, pero tiene que ser distinguido de otros microorganismos Gram positivos (Centre for Health Protection 2010).

1.4.2. Biopelículas de *L. monocytogenes*

Ha habido un interés particular desde la década de los 80 debido a que se ha demostrado que *Listeria monocytogenes* se adhiere y persiste por largos periodos a numerosas superficies, incluyendo; acero inoxidable, vidrio, madera, porcelana, hierro, plástico, poliéster, propileno, polipropileno, caucho, fibra de vidrio, cartón encerado y papel; y esto se relaciona directamente con la formación de biopelículas. La habilidad de la listeria para adherirse a superficies de distintas propiedades indica que es un potencial contaminante para el material de empaque y foco de contaminación. Las concentraciones de bacterias que se encuentran en una biopelícula de *L. monocytogenes* se encuentran entre $10^4 - 10^7$ UFC/cm². Concentración por debajo, en comparación a otras bacterias que rondan concentraciones hasta de 10^{12} UFC/cm² (da Silva y De Martinis 2013). El progreso de adhesión de *L. monocytogenes* en las superficies sólidas tiene la siguiente secuencia: La célula se deposita en la superficie, se fija y la coloniza formándose la biopelícula (figura 5).

La adhesión de la bacteria *listeria* ha sido atribuida a interacciones hidrofóbicas, presencia de flagelos, fibrillas, y la síntesis de exopolisacáridos. *L. monocytogenes* es un microorganismo hidrofóbico, con energía libre superficial 66 mJ/m^2 . Por lo tanto la adhesión y la colonización de la superficie es rápida $\leq 2 \text{ h}$ a 20 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en sustratos hidrófilos. *Listeria* produce flagelos a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ pero no a $37 \text{ }^\circ\text{C}$; los flagelos de la listeria actúan como estructuras adhesivas durante las primeras etapas de fijación de la célula. La formación de fibrillas se ha observado a $\leq 21 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH de 6.0 a 9.0, después de 9 horas de incubación en superficies de hierro.

Las plantas de alimentos refrigerados, proporcionan condiciones para la sobrevivencia y crecimiento de *L. monocytogenes*. El organismo se puede adherir a las superficies de contacto de los alimentos y formar biopelículas impidiendo los eficientes procedimientos de sanitización. Las áreas refrigeradas con ambientes húmedos, además de la acumulación de depósitos de materia orgánica permiten la sobrevivencia y crecimiento de la bacteria. La

mayor proliferación de *L. monocytogenes* ocurre en presencia de suero de cerdo en acero inoxidable, polímeros y fibra de plástico reforzado (Ryser y Marth 2007).

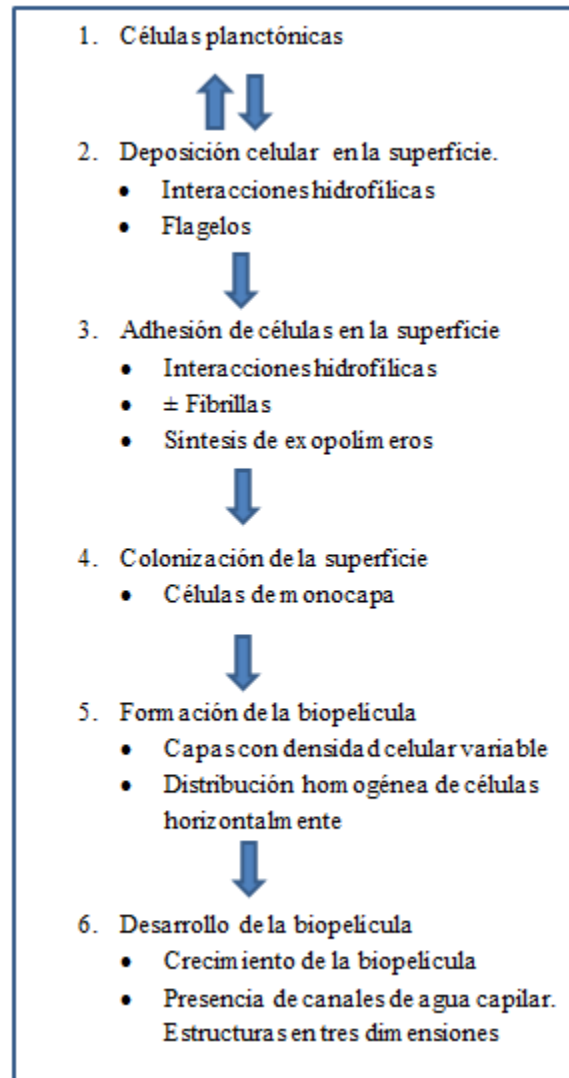


Figura 5. Formación de biopelículas de *L. monocytogenes* Ryser y Marth (2007).

1.4.2.1. Remoción de Biopelículas

Los nutrientes, el agua limitante, el diseño de equipos y el control de temperatura son aspectos importantes en el control de las biopelículas. Es muy frecuente, que las variables mencionadas anteriormente, no se puedan cambiar, por tanto el control de la biopelícula queda reducido a la efectividad de la limpieza que se realice sobre las áreas y equipos de proceso. En la mayoría de las plantas de proceso de alimentos, las superficies de contacto

con los alimentos son limpiadas y sanitizadas diariamente, sin embargo muchas otras superficies como los tanques de almacenamiento y los exteriores de las bombas, paredes, y techos no presentan un plan de limpieza efectivo. Estos aspectos generan una oportunidad para la formación de biopelículas en presencia de humedad. (Navia et al., 2010).

En la industria es necesario desarrollar un programa de limpieza que pueda inhibir la acumulación de bacterias en las superficies abióticas. Una inapropiada limpieza puede ser una fuente para el desarrollo de biopelículas. Las biopelículas pueden ser removidas mediante distintos métodos tanto físicos como químicos.

Métodos físicos. Los métodos físicos más comunes utilizados para remover las biopelículas son mediante la limpieza de las superficies usando cepillos. Los métodos de cepillados seguidos de técnicas de ultrasonido (100-150 kHz) pueden eliminar las capas de bacterias adheridas. Otro método es utilizar agua a altas temperaturas siendo efectivo a temperaturas de 125 °C por 30 min. Recientemente bajas corrientes eléctricas en combinación con antibióticos resultan suficientes para remover biopelículas.

Métodos químicos. Las sustancias mayormente utilizadas para sanitizar son halógenos, peróxidos, ácidos, compuestos clorados, y compuestos de amonio cuaternario. El cloro es el compuesto más usado por su capacidad oxidante. Se ha encontrado que el cloro logra remover *Salmonella* de acero inoxidable; sin embargo requiere de alto tiempo de contacto para ser efectivo. El peróxido de hidrógeno es un agente de amplio espectro, siendo bactericida y activo contra esporas, el peróxido ha demostrado ser efectivo contra *Listeria* y *Salmonella*. Los compuestos de amonio cuaternario son surfactantes catiónicos que tienen actividad limpiadora, son eficientes contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, se ha demostrado que en concentraciones de 400 ppm por 5 min. Inactiva biopelículas de *Listeria monocytogenes* (Myszka y Czaczyk 2011).

Remover o inactivar las bacterias de superficies abióticas mediante el lavado y tratamientos de desinfección, no siempre garantiza la eliminación de biopelículas. Muchos mecanismos se han propuesto para explicar la resistencia de las biopelículas, incluyendo la resistencia de los agentes antimicrobianos para penetrar la estructura de las biopelículas, el crecimiento lento y la disminución de oxígeno (Myszka y Czaczyk 2011). El principal factor intrínseco

de la resistencia de las biopelículas se debe a que la matriz polimérica puede actuar como barrera de difusión que evita que los compuestos antimicrobianos lleguen a su objetivo (Paraje 2011). Se han propuesto una variedad de mecanismos para explicar la resistencia de las biopelículas bacterianas a los agentes antimicrobianos, e incluyen pero no se limitan a:

- Agotamiento del agente antimicrobiano en fase líquida
- Retraso en la penetración del agente antimicrobiano en la matriz de la biopelícula
- Tasa de crecimiento alterada de los organismos en la biopelícula
- Cambios fisiológicos de adaptación debido al modo de crecimiento de la biopelícula

Existe evidencia creciente de que muchas bacterias de biopelículas a menudo sobreviven a pesar del agente antimicrobiano que penetra en la matriz a una concentración apropiada. Además puede que el objetivo bioquímico no sea el correcto para el agente antimicrobiano. Es también notable que la entrega del agente antimicrobiano sea lenta, o su concentración se vea empobrecida de alguna manera, la posibilidad de que los microorganismos que desarrollaron resistencia, debido a la respuesta al estrés por desarrollarse en condiciones adversas, se incrementa. Esto indica que las bacterias de las biopelículas no se eliminan durante el tratamiento, existe la posibilidad de que se presenten poblaciones de organismos resistentes a los agentes antimicrobianos (Fratamico et al., 2009).

1.4.2.2. Estrategias para el control de biopelículas

Los métodos para prevenir la formación de biopelículas en las distintas superficies, incluyen una amplia variedad de desinfectantes, modificar la hidrofobicidad de las superficies y el diseño de los equipos. Algunas superficies se impregnan con agentes antimicrobianos como anti fúngicos con iones de plata. Se ha reportado que la aplicación de ácido láctico previene la adherencia de los microorganismos. Además varios estudios han demostrado que aplicar nisina sobre superficies sólidas inhibe la adhesión inicial de bacterias. En la industria alimentaria los sistemas (HACCP) son estrategias que pueden reducir o eliminar las biopelículas microbianas. Los análisis de riesgos sumados con las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas agropecuarias pueden prever y anticipar riesgos antes de que estos ocurran (Myszka y Czaczyk 2011).

Entre las distintas estrategias para el control de biopelículas se encuentran (Aswathanarayan y Vitt 2013) :

Inhibidores de detección de quórum: Es evidente que la resistencia de las biopelículas a los agentes antimicrobianos se adquiere como una estrategia multicelular que se basa en el intercambio de señales químicas entre las células en un proceso conocido como "detección de quórum". La aplicación de inhibidores de detección de quórum es una de las técnicas prometedoras para prevenir la formación de biopelículas.

Bacteriófagos: Pueden ser una alternativa o complemento de los antibióticos para las infecciones bacterianas, en particular para la reducción de biopelículas o su interrupción. El tratamiento se basa en el uso de fagos líticos para combatir las infecciones bacterianas. Los fagos son muy específicos y eficientes, no son patógenos para el hombre y persisten sólo mientras las bacterias específicas están presentes.

Enzimas: Como la matriz de la biopelícula recubre las células bacterianas dentro de la colonia de la biopelícula, las enzimas degradan la matriz y propician el desprendimiento de células de la colonia y su liberación en el medio ambiente. Las enzimas que degradan la matriz implicadas en la dispersión de la biopelícula, incluyen glicosidasas, proteasas, y desoxirribonucleasas.

Tensoactivos: El pre-acondicionamiento de superficies utilizando biosurfactantes se puede hacer para evitar la adherencia de bacterias y la formación de biopelículas. Los biotensoactivos son compuestos microbianos que pueden modificar las propiedades físico-químicas de las superficies y en consecuencia la adhesión. Los agentes tensoactivos son productos químicos que normalmente se utilizan para la limpieza de superficies en contacto con alimentos. Los biotensoactivos tienen baja toxicidad y alta biodegradabilidad en comparación con tensoactivos sintéticos.

Nanopartículas: La formación de biopelículas se puede prevenir mediante el diseño de las superficies que pueden restringir la colonización bacteriana y la formación de biopelículas. La "nano-funcionalización" de las superficies mediante el recubrimiento, impregnación, o la incorporación de nanomateriales puede inhibir la adhesión bacteriana y la formación de

biopelículas, muchas de las nanopartículas con propiedades antibacterianas también presentan actividad anti biopelículas.

Fitoquímicos y alimentos funcionales: Hay un número de compuestos bioactivos con actividad contra la adhesión bacteriana y muchos de éstos se encuentran en alimentos y bebidas naturales, tales como: arándanos, té, café, vino, leche, uvas, extractos de hongos etc.

1.4.3. Listeria como indicador de limpieza

El entorno donde se procesan los alimentos puede albergar varios microorganismos patógenos, entre ellos *L. monocytogenes*, que pueden re contaminar los alimentos durante la producción. Muchas zonas en las áreas de producción con bajo nivel de saneamiento y de difícil acceso, proporcionan nichos donde proliferan bacterias y se pueden desarrollar biopelículas. Las compañías de alimentos hoy en día dedican muchos esfuerzos a diseño y mantenimiento de sistemas de gestión de seguridad alimentaria, sin embargo los resultados no siempre son satisfactorios. Los organismos indicadores se han utilizado como marcadores, cuya presencia en números superiores a los límites indican la posible presencia de microorganismos patógenos. El término de “organismos indicadores” ha sido utilizado desde hace casi un siglo para evaluar el estado microbiológico de los sistemas de producción de alimentos, calidad y seguridad de los productos alimenticios. Enfermedades transmitidas por alimentos y el deterioro microbiano de los alimentos, resulta del fracaso o la incapacidad para controlar los contaminantes patógenos. Los métodos más convencionales para la detección de patógenos bacterianos se basan en el uso de medios microbiológicos para crecer selectivamente y enumerar las bacterias. Estos métodos son generalmente de bajo costo y proporcionan resultados cualitativos y cuantitativos. Este tipo de análisis no pueden sustituir a la detección de patógenos específicos, para los que existen métodos apropiados, sin embargo proporcionan información en tiempos más cortos, por lo tanto los análisis con organismos indicadores se utilizan ampliamente para medir el saneamiento inadecuado, y el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de higiene (Dzieciol et al., 2016).

Microorganismos indicadores de uso frecuente en alimentos. Los indicadores más utilizados en las industrias alimentarias son las células viables (recuento total de células viables) de levaduras, mohos, entero bacterias, coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y *Listeria* spp.

Las bacterias del género listeria, están presentes en el medio ambiente, tienen una mayor resistencia al estrés ambiental y toleran temperaturas de refrigeración, así como mayor resistencia a altas temperaturas, aunque es posible inactivarlas a condiciones de pasteurización. Por lo tanto esta bacteria es utilizada para evaluar el riesgo para su mismo género. Los esfuerzos para controlar *L. monocytogenes* se llevan a cabo mediante pruebas del género listeria, que está muy extendida en el medio ambiente y se encuentra comúnmente en las instalaciones de procesamiento de alimentos. *Listeria monocytogenes* y otras *Listeria* spp. se pueden encontrar al mismo tiempo en los alimentos. Esto es significativo porque la presencia de *Listeria innocua* y otras especies no patógenas de *Listeria* pueden servir como indicadores de la presencia de *L. monocytogenes*. En consecuencia la ausencia de listeria se utiliza como indicador de ausencia de *L. monocytogenes* (HBD Halkman 2014).

1.5. Nanotecnología

La nanotecnología es el estudio de la manipulación de la materia a escala atómica y molecular, con al menos una dimensión característica medida en nanómetros (Chellaram, et al., 2014). Las nanopartículas se desarrollaron alrededor de 1970 para la realización de vacunas y fármacos contra el cáncer. Hoy se consideran una gran promesa para el desarrollo de nuevos productos en casi todos los sectores industriales. Entre los diferentes sectores en los que se reconoce su potencial aplicación van desde electrónica, atención a la salud, textiles, medio ambiente y alimentos. Las ventajas que los materiales ofrecen en estas dimensiones, es que muestran propiedades únicas, que pueden ser explotadas para una amplia gama de aplicaciones. Estas propiedades se deben principalmente a una superficie de alta masa, que resulta en una mayor reactividad para las interacciones, la entrega de iones, o de contacto. Sin embargo otras características físico-químicas tales como la forma, composición, carga, solubilidad pueden cambiar su comportamiento de manera impredecible (Gallocchio et al., Ricci 2015).

1.5.1. Propiedades físicas y químicas de los nanomateriales

Los nanomateriales presentan diferentes propiedades físicas y químicas, estas dependen de su forma, tamaño, características de superficie, y de su estructura interna. Los materiales a nano escala son un puente entre materiales a granel y estructuras atómicas o moleculares, un material a granel debe tener propiedades físicas constantes independientemente de su tamaño, pero en nano escala se observan propiedades dependientes de su tamaño (Public Health 2009). Algunas características conocidas de los nanomateriales se relacionan con diversos factores, por ejemplo:

- Tamaño, forma, superficie específica y proporción entre anchura y altura
- Si se adhieren unas a otras
- Distribución según el tamaño
- Lisura o rugosidad de su superficie
- Estructura molecular
- Composición, incluida su pureza y cualquier aditivo o impureza conocidos
- Estado en el que se encuentran (sólido, líquido y gas)
- Química de superficie
- Atracción de moléculas de agua y de aceites o grasas

1.5.1. Nanotecnología en el área de los alimentos

La nanotecnología en el área de los alimentos, tiene su aplicación en la calidad y la inocuidad alimentaria, el desarrollo de nuevos productos y el envasado, entre otros campos. El interés de la nanotecnología radica en el hecho de que este pequeño tamaño conlleva propiedades físicas y químicas que difieren significativamente de las habituales a mayor escala. Con ello, muchos productos son más durables, resistentes, livianos, limpios o multifuncionales. Otras de las oportunidades que ofrece el uso de nanotecnología en la cadena de producción de alimentos son:

- Entrega de productos agroquímicos
- Nanomateriales para la detección de patógenos en plantas y animales
- Aditivos alimentarios como color, potenciadores de sabor, suplementos alimenticios, nanopartículas para la eliminación de contaminantes y patógenos en alimentos

- Materiales en contacto con alimentos, con características antioxidantes, o antimicrobianas, para la conservación de los alimentos
- Mejora de los nutrientes como vitaminas, antioxidantes o aceites saludables a través de su encapsulación
- Mejora de textura de los productos con pequeños cristales de tamaño nanométrico

En lo que se refiere a la evolución de esta tecnología, podría producirse un cambio potencial a partir de materiales inorgánicos, lo que sugiere que las aplicaciones serían llevadas a la práctica, dejando de ser solo de investigación y desarrollo.

Entre los métodos nanotecnológicos que se están empleando en el área de alimentos se encuentran (Soto y López 2011):

- Nanomicelas.** Son partículas esféricas de 5 a 100 nanómetros de diámetro. Se forman espontáneamente por la disolución de surfactantes en agua a concentraciones que exceden un nivel crítico, conocido como “concentración crítica de la micela”. Permiten encapsular moléculas no polares como lípidos, saborizantes, antimicrobianos, antioxidantes y vitaminas.
- Liposomas.** Son formados por lípidos polares abundantes en la naturaleza, principalmente fosfolípidos. Su tamaño varía entre 20 nm y unos cientos de micrómetros; su interior es acuoso por naturaleza. A diferencia de las nanomicelas, son usados para encapsular compuestos solubles en agua y en grasa. Recientemente, también se utilizaron liposomas para encapsular los aceites esenciales y sus componentes, timol, y carvacrol así como su mezcla, mostraron una mayor actividad antimicrobiana después de ser encapsulados.
- Nanoemulsiones.** Son dispersiones muy finas de dos líquidos inmiscibles (generalmente agua en aceite) con uno de los líquidos siendo dispersado en el otro en forma de gotas; el diámetro de las gotas varía entre 50 y 200 nm
- Nanopartículas biopoliméricas.** Estas nanopartículas consisten de una matriz de biopolímeros que están concentrados a través de fuerzas intermoleculares de atracción o de enlaces covalentes para formar partículas sólidas. Existe una amplia variedad de biopolímeros naturales y sintéticos que han sido usados para encapsular

y transportar compuestos. Los materiales de la pared pueden ser sintéticos, tal como poli (DL-lactida-co-glicolida) (PLGA), o biopolímeros naturales, tales como proteínas y polisacáridos. Una característica importante de este sistema es de liberación controlada, por lo general incluye una liberación explosiva inicial seguido de una liberación prolongada. Las nanopartículas también demostraron una alta eficiencia de atrapamiento que van desde 92% a 98% y liberación continua de los antimicrobianos en 72 h.

1.5.2. Nanopartículas antimicrobianas

La Nanotecnología ofrece una plataforma sólida para el ajuste de las propiedades fisicoquímicas de numerosos materiales para generar compuestos antimicrobianos eficaces (Beyth et al., 2015). Una nueva generación de películas comestibles se está desarrollando con el objetivo de permitir la incorporación o la liberación controlada de compuestos activos utilizando la nanotecnología (Pérez y López 2011).

1.5.2.1. Nanopartículas en el control de biopelículas

La formación de biopelículas se puede prevenir mediante el diseño de las superficies que pueden restringir la colonización bacteriana y la formación de biopelículas. La "nanofuncionalización" de las superficies mediante el recubrimiento, impregnación, o la incorporación de nanomateriales puede inhibir la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas. Muchas de las nanopartículas con propiedades antibacterianas también presentan actividad antibiopelícula. Nanopartículas de fluoruro de magnesio tienen actividad antimicrobiana y son capaces de prevenir la formación de biopelículas de agentes patógenos comunes, tales como *E. coli* y *S. aureus*. Superficies de vidrio recubierto con nanopartículas de óxido de zinc son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) que interfieren con la *E. coli* y la formación de biopelículas de *S. aureus*. En el caso del óxido nítrico (NO) liberador de nanopartículas, tiene propiedades de difusión rápida de (NO) que puede resultar en una mayor penetración en la matriz de las biopelículas y por lo tanto mejorar la eficacia contra las bacterias de biopelículas incrustadas. Su actividad antibiopelícula es de amplio espectro y es más eficaz contra las especies gram-negativas. Su capacidad para erradicar tanto *P. aeruginosa* y *E. coli* en un $\geq 99.999\%$ de destrucción de

biopelícula es prometedor ya que las bacterias Gram negativas son generalmente más invasivas que las Gram positivas. Por lo tanto, las nanopartículas ofrecen una nueva línea de investigación en la lucha contra las biopelículas (Aswathanarayan y Vitt 2013).

La nanoencapsulación de los aceites esenciales en partículas poliméricas también es capaz de mejorar la actividad antimicrobiana. Nanocápsulas que contienen carvacrol actúan sobre biopelículas bacterianas facilitando su acción. Las Nanopartículas que contienen carvacrol alteran la arquitectura de la biopelícula que conduce a una fluidificación de la matriz extracelular que podría mejorar la penetración de los agentes antimicrobianos en el núcleo profundo de la biopelícula (Luo y Wang 2014).

1.5.2.2. Mecanismos de inhibición de las nanopartículas con sustancias antimicrobianas

Los nanomateriales actúan en dos vías principales en la inhibición de las bacterias, que generalmente actúan simultáneamente (1) la interrupción de la integridad de la membrana y (2) la producción de especies reactivas oxígeno (ERO). Otros aspectos que propician la acción antimicrobiana son (3) la liberación de iones tóxicos, (4) la interrupción del transporte de electrones (5) la oxidación de proteínas y (6) el colapso de la membrana celular (Figura 6) (Santos et al., 2013).

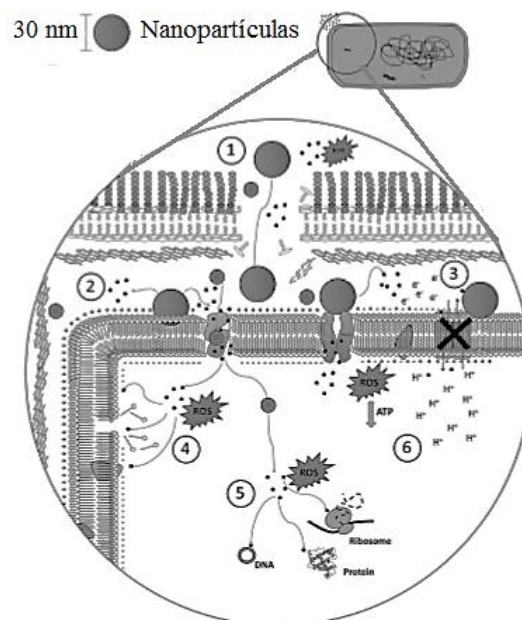


Figura 6. Representación de los efectos de las nanopartículas sobre las bacterias Santos et al., (2013).

El daño a la membrana ocurre cuando los nanomateriales se unen electrostáticamente a la membrana celular, lo que conduce a la alteración del potencial de membrana, su despolarización, y la pérdida de su integridad, lo que da lugar a un desequilibrio del transporte, alteración de la respiración, interrupción de la transducción de energía y la lisis celular. La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), es considerado el efecto determinante más eficaz tanto *in vitro* e *in vivo* de la citotoxicidad de los nanomateriales, debido a la interrupción de la cadena respiratoria o directamente por los mismos nanomateriales. Una explosión de ERO provoca a través de estrés oxidativo daño a todas las macromoléculas de la célula, dando lugar a la peroxidación de lípidos, la alteración de las proteínas, la inhibición de enzimas, y daños al ARN y ADN. Otros efectos de los nanomateriales incluyen la inhibición directa de enzimas específicas esenciales, la inducción de especies reactivas de nitrógeno, y la inducción de la muerte celular programada (Beyth et al., 2015).

Nanopartículas inorgánicas. Metales y óxidos metálicos han sido estudiados por su actividad antimicrobiana. Las nanopartículas de óxidos metálicos son ampliamente conocidas por su alto poder antimicrobiano, en las que se incluyen plata, óxido de hierro, óxido de titanio, óxido de cobre, y óxido de zinc. La mayoría de las nanopartículas de óxido de metal presentan propiedades bactericidas a través de especies reactivas de oxígeno, aunque algunos son eficaces debido a su estructura y a la liberación de iones metálicos.

Nanopartículas orgánicas. Nanopartículas poliméricas matan a los microorganismos, ya sea por los antibióticos que liberan, péptidos antimicrobianos y agentes antimicrobianos, o por superficies catiónicas, tales como compuestos de amonio cuaternario, piridinas alquilo o fosfonio cuaternario. Se han propuesto múltiples mecanismos de acción para la forma en que estos grupos catiónicos son capaces de romper la membrana celular bacteriana, con algunas cadenas hidrófobas que requieren de ciertas longitudes para penetrar y romper la membrana bacteriana.

1.5.2.3. Uso de la nanotecnología para la formulación de aceites esenciales como antimicrobianos

Durante varios años, la investigación sobre el desarrollo de formulaciones de fármacos se ha centrado en la adaptación de los sistemas de suministro que son capaces de sostener una

liberación del fármaco después de la administración. Estos tipos de formulaciones, conocidas comúnmente como sistemas de administración de fármacos modificados, tienen varias ventajas en comparación con las preparaciones convencionales. Su capacidad de controlar la liberación de aceites esenciales, confiere a ellos una eficacia mejorada, y una toxicidad reducida. Además de controlar la liberación de molécula de fármaco, los nano vehículos también protegen a los aceites esenciales contra la posible degradación térmica o foto degradación, aseguran una mayor estabilidad, así como su función, pueden proteger a los aceites esenciales de la oxidación o la evaporación, y facilitar su actividad antimicrobiana proporcionando diversas propiedades de difusión ante membranas biológicas, debido a la dimensión en nano escala de las partículas. En consecuencia, se extiende la vida útil del producto final. Teniendo en cuenta estas características, estos sistemas pueden realmente representar un enfoque interesante para la superación de las limitaciones de los aceites esenciales. La asociación de aceites esenciales antimicrobianos con nanopartículas poliméricas presenta varias ventajas; liberación controlada, el aumento de solubilidad en agua, la reducción de la citotoxicidad, e igual o mayor actividad antimicrobiana (São et al., 2013).

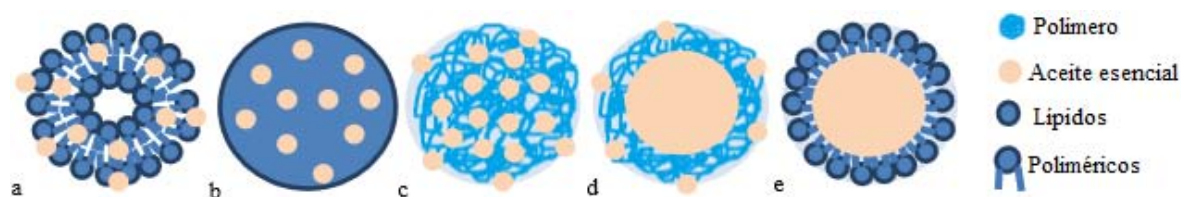


Figura 7. Ilustración esquemática de las plataformas de nanopartículas para aceites esenciales antimicrobianos: a) liposomas, b) nanopartículas lipídicas sólidas, c) nanoesferas poliméricas, d) nanocápsulas poliméricas, y e) Nanoemulsiones São et al., (2013)

1.5.2.3.1. Métodos para obtener nanopartículas con aceites esenciales.

La encapsulación de los aceites esenciales en partículas poliméricas se ha investigado, siendo la principal limitación, la pérdida de los aceites esenciales sobre todo en técnicas que incluyen un calentamiento o una etapa de evaporación. Por otro lado, la encapsulación puede proporcionar muchas ventajas tales como la protección de la degradación. Entre los métodos para encapsular aceites esenciales se encuentran (El Asbahani et al., 2015):

1. Nanoprecipitación. Es una técnica de desplazamiento de solvente. Es sencilla y reproducible que permite la obtención de nanopartículas monodispersas. También tiene la ventaja de ser rápida y económica.

2. Coacervación. Puede ser simple o compleja; se utilizan uno o dos polímeros, respectivamente. La coacervación es generalmente definida como la separación de las dos fases líquidas en una solución coloidal. Una fase es rica en polímero y llamada fase de coacervado y las otras dosis no contiene polímero y se llama solución de equilibrio.

3. Secado por pulverización. Es un método popular de la formación de micropartículas, ya que es fácil de realizar en un nivel industrial y permite una producción continua. Se compone de atomización de líquido en gotas pequeñas y, una etapa de secado que se lleva a cabo utilizando gas y la recogida de las partículas sólidas mediante calentamiento.

4. Expiación rápida de soluciones supercríticas. Método poco usado, en el que se utiliza fluidos supercríticos base. Este proceso se ha convertido en una alternativa atractiva para encapsular sustancias naturales debido a la utilización de disolventes ecológicos.

5. Encapsulación en liposomas. Los liposomas son sistemas formados por uno o varios fosfolípidos o varios compartimentos acuosos. Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas que son capaces de auto-organizarse espontáneamente en medios acuosos. Son ampliamente utilizados como portadores de ambas moléculas hidrófilas en los compartimentos acuosos y lipófilos en las bicapas, sino también moléculas anfifílicas.

1.5.3. Zeína como biopolímero para la formación de nanopartículas

La zeína es la proteína de reserva principal del maíz, representa del 35 – 60% de las proteínas presentes, y se encuentra exclusivamente en el endospermo y es considerada una prolamina debido a su solubilidad característica. La zeína ha sido de interés científico desde su aislamiento en 1821. Debido a la deficiencia en aminoácidos esenciales, hace que sea de

mala calidad nutricional, y su insolubilidad en agua limita su uso en productos alimenticios, por lo tanto su objetivo principal en los últimos años ha sido su posible utilización como un polímero industrial (Shukla y Cheryan 2001). Las propiedades de la zeína (Tabla 7) han traído una amplia variedad de aplicaciones en diferentes industrias, especialmente en los campos de la alimentación y la biomedicina. Los principales intereses en la utilización de la zeína, surgen de los siguientes aspectos: es reconocida como segura (GRAS) además de que tiene características prometedoras, incluyendo biocompatibilidad, biodegradabilidad, y baja toxicidad (Yangchao y Qin 2014).

La zeína es una mezcla de péptidos de diferentes pesos moleculares, solubilidad y carga. La zeína no es soluble en agua, a menos que se apliquen condiciones específicamente definidas, tales como una cierta concentración de etanol (figura 8), altas concentraciones de urea, y altas concentraciones de álcali (pH 11 o superior). Este comportamiento de solubilidad única se atribuye a su secuencia de aminoácidos, con más de 50% no polares, incluyendo leucina, prolina, alanina, fenilalanina, isoleucina, y valina (Yangchao y Qin 2014).

Tabla 7. Propiedades de la Zeína.

Propiedad	Características
Apariencia	Polvo de color amarillo amorfo
Constante dieléctrica a 500V, 60 ciclos, 25-90 °C	4.9 -5.0
Coefficiente de difusión	$3.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$
Temperatura de transición vítrea	165 °C
Punto isoelectrico, pH	6.2 (varía entre 5 y 9)
Peso molecular	~35,000
Coefficiente de sedimentación	1.5 s
Gravedad específica, a 25 °C	1.25
Punto de degradación térmica	320 °C

Fuente: Esquivel (2013)

La fuerte hidrofobicidad hace de la zeína un biopolímero natural único, ya que no puede ser disuelto en agua, pero es soluble en soluciones etanol/agua. La manipulación de la solubilidad de la zeína a través del cambio de condiciones del disolvente ha dado lugar a

varias aplicaciones. En general, la técnica de fabricación para preparar partículas de zeína se considera una dispersión líquido-líquido o método antiodsolvente. Típicamente el tamaño de las nanopartículas de zeína está en los rangos de 100 a 400 nm, dependiendo de los parámetros de su elaboración (Yangchao y Qin 2014).

Varios estudios reportan el uso de zeína como un material para generar partículas cargadas con compuestos antimicrobianos, y así facilitar su administración y su eficacia a lo largo de tiempo por su liberación sostenida y controlada. Recientemente el uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos, ha generado interés entre los investigadores. Debido a su naturaleza sensible, los aceites esenciales se pueden degradar fácilmente bajo la acción del oxígeno, la luz y altas temperaturas. Por otra parte para algunas aplicaciones (antibacterial, antioxidantes y conservantes) requieren de liberación controlada para lograr los resultados. Por lo tanto se requiere del desarrollo de formulaciones que protejan a los aceites esenciales de la degradación, perdidas por evaporación, facilitar su manipulación y lograr la liberación controlada. La encapsulación de aceites esenciales como el de orégano, en partículas de zeína fue reportado por Parris, et al (2005), preparándolos por el método de dispersión líquido-líquido, los estudios revelaron una mejora en las propiedades antioxidantes y antibacterianas (Ashok y Krassimir 2014). Las características fisicoquímicas y nano estructuras únicas de la zeína, hacen a sus moléculas intrínsecamente superiores a otros polímeros naturales y sintéticos. A medida que los sistemas de administración en micro y nano estructuras a base de zeína hacen que las posibilidades de aplicación estén creciendo rápidamente.

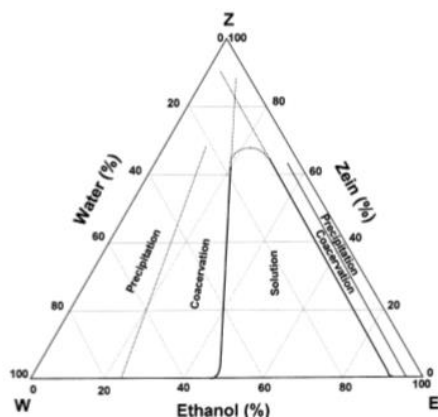


Figura 8. Diagrama de tres fases para la solubilidad de la zeína en etanol y agua (Shukla y Cheryan 2001)

2. METODOLOGÍA

2.1. Problema y objetivos.

PROBLEMA: Asegurar la inocuidad en toda la cadena alimentaria es fundamental para evitar contaminación de los productos, y por ende tener alimentos inocuos. Uno de los principales problemas es la contaminación de superficies. Diferentes bacterias patógenas y alterantes para los alimentos pueden encontrarse presentes en distintas áreas, ya sea en pisos, paredes y techos, así como en las superficies de diferentes equipos, esto representa un foco de contaminación y nichos de crecimiento de biopelículas bacterianas. La limpieza y desinfección son acciones evidentemente necesarias, que constantemente deben ser monitoreadas y realizadas para asegurar la inocuidad de los productos en una línea de producción. Los nuevos desarrollos tecnológicos deben contrarrestar estas situaciones adversas, el uso de tecnologías como la nanoencapsulación representa una opción que puede mejorar el funcionamiento de un desinfectante. El uso de materias de origen natural que pueden presentar algunas características desfavorables, como es el caso de los aceites esenciales y sus derivados fenólicos, los cuales son volátiles, fotosensibles, poco solubles en agua y presentan fuertes aromas, pueden verse beneficiados, con la nanoencapsulación aumentando y mejorando sus propiedades antimicrobianas, por las características que el tamaño y comportamiento presentan por su dimensión en nanoescala.

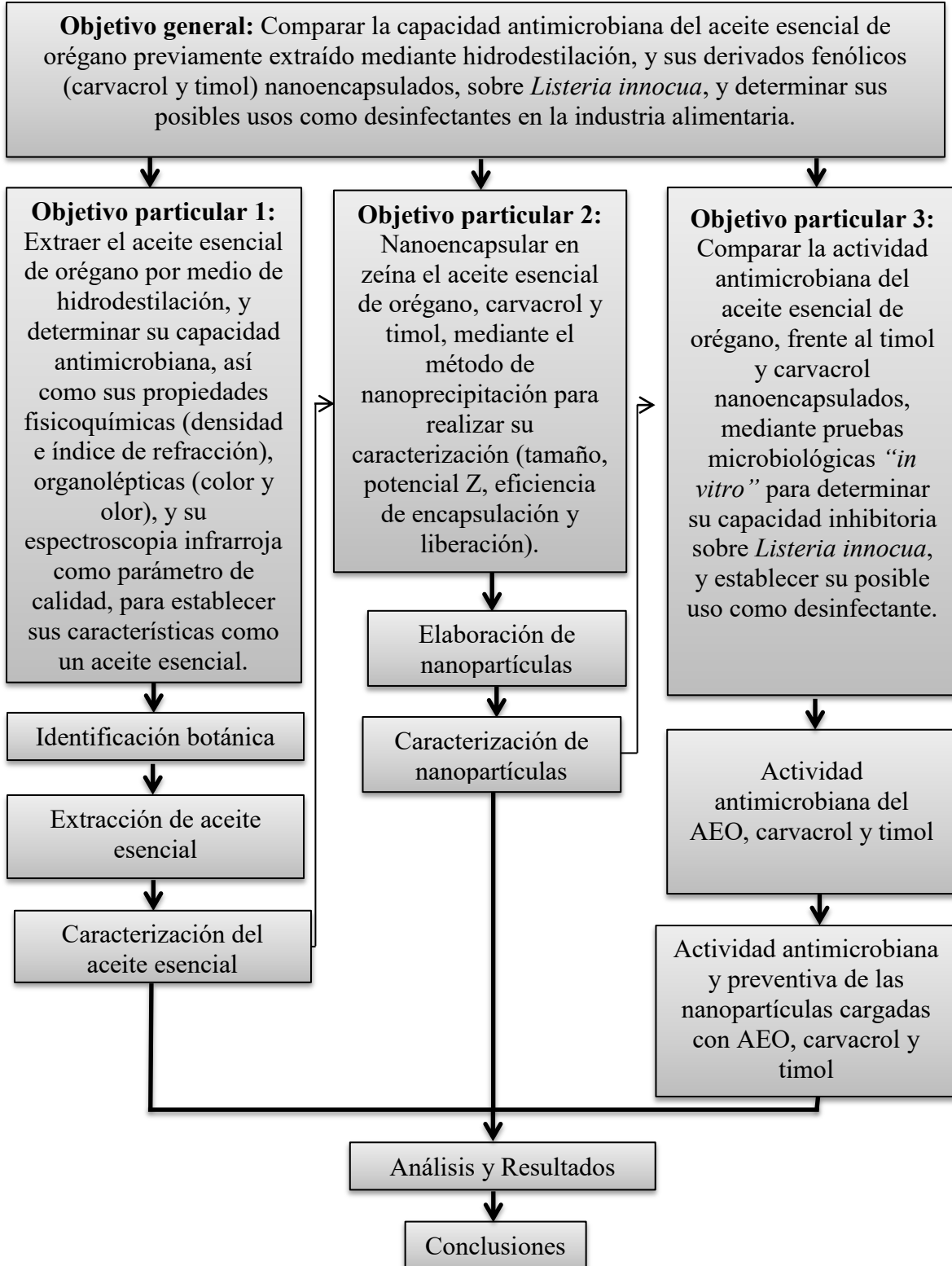
OBJETIVO GENERAL: Comparar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano previamente extraído mediante hidrodestilación, y sus derivados fenólicos (carvacrol y timol) nanoencapsulados, sobre *Listeria innocua*, y determinar sus posibles usos como desinfectantes en la industria alimentaria.

OBJETIVO PARTICULAR 1: Extraer el aceite esencial de orégano por medio de hidrodestilación, y determinar su capacidad antimicrobiana, así como sus propiedades fisicoquímicas (densidad e índice de refracción), organolépticas (color y olor), y su espectroscopia infrarroja como parámetro de calidad, para establecer sus características como un aceite esencial.

OBJETIVO PARTICULAR 2: Nanoencapsular en zeína el aceite esencial de orégano, carvacrol y timol, mediante el método de nanoprecipitación para realizar su caracterización (tamaño, potencial Z y eficiencia de encapsulación y liberación).

OBJETIVO PARTICULAR 3: Comparar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano, frente al timol y carvacrol nanoencapsulados, mediante pruebas microbiológicas “*in vitro*” para determinar su capacidad inhibitoria sobre *Listeria innocua*, y establecer su posible uso como desinfectante.

2.2. Cuadro metodológico



2.3. Materiales y métodos

2.3.1. OBJETIVO PARTICULAR 1: Extraer el aceite esencial de orégano por medio de hidrodestilación, y determinar su capacidad antimicrobiana, así como sus propiedades fisicoquímicas (densidad e índice de refracción), organolépticas (color y olor), y su espectroscopia infrarroja como parámetro de calidad, para establecer sus características como un aceite esencial.

2.3.1.1. Origen del material biológico

El material biológico se adquirió como orégano seco, en el molino de chiles y harinas Azteca III en la calle Revolución Mexicana interior del Mercado Municipal local 28 en Tepeji del Río, Estado de Hidalgo, C.P. 42854. Se logró averiguar que la procedencia del orégano, tiene como matriz distribuidor al establecimiento Abastos Cantabria S.A de C.V. ubicada en la Central de Abastos de la Ciudad de México Delegación Iztapalapa C.P 09040, pasillo H bodega 32-C . La adquisición del orégano se llevó a cabo en dos exhibiciones, en base a las necesidades para la obtención del AEO.

2.3.1.2. Identificación botánica de la especie de orégano

La muestra de orégano se identificó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, en el Departamento de Herbolaria ubicado en Avenida de los Barrios No 1. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México CP: 54090.

2.3.1.3. Acondicionamiento del orégano para su caracterización y la extracción del aceite esencial

Para la extracción del aceite esencial, fue necesario realizar acciones preliminares al material biológico, las cuales consistieron en seleccionar la materia prima, así como la reducción de su tamaño. Debido a que la mayor concentración del aceite esencial se encuentra en las hojas y flores (Ryman 1994), se realizó una selección de las hojas, separando las ramas y material extraño (polvo, ramas, piedras, pelusas). La selección se llevó de forma manual, disponiendo el orégano sobre charolas de aluminio y seleccionando solo las hojas y flores.

La reducción de tamaño se llevó mediante trituración mecánica, para esta acción se empleó una licuadora de uso doméstico marca Oster (modelo 10-Speed), las condiciones a las que se realizó la reducción de tamaño fue a la mayor velocidad por 15 minutos.

2.3.1.4. Determinación de humedad del orégano

Método de secado en termobalanza: Este método se basa en evaporar mediante radiación, la termobalanza registra la pérdida continúa de peso hasta que la muestra llegue a un peso constante, expresando el resultado como porcentaje de humedad y materia volátil. La determinación se realizó en el laboratorio experimental multidisciplinario de farmacia, regulando la temperatura de la termobalanza (figura 9) en 100 °C, y pesando 2g de orégano como muestra. El método se basó según la NMX-F-211-1987 (2008), siguiendo el mismo principio.



Figura 9. Termobalanza OHAUS MB-45.

2.3.1.5. Determinación del tamaño de partícula del orégano molido

El objetivo principal de reducir el tamaño de la planta es el aumentar el área superficial de contacto entre el material vegetal y el vapor de agua, para facilitar la mejor y mayor disolución de los principios activos (Mc Cabe 2007). El método de retención de tamices es uno de los métodos más sencillos para medir el tamaño y distribución de partícula. Consiste en hacer pasar el material a través de una serie de tamices circulares de cerca de 20 cm de diámetro y 7 cm de altura; cada uno de diferente tamaño de poro organizado desde el más grande hasta el más pequeño de manera que cada tamiz encaje en el siguiente

herméticamente para minimizar la pérdida de polvo. Los tamices se someten a movimiento axial y diametral constante durante 10-15 minutos, de manera tal que el material pase por todos los tamices y que al final de la prueba el material quede disperso en diversas fracciones entre los tamices (Shekunov et al., 2007). Mediante esta prueba se logró determinar el tamaño medio aritmético. El tamizaje se llevó a cabo en un tamizador ERWEKE AR 400 (figura 10) en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia.



Figura 10. Tamizador ERWEKA AR 400.

2.3.1.6. Extracción de aceite esencial de orégano

La obtención del aceite esencial de orégano se llevó a cabo mediante hidrodestilación (figura 11), El principio de extracción se basa en la destilación azeotrópica. A presión atmosférica y durante el proceso de extracción (calentamiento), las moléculas de agua y el aceite esencial forman una mezcla heterogénea que alcanza su temperatura de ebullición a un punto por debajo o cercano a 100°C, mientras que para los componentes del aceite esencial este punto es muy alto. La mezcla aceite/agua se destila al mismo tiempo como si fueran un solo compuesto, esto se conoce como co-destilación en presencia de vapores de agua como unidad de disolvente.

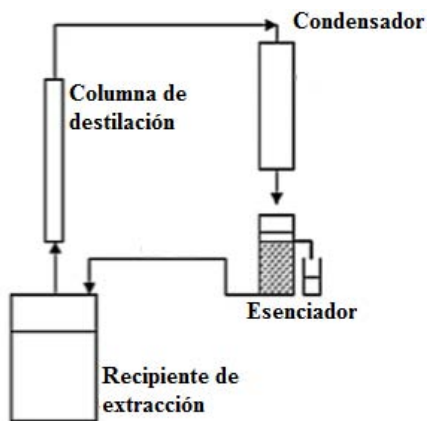


Figura 11. Aparato de hidrodestilación. Modificación de (El Asbahani et al., 2015).

La hidrodestilación se basó en el método de Sánchez Barrera (2015) con modificaciones. Se pesaron 100g del orégano molido y se midieron 700ml de agua destilada en un matraz bola, se llevó a ebullición con agitación constante en una parrilla, al iniciar la extracción se realizó un calentamiento regulando la temperatura en 500°C aproximadamente de acuerdo a la graduación de la parrilla, al obtener las primeras gotas del extracto se reguló la temperatura en 300°C manteniendo esta temperatura durante el proceso de extracción; el vapor generado fue arrastrado hacia la trampa Clevenger (figura 12) y precipitado mediante una columna de refrigeración, esta etapa se llevó a cabo por alrededor de 3 a 4 horas, el sistema de hidrodestilación se cubrió con papel aluminio para minimizar la transferencia de calor y proteger el extracto de daños por la luz, se obtuvo una mezcla heterogénea aceite/agua, donde por diferencia de densidad se separó el aceite esencial mediante decantación.

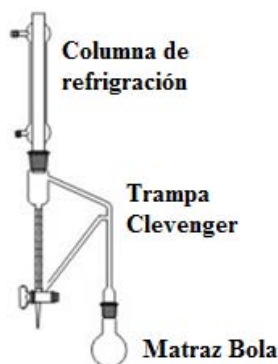


Figura 12. Sistema de hidrodestilación de laboratorio (Indiamart, 2016).

2.3.1.7. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del aceite esencial de orégano

Para la utilización de los aceites esenciales es necesario conocer su composición detallada y sus características fisicoquímicas y organolépticas, como parámetros para establecer las normas que determinen sus requisitos mínimos de calidad.

2.3.1.7.1. Índice de refracción

El índice de refracción de un aceite se define como la razón de la velocidad de la luz en el aire con respecto a la velocidad de la luz en el aceite evaluado. El índice de refracción es característico dentro de ciertos límites para cada aceite por lo que es un indicador de pureza (Martínez et al., 2011). Para determinar el índice de refracción se empleó un refractómetro Abbe del laboratorio L-324 de Productos Naturales, en base a la norma mexicana NMX-F-074-SCFI-2011. El valor se obtuvo mediante lectura directa en el equipo, evaluado a la temperatura en que se realizó la prueba.

2.3.1.7.2. Densidad

La densidad es una magnitud referida a la cantidad de masa contenida en un volumen. La densidad se determinó mediante el método del picnómetro. Un picnómetro es un recipiente calibrado, con el que se puede pesar un volumen de líquido con mucha precisión. Al obtener poca cantidad de aceite esencial en las extracciones, se sustituyó por un matraz volumétrico de 1 ml para determinar el valor de la densidad, siguiendo el método según la norma NMX-F-075-SCFI-2012. Los cálculos con los que se obtuvieron los resultados son:

Dónde:

$$a_2 - a_1 = X_1 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$a_3 - a_1 = X_2 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\delta = X_2 - X_1 \quad \text{Ecuación 3}$$

a_1 = Matraz vacío

a_2 = Matraz con agua

a_3 = Matraz con aceite

X_1 = Masa del agua

X_2 = Masa del aceite

δ = Densidad relativa del aceite

2.3.1.7.3. Espectroscopia infrarroja

Los compuestos orgánicos absorben radiación en la zona IR y las posiciones de las bandas de absorción dan información muy valiosa sobre la estructura molecular. En la espectroscopia infrarroja, el perfil del espectro IR del aceite esencial puede emplearse como parámetro de calidad en relación a un estándar establecido (Primo 1995). El espectro infrarrojo se determinó en un espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet iS10FT (figura 13) del laboratorio de química medicinal de posgrado en la FESC UNAM. Se utilizó la punta cóncava para líquidos, colocando una gota del aceite esencial en la celda para realizar la lectura.



Figura 13. Espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet iS 10FT.

2.3.1.7.4. Color

El color es un criterio básico en la evaluación de calidad, constituye una cualidad fundamental en el análisis sensorial. Este parámetro puede verse afectado por la variedad, zona de producción, grado de maduración, proceso de obtención y la conservación del producto. Para determinar el color se emplearon las cartas de color de Munsell, (Sánchez 2015) como referencia sensorial, las cuales consisten en distintas notaciones que combinadas forman el símbolo del color. Las variables utilizadas por Munsell para describir los atributos del color son el tono (*hue*), los tonos primarios en este sistema incluyen rojo, amarillo, verde, azul y púrpura. La claridad (*value*) varía entre 0 a 10 donde cero corresponde a negro y el valor de diez a blanco. Por último el croma (*chroma*), que corresponde a la distancia del color respecto al eje de los colores acromáticos. Además se

realizó una prueba instrumental mediante colorimetría, donde un colorímetro emite una luz, y mediante sensores asigna distintos valores que se expresan en el sistema de medición CELAB, la notación se deriva de CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) y LAB, donde L* define la claridad o brillantes, a* denota el valor rojo/verde y b* el valor amarillo/azul (X-Rite, Incorporated 2002).

2.3.1.7.5. Olor

Aunque el grado de percepción del olor y sabor varía de un individuo a otro, el mecanismo sensorial es el mismo en todas las personas, pues se efectúa siempre por un órgano receptor. Para evaluar el olor se propuso utilizar 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* (Díaz y Pérez 2006).

2.3.2. OBJETIVO PARTICULAR 2: Nanoencapsular en zeína el aceite esencial de orégano, carvacrol y timol, mediante el método de nanoprecipitación para realizar su caracterización (tamaño, potencial Z, eficiencia de encapsulación y liberación).

2.3.2.1. Nanoencapsulación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol

El desarrollo de las nanopartículas de zeína cargadas de aceite esencial de orégano, timol y carvacrol, además de una muestra control, libre de los activos. Se basó en el método de nanoprecipitación (figura 14) de acuerdo a (Goncalves da Rosa et al., 2015) con modificaciones. Este método también es conocido como intercambio de disolventes. La técnica se basa en disolver un polímero en un disolvente (generalmente compuestos volátiles o solventes miscibles en agua) y añadir a un anti disolvente (generalmente agua), mientras se somete a agitación, este proceso puede ser reversible. El principio detrás de esta técnica involucra la rápida difusión del disolvente en el anti-disolvente y la posterior disminución de la tensión de la interface entre las dos fases. Esto aumenta el área superficial y conduce a la formación de pequeñas gotitas de disolvente orgánico. El proceso se compone de tres estrategias, nucleación, crecimiento y agregación, cada uno de estos

pasos determina el tamaño de partículas resultante (Hatton 2015). Se realizaron pruebas preliminares para la optimización de la formulación y sus condiciones.

Para la elaboración de las nanopartículas se empleó un homogeneizador Ultra Turrax (IKA Modelo T 18), un inyector (Cole Parmer Modelo Vernon 60061). Mientras que los reactivos que se utilizaron fueron: Agua destilada, etanol (Meyer), zeína (Sigma), extracto de aceite esencial de orégano, carvacrol (Symrise) y timol (Symrise).

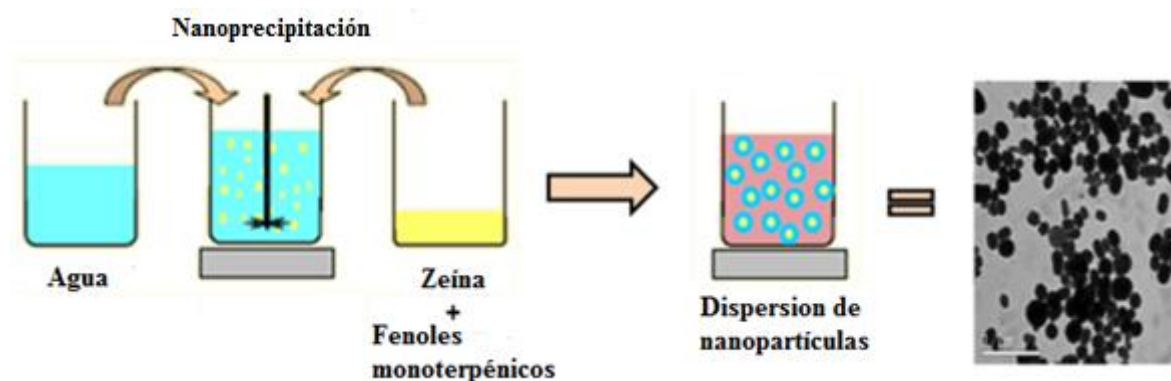


Figura 14. Nanoprecipitación modificación de (Goncalves da Rosa et al., 2015).

2.3.2.2. Caracterización de las nanopartículas

Con el fin de entender las propiedades y características de las nanopartículas, se evaluó su tamaño, índice de poli dispersión (PDL), potencial Z (ζ), eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación de los compuestos. A continuación se describen las técnicas.

2.3.2.2.1. Microscopia de las nanopartículas

La microscopia electrónica de barrido se utilizó para observar la morfología de las muestras y para comprobar la formación de las nanopartículas. Las muestras que se observaron fueron las de timol, carvacrol y la mezcla de timol/carvacrol de la formulación correspondiente a 0.25% de activo, y la del aceite esencial de orégano a la concentración correspondiente a 0.4%. 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 destinaron al Laboratorio de Microscopia Electrónica de la FES Cuautitlán, para sus correspondientes micrografías (Sánchez 2015).

2.3.2.2.2. Determinación de tamaño, índice de polidispersión y potencial Z.

La determinación del tamaño de partícula, polidispersidad y potencial Z de las nanopartículas se obtuvieron por Dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments) (figura 15). Las muestras (1.0 ml) se diluyeron con agua destilada y se colocaron en las celdas de apertura cuadrada y 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 durante 3 meses, para comparar su estabilidad siendo conservadas bajo refrigeración a 3°C aproximadamente, y en un periodo de 5 meses solo se evaluaron las formulaciones seleccionadas con mejores condiciones (Goncalves da Rosa et al., 2015).

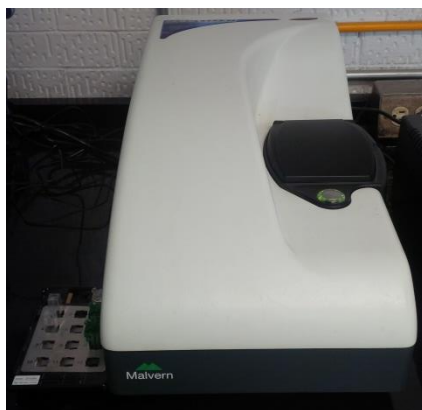


Figura 15. Zetasizer Nano-ZS90.

2.3.2.2.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se determinó basándose en el método de Yunpeng et al., (2012) con modificaciones. Previamente se realizaron lecturas espectrofotométricas para determinar la longitud de onda (λ) y se elaboraron curvas patrón (Anexo 3) para calcular posteriormente la concentración en base a la absorbancia. La determinación de la eficiencia se llevó a cabo mediante la diferencia entre la totalidad del activo en una muestra, y la fracción contenida en el sobrenadante. Se tomó una muestra de 2 ml la cual se centrifugó para separar las nanopartículas de la fase continua mediante una centrifuga (Zentrifugen EBA 12) a 15,000 rpm por 45 min (figura 16). Una vez separada la fase móvil, se tomó una muestra del sobrenadante, el cual se diluyó en una relación 1:10 en una solución etanol/agua al 20% (V/V). A esta disolución se le midió la absorbancia en un espectro UV-

Visible (Hitachi U-5100) (figura 17). En base a las lecturas obtenidas fue posible calcular mediante la ley de Beer la eficiencia de encapsulación (%) que define la relación entre la cantidad de fármaco encapsulado y aquel que fue añadido durante la elaboración de las nanopartículas. También se determinó la carga de los activos (AEO, carvacrol y timol) en relación a la masa del agente encapsulante (zeína).



Figura 16. Centrifuga (Zentrifugen EBA 12)



Figura 17. Espectro UV-Visible (Hitachi U-5100)

2.3.2.2.4. Determinación de la liberación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol

La liberación del aceite esencial de orégano y los compuestos fenólicos (timol y carvacrol) y la mezcla de carvacrol y timol encapsulados en las nanopartículas, se determinó en base a Parris et al., (2005) y Goncalves da Rosa et al., (2015) con modificaciones. A diferencia del método original se utilizaron membranas de diálisis de 6 – 8 KD, donde el transporte del activo presente en la muestra se produce por la diferencia de concentración a través de la membrana mediante transporte por difusión. El procedimiento para determinar la liberación fue el siguiente:

1. Membranas de diálisis se cortaron con una longitud de 5cm y se hidrataron por 15 horas.
2. Se colocaron 0.25mL de las nanopartículas en suspensión y se sujetaron por ambos extremos.

3. Se colocaron en vasos de precipitados de 100mL con 50mL de solución Agua-Etanol (80-20 % V/V).
4. Se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente, y se tomaron muestras en periodos de 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas.
5. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible (Hitachi U-5100) y en base a los resultados se calculó la fracción de los activos liberados.

2.3.3. OBJETIVO PARTICULAR 3: Comparar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano, frente al timol y carvacrol nanoencapsulados, mediante pruebas microbiológicas *in vitro* para determinar su capacidad inhibitoria sobre *Listeria innocua*, y establecer su posible uso como desinfectante.

2.3.3.1. Origen del material biológico

Las pruebas se realizaron estudiando al género *Listeria*, se utilizó *Listeria innocua* emulando a *Listeria monocytogenes*, la cual fue proporcionada en el laboratorio 5 de Bacteriología, de la FESC Campo 1 se realizaron pruebas de tinción Gram, catalasa y oxidasa para confirmar el género *Listeria*.

2.3.3.1.1. Tinción Gram

La Tinción Gram, es un elemento fundamental para la taxonomía e identificación, permite distinguir dos grupos de bacterias totalmente diferentes, las bacterias Gram positivas que presentan una gruesa capa de peptidoglicano como estructura fundamental por sobre la membrana citoplasmática, y las bacterias Gram negativas, que encima de esta presentan una delgada capa de peptidoglicano, a la que se superpone una capa de lipopolisacáridos-lipoproteína, denominada membrana externa (Espinal 2005). El género *Listeria* pertenece a las bacterias Gram positivas, el procedimiento para la realización de la prueba consistió en:

1. Disponer de portaobjetos, kit de tinción Gram (cristal violeta, lugol, safranina, alcohol-acetona y agua destilada), microscopio, asa bacteriológica y mecheros.
2. Se esterilizó en la flama el portaobjetos y el asa bacteriológica.

3. Se colocó una gota de solución salina estéril, sobre un portaobjetos debidamente identificado y sobre este se diluyó una colonia de una caja de 48 horas de incubación.
4. Se cubrió con cristal violeta dejando actuar por 3 minutos y se lavó con agua destilada.
5. Se cubrió con lugol dejando actuar por 3 minutos.
6. Se decoloró con alcohol-acetona por no más de 10 segundos.
7. Se cubrió con safranina dejando actuar por 3 minutos y se lavó con agua destilada.
8. Se dejó secar y se miró al microscopio con el objetivo 100X.

2.3.3.1.2 Prueba de oxidasa

Los citocromos oxidasas son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia, transfiriendo electrones (hidrógeno) al oxígeno, con formación de agua (Álvarez 2005). La prueba de oxidasa determina indirectamente la presencia de la citocromo C-Oxidasa, el género *Listeria* es una bacteria oxidasa negativa. La prueba consistió en colocar dentro de una caja Petri, un trozo de papel filtro impregnado con el reactivo (N, N-Dimetil-p-fenilendiamina), una muestra con colonias de 48 horas de incubación, se colocó con un palillo estéril. La prueba positiva indica una coloración púrpura, mientras que la prueba negativa no presenta cambio de color del reactivo.

2.3.3.1.3 Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima (hemoproteína) que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen la enzima catalasa (Álvarez 2005). El género *Listeria* pertenece a las bacterias catalasa positiva. La prueba de catalasa consistió en tomar una muestra de una colonia con 48 horas de incubación y agregarle una gota de peróxido de hidrogeno al 3%, sobre la muestra. La prueba es positiva si se generan burbujas por la formación de agua y oxígeno; por la acción de la catalasa liberada por la bacteria.

2.3.3.2 Prueba para la actividad bactericida del AEO, Carvacrol y timol

Para determinar el efecto bactericida del AEO, carvacrol y timol se emplearon distintas concentraciones, (Gómez y López 2009) han reportado actividad antimicrobiana sobre diferentes bacterias en concentraciones de 100 a 200 ppm. Mientras que para *L. monocytogenes* fueron necesarios 8,000 ppm en carne de res empacada en una atmósfera modificada. Por lo que se utilizaron distintas concentraciones para encontrar la que presenta inhibición de *L. innocua*, y comprobar el efecto bactericida de los activos. Las concentraciones utilizadas fueron (ppm) 250 (0.025%), 500 (0.05%), 1000 (0.1%), 2500 (0.25%), 5000 (0.5%), 10000 (1%), 15000 (1.5%), 20000 (2%), y 30000 (3%). Debido a la poca solubilidad de los activos, fue necesario el uso de un tensoactivo (Tween 20) a una concentración (V/V) del 6% en agua. Las diferentes concentraciones se probaron en cultivos de *L. innocua* con aproximadamente 2×10^7 UFC/ml. Cajas Petri con Tripticasa de Soya Agar (TSA) como medio de cultivo sembrado en forma masiva, se dividieron y se identificaron previamente, y se inocularon 25µL de las soluciones de los activos, se dejaron secar, posteriormente se incubaron a 37 °C por 48 horas. Los resultados se reportaron por la ausencia o presencia de inhibición.

2.3.3.3. Prueba para la actividad bactericida de las nanopartículas

La actividad antibacteriana de las nanopartículas cargadas con AEO, carvacrol y timol, además de la mezcla carvacrol timol, fue probada contra *Listeria innocua* por inhibición en base a Goncalves da Rosa et al, (2015) con modificaciones. El método consistió en inocular 1 ml de *Listeria innocua* de un cultivo de caldo infusión cerebro corazón (BHI) de 24 horas en cajas Petri con alrededor de 2×10^7 UFC/ml de manera masiva en agar nutritivo Tripticasa de Soya Agar (TSA). Se colocaron 25 µl de la suspensión de nanopartículas, las cuales contenían las nanopartículas y el sobrenadante, de la misma forma se realizaron para las nanopartículas previamente centrifugadas y resuspendidas en agua destilada. Las cajas se incubaron a 37°C. La actividad antibacteriana se evaluó midiendo el diámetro de las zonas de inhibición (mm) en un periodo de 24, 48 y 72 horas.

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

Dentro de las características principales de las nanopartículas se encuentra la liberación controlada del activo encapsulado. Para realizar esta prueba se utilizaron las condiciones de Parris et al., (2005) con modificaciones (Diferentes pruebas previas se realizaron para establecer las condiciones). El método consistió en inocular en tubos 2.5ml de agua destilada estéril, 100µl de bacteria concentrada en caldo infusión cerebro corazón (BHI), así como 150µl de nanopartículas cargadas con el AEO, carvacrol, timol y una mezcla carvacrol-timol, todas en suspensión. Se tomaron muestras en periodos de tiempo de 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 horas manteniéndose a 37°C en un baño maría con agitación axial, tomando 0.5ml de muestra y realizando 3 diluciones decimales para las nanopartículas con activos y 6 para la muestra control. Posteriormente se inocularon 30µl en cajas Petri con medio de cultivo Tripticasa de Soya Agar (TSA) previamente divididas e identificadas (figura 18). Se incubaron a 37°C por 48 horas y se prosiguió a realizar el conteo en placas y graficar la disminución de bacterias contra tiempo.

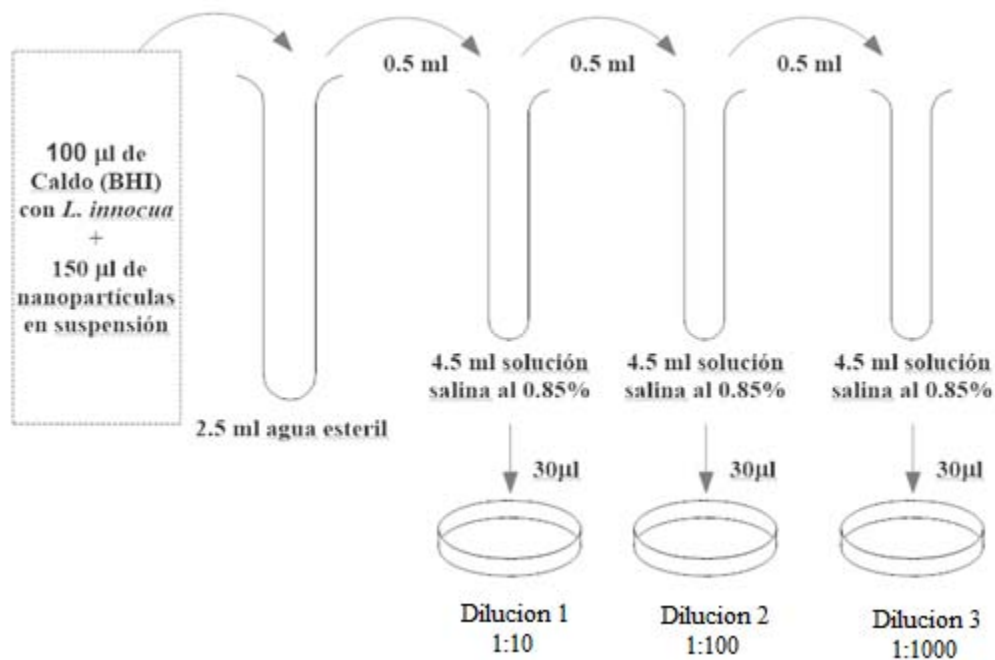


Figura 18. Esquema de las diluciones para la liberación controlada.

3. RESULTADOS

3.1. Resultados del objetivo particular 1

3.1.1. Identificación botánica de la especie de orégano.

La identificación taxonómica del orégano (Anexo 1) fue proporcionada por el herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a cargo de la M. en C. Edith López Villafranco. El nombre científico de la planta es *Lippia graveolens* Kunth perteneciente a la familia botánica *varbanaceae*, conocida popularmente como orégano. La planta fue integrada a la colección etnobotánica del herbario con el número de registro 2516 IZTA (figura 19)



Figura 19. Muestra integrada a la colección botánica.

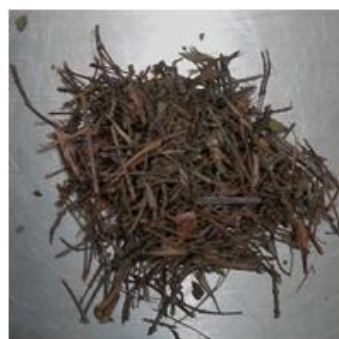
3.1.2. Acondicionamiento del orégano para su caracterización y la extracción de su aceite esencial

Previo a la reducción de tamaño de la planta de orégano, se realizó una selección para obtener solo las hojas y flores, las cuales contienen la mayor cantidad del aceite esencial.

Esta selección (figura 20), se llevó de forma manual, separando, ramas, piedras y la materia extraña, de las hojas y flores de la planta de orégano.



(A)



(B)

Figura 20. Selección del material biológico (A) Hojas de orégano, (B) Materia extraña.

3.1.3. Determinación de humedad del orégano

El resultado obtenido de la determinación de humedad, se muestra en la tabla 8. El análisis se realizó para el orégano previamente molido.

Tabla 8. Porcentaje de humedad, materia volátil y sólidos totales.

Muestra de orégano	% Humedad y materia volátil	% de sólidos totales
Orégano obtenido el 5 de octubre del 2015	10.21	89.79

La razón más importante por la que se lleva a cabo un proceso de secado en el orégano, es su conservación, mediante este método se promueve el mantenimiento de los componentes del material fresco, asegurando su calidad, y se evita la proliferación de microorganismos (Velásques y Acevedo 2014). Es por esta razón que la humedad indica que la cadena de producción del orégano cuenta con las características necesarias para su distribución y consumo. La Organización Internacional de Asociaciones de Comercio de Especies (en inglés IOSTA) en conjunto con la Comisión del CODEX alimentarius (ESA 2013), documentaron los requerimientos mínimos de calidad para las especias, donde el orégano tiene como parámetros de calidad un porcentaje de humedad máximo de 12%, y de 1.5% para el aceite volátil. En base a los datos obtenidos, las hojas y flores destinadas a la

extracción del aceite esencial, cumplen los parámetros de calidad. Como resultado se puede afirmar que el orégano tiene un porcentaje de humedad que garantiza un buen proceso de producción.

3.1.4. Determinación del tamaño de partícula del orégano molido.

La reducción de tamaño tiene como propósito principal, tener una mayor área de contacto, en el proceso de extracción del aceite esencial, de esta manera se facilita la disolución de los principios activos (Mc Cabe 2007). El mayor o menor tamaño de un sólido no representa una condición química relevante, sino más bien una importancia superficial (Vian y Ocón 1979). Con el objetivo de aumentar el área superficial de contacto, entre el material vegetal en el proceso de extracción del aceite esencial y aumentar la eficiencia, se redujo su granulometría media, mediante el proceso de molienda. Posteriormente una muestra de 75 g de orégano molido fue tamizado, para separar las distintas fracciones que lo componen, por el diferente tamaño de sus partículas. Después de los datos obtenidos y los cálculos granulométricos se obtuvieron los siguientes resultados, (tabla 9).

Tabla 9. Tamizaje del orégano del análisis granulométrico.

Tamiz	Apertura media aritmética (mm)	Peso retenido (g)	% De partículas retenido por apertura media
10	1.425	0.18	0.23
30	0.45	23.21	30.91
40	0.275	48.33	64.37
60	0.215	3.02	4.02
80	0.1525	0.08	0.10
100	0.15	0.12	0.15
Base		0.13	0.17
Total		75	100

En base al porcentaje de partículas retenidas por apertura, para 0.275 mm se separó la mayor fracción de partículas (64.37%), y entre la apertura 0.45 y 0.275 mm, se encuentra el 95.5% de las partículas retenidas, encontrándose dentro de estos intervalos el tamaño medio de las partículas, es decir que se utilizó en gran mayoría partículas de este tamaño, garantizando un alta homogeneidad dentro de los intervalos mencionados, Los datos

obtenidos dan una idea de la composición granulométrica del orégano molido, sin embargo un análisis más específico se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Análisis granulométrico del orégano molido

Parámetros granulométricos	(mm)	(μm)
Tamaño medio aritmético de la muestra	0.3289	328.95
Tamaño medio geométrico	0.3164	316.43
Diámetro medio superficial de la muestra	0.3593	359.31
Tamaño de partícula que tiene la superficie media	0.3437	343.79
Diámetro de partícula que posee el peso o el volumen medio	0.5384	538.42
Diámetro de partícula hipotética que tuviera la superficie específica.	0.3658	365.82

El análisis granulométrico como tratamiento previo en un proceso de hidrodestilación, se ha estudiado poco, y no se ha señalado la relevancia del tamaño de partícula en el proceso de extracción de un aceite esencial. Sin embargo es evidente que el aumento de la finura favorece la reactividad y solubilidad, ya que se ha demostrado que al aumentar la superficie (disminuir el tamaño) de un producto, el contenido energético de la unidad superficial de tal producto aumenta también (Vian y Ocón 1979). El tamaño de partícula predominante es mucho menor al tamaño de hojas seccionadas como comúnmente se da en un proceso de extracción, por lo que el tamaño medio aritmético de 0.3289 mm, favoreció el proceso de extracción.

3.1.5. Extracción de aceite esencial de orégano

Se realizaron un total de 3 extracciones (figura 21), conservando en su mayoría las mismas condiciones. Los procesos de extracción se realizaron pesando 100 g de orégano molido y 700 ml de agua destilada, excepto para la primera extracción donde se ocuparon 1000 ml de agua.



Figura 21. Extracción del aceite esencial de orégano mediante hidrodestilación.

Un volumen de 9.3 ml aproximadamente se obtuvo de todas las extracciones, el rendimiento total promedio fue de 3.1% aproximadamente, la variación en cuanto al volumen extraído fue menor a 0.05 ml, por lo que el proceso de extracción, así como la materia prima, conservaron un rendimiento semejante. La cantidad extraída de aceite esencia se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Cantidad de aceite esencial de orégano extraído por hidrodestilación.

Extracción	Volumen (ml)
2 Septiembre 2015	2.8
8 Octubre 2015	3.3
8 Octubre 2015	3.2
Promedio	3.1

El volumen extraído varió debido a que la primera extracción se realizó con una diferencia de un mes con respecto a las últimas dos extracciones y con una mayor cantidad de agua destilada, además las condiciones ambientales pudieron haber afectado su rendimiento. Existen registros de rendimiento de la extracción de aceite esencial de orégano de entre 0.4 a 3.6% (Muñoz 2010), el rendimiento obtenido en las tres diferentes extracciones, se encuentra dentro de este intervalo, por lo que se puede considerar óptimo el proceso de extracción, a pesar de la ligera variación entre las extracciones.

3.1.6. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del aceite esencial de orégano

Entre los parámetros fisicoquímicos que posee el aceite esencial de orégano, se evaluó el índice de refracción y la densidad, además de un análisis de espectro infrarrojo para establecer parámetros de calidad, por último se evaluaron sus propiedades organolépticas color y olor, que son características específicas del aceite esencial de orégano.

3.1.6.1. Índice de refracción

El análisis del índice de refracción tiene como interés la identificación, caracterización y comprobación de la pureza de los aceites esenciales. Para evaluar este parámetro, se midió a cada extracción el índice de refracción. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Índice de refracción del aceite extraído.

Extracción	Temperatura de medición (°C)	Índice de refracción
2 Septiembre 2015	23	1.4903
8 Octubre 2015	23	1.4808
8 Octubre 2015	26	1.4498
Promedio		1.4736

Los intervalos de referencia en que se encuentran los valores del aceite esencial van de 1.47 como límite inferior a 1.50 como límite superior, establecidos por (Corella y Ortega 2013). El promedio obtenido indica un valor bajo de índice de refracción, sin embargo se encuentra dentro de los parámetros. De las tres extracciones solo un valor se encuentra fuera de los valores, se puede atribuir este dato, error en la medición, condiciones en la extracción o incluso la naturaleza misma del producto. Al ser un líquido de origen orgánico su índice de refracción es bastante sensible a la temperatura; un aumento de temperatura de 1 °C corresponde en un descenso de 0.0004 – 0.0005 del valor en el índice de refracción (Connors 1981), por lo que la temperatura de medición sí puede influir en los resultados. Otro aspecto dentro del análisis del índice de refracción es que los aceites esenciales son de composición variable, fijándose márgenes entre los valores en que se deben encontrar. Los resultados obtenidos, indican que el aceite esencial tiene una composición variable de componentes dentro de los intervalos correspondientes, es posible que en las muestras se

tengan fracciones de distintas plantas, de distintos períodos, lo que influye en las características del aceite. Es comprensible también que las diferentes condiciones tanto de la extracción y la medición del índice de refracción alteren en menor y mayor grado los resultados.

3.1.6.2. Densidad

Los aceites esenciales tienen a una temperatura dada, un valor de densidad que se encuentra en un pequeño intervalo dependiendo de la procedencia. Existen datos precisos sobre los valores de distintos aceites esenciales. La mayoría de los aceites esenciales, al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos, tiene una densidad menor que la del agua (1 g/cm^3), el valor de la densidad de los aceites esenciales se encuentra entre 0.842 y 1.172. (Ortuño 2006). La densidad del aceite esencial del orégano, se evaluó por triplicado, en la tabla 13, y se muestran los resultados.

Tabla 13. Densidad del aceite esencial de orégano.

Evento	Densidad aparente
1	0.9431
2	0.9621
3	0.963
Promedio	0.9561

Valores de densidad para aceite esencial de orégano entre 0.9211 y 0.9917 g/ml a 20°C se obtuvieron para dos métodos de extracción de acuerdo a (Torrenegra et al., 2015), por lo que el valor obtenido de la extracción se encuentra dentro de los parámetros, además (Albado et al., 2001) reporta que la densidad para el aceite esencial de orégano corresponde a 0.9232 g/ml valor por debajo del promedio. Sin embargo debido a que los aceites esenciales tienen una composición variable, es evidente que la densidad variará dependiendo del origen de la materia prima.

3.1.6.3. Espectroscopia infrarroja

El análisis de espectroscopia infrarroja tuvo como objetivo comprobar la autenticidad del aceite esencial extraído. Productos como un aceite esencial, tienen una composición característica, que expuesta a una radiación infrarroja resulta en la absorción de sus constituyentes químicos. El espectro infrarrojo que se obtuvo de esta prueba se muestra en la figura 22.

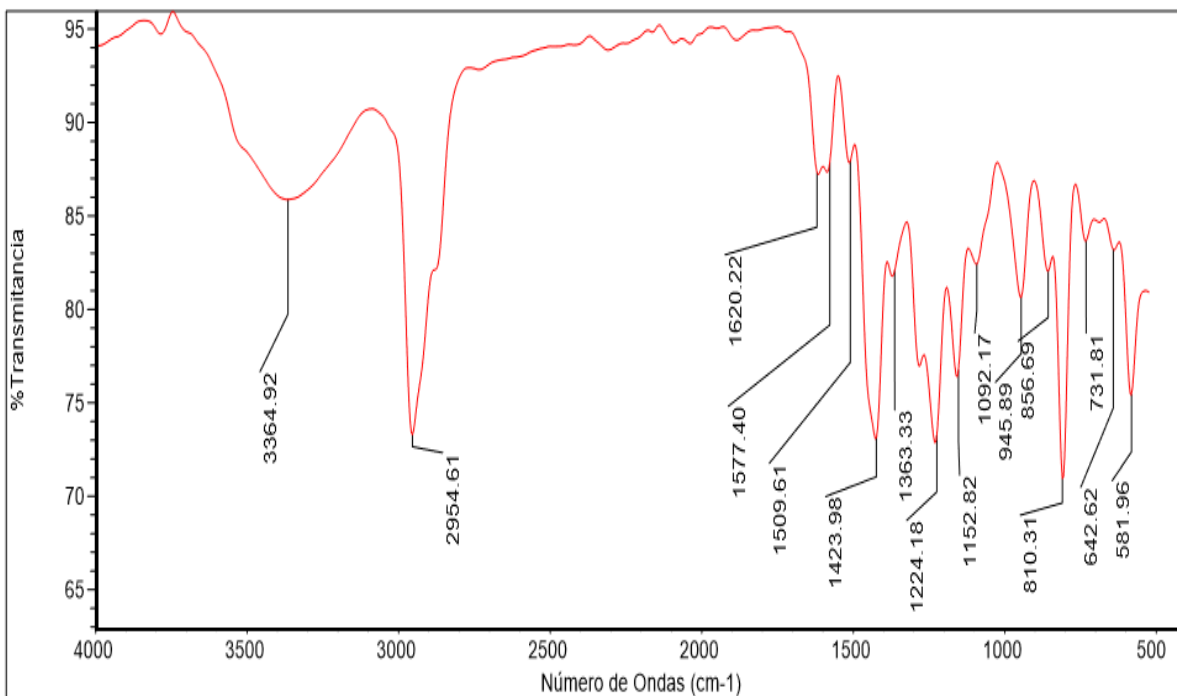


Figura 22. Espectro infrarrojo del aceite esencial de orégano.

Haciendo una comparación entre los grupos funcionales que se encuentran predominantemente en los aceites esenciales, y el número de grupos funcionales de la muestra de aceite esencial de orégano, se encontraron 7 grupos funcionales representados como picos en las bandas espectrales característicos de los fenoles, que se muestran en la tabla 14, en esta misma tabla también se encuentra la referencia para un extracto de aceite esencial de orégano y los valores obtenidos de la muestra.

Tabla 14. Comparación de los compuestos de acuerdo al número de onda dentro de la composición del aceite esencial de orégano.

Grupo funcional	Numero de onda espectral (cm ⁻¹)	Número de onda referencia (Arroyo et al., 2008) (cm ⁻¹)	Número de onda extracto obtenido (cm ⁻¹)
Alcoholes, Fenoles	3200 – 3400	3356	3364.92
C = C aromático	1500 – 1600	1655, 1456	1577.40
Acido carboxílico	1200 – 1300	1331	1224.18
Alcoholes terciarios	1150 – 1200	--	1152.82
Alcoholes primarios	1040 – 1060	1090	1092.17
Benceno disustituído	800 – 860	881	810.31
Anillos aromáticos monosustituído	690 – 760	--	731.81

Siendo los compuestos fenólicos carvacrol y timol, los principales elementos que constituyen al aceite esencial de orégano, se encontraron absorciones propias de dichos compuestos fenólicos (García y Palou 2008). Un espectro infrarrojo de un fenol cuenta con una banda característica (figura 23) entre 3200 y 3500 cm⁻¹ debida al grupo –OH, así como las bandas aromáticas usuales entre 1500 y 1600 cm⁻¹. En los fenoles son visibles los picos del anillo aromático monosustituído en 690 y 760 cm⁻¹ (McMurry 2012). En base a los valores obtenidos en el espectro, se encuentran características espectroscópicas semejantes a los compuestos predominantes en el extracto del aceite esencial de orégano: carvacrol y timol además de que otros grupos funcionales coinciden con los otros grupos funcionales.

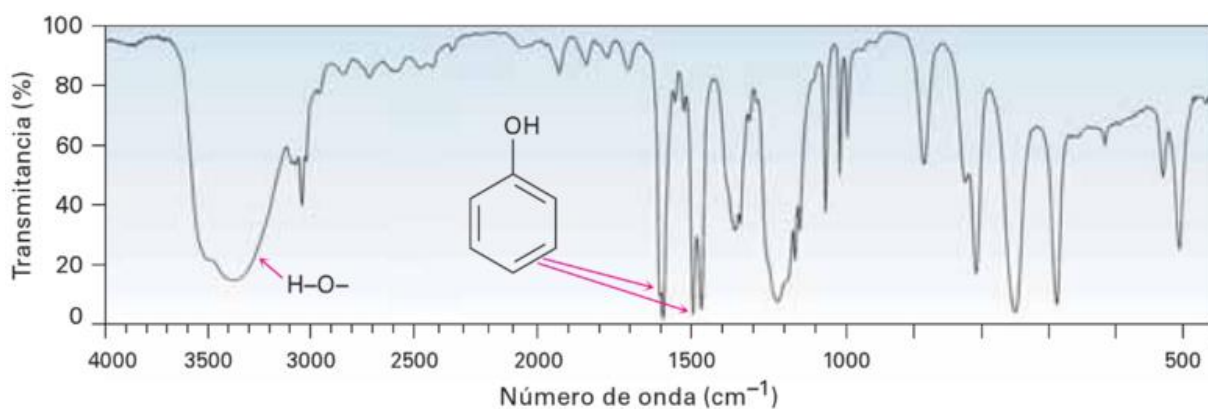


Figura 23. Espectro infrarrojo característico de fenoles (McMurry 2012).

3.1.6.4. Color

El color es un criterio básico en la evaluación de la calidad de un aceite. Las pruebas realizadas para determinar el color del aceite esencial de orégano, consistieron en una prueba de comparación mediante el sistema Munsell (Anexo 2), y de una prueba instrumental obtenidos por un colorímetro. Siguiendo la notación de Munsell, se determinó que el color del aceite esencial extraído pertenece al color 10Y 5/6, es decir color amarillo (oliva ligero), con una claridad de 5 y un croma de 6. El comparativo del color se muestra en la figura 24.



Figura 24. Comparativo del color del aceite esencial de orégano con el sistema Munsell.

La prueba instrumental que se realizó con el colorímetro se resume en la tabla 15. Donde se muestra los valores obtenidos para el aceite esencial como patrón, y comparados con aceite mineral en la notación CIELAB.

Tabla 15. Valores de color mediante colorimetría.

Parámetros	AEO	Aceite mineral
L*	7.69	9.15
a*	-0.52	-0.43
b*	1.06	0.95

La notación CELAB indica que el aceite esencial de orégano tiene una claridad de 7.69, el valor de a^* (rojo/verde) tiene un valor de -0.52, y b^* (amarillo/azul) de 1.06. El parámetro para evaluar el color no se ha establecido de manera concreta, se ha reportado que el aceite esencial de orégano esta entre la gama de colores amarillo y café (Vega Portocarrero y López Malo 2009). Las diferentes características que tiene un aceite esencial, están en función del material biológico, donde la especie, edad de la planta, proceso de secado, conservación, y su extracción, son factores que determinan cada una de sus características.

3.1.6.5. Olor

El olor de las especias o de sus aceites esenciales, depende principalmente de aquellos compuestos volátiles de los que están compuestos. El caso del aceite esencial de orégano tiene como principales componentes al carvacrol y timol, estos compuestos están relacionados con las cualidades aromáticas especiadas, además otros compuestos presentes en el AEO como terpenos, presentan aromas típicos del tipo floral, especiado y fragancia de madera. Tomando como referencia los atributos aromáticos de (Díaz y Pérez 2006) se determinó que el olor del aceite esencial de orégano es “característico, fuerte, peculiar especiado, no desagradable, exento de olores extraños o rancios”. Sin duda la principal característica en el olor es su fuerte aroma especiado, muy característico. Este factor es uno de los motivos por los que el uso de estos compuestos se ven limitados, aunque otras de sus características estén ampliamente reconocidas.

3.2. Resultados del objetivo particular 2

3.2.1. Nanoencapsulación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol

Se realizaron pruebas preliminares para establecer las condiciones de los equipos y cantidad de reactivos, para la obtención de las nanopartículas.

Para la selección del disolvente de la zeína, AEO, carvacrol y timol, se usó etanol y propilenglicol, resultando mejor el etanol, en cuanto estabilidad y solubilidad de los compuestos, como lo reporta también Goncalves da Rosa et al., (2015) y Yunpeng et al., (2012).

Se utilizó agua como anti-disolvente o dispersante, además de probar con agentes estabilizantes como el poloxámero a 1.5, 3 y 5% así como con alcohol polivinílico a 1.5 y 3%. Se evaluó el tamaño e índice de polidispersión, obteniendo los mejores resultados utilizando solo agua como medio dispersante.

Para la dispersión de las fases se probó mediante agitación, homogenización y sonicación, la agitación se descartó por no lograr dispersar las fases, mientras que la homogenización y sonicación dieron buenos resultados. Para las últimas dos técnicas, el índice de polidispersión fue muy similar, mientras que para el tamaño, la sonicación resultó en partículas de menor tamaño, sin embargo el desgaste de la sonda de ultrasonido limitó su uso, por lo que se decidió utilizar el equipo Ultra-Turrax T18. Se fijaron las condiciones en 3000 rpm y la inyección en 12.7 ml/h por 8 min.

Para la cantidad de los activos (AEO, carvacrol y timol) se decidió utilizar tres concentraciones (0.1, 0.25, 0.5%), sin embargo, con el AEO, los tamaños de las partículas a la concentración de 0.5%, resultaron menores de 50 nm, valor que no se registra para nanopartículas elaboradas con zeína, que encapsulen compuestos hidrofóbicos, este comportamiento pudo deberse a algún componente del AEO, que a esta concentración en conjunto con las condiciones de los demás elementos, logra disolver la zeína. Debido a esto se redujo esta concentración para el AEO en 0.4 % como concentración máxima.

El método de preparación de las nanopartículas fundamentado en la técnica de nanoprecipitación, consistió en elaborar una solución de zeína, la cual se obtuvo al disolver 20 mg en una solución de 10 ml de etanol y agua (85 % V/V) manteniéndose en agitación por 5 h. Para nanoencapsular a el AEO, carvacrol, timol, y la mezcla timol-carvacrol con tres distintas concentraciones, se le agregaron (0.1, 0.25, 0.4%) de los activos, en base a la formulación para el AEO, mientras que para el carvacrol, timol y la mezcla de ambos se le agregaron (0.1, 0.25, 0.5%). Para la mezcla timol-carvacrol la concentración se dividió para carvacrol y timol en (25-75, 50-50, 75-25%) para cada concentración. En total se formularon 19 diferentes nanopartículas. Posteriormente 10 ml de la solución de zeína con los compuestos activos se dispersaron por goteo a 12.7 ml/h con un inyector (Cole Parmer Modelo Vernon 60061) en 30 ml de agua durante 8 min. Los cuales se homogenizaron con

un Ultra Turrax (IKA Modelo T 18). A 3000 rpm. Las nanopartículas obtenidas, se mantuvieron en suspensión del agua dispersante y se almacenaron en refrigeración a 3 °C.

3.2.2. Caracterización de las nanopartículas

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

3.2.2.1. Determinación de las dimensiones y morfología de las nanopartículas mediante microscopía

Se determinó por microscopía en dos dimensiones, la morfología superficial de las nanopartículas y el tamaño aproximado. Se realizó para cada uno de los activos, con aumentos de 500 y 10,000X.

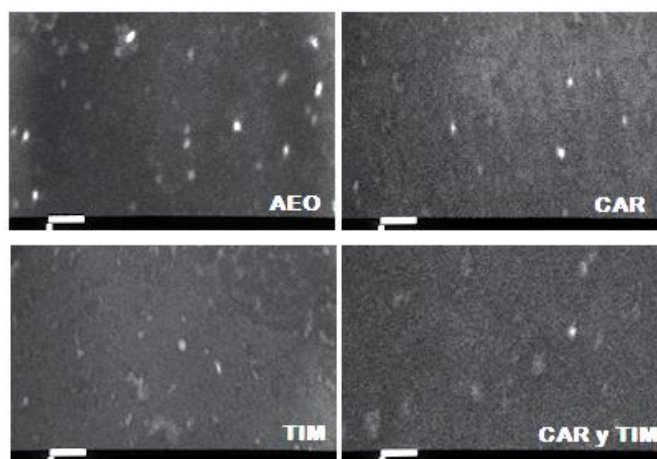


Figura 25. Microscopía de las nanopartículas con aumento de 10,000X del aceite esencial de orégano (AEO), carvacrol (CAR), timol (TIM) y la mezcla carvacrol-timol (CAR y TIM).

En la figura 25 se muestran las imágenes para 10,000x obtenidas por la microscopía electrónica de barrido, se puede apreciar que el tamaño de las partículas en base a la escala, se encuentra entre 100 y 200 nm, la morfología que presentan es semiesférica, estas condiciones fueron más evidentes para el AEO y carvacrol. Yunpeng et al., (2012) 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., (2005) que encapsuló aceites esenciales, entre ellos el de orégano, reporta que las partículas parecen tener un

arreglo donde las esferas se encuentran agregadas, también indica que la población de las nanopartículas tiene una distribución de tamaños medios mayores a 100 nm, por lo tanto, las dimensiones y morfología que las nanopartículas tienen, comprueban que con la técnica de preparación, se obtienen resultados reproducibles para sistemas similares.

3.2.2.2. Determinación de tamaño, índice de polidispersión y potencial Z

Todas las nanopartículas elaboradas se evaluaron desde su obtención, y durante los dos primeros meses, aquellas que no lograron resultados óptimos en las pruebas microbiológicas se descartaron, las nanopartículas que resultaron con mejores condiciones se continuaron evaluando por un periodo de dos meses más, completando cuatro meses de evaluación.

El tamaño: Es el parámetro más importante dentro de las características de las nanopartículas, tamaños más pequeños ofrecen mayor superficie de área, y como resultado mayor entrega de los activos, además del tamaño, la agregación de las nanopartículas afecta su actividad y toxicidad cuando interactúan con sistemas biológicos (Cioffi y Rai 2012).

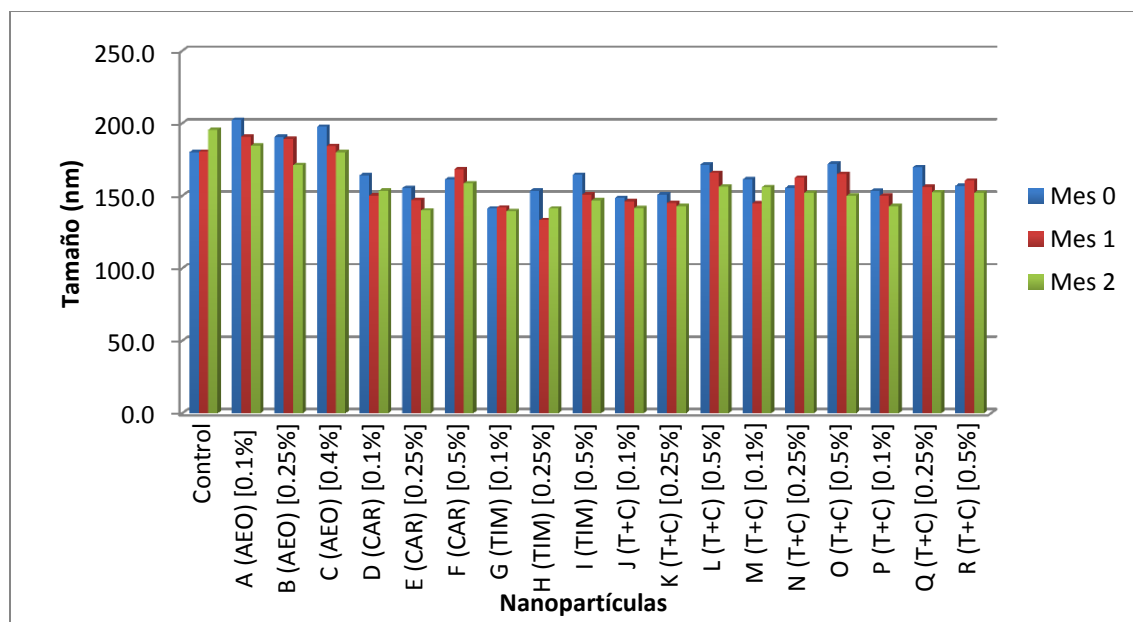


Figura 26. Variación del tamaño de las nanopartículas en almacenamiento desde su elaboración y durante dos meses.

Todas las nanopartículas en un periodo de dos meses, se conservaron a una temperatura de 3 °C, manteniéndose estables (Tabla 16). En la figura 26 se muestran los tamaños, y se puede apreciar que las nanopartículas control y AEO poseen el mayor tamaño 187 nm, y una desviación de 3.3 nm, mientras que las restantes nanopartículas que contienen carvacrol y timol poseen tamaños de menor dimensión, promediando 153 nm y una desviación de 7.2 nm, la diferencia entre las nanopartículas de control y AEO, frente a las de carvacrol y timol fue alrededor de 24 nm. El timol fue el compuesto que registró menor tamaño en comparación con todas las nanopartículas con 145 nm en promedio.

El índice de polidispersión (IPD) muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas, valores de IPD entre 0.1 y 0.25 indican una estrecha distribución del tamaño. (Kishen 2015). En el periodo de dos meses (figura 27), el IPD mantuvo valores similares para todas las nanopartículas, el promedio total de todas las nanopartículas fue de 0.23, con una desviación de 0.012 por lo que se puede considerar que la distribución del tamaño de las nanopartículas fue uniforme (Tabla 16).

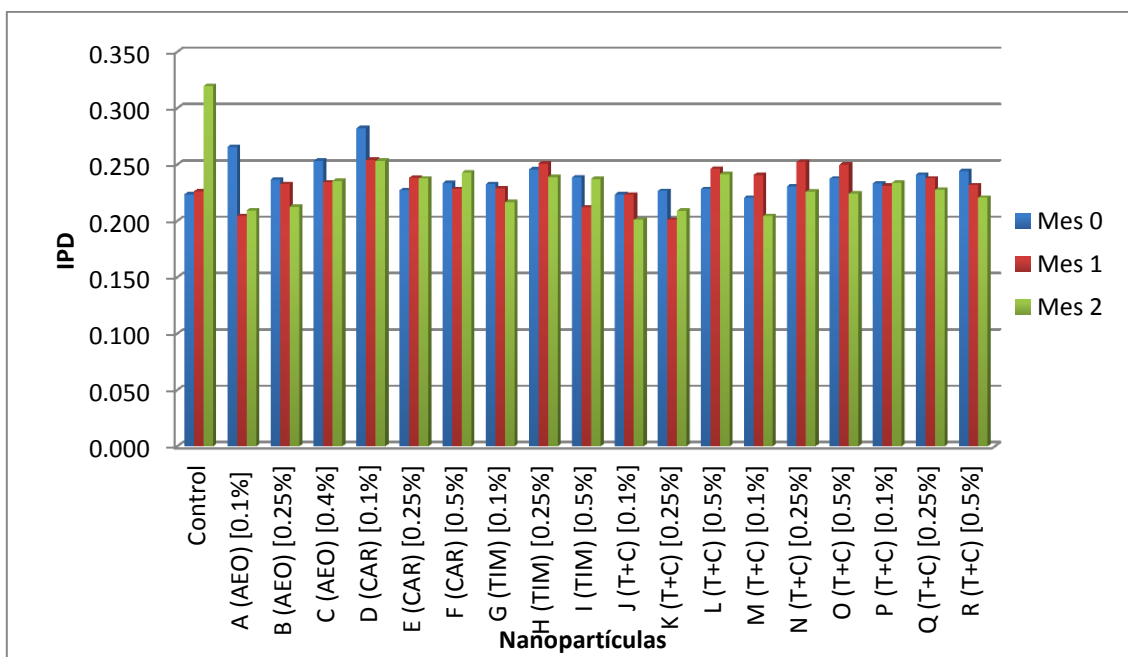


Figura 27. Variación del Índice de polidispersión (IPD) de las nanopartículas en almacenamiento durante dos meses y desde su elaboración.

La carga superficial de las nanopartículas dado por el **potencial Z**, proporciona información sobre la estabilidad del sistema en suspensión, teóricamente valores mayores a (+/-) 30 mV, muestran suspensiones estables. Para los dos meses en que se monitorearon todas las nanopartículas se puede ver en la figura 28, que la totalidad de las nanopartículas, descartando al control, se encuentran por arriba de 30 mV con un promedio de 49.7 mV, aunque se logra apreciar una tendencia para la mayoría de las nanopartículas al disminuir su valor, los valores obtenidos, sugieren un sistema estable (tabla 16).

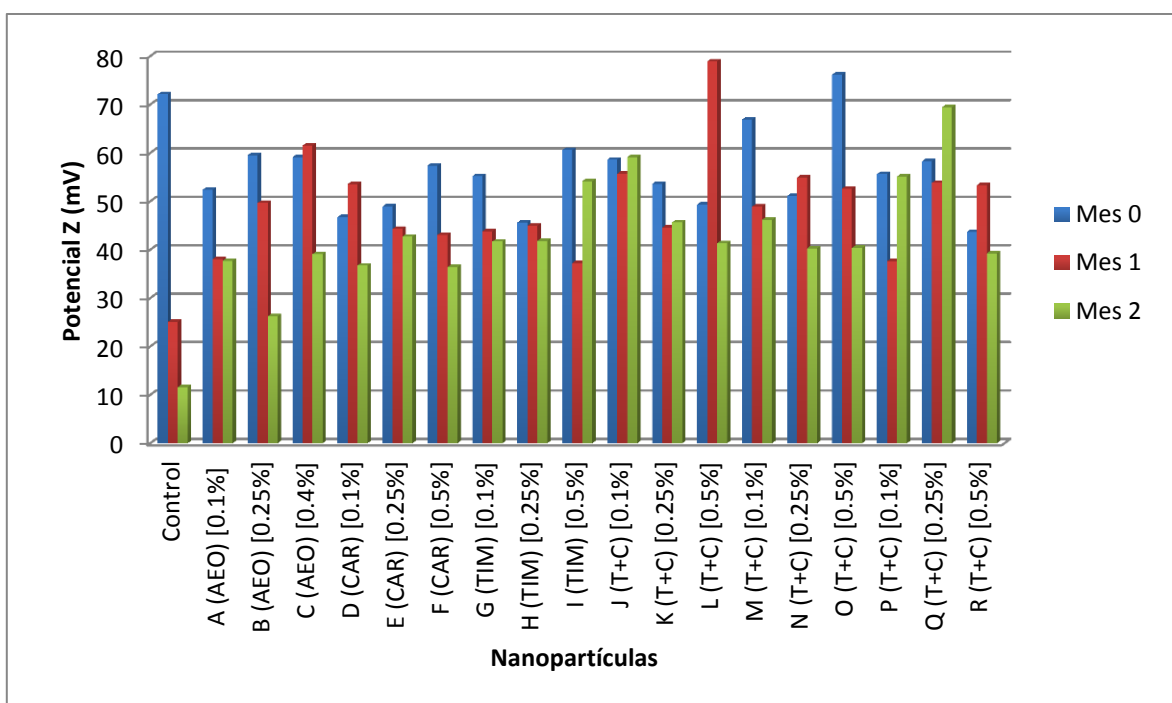


Figura 28. Variación del Potencial Z de las nanopartículas en almacenamiento durante dos meses y después de su elaboración.

Se puede concluir que en un periodo de dos meses, los parámetros del tamaño, índice de polidispersión, y potencial Z son estables para todas las nanopartículas, manifestando que en este lapso de tiempo, sus características tienen una tendencia a permanecer constantes, desde su obtención hasta dos meses de almacenamiento a 3 °C. Independientemente de su actividad antimicrobiana, todas las nanopartículas cumplen características similares, de esta manera, al compararlas no se encuentran diferencias significativas, ya que su comportamiento es similar entre todas.

Tabla 16. Comparativo de los parámetros de tamaño Índice de polidispersión y potencial Z promedio en un periodo de 3 meses, para las nanopartículas del aceite esencial de orégano, carvacrol, timol y la mezcla carvacrol-timol.

	Concentración %	Compuestos de las nanopartículas	Tamaño (nm)	Índice de Polidispersión IPD	Potencial Z ζ (mV)
--	--	Control	185.34	0.257	36.27
A	0.1	AEO	192.62	0.226	42.72
B	0.25	AEO	183.73	0.227	45.14
C	0.4	AEO	187.36	0.241	53.26
D	0.1	Carvacrol	155.99	0.263	45.67
E	0.25	Carvacrol	147.48	0.234	45.31
F	0.5	Carvacrol	162.78	0.235	45.61
G	0.1	Timol	140.88	0.226	46.90
H	0.25	Timol	142.73	0.245	44.13
I	0.5	Timol	154.06	0.229	50.67
J	0.1 (50-50)	Carvacrol + Timol	145.47	0.216	57.81
K	0.25 (50-50)	Carvacrol + Timol	146.33	0.212	47.94
L	0.5 (50-50)	Carvacrol + Timol	164.58	0.239	56.52
M	0.1 (75-25)	Carvacrol + Timol	154.07	0.222	54.00
N	0.25 (75-25)	Carvacrol + Timol	156.72	0.236	48.77
O	0.5 (75-25)	Carvacrol + Timol	162.44	0.237	56.38
P	0.1 (25-75)	Carvacrol + Timol	148.84	0.233	49.46
Q	0.25 (25-75)	Carvacrol + Timol	159.41	0.235	60.51
R	0.5 (25-75)	Carvacrol + Timol	156.51	0.232	45.41

*A:(AEO) [0.1%], B:(AEO) [0.25%], C:(AEO) [0.4%], D:(Carvacrol) [0.1%], E:(Carvacrol) [0.25%], F:(Carvacrol) [0.5%], G:(Timol) [0.1%], H:(Timol) [0.25%], I:(Timol) [0.5%], J:(carvacrol50-timol50) [0.1%], K:(carvacrol50-timol50) [0.25%], L:(carvacrol50-timol50) [0.5%], M:(carvacrol75-timol25) [0.1%], N:(carvacrol75-timol25) [0.25%], O:(carvacrol75-timol25) [0.5%], P:(carvacrol25-timol75) [0.1%], Q:(carvacrol25-timol75) [0.25%], R:(carvacrol25-timol75) [0.5%].

Se evaluó el tamaño, IPD, y potencial Z durante cuatro meses, a las diferentes nanopartículas que se seleccionaron mediante análisis microbiológicos por su capacidad inhibitoria contra *Listeria innocua*, las nanopartículas que se seleccionaron corresponden a las de mayor concentración de activo en su formulación, para cada uno de los activos, mientras que para la mezcla carvacrol-timol, se seleccionó a la formulación con mayor concentración de activos y con la proporción de 75% de carvacrol y 25% de timol. Para los cuatro meses que se evaluaron, se analizó estadísticamente la diferencia en la variabilidad y el grado de homogeneidad, comparando entre sí, cada formulación a través del tiempo para cada uno de los parámetros de tamaño, IPD y potencial Z.

Tamaño: Comparando la variabilidad 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. Si bien no hay estudios que expliquen el comportamiento para este sistema en particular, se sabe que las nanopartículas elaboradas con zeína tienen un intervalo de tamaño de entre 100 y 400 nm, además de que sus características son muy estables en tamaño y forma, en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y 43 % de HR (Gomez et al., 2012). Dentro de las características del tamaño, se registra un incremento, cuando se aumenta la concentración del polímero (Ravishankar Rai 2016), en este caso, la zeína, posiblemente tuvo una degradación de algunos de sus aminoácidos, por acción del agua en que se encuentran suspendidas las nanopartículas, y la alta volatilidad de los activos, durante el periodo que fueron evaluados, podrían haber disminuido en su concentración y haber aumentado la concentración de zeína, y consecuentemente, el aumento en el tamaño. Mientras que la disminución generalmente es afectada por las condiciones de almacenamiento, donde diferentes factores están relacionados, ya sea la temperatura, la naturaleza de los agentes o la reacción de los disolventes utilizados, pueden influir en la disminución del tamaño.

Comparando las distintas nanopartículas, mediante un análisis de variancia con un 95% de confiabilidad, indica que el tamaño promedio es distinto para cada activo nanoencapsulado, en la figura 29 es evidente esta diferencia, ya que el control y las nanopartículas con AEO,

se encuentran en intervalos de tamaño de entre 180 y 200 nm, variando entre 45 y 34 nm respectivamente, mientras que la variación para el resto de nanopartículas fue carvacrol 20 nm, timol 39 nm y la mezcla carvacrol-timol 56 nm, y con tamaños menores a 173 nm. Analizando las diferencias mediante una prueba de Tukey, no se encontró diferencia de tamaño entre el control y el AEO, mientras que entre el carvacrol, timol y la mezcla de carvacrol-timol, y de igual manera entre el timol y la mezcla carvacrol-timol, tampoco existe diferencia. Es decir, que existe una diferencia en el tamaño medio de las nanopartículas del AEO, comparada con sus componentes fenólicos (carvacrol y timol), por lo tanto los compuestos fenólicos registran un menor tamaño en comparación con el AEO que los contiene. Durante los cuatro meses que se evaluó el tamaño, la tendencia es predominantemente lineal, donde la variación promedio del tamaño es de 40 nm, por lo que la variación no representa un cambio significativo, ya que todas las nanopartículas se encuentran cerca de los intervalos de tamaño (100 - 400 nm) características de la zeína, esta característica es importante ya que favorece la estabilidad de las nanopartículas y posiblemente una mejor acción antimicrobiana.

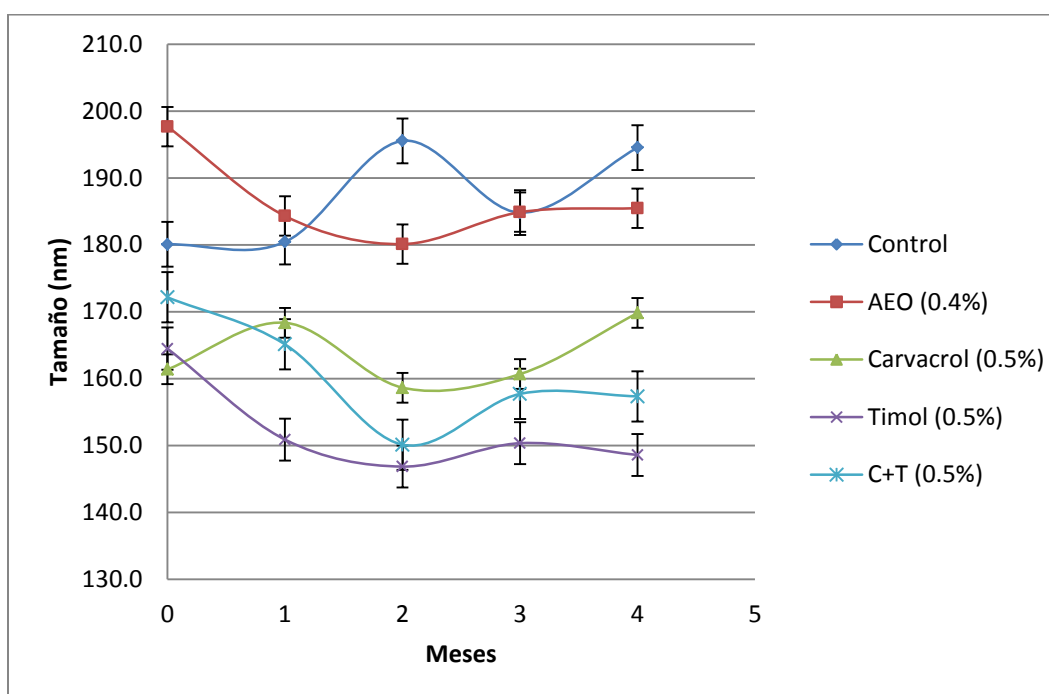


Figura 29. Variación en el tamaño de las nanopartículas en cuatro meses de almacenamiento.

Índice de polidispersión (IPD): Analizando el índice de polidispersión (figura 30), en el periodo de cuatro meses, mediante un análisis de varianza, con un 95% de confiabilidad, se encontró que la polidispersión media de todas las nanopartículas es igual, con un promedio general de 0.23 además de que la variación a través del tiempo fue de cero para las nanopartículas de AEO, carvacrol, timol y la mezcla carvacrol-timol, y solo de 0.001 para el control. Yunpeng et al., (2012) reporta y señala que valores menores a 0.3, como el que se obtuvo en las nanopartículas, se consideran estables. Los resultados muestran una estabilidad de las nanopartículas en al menos 4 meses después de su elaboración, además la tendencia tiene un comportamiento mayormente lineal, indica que la estabilidad en el índice de polidispersión es constante, lo que otorga buenas características a las nanopartículas.

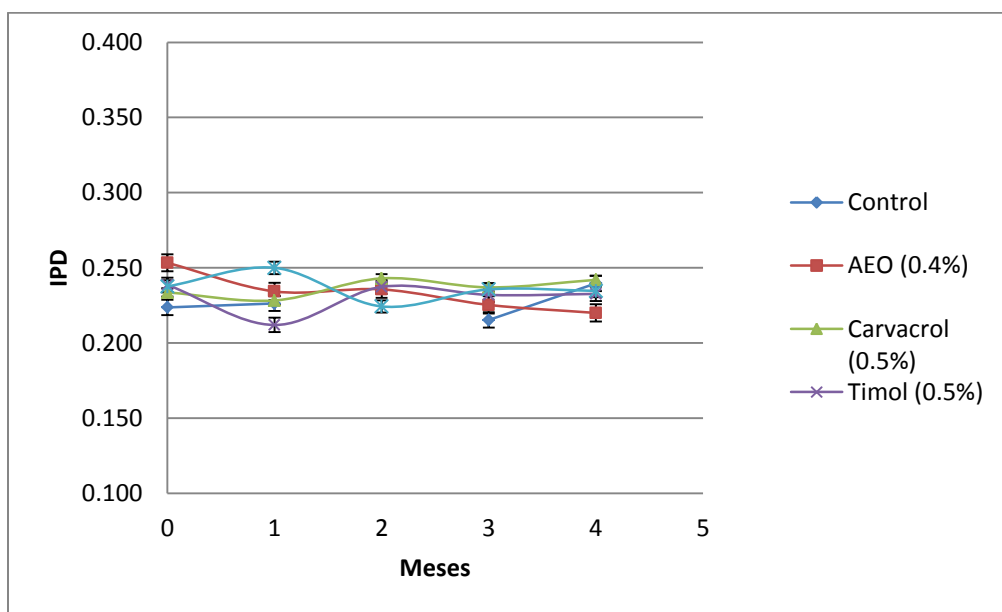


Figura 30. Variación en el Índice de polidispersión (IPD) de las nanopartículas en cuatro meses de almacenamiento.

Potencial Z: La estabilidad de las nanopartículas depende mayormente de la carga superficial, un conjunto de nanopartículas en suspensión se mantienen unidas por fuerzas como la de Van der Waals, electrostática, y por su hidrofobicidad. La aglomeración, estabilidad y dispersión están directamente relacionadas con el potencial Z (Asmatulu Ramazan 2013), valores menores a (+/-) 30 mV, comprometen la estabilidad, ya que las

nanopartículas tienden a aglomerarse y formar grupos más grandes, las interacciones de repulsión disminuyen y la distribución de tamaño se vuelve menos uniforme. En la figura 31 se muestra el comportamiento para los cuatro meses en que se evaluaron las nanopartículas, donde se aprecia una disminución significativa a través del tiempo.

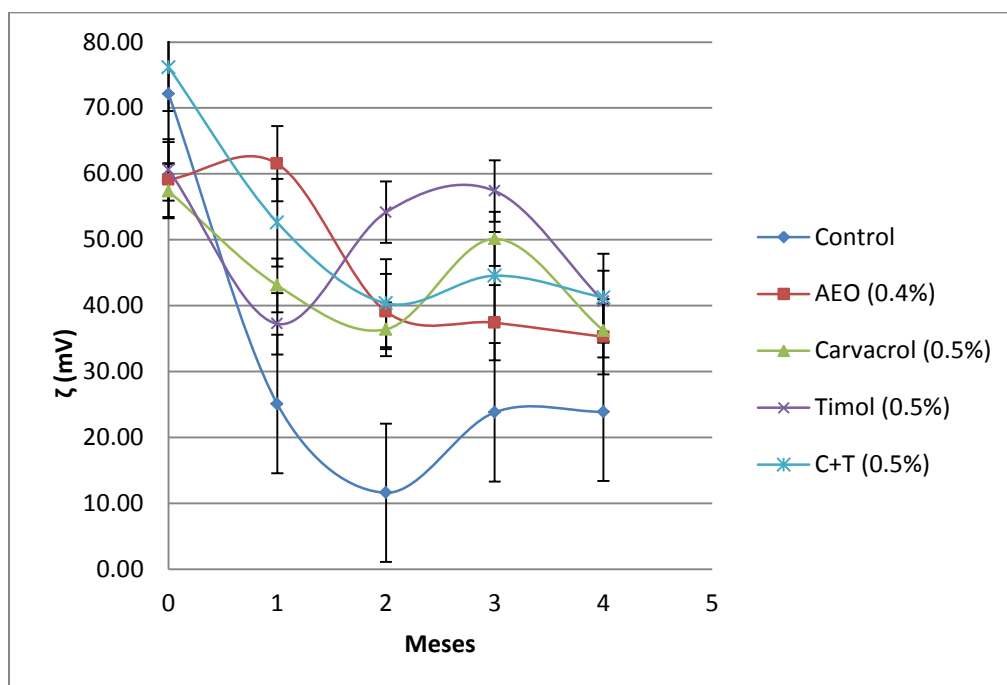


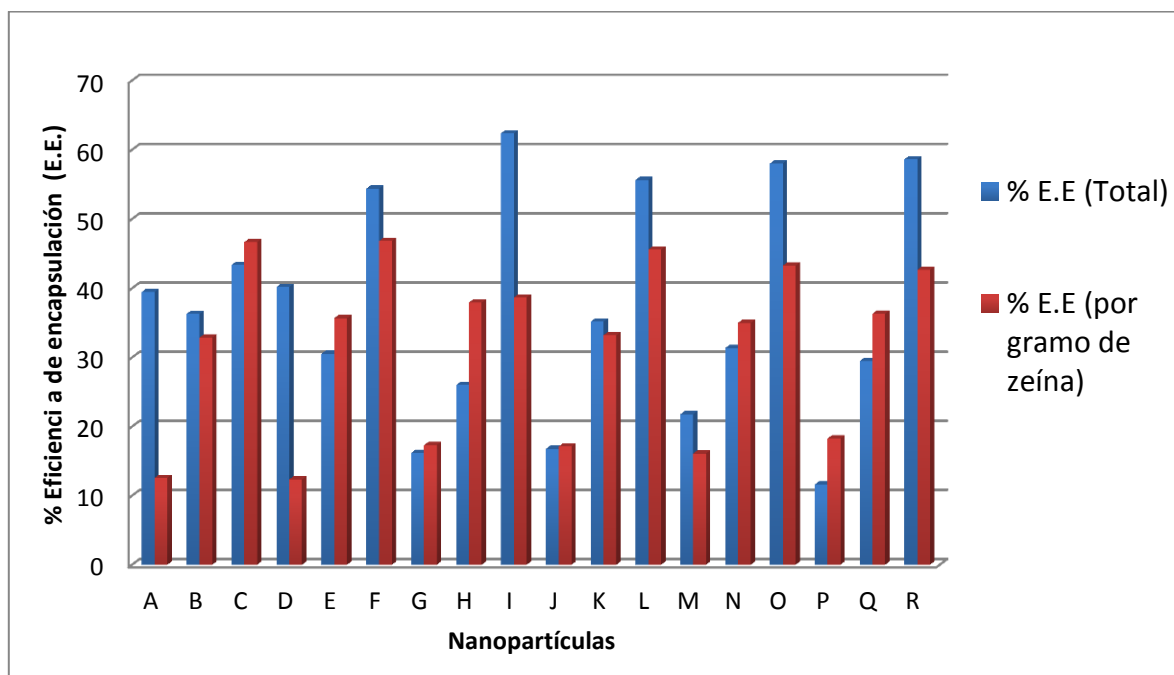
Figura 31. Variación en el Potencial Z de las nanopartículas en cuatro meses de almacenamiento.

El análisis de varianzas con un 95% de confiabilidad muestra que no existe diferencia entre los valores medios del potencial Z, por lo que se puede considerar un comportamiento similar para cada una de las nanopartículas. Mediante un análisis de regresión lineal, el pronóstico indica que para el quinto mes, las nanopartículas de, AEO y la mezcla carvacrol-timol, tendrán un valor menor a 30 mV, lo que indudablemente repercutiría en su tamaño e IPD. Es hasta el séptimo mes donde el carvacrol presentaría un valor menor a 30 mV, de acuerdo al pronóstico, es hasta aproximadamente doce meses cuando el timol disminuya este valor. Por lo que comparando los diferentes compuestos encapsulados, el AEO y la mezcla timol carvacrol serían estables en periodos de hasta cuatro meses, es posible que el carvacrol y timol juntos presenten antagonismo en la estabilidad de las nanopartículas, ya que estos compuestos unidos intencionalmente y naturalmente en el AEO, presentan la menor estabilidad de acuerdo a los resultados, mientras que individualmente estos

compuestos fenólicos, son más estables, siendo el timol el que mejores condiciones de estabilidad presenta.

3.2.2.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación

Diferentes estudios acerca de nanopartículas elaboradas con zeína, reportan eficiencias de encapsulación altas, entre 85 a 90% (Ravishankar Rai 2016), mientras que Yunpeng et al., (2012) reporta para timol y carvacrol eficiencias superiores a 50%. En base a la metodología seguida, se evaluó para todas las nanopartículas su eficiencia de encapsulación para el segundo mes después de su obtención, la figura 32 muestra el comparativo de los diferentes resultados, y se compara para cada formulación la eficiencia total, y en relación a la masa de zeína que encapsuló a los activos.



A:(AEO) [0.1%], B:(AEO) [0.25%], C:(AEO) [0.4%], D:(Carvacrol) [0.1%], E:(Carvacrol) [0.25%], F:(Carvacrol) [0.5%], G:(Timol) [0.1%], H:(Timol) [0.25%], I:(Timol) [0.5%], J:(carvacrol50-timol50) [0.1%], K:(carvacrol50-timol50) [0.25%], L:(carvacrol50-timol50) [0.5%], M:(carvacrol75-timol25) [0.1%], N:(carvacrol75-timol25) [0.25%], O:(carvacrol75-timol25) [0.5%], P:(carvacrol25-timol75) [0.1%], Q:(carvacrol25-timol75) [0.25%], R:(carvacrol25-timol75) [0.5%].

Figura 32. Comparativo de la Eficiencia de encapsulación las distintas nanopartículas a dos meses después de su encapsulación.

La mejor eficiencia de encapsulación fue para las formulaciones que contienen mayor cantidad de los activos (0.4 % AEO y 0.5% carvacrol y timol), que representó más del 35% de activos encapsulados. El timol presenta la mayor cantidad de activo encapsulado, con 62.37% de encapsulación (38.66% por gramo de zeína), no obstante el carvacrol tuvo la mayor cantidad encapsulada por gramo de zeína con 46.82%, y 54.37% en la formulación total. Yunpeng et al., (2012) menciona 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. De acuerdo a los resultados, se pudo descartar las formulaciones con menor cantidad de activos, ya que se encuentran por debajo del 50% de encapsulación.

3.2.2.4. Determinación de la liberación del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol

Una de las características principales de las nanopartículas es la liberación sostenida y controlada, ya que mejora su bioactividad y minimiza la degradación (Patel y Velikov 2014). La liberación que se llevó a cabo mediante la permeación a través de membranas de diálisis, siendo rápida, fue en un lapso de 4 horas que se dio la mayor liberación para cada uno de los activos.

A los 15 min, que se realizó la primera medición de la liberación, se liberó más del 20% de los activos, lo que puede representar la fracción no encapsulada libre en el sobrenadante de activo dentro de los primeros minutos de la liberación. Al cumplirse una hora, se registró una liberación de poco más del doble que a los 15 minutos 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 como se mencionó anteriormente que se liberó la mayor cantidad de los activos, el timol presentó la mayor cantidad de liberación con un promedio de 906.78 μg (72.54%), le siguió la mezcla carvacrol-timol con un 868.55 μg (69.48%), el carvacrol registró una liberación máxima en el mismo periodo de 841.86 μg (67.34%), por último el AEO registro su liberación máxima con 60.68 μg (60.68%), después de este tiempo, no se registró la liberación de más activo, y

se aprecia en la gráfica cómo es que comienza a disminuir la cantidad de activo liberado, a razón del volumen añadido de la solución de etanol/agua para la prueba. Goncalves da Rosa et al., (2015), quienes igualmente realizaron 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 a comparación del carvacrol. En la figura 33, se muestra el perfil de liberación de las nanopartículas seleccionadas con mejores condiciones, donde se muestra la cantidad liberada en [μg] 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.

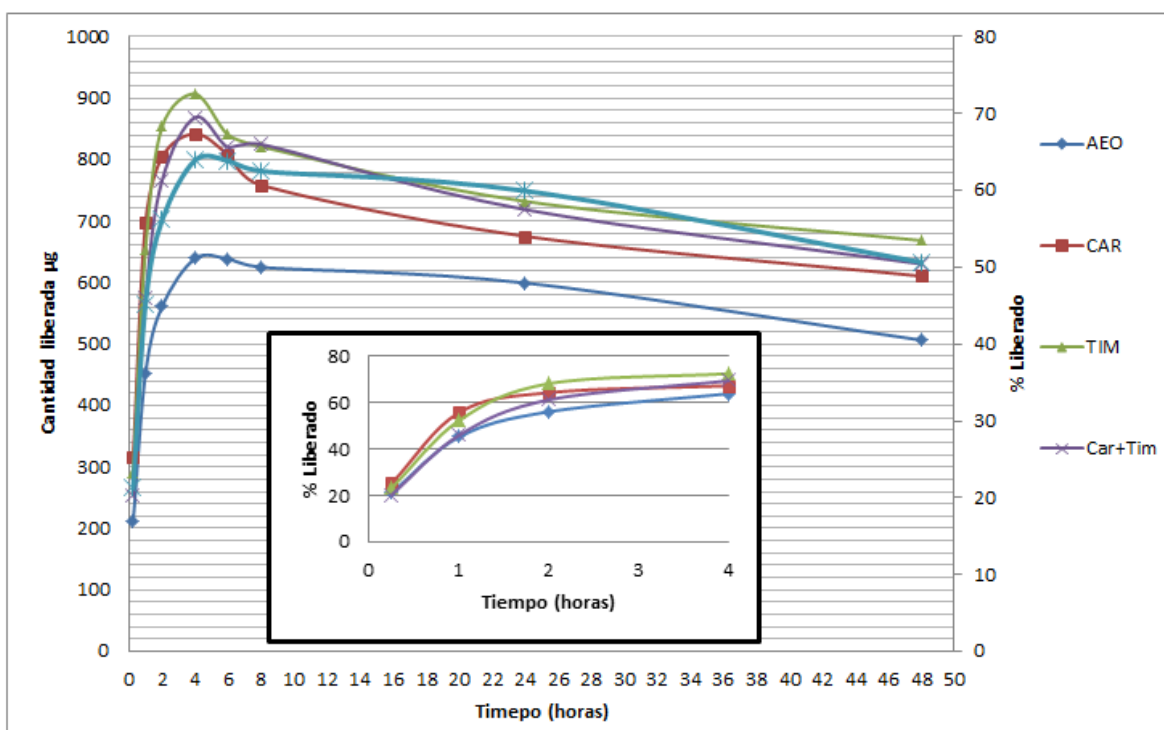


Figura 33. Perfil de liberación de las nanopartículas, mediante permeación a través de membranas de diálisis (Total y en un periodo de 4 horas).

3.3. Resultados del objetivo particular 3

3.3.1. Identificación del material biológico

3.3.1.1. Tinción Gram

La identificación del género *Listeria*, mediante tinción Gram, permite identificar las características morfológicas de la bacteria, debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares, teniendo las bacterias Gram positivas el peptidoglicano como componente principal. Se observó que se trata de una bacteria en forma de bacilo con los bordes redondeados, aislada, en pares o en cadenas cortas, y en forma de “V” o “Y”. Como peculiaridad de la bacteria, se tiñe de forma variable, presentándose ocasionalmente como cocobacilo (Ausina y Moreno 2005). La prueba fue positiva, y la morfología de la bacteria se aprecia mayormente como bacilo (figura 34). La prueba sirvió como control durante las pruebas microbiológicas, como aseguramiento de la presencia del género.

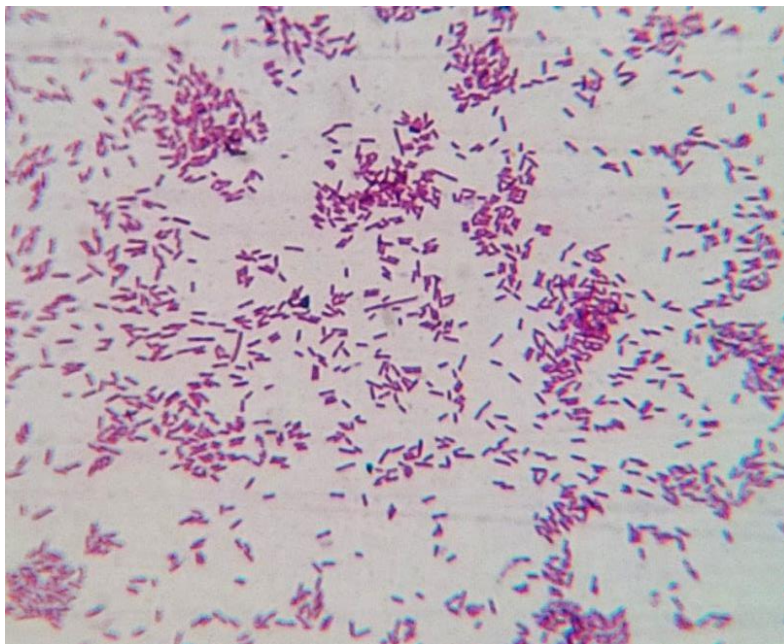


Figura 34. Tinción Gram de *L. innocua* con aumento de 100X.

3.3.1.2 Prueba de oxidasa

La prueba de detección de oxidasa se utiliza para diferenciar entre géneros y familias de bacterias, además la prueba de oxidasa tiene mayor uso para diferenciar entre bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas, el resultado de la prueba es negativo (Tabla 17) para *Listeria*. Por lo que se comprueba el género.

3.3.1.3 Prueba de catalasa

La detección de catalasa al igual que la prueba de oxidasa se utiliza para diferenciar el género *Listeria*, es útil para discriminar entre géneros, por ejemplo, permite diferenciar entre Estafilococos (+), y Estreptococos (-) o *Listeria* (+) y lactobacilos (-) (Ford Michael 2010). Los resultados (Tabla 17) indicaron catalasa positiva.

Tabla 17. Pruebas para la identificación del género *listeria*.

Prueba	Referencia	Resultado
Tinción Gram	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)
Catalasa	(+)	(+)

3.3.2 Prueba para la actividad bactericida del AEO, Carvacrol y Timol.

Una medida de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, así como de sus derivados fenólicos, reportada por la mayoría de los investigadores, es la concentración mínima inhibitoria (CMI). Sin embargo, aún existen diferencias en la definición de este término entre los diversos autores (Gómez y López 2009). Para evaluar de manera directa la acción del AEO, y sus derivados fenólicos carvacrol y timol, se realizó una prueba cualitativa para conocer entre que concentraciones se inhibía el crecimiento visible de *Listeria innocua*. Se determinó mediante pruebas preliminares el uso de las siguientes concentraciones; 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000, y 30000 ppm. (Figura 35) para cada uno de los activos. Los resultados muestran inhibición para el AEO con una concentración de hasta 30000 ppm (figura 36). El carvacrol inhibió a partir de la concentración correspondiente a 20000 ppm (figura 37), mientras que el timol inhibió a partir de una concentración de 15000 ppm (Figura 38). Se han reportado distintos

mecanismos de acción de los aceites esenciales y sus compuestos, sin embargo estos mecanismos no son aún lo suficientemente claros.

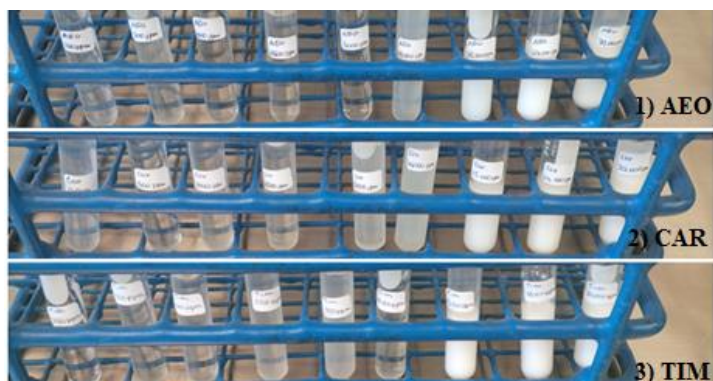


Figura 35. Concentraciones en ppm de 1) AEO, 2) Carvacrol y 3) Timol.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano es debida al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contienen; estos actúan rompiendo el flujo de electrones de los contenidos celulares. La pérdida prolongada de estas partículas y compuestos conduce a la muerte de los microorganismos (Denyer y Hugo 1991). Debido a que la mayor actividad antimicrobiana radica en los compuestos fenólicos carvacrol y timol, siendo estos compuestos estructuralmente similares, ya que difieren en la localización del grupo hidroxilo en el anillo fenólico, ambas sustancias parecen tener mayor actividad afectando la permeabilidad de la membrana, pudiendo provocar que se alteren los procesos de difusión y de transporte activo, 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 (Calvo y Martínez 2009). La actividad antimicrobiana del carvacrol y timol compuestos pertenecientes al aceite esencial de orégano, se debe a la presencia del grupo hidroxilo y los elementos deslocalizados del anillo bencénico (Gómez y López 2009). De acuerdo a los mecanismos de acción descritos, el AEO contiene múltiples componentes que inhiben el crecimiento de *Listeria innocua*, es muy probable que la concentración de estos componentes determine la actividad antimicrobiana, y la resistencia a los distintos componentes, o ser altamente sensible, además, es posible que el carácter volátil del aceite y de sus componentes, explique porque la bacteria fue sensible a concentraciones altas como la de 30000 ppm, para que visiblemente se inhibiera el crecimiento (figura 36), como

se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción, se debe a los diferentes componentes del aceite esencial de orégano que actúan sobre la bacteria, pudiendo verse afectada su concentración en la experimentación, por el factor de la temperatura en el tiempo de incubación, donde pudieran haber pérdida de estos compuestos.

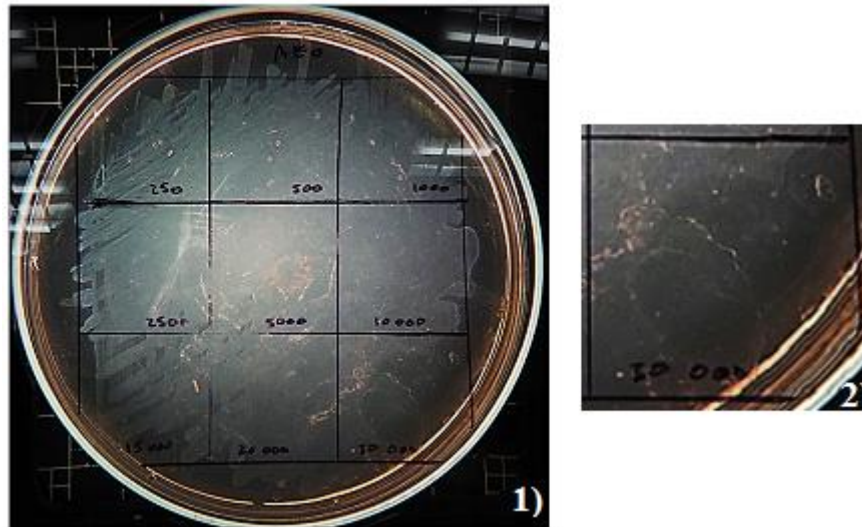


Figura 36. Prueba de inhibición para el AEO 1) Caja Petri, 2) Concentración donde se presentó la inhibición visible.

La acción antimicrobiana del carvacrol tiene características muy similares a la acción del AEO del que deriva, existen diferentes estudios realizados para determinar la acción individual de este compuesto, aplicado a distintas bacterias. En bacterias Gram negativas, es capaz de desintegrar la membrana externa permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementar la permeabilidad de la bacteria. Bacterias Gram positivas patógenas como el *B. cereus*, y *listeria*, han demostrado que el carvacrol interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapafosfolipídica, alineándose entre las cadenas de ácidos grasos. Esta distorsión de la estructura física puede causar la expansión y desestabilización de la membrana, incrementando la fluidez de la misma, provocando un aumento en la permeabilidad (Ultee, Bennik y Moezelaar 2002), un efecto similar se presenta en *Staphylococcus aureus*, particularmente para esta bacteria, el carvacrol daña la membrana provocando la disipación de dos componentes de la fuerza motriz del protón, el gradiente de pH y el potencial eléctrico, pudiendo ser mayor el daño a la membrana en presencia de

nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas ATPasas (Lambert et al., 2001).

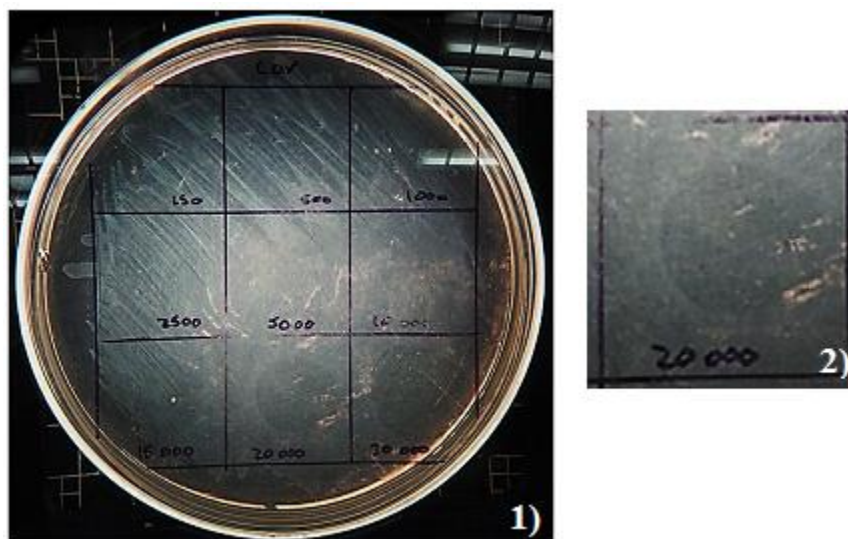


Figura 37. Prueba de inhibición para el Carvacrol 1) Caja Petri, 2) Concentración donde se presentó la inhibición visible.

A diferencia del AEO, el carvacrol presentó inhibición con una concentración menor, de 20000 ppm (figura 37), por lo que su acción inhibitoria, comparándola con el AEO, es mejor, ya que se requirió de menos cantidad del activo. El hecho de que sea solo el carvacrol y no unido con otros compuestos, como es el caso del AEO, el que inhiba, puede deberse a que la bacteria es más sensible a este compuesto fenólico puro, que a un conjunto de compuestos. Otro factor, puede deberse a las características naturales del carvacrol, como la solubilidad en el agente surfactante que se utilizó y la volatilidad, ya que al realizar las disoluciones el carvacrol fue más fácil de solubilizar, y no presentó un fuerte aroma característico, a diferencia del orégano.

El timol ha sido reportado por varios autores como uno de los agentes antimicrobianos más potentes de los constituyentes de los aceites esenciales, su estructura química es similar a la del carvacrol, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, por lo que su mecanismo de acción es semejante al del carvacrol (García y Palou 2008). El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida

de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander et al., 1998).

En estudios en *S. aureus*, bacteria Gram positiva, mostraron que el timol une las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, cambiando las características de permeabilidad de la misma. También se encontró que el efecto inhibitorio del timol es mayor a un pH de 5.5 que a 6.5, ya que los bajos valores de pH la moléculas del agente antimicrobiano no está disociada, logrando unir mejor las partes hidrofóbicas de las proteínas y, por lo tanto, facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana. (Juven et al., 1994). También se ha descubierto que el timol cambia la permeabilidad de la membrana de las células microbianas, dejando que se filtren los constituyentes químicos que son esenciales para el metabolismo, tales como iones ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. Estos efectos causan un incremento de la fase Lag, provocando una disminución en la carga celular total (Lambert y Pearson 2009).

En estudios en *B. cereus*, de Falcone et al., (2005) se observó que a concentraciones entre 50 y 250 ppm de timol, el número de microorganismos alcanzados en la fase estacionaria disminuye de manera lineal con el incremento de la concentración del agente antimicrobiano. Así mismo, cuando la concentración es igual o mayor a 500 ppm, no se observa crecimiento, concluyendo que altas concentraciones de timol, el efecto es completamente inhibitorio, el mismo autor señala que la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol son dependientes de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio, y la temperatura de incubación. Al presentar una menor concentración de 15000 ppm (Figura 38) para inhibir a *L. innocua*, es posible que la acción antimicrobiana se vio favorecida por la sensibilidad de la bacteria y probablemente por el factor del pH ácido, y la temperatura, otro aspecto que pudiera favorecer la actividad del timol es que se encuentra en forma de cristales a diferencia del AEO y el carvacrol que se encontraron en fase líquida pudiendo afectar su volatilidad.

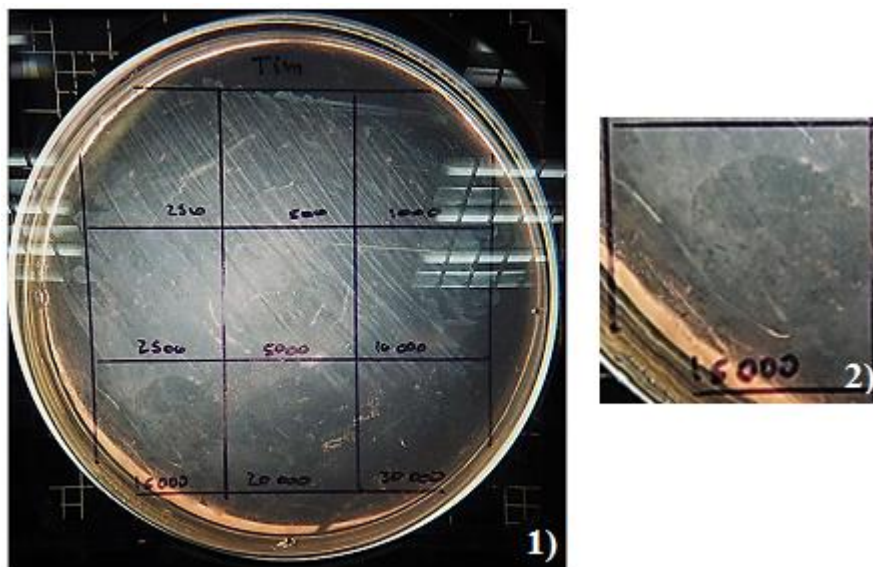


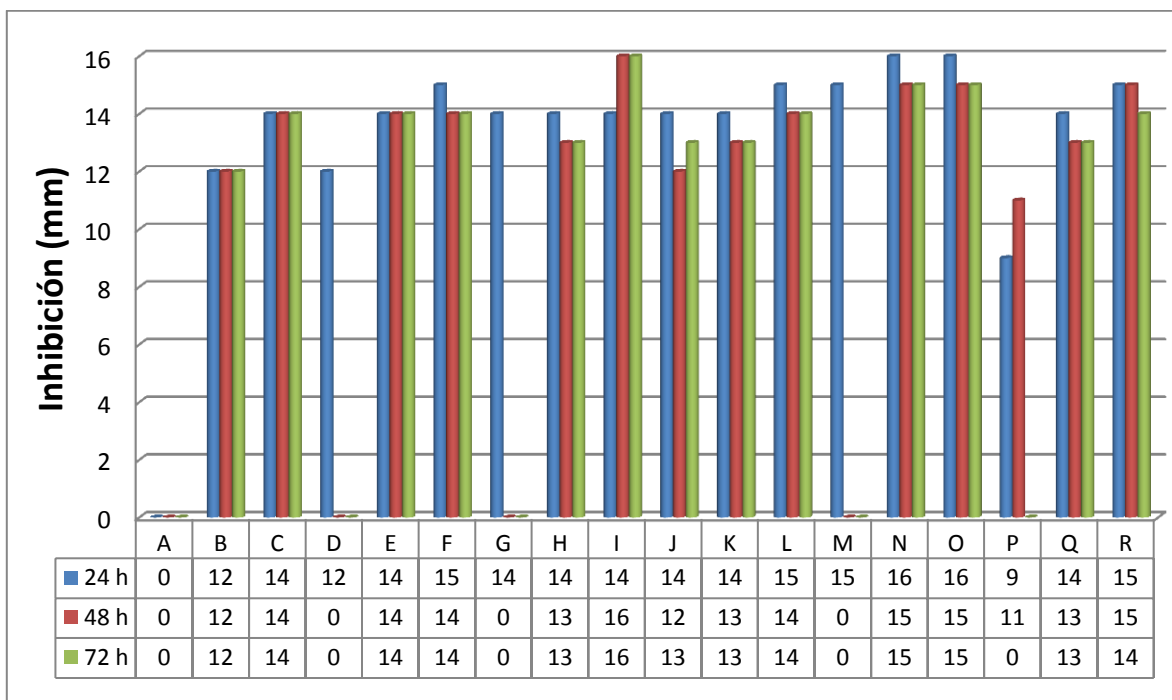
Figura 38. Prueba de inhibición para el Timol 1) Caja Petri, 2) Concentración donde se presentó la inhibición visible.

3.3.3. Prueba para la actividad bactericida de las nanopartículas

La nanotecnología está empezando a ser capaz de proporcionar las herramientas necesarias para la actividad antibacteriana de compuestos alternativos. La prueba para evaluar el efecto antibacteriano de las nanopartículas cargadas con AEO, carvacrol y timol, se realizó de la misma manera que para los agentes disueltos en el surfactante. Se encontró entre los diferentes activos, a tres distintas concentraciones, cuáles fueron los que causaron inhibición del crecimiento visible de la bacteria. Debido a que esta encapsulado el agente inhibidor, se evaluaron para tres días de incubación, periodo en el que se presenta el máximo crecimiento de *L. innocua* y buscando que en este lapso de tiempo se presentara la liberación de los compuestos encapsulados.

En la figura 39 se muestran los comparativos para las nanopartículas en suspensión, a partir de esta gráfica, se pueden elegir para cada compuesto las mejores concentraciones. Era evidente un comportamiento en el cual a mayor cantidad de activo, se presentara una mejor inhibición, aunque se esperaba que la nanoencapsulación, mejorara la actividad antimicrobiana aún con menos concentración, en todas las nanopartículas, las concentraciones bajas muestran poca o nula inhibición, quiere decir que para lograr una inhibición de estos activos nanoencapsulados, su concentración debe ser mayor a 1000

ppm. 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. Por lo que en base a los resultados se seleccionaron las concentraciones más altas para cada compuesto, AEO con (0.4%), timol y carvacrol con (0.5%) y para la mezcla carvacrol-timol, se eligió la mezcla con la proporción (75 carvacrol y 25 timol), a una concentración de (0.5%) ya que esta presentó mayor inhibición.

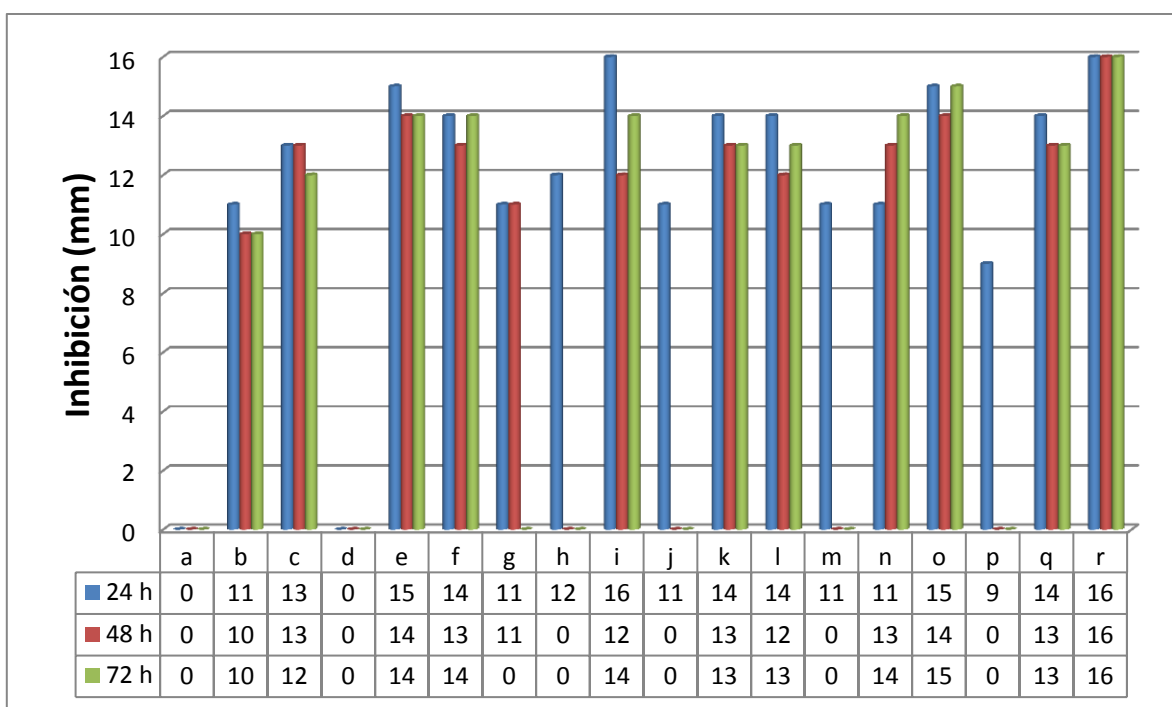


*A:(AEO) [0.1%], B:(AEO) [0.25%], C:(AEO) [0.4], D:(Carvacrol) [0.1%], E:(Carvacrol) [0.25%], F:(Carvacrol) [0.5%], G:(Timol) [0.1%], H:(Timol) [0.25%], I:(Timol) [0.5%], J:(carvacrol50-timol50) [0.1%], K:(carvacrol50-timol50) [0.25%], L:(carvacrol50-timol50) [0.5%], M:(carvacrol75-timol25) [0.1%], N:(carvacrol75-timol25) [0.25%], O:(carvacrol75-timol25) [0.5%], P:(carvacrol25-timol75) [0.1%], %, Q:(carvacrol25-timol75) [0.25%], %, R:(carvacrol25-timol75) [0.5%].

Figura 39. Prueba de las zonas de inhibición (mm) de *L. innocua* con las nanopartículas de los diferentes activos en suspensión, en tres días de evaluación.

Para las nanopartículas que fueron centrifugadas y resuspendidas, se buscaba determinar el efecto inhibitorio, donde los componentes del sobrenadante no influyeran en la actividad antibacteriana. En la figura 40, se aprecia un comportamiento similar para las que se encontraban en suspensión originalmente, aunque su inhibición fue menor, comparando las inhibiciones entre el AEO y sus derivados fenólicos carvacrol y timol, estos últimos presentaron mejor inhibición, y de entre ellos, fue el timol el que mejor inhibición presentó

a la mayor concentración. Comparando la mezcla de los compuestos, la concentración más alta (r) con una proporción mayoritaria de timol con 75% en su formulación, registró la mayor inhibición con 16 mm durante los tres días de incubación, pese a estos resultados, se seleccionó la formulación (O) con (75/25) de carvacrol-timol respectivamente, ya que fue mejor su inhibición con el sobrenadante, además de que sus características de tamaño (162.44 nm), índice de polidispersión (0.237) y potencial Z (56.38 mV) son las que mejores condiciones presentan.




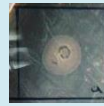

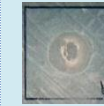




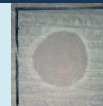

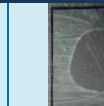
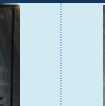


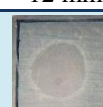


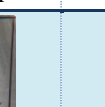
*a:(AEO) [0.1%], b:(AEO) [0.25%], c:(AEO) [0.4], d:(Carvacrol) [0.1%], e:(Carvacrol) [0.25%], f:(Carvacrol) [0.5%], g:(Timol) [0.1%], h:(Timol) [0.25%], i:(Timol) [0.5%], j:(carvacrol50-timol50) [0.1%], k:(carvacrol50-timol50) [0.25%], l:(carvacrol50-timol50) [0.5%], m:(carvacrol75-timol25) [0.1%], n:(carvacrol75-timol25) [0.25%], o:(carvacrol75-timol25) [0.5%], p:(carvacrol25-timol75) [0.1%], q:(carvacrol25-timol75) [0.25%], r:(carvacrol25-timol75) [0.5%].

Figura 40. Prueba de las zonas de inhibición (mm) de *L. innocua* con las nanopartículas de los diferentes activos resuspendidas, en tres días de evaluación.

Los resultados se muestran en las tablas 18 a 22 para las nanopartículas en suspensión (NS) y para las nanopartículas que se separaron mediante centrifugación y se resuspendieron en agua destilada (NR). También se muestra la medida de las zonas que inhibió el crecimiento, para comparar si presentaban un crecimiento de la bacteria o se incrementaba su inhibición.

En la tabla 18 para las nanopartículas de AEO, indican que las formulaciones con 0.25 y 0.4% de concentración del activo, registraron inhibiciones a partir de 24 horas de incubación, y durante 48 y 72 horas más, mientras que las nanopartículas que contenían 0.1% del activo, fue evidente el crecimiento de colonias. En tres días que se monitoreo el crecimiento, las nanopartículas suspendidas, no presentaron aumento ni disminución en la inhibición, es decir que las nanopartículas ni el sobrenadante, se difumina el tripticasa soya agar, por lo que en un medio sólido como lo es el agar las nanopartículas actúan solo en contacto directo con las bacterias, y probablemente sea necesario el uso de agua como disolvente para cubrir una mayor área. Para las nanopartículas que se les eliminó el sobrenadante, y se resuspendieron en agua destilada, registraron menor inhibición, disminuyendo de 1 a 2 mm respecto a las nanopartículas con el sobrenadante, por lo que el agente libre en el sobrenadante tiene efecto inhibitorio, y al eliminarlo, se comprueba que es el AEO libre y encapsulado el que tiene actividad antimicrobiana, además de que el etanol presente en la formulación, no tiene acción en la inhibición de *L. innocua*. Los resultados permiten descartar la formulación A (0.1%), ya que fue nula la inhibición.

Tabla 18. Comparación de las inhibiciones del crecimiento de *L. innocua* frente al AEO nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.



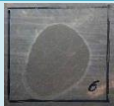





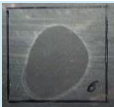


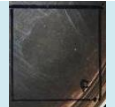


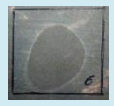
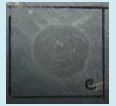
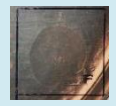

Tiempo de incubación	A [0.1%] (NS)	a [0.1%] (NR)	B[0.25%] (NS)	b [0.25%] (NR)	C [0.4%] (NS)	c [0.4%] (NR)
24 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	12 mm	11 mm	14 mm	13 mm
48 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	12 mm	10 mm	14 mm	13 mm
72 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	12 mm	10 mm	14 mm	12 mm

*A:(AEO) [0.1%], B:(AEO) [0.25%], C:(AEO) [0.4], *a:(AEO) [0.1%], b:(AEO) [0.25%], c:(AEO) [0.4%]

Las nanopartículas de carvacrol (Tabla 19) tuvieron una mejor inhibición con respecto a las del AEO, las cuales corresponden a las concentraciones de E (0.25%) y F (0.5%), con 14 y 13 mm de inhibición respectivamente, la variación en la zona de inhibición durante los tres

días fue de 1 mm. Las nanopartículas correspondientes a D (0.1%) en suspensión presentaron inhibición a las 24 horas de incubación, sin embargo a las 48 horas, se observó el crecimiento de pequeñas colonias. La mejor inhibición se dio para las nanopartículas en suspensión. En base a los resultados, se descarta la formulación D (0.1%) por no presentar inhibición. Goncalves da Rosa et al., (2015), utilizó para el carvacrol una concentración de 0.25%, registrando inhibición para *Listeria*, con criterio de experimentación, de buena actividad antibacteriana, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Tabla 19. Comparación de las inhibiciones del crecimiento de *L. innocua* frente al carvacrol nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.



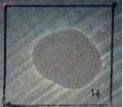


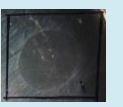


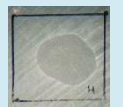


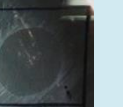






Tiempo de incubación	D [0.1%] (NS)	d [0.1%] (NR)	E [0.25%] (NS)	e [0.25%] (NR)	F [0.5%] (NS)	f [0.5%] (NR)
24 horas						
Ø de inhibición	12 mm	0 mm	14 mm	12 mm	15 mm	14 mm
48 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	14 mm	13 mm	14 mm	13 mm
72 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	14 mm	13 mm	14 mm	14 mm

D:(Carvacrol) [0.1%], E:(Carvacrol) [0.25%], F:(Carvacrol) [0.5%], * d:(Carvacrol) [0.1%], e:(Carvacrol) [0.25%], f:(Carvacrol) [0.5%],

Las nanopartículas cargadas con timol tabla 20 fueron mejores para 48 y 72 horas, todas presentaron buena inhibición, sin embargo a las 48 horas, las formulaciones G (0.1%) y h (0.25%), presentaron crecimiento de colonias, solo las nanopartículas en suspensión de H (0.25%) e I (0.5%) inhibieron durante los tres días. Relacionando el resultado de la eficiencia de encapsulación, con las inhibiciones, G tiene una baja eficiencia de encapsulación con 16.7%, que se reflejó en el crecimiento de bacterias. Para las nanopartículas de H (0.25%) se aprecia una tendencia a disminuir su inhibición, además de que las nanopartículas centrifugadas y resuspendidas no fueron capaces de inhibir en 48 horas de incubación, por lo que también se descartaron. Goncalves da Rosa et al., (2015), encontraron para el timol, al igual que el carvacrol una buena inhibición contra *Listeria*, con una concentración de 0.25%, esto se cumplió solo para las nanopartículas en

suspensión, ya que las que fueron centrifugadas presentaron crecimiento de colonias después de 48h de incubación. Hasta este punto, el timol, presenta la mejor inhibición con respecto a AEO y carvacrol, al menos para la mayor concentración de 0.5%, ya sea en suspensión, y eliminando el sobrenadante.





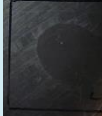




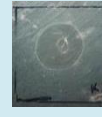



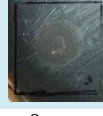
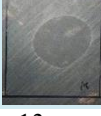

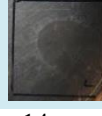
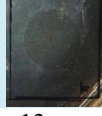
Tabla 20. Comparación de las inhibiciones del crecimiento de *L. innocua* frente al timol nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.

Tiempo de incubación	G [0.1%] (NS)	g [0.1%] (NR)	H [0.25%] (NS)	h [0.25%] (NR)	I [0.5%] (NS)	i [0.5%] (NR)
24 horas						
Ø de inhibición	14 mm	11 mm	14 mm	12 mm	14 mm	16 mm
48 horas						
Ø de inhibición	0 mm	11 mm	13 mm	0 mm	16 mm	12 mm
72 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	13 mm	0 mm	16 mm	14 mm

G:(Timol) [0.1%], H:(Timol) [0.25%], I:(Timol) [0.5%], *g:(Timol) [0.1%], h:(Timol) [0.25%], i:(Timol) [0.5%]

Las nanopartículas que contienen la mezcla de los dos compuestos fenólicos, carvacrol y timol, al 50/50, (Tabla 21) lograron una inhibición similar al estar nanoencapsulados de forma individual, se puede establecer que a una misma proporción, el efecto antimicrobiano es sinérgico, aunque posiblemente el efecto antimicrobiano sea predominante para uno de los dos compuestos. La inhibición fue mejor para las nanopartículas con mayor concentración de los activos K (0.25%) y L (0.5%), tanto para las nanopartículas suspendidas, como las resuspendidas, el comportamiento fue similar a las anteriores nanopartículas, inhibiendo en el transcurso de tres días las que contienen mayor cantidad de activo, la única formulación que no inhibió fue la correspondiente a J (0.1%), donde la cantidad encapsulada no logró inhibir el crecimiento de *L. innocua*.

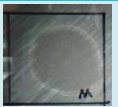



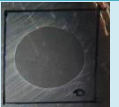
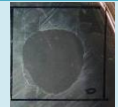
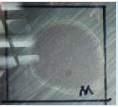
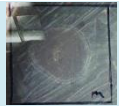
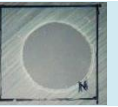

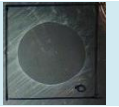

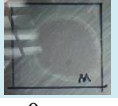

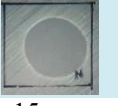

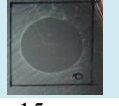

Tabla 21. Comparación de las inhibiciones del crecimiento de *L. innocua* frente al carvacrol + timol (50/50) nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.

Tiempo de incubación	J [0.1%] (NS)	j [0.1%] (NR)	K[0.25%] (NS)	k[0.25%] (NR)	L [0.5%] (NS)	l [0.5%] (NR)
24 horas						
Ø de inhibición	14 mm	11 mm	14 mm	11 mm	15 mm	14 mm
48 horas						
Ø de inhibición	12 mm	0 mm	13 mm	10 mm	14 mm	12 mm
72 horas						
Ø de inhibición	13 mm	0 mm	13 mm	10 mm	14 mm	13 mm

J:(carvacrol50-timol50) [0.1%], K:(carvacrol50-timol50) [0.25%]. L:(carvacrol50-timol50) [0.5%] * j:(carvacrol50-timol50) [0.1%], k:(carvacrol50-timol50) [0.25%], l:(carvacrol50-timol50) [0.5%]

Las nanopartículas de carvacrol y timol, con mayor cantidad de carvacrol (75 %) (Tabla 22) mantienen la tendencia de inhibición de las anteriores nanopartículas, siendo las concentraciones altas N (0.25%) y O (0.5%), las que mayor área de inhibición presentaron durante todo el periodo de evaluación. La formulación M (0.1%) solo logró inhibir dentro de 24 horas, presentando la formación de colonias después de este tiempo, por lo que se descarta. De las mezclas de carvacrol-timol, esta formulación en particular con mayor cantidad de carvacrol, tubo las mejores condiciones de inhibición, a partir de la concentración de N (0.25%) y O (0.5%), esta última cuentan con diámetros promedio de aproximadamente 15 mm, para las nanopartículas en suspensión y resuspendidas, por lo que esta combinación presentó mayor sinergismo para inhibir a *L. innocua*, también tuvo como particular característica que siendo el timol el que mejor inhibición presento de forma independiente, estando mezclado en una menor concentración, junto con una mayor proporción de carvacrol, la inhibición fue mejor, por lo que con las cantidades utilizadas, la participación de los compuestos beneficio su actividad antimicrobiana, lo que dio lugar para la determinación de la liberación, como la mezcla de los compuestos fenólicos que mejores condiciones inhibitorias presenta.

Tabla 22. Comparación de las inhibiciones del crecimiento de *L. innocua* frente al carvacrol + timol (75/25) nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.

Tiempo de incubación	M [0.1%] (NS)	m [0.1%] (NR)	N[0.25%] (NS)	n[0.25%] (NR)	O [0.5%] (NS)	o [0.5%] (NR)
24 horas						
Ø de inhibición	15 mm	11 mm	16 mm	11 mm	16 mm	15 mm
48 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	15 mm	13 mm	15 mm	14 mm
72 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	15 mm	14 mm	15 mm	15 mm

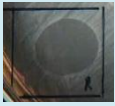



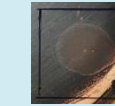





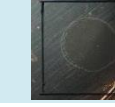





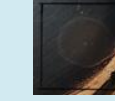
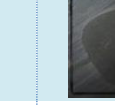
M:(carvacrol75-timol25) [0.1%], N:(carvacrol75-timol25) [0.25%], O:(carvacrol75-timol25) [0.5%], * m:(carvacrol75-timol25) [0.1%], n:(carvacrol75-timol25) [0.25%], o:(carvacrol75-timol25) [0.5%]

Por último la mezcla de nanopartículas, carvacrol-timol (25/75) (Tabla 23) muestra el mismo resultado que el resto de las nanopartículas, inhibiendo, las que mayor concentración de los activos contienen, la menor concentración P (0.1%) se descarta por presentar el crecimiento de colonias a las 72 hora de incubación. Las nanopartículas de mayor concentración R (0.5%), y particularmente las que fueron separadas del sobrenadante, presentaron la mayor inhibición con 16 mm. Comparando la mezcla de carvacrol-timol, con el AEO, que los contiene, muestra que estos compuestos tienen una mayor actividad antimicrobiana mezclados de forma intencional, que de forma natural, además de que el AEO, contiene muchos más compuestos que pudieran interferir en la inhibición, posiblemente, compuestos no fenólicos que no presentan actividad antimicrobiana.

Los mecanismos de acción que se describieron en el apartado 3.3.2, explica cómo es que el AEO y sus compuestos fenólicos (carvacrol y timol) logran inhibir el crecimiento de las bacterias, sin embargo su nanoencapsulación provoca que a una menor concentración se registre inhibición visible del crecimiento de *L. innocua*. La forma cómo 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 que pueden penetrar alterando el metabolismo de la

bacteria, y la liberación de los activos con propiedades antimicrobianas (Castrillón y Palma 2014). Sin embargo dentro de los múltiples efectos que inhiben el crecimiento de la bacteria, uno de ellos es el efecto del sobrenadante, ya que en él se encuentran libre la parte no encapsulada de los compuestos, además una fracción de etanol donde disolvieron los activos que podría ser parte en la acción inhibitoria, esto resulta benéfico, ya que propicia la eliminación de la bacteria de manera inicial antes de que se inicie la liberación de los activos.

Tabla 23 Comparación de las inhibiciones del crecimiento de *L. innocua* frente al carvacrol + timol (25/75) nanoencapsulado en suspensión original (NS) y resuspendido en agua destilada (NR) a diferentes concentraciones.

Tiempo de incubación	P [0.1%] (NS)	p [0.1%] (NR)	Q[0.25%] (NS)	q [0.25%] (NR)	R [0.5%] (NS)	r [0.5%] (NR)
24 horas						
Ø de inhibición	9 mm	9 mm	14 mm	11 mm	15 mm	16 mm
48 horas						
Ø de inhibición	11 mm	0 mm	13 mm	13 mm	15 mm	16 mm
72 horas						
Ø de inhibición	0 mm	0 mm	13 mm	13 mm	14 mm	16 mm

P:(carvacrol25-timol75) [0.1%], %, Q:(carvacrol25-timol75) [0.25%], %, R:(carvacrol25-timol75) [0.5%] * p:(carvacrol25-timol75) [0.1%], %, q:(carvacrol25-timol75) [0.25%], %, r:(carvacrol25-timol75) [0.5%].

No obstante, diferentes autores mencionan los efectos de las nanopartículas. Entre ellos se encuentra el transporte directo de los activos, de esta manera la actividad se mejora debido a que se incrementa el área disponible para el contacto con los microorganismos (Rai y Kon 2013). Estudios *in vitro* de nanopartículas de zeína realizados por Kaihara y Numata (2013) demostraron que estas nanopartículas 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, experimentos indican daños en las membranas que se categorizan como hoyos o poros en las membranas (Santos et al., 2013). Es el tamaño y la entrega de los compuestos antimicrobianos los que principalmente mejora el

efecto antimicrobiano, ya que la interacción de las nanopartículas con las bacterias, es consecuencia del tamaño y forma de las partículas (Suresh 2015).

En general, comparando la actividad antimicrobiana del AEO, carvacrol y timol, nanoencapsulado, contra su estado libre, se encontró que se requiere de una menor concentración de los activos para lograr una inhibición visible (Figura 41) el AEO disminuyó la concentración en 86%, carvacrol 75% y el timol 66%. Las características que otorga la nanoencapsulación benefician la actividad antimicrobiana, para compuestos como el AEO y sus derivados fenólicos, logran controlar su liberación, lo que proporciona diversas propiedades de difusión en membranas biológicas por su tamaño, entregando los compuestos de manera directa sobre las bacterias, y de esa manera se logra que los mecanismos de acción operen contra el crecimiento de las bacterias. Además de beneficiar su actividad antimicrobiana, la nanoencapsulación protege a los compuestos de diferentes factores, ya sea a la foto degradación, y termo degradación, oxidación, evaporación, así como mejorar la solubilidad en agua (São et al., 2013).

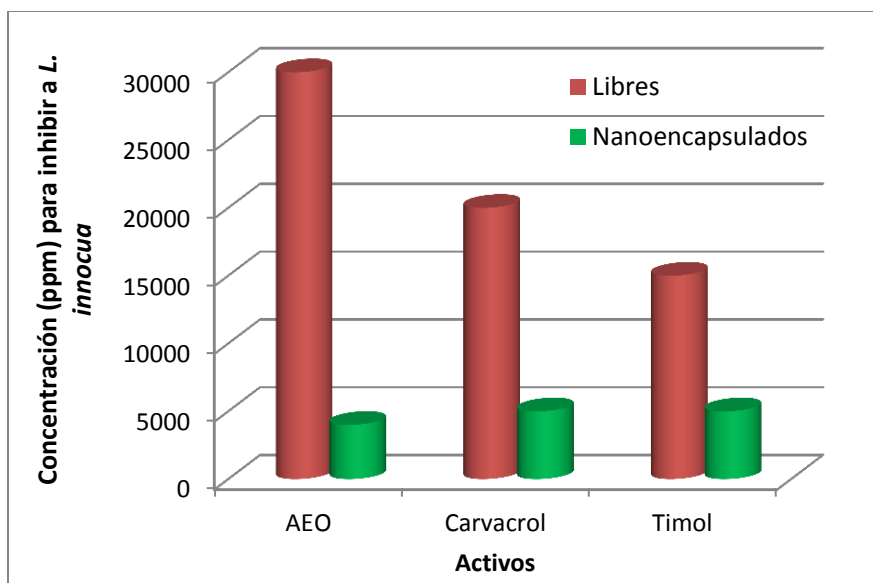


Figura 41. Comparación de la concentración requerida para inhibir visiblemente a *L. innocua*.

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

Una de las principales características de la nanoencapsulación del AEO, carvacrol y timol, es la liberación periódica, para evaluar este comportamiento, se realizó una prueba para comprobar, a través del tiempo, la disminución del número de bacterias, por la acción de los compuestos que se liberan. Los resultados obtenidos en la tabla 24, muestran una disminución de en el número de bacterias a partir de 15 minutos, y una inhibición total desde una hora para el timol, 4 horas para el AEO, y de 48 horas para el carvacrol y la mezcla de carvacrol y timol. Las nanopartículas de control de zeína, sin carga de activos, siempre presentó crecimiento de *L. innocua*, con un promedio de 2.21×10^7 UFC/ml durante las 48 horas que se realizó la prueba, la formulación de nanopartículas de control incluye una fracción de etanol, que no modificó la cantidad de bacterias, siempre se mantuvo en siete ciclos logarítmicos, lo cual significa que la composición de las nanopartículas de control no cuenta con algún efecto antimicrobiano, e incluso para esta condición, su crecimiento fue ligeramente mayor que con solo el medio de cultivos de TSA, posiblemente por tratarse de una proteína, aun sin aminoácidos esenciales, la bacteria no se ve afectada en su desarrollo y probablemente favorezca su crecimiento.

Las nanopartículas que contienen a el AEO, presentaron una disminución de las bacterias desde los 15 minutos iniciales de la prueba, disminuyendo dos ciclos logarítmicos el número de bacterias comparándolo con el control, 45 minutos después, cuando se cumplió una hora, se registró una disminución en el número de bacterias dentro del mismo ciclo logarítmico, una hora después el crecimiento disminuyó de la misma manera en el mismo ciclo logarítmico, fue hasta las 4 horas donde se presentó la inhibición completa de las bacterias. La liberación mediante bolsas de diálisis, dio como resultado la mayor liberación en cuatro horas, por lo que coincide con el AEO, otro factor es la actividad bactericida del activo liberado, logrando inhibir por completo en el transcurso de cuatro horas, además del efecto que la nano escala puede aportar para inhibir la bacteria, como la penetración de las nanopartículas a la bacteria, efecto que algunos autores suponen (Yunpeng et al., 2012).

Tabla 24. Inhibición de *L. innocua* por acción de la liberación sostenida del AEO, carvacrol y timol, a partir de su encapsulación en nanopartículas.

Nanopartículas	Control	AEO	Carvacrol	Timol	Carvacrol + Timol
Tiempo (horas)	UFC/ml				
0.25	1.0×10^7	5.0×10^5	1.77×10^6	1.57×10^6	1.37×10^6
1	4.67×10^7	1.33×10^5	3.33×10^3	0	6.0×10^4
2	3.0×10^7	3.33×10^4	6.67×10^4	0	2.67×10^4
4	1.33×10^7	0	3.33×10^4	0	2.0×10^3
6	1.67×10^7	0	3.0×10^3	0	3.33×10^3
8	1.67×10^7	0	0	0	6.67×10^3
24	3.33×10^7	0	3.33×10^2	0	3.33×10^2
48	1.0×10^7	0	0	0	0

El carvacrol fue el compuesto, que presenta mayor tiempo para disminuir el número de colonias, la disminución, de bacterias fue irregular para este compuesto, al tiempo inicial de 15 minutos la disminución fue de un ciclo logarítmico, una hora después, disminuyó otro ciclo logarítmico, a las 2 horas, se registró un aumento del número de bacterias en un ciclo, 4 horas después la disminución se presentó nuevamente pero dentro del mismo ciclo logarítmico, a las 6 horas cumplidas se dio una disminución de 2 ciclos logarítmicos, fue después de 8 horas donde no hubo crecimiento de bacterias, con un día de actuación de las nanopartículas, se presentó crecimiento de bacterias por 2 ciclos logarítmicos, fue hasta las 48 horas cuando la bacteria no presentó crecimiento. El incremento de las bacterias a las 24 horas pudo ser error en la técnica, o de la experimentación, contaminando la muestra. El carvacrol presentó una buena inhibición en la prueba de la actividad bactericida de las nanopartículas, sin embargo su liberación parece ser menos eficiente, factores 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 (Yunpeng et al., 2012), resultaron en una menor inhibición.

El timol fue el compuesto que más rápidamente logró inhibir a *L. innocua*, al igual que el carvacrol, desde los 15 minutos se registró la disminución en el crecimiento en un ciclo logarítmico, después de 1 hora no se registró crecimiento de la bacteria, inhibiéndola en este lapso de tiempo por completo. El timol es el activo que mayor actividad presentó en la prueba para la actividad bactericida de los activos, al requerir una menor concentración para inhibir a la bacteria, además de que tiene mejores condiciones de encapsulación, fue el de menor tamaño, menor índice de polidispersión, el más estable de acuerdo a el potencial Z, y el de mayor eficiencia de encapsulación, el solo hecho de presentar mejor actividad antibacteriana, pudo traducirse en una mejor inhibición en la prueba de liberación, y al contar con las mejores características de nanoencapsulación, favoreció más rápidamente inhibir a la bacteria.

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 llevo más tiempo para lograrse, como todos los activos la disminución se presentó en el tiempo inicial de 15 minutos, en este caso con un ciclo logarítmico, la disminución a través del tiempo fue progresiva disminuyendo 3 ciclos para la hora cumplida, manteniéndose por otra hora más disminuyendo el número de bacterias dentro del mismo ciclo, para las 4, 6 y 8 horas de estar la bacteria expuesta a las nanopartículas, se registró la disminución de un ciclo, para las 24 horas cumplidas se inhibió el crecimiento, registrándose solo dos ciclos logarítmicos, y solo hasta las 48 horas se inhibió por completo el crecimiento. Al tener mayor concentración de carvacrol, es predecible un comportamiento similar, sin embargo la liberación de estos compuestos mezclados no fue como se esperaba, tardando al menos 24 horas en inhibir, sin embargo esta liberación prolongada puede favorecer casos en el que se requiera mayor tiempo para menores cargas de bacterias.

Para representar de mejor manera, como es que la liberación de los activos inhibe el crecimiento de las bacterias, se elaboró una gráfica linealizada de los logaritmos, para apreciar de mejor manera el comportamiento, en la figura 42 se muestra el comportamiento de cada activo. La gráfica muestra de manera más sencilla el comportamiento de las nanopartículas. El control, muestra la presencia de bacterias dentro del mismo ciclo

logarítmico de manera constante, se puede decir, que la formulación libre de cualquiera de los activos, no influye en la inhibición de la bacteria, y que ninguno de los componentes altera el crecimiento de la bacteria, tampoco parece afectar al medio de cultivo, incluso, puede que la zeína otorgue nutrientes, a pesar de no contener varios de los aminoácidos esenciales. Yunpeng et al., (2012) menciona 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., (2001) menciona que daños en la membrana pueden ser mayores en la presencia de nutrientes.

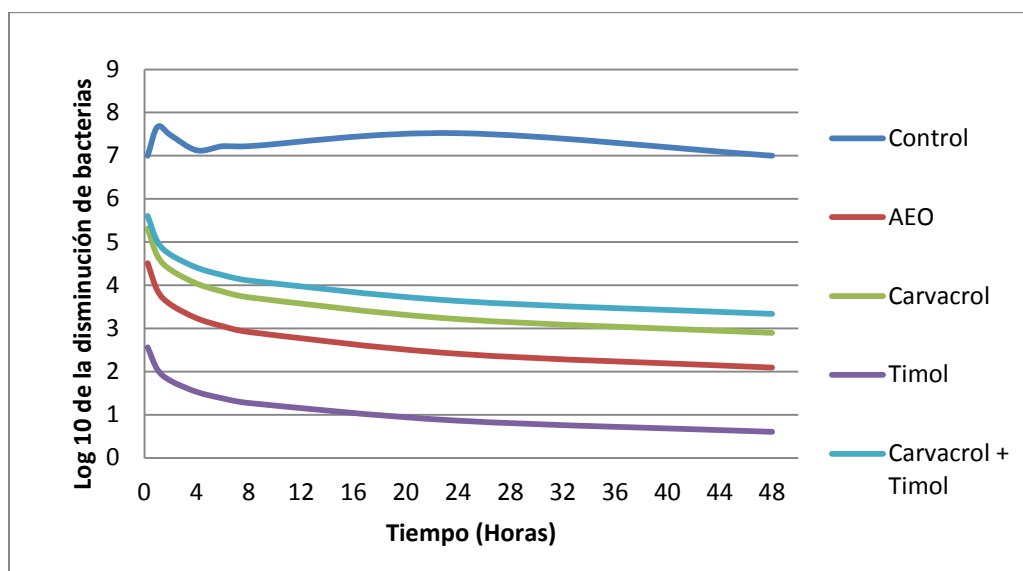


Figura 42. Logaritmos linealizados de la cinética de disminución de las bacterias por la liberación de los activos nanoencapsulados a través del tiempo.

Todas las nanopartículas cargadas con los activos, registran la disminución de bacterias al paso del tiempo, por lo que su liberación es evidente, sin embargo, al registrarse disminución de la bacteria desde los 15 minutos, la acción de los compuestos libres en el sobrenadante también afecta la inhibición, todos logran disminuir el número de bacterias en al menos un ciclo logarítmico al inicio de la prueba, la acción de los compuestos libres es la responsable de esta disminución, por lo que a pesar de no tener un alto porcentaje de encapsulación, resulta benéfico como primer recurso para la eliminación de una carga microbiana. El caso del timol es el que presenta la liberación más rápida. Se sabe que el

timol encapsulado fue más eficaz en la supresión de bacterias Gram positivas que timol no encapsulado por un período de tiempo más largo. 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 timol que estaba contenido en las nanopartículas de zeína (Bilia et al., 2014), este comportamiento fue más evidente para el AEO y carvacrol.

En general, comparando la actividad antimicrobiana del AEO, carvacrol y timol, presentan buena actividad antimicrobiana, los tres compuestos lograron inhibir visiblemente el crecimiento de *L. innocua*, se encontró que los derivados fenólicos del AEO (carvacrol y timol) tienen una mayor actividad antimicrobiana, y de estos dos, el timol es el que mejores resultados posee.

Comparando la liberación por permeación a través de las membranas de diálisis, y la liberación *in vitro* con *L. innocua*, se graficó el porcentaje de liberación contra la inhibición de la bacteria para la máxima liberación en 4 horas (Figura 43). Debido a que las liberaciones se llevaron a cabo en diferentes condiciones, la cantidad liberada y la disminución de la carga bacteriana no se ajustan a los periodos de tiempo, ya que la máxima liberación con las bolsas de diálisis fue de cuatro horas para todos los activos, mientras que con la prueba *in vitro* con *L. innocua* fue de 1 hora para el timol, 4 para el AEO, y 48 horas para el carvacrol y la mezcla carvacrol-timol, sin embargo tomando en cuenta que la inhibición aumentaba con el tiempo, y la liberación por permeación también aumenta con el tiempo, se comparó el comportamiento en las primeras 4 horas.

En la gráfica, los distintos activos muestran una disminución en el número de bacterias al aumentar el porcentaje de activo liberado dentro de las primeras 4 horas, todos los activos nanoencapsulados lograron inhibir, comparándolos, es el timol el que mayor inhibición logra, con un porcentaje de liberación similar a los demás activos, logró disminuir el número de bacterias, hasta un crecimiento de 1 a 2 ciclos logarítmicos con cerca del 70% de la liberación. El AEO, fue el segundo mejor activo, inhibió el crecimiento de la bacteria entre 3 y 4 ciclos logarítmicos, su pendiente tiene el coeficiente de correlación lineal más alto (0.9934), y abarca una mayor proporción de inhibición con 1.3 ciclos logarítmicos. El carvacrol y la mezcla de carvacrol timol, tuvieron un resultado similar, inhibieron el

crecimiento de la bacteria entre 4 y 5 ciclos logarítmicos en las primeras cuatro horas, sin embargo, lograron inhibir la totalidad de la bacteria en 48 horas.

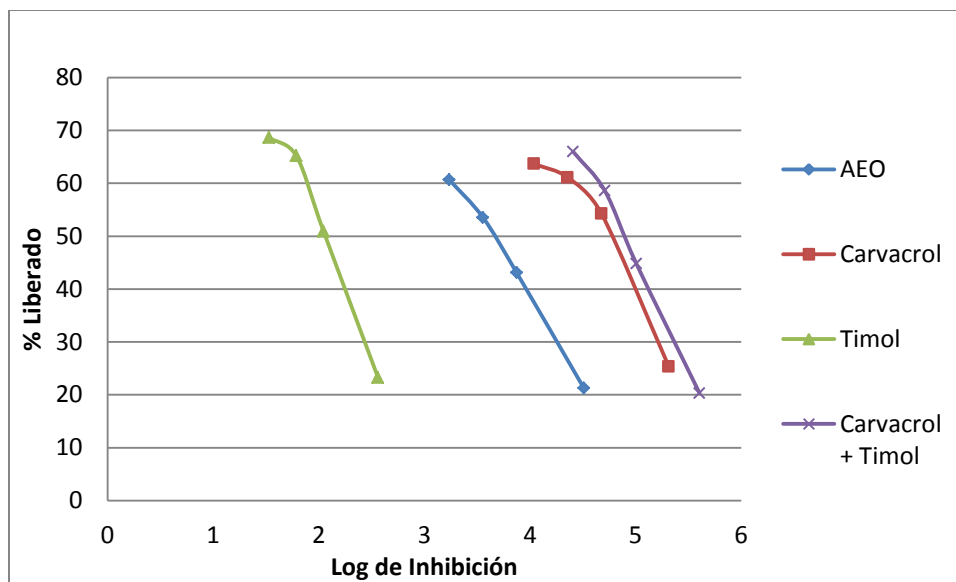


Figura 43. Comparación de las liberaciones de los activos, a través de membrana de diálisis y por inhibición de carga bacteriana.

La velocidad de liberación de los principios activos a partir de sistemas de nanopartículas puede verse afectado por la combinación de varios factores tales como las características de la matriz del polímero (espesor, porosidad, capacidad de hinchamiento), el tamaño de las nanopartículas, el lugar y la concentración del compuesto activo, las propiedades fisicoquímicas, las condiciones del medio (tipo de disolvente, pH, temperatura, fuerza iónica) donde el compuesto activo se liberara (Goncalves da Rosa et al., 2015). La significativa baja liberación de los compuestos encapsulados en zeína, se atribuye a su naturaleza hidrofóbica, que contiene muchos aminoácidos no polares, además nanopartículas elaboradas con zeína presentan una alta superficie hidrofóbica, la cual disminuye la difusión y la liberación (McClements y Decker 2009). La prueba de liberación con la bacteria, se realizó con agua, en base al carácter hidrofóbico de la zeína y de los activos que son igualmente hidrofóbicos, puede retrasar la liberación, en comparación a una liberación a través de membranas de diálisis donde se incorporó una solución de etanol-agua, la cual aceleraría la liberación de los compuestos ya que tanto la zeína, así como el AEO, carvacrol y timol, son solubles en soluciones etanol-agua.

CONCLUSIONES

- Se comparó la actividad antimicrobiana del AEO, carvacrol y timol, contra *L. innocua*, encontrando que logran inhibir a partir de 30,000 ppm, 20,000 ppm y 15,000 ppm respectivamente, en forma libre. Y nanoencapsulado, las mejores inhibiciones fueron con concentraciones de 4,000 ppm para el AEO y 5,000 para el carvacrol y timol.
- El material biológico y los tratamientos previos a la extracción, resultaron favorecedores en la obtención del aceite, ya que la humedad y el material volátil (10.21%) y la reducción de tamaño (0.3289 mm), permitieron obtener un rendimiento de 3.1% de aceite esencial de orégano.
- La estabilidad de las nanopartículas almacenadas a 3 °C es de 4 meses, la disminución de los valores de potencial Z indica que las nanopartículas de AEO, tienen una estabilidad máxima de 4 meses, las de carvacrol de aproximadamente 7 meses, timol de aproximadamente 12 meses y la mezcla carvacrol-timol de 4 meses.
- La liberación de los compuestos para inhibir por completo el crecimiento de *L. innocua* fue de 4 horas para el AEO, 48 horas para el carvacrol, 1 hora para el timol y de 48 horas para la mezcla de carvacrol-timol.
- La nanoencapsulación del aceite esencial de orégano y de sus compuestos fenólicos, otorgaron una eficacia mejorada de los activos, logrando aumentar su solubilidad, protegiéndolos de la degradación, aumenta su estabilidad, facilitan su administración y se logró disminuir su concentración para inhibir del AEO en 86%, carvacrol y timol en 83%

PROSPECTIVAS

- Evaluar la actividad antimicrobiana de más aceites esenciales con propiedades antibacterianas, como tomillo, canela y clavo, contra bacterias patógenas y alterantes en alimentos.
- Establecer la toxicidad que la nanoencapsulación otorga al AEO y a sus derivados fenólicos, y definir los mecanismos que aumentan la capacidad antimicrobiana.
- Realizar nanopartículas con otros polímeros, con características que convengan para la entrega de los activos, así como en la mejora de la actividad antibacteriana.
- Realizar pruebas *in vivo* de inhibición de las nanopartículas en distintas superficies de contacto con alimentos, para evaluar su aplicación como un agente preventivo en la proliferación de microorganismos, o como agente correctivo de acción prolongada.
- Realizar pruebas de solubilidad en agua de las nanopartículas y su posible incorporación para aplicarse en recubrimientos, películas y empaques, que mejoren sus propiedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, Salwa. «Mechanism of Biofilm formation by *Listeria monocytogenes*.» Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. Leicester, Inglaterra Marzo de (2013)
- Albado, Plaus Emilia, Flores, Gloria Saez, y Ataucusi, Sandra Gabriel. «Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano).» *Revista Medica Herediana*, 12 (1): 16-19. (2001)
- Álvarez, Clara Inés. *Manual básico de bacteriología*. 2a ed. México D.F.: México: UNAM, (2005)
- Arroyo Izlia, Hernandez Haydee, Cruz Victoria, y Jimenez Alaíde. *Determinación de compuestos fenolicos totales por espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de gases masas de extractos de orégano mexicano (lippia spp) seco y fresco*. México D.F.: V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, (Tuxtla Gutierrez, Chiapas, México) (2008)
- Ashok, Patel, y Velikov Krassimir. «Zein as a source of functional colloidal nano-and microstructures.» *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 19 (8): 450-458 (2014)
- Asmatulu Ramazan. *Nanotechnology Safety*. Primera edicion. San Diego.: Estados Unidos Elsevier, (2013)
- Aswathanarayan, Jamuna Bai, y Ravishankar Rai Vitt Vitt. «Microbial biofilms and their control by various antimicrobial strategies.» *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* 1 (13): 124-133 (2013)
- Ausina Vicente y Moreno Santiago. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica* . Primera Edicion. México: Panamericana, (2005)
- Beresford, M., Andrew P. y Shama G. «*Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments.» *Journal of Applied Microbiology*, 90 (6): 1000-1005 (2001)
- Beyth, Nurit, Yael Hourri-Haddad, Avi Domb, Wahid Khan, y Ronen Hazan. «Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials.» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20 (15): 1-16 (2015)
- Bilia, Anna, Cilizia Guccione, Benedetta Isacchi, Chiara Righeschi, Fabio Firenzuoli, y Maria Bergonzi. «Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy

- for successful Therapeutic Approach.» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 25: 1-14 (2014)
- Brooks, Geo. F. *Jawetz Melnick y adelberg: Microbiologia Medica* . México: McGraw Hill, (2011)
- Burt, Sara. «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review.» *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 223-253 (2001)
- Callejo, Raquel, Prieto Monica, Martínez Claudia, Aguerre Lorena, Rocca Florencia, y Martínez Gisela. «World Health Organization.» *WHO Global Salm Surv.* Mayo de 2013.
http://bvs.panalimentos.org/local/file/Manual_Listeria_monocytogenes_2008.pdf.
- Calvo, Jorge, y Martínez Luis. «Mecanismos de acción de los antimicrobianos.» *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (1): 44-52 (2009)
- Carpentier, Brigitte, y Cref Oliver. «Review. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises.» *International Journal of Foos Microbiology* 145 (5): 1-8 (2011)
- Castañeda, Ruelas Gloria, Campos Carlos Eslava, y del Camp Nohelia Castro. «Listeriosis en México: importancia Clínica y epidemiológica.» *Salud Publica en México*, 56 (6): 654-659 (2014)
- Castrillón, Laura, y Palma Alejandro. «Actividad antimicótica de nanopartículas.» *Mundo Nano* 7 (12): 6-18 (2014)
- Centre for Health Protection. «Deprment of Health.» *Hong Kong Special Administrative Region*. Julio 2010.
http://www.chp.gov.hk/files/pdf/epidemiology_of_listeriosis_and_prevention_strategies_r.pdf.
- Chellaram, C., G. Murugaboopathi, R. Sivakumar, S. Ganesan, S. Krithika, y G. Priya. «Significance of Nanotechnology in Food Industry.» *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society* : Elsevier, 8: 109-113 (2014)
- Cioffi Nicola, y Rai Mahendra. *Nano-Antimicrobials*. Primera Edicion. Londres.: Inglaterra. Springer, (2012)
- Comisión Nacional Forestal. «Comisión Nacional Forestal.» *Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico Gerencia de Desarrollo y Transferencia de Tecnología* . 29 de Septiembre de 2009. www.conafor.gob.mx.

- Connors, Kenneth. *Curso de análisis farmacéutico*. Segunda Edición. Barcelona.: España Reverté, (1981)
- Corella, Rubén, y Ortega María. «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 (2013)
- Corlett, Donald A. *HACCP User's Manual*. Springer Science & Business Media, Estados Unidos (1998)
- da Silva, Eliane Pereira y Elaine Cristina Pereira De Martinis. «Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*.» *Appl Microbiol Biotechnology*, 97 (3): 957-968 (2013)
- Dando, William A. *Food and Famine in the 21st Century*. ABC-CICLO, Londres Inglaterra (2012)
- Da-Wen Sun. *Emerging Technologies for Food Processing*. 1. San Diego.: Estados Unidos Elsevier (2014)
- Denyer, S., y B. Hugo. *Mechanisms of action of Chemical Biocides: Their Study and Exploration*. Estados Unidos. Primera Edición. Wiley, (1991)
- Díaz del Castillo Rodríguez, Felipe. *Introducción a los nanomateriales*. Cautitlán Izcalli, UNAM.: México (2012)
- Díaz Morato, Consuelo, y Soledad Pérez Coello. «Análisis de los compuestos responsables del aroma de las especias.» *Investigación Química*, 102 (3): 31-35 (2006)
- Dzienciol, Monika, Elisa Schornsteiner, Meryem Muhter, Beatrix Stessl, Martin Wagner, y Stephan Schmitz. «Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated food processing environment.» *International Journal of Food Microbiology*, 16 (233): 33-40 (2016)
- El Asbahani, A., y otros. «Essential oils: From extraction to encapsulation.» *International Journal of Pharmaceutics*. 10 (483): 220-243 (2015)
- ESA. «Comisión del CODEX Alimentarius.» 14 de Enero de 2013. ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccsch/ccsch1/sc01_03s.pdf (último acceso: 22 de Abril de 2016).
- Espinal, Georgina. *Manual de Prácticas de Microbiología I*. Primera edición. Santo Domingo. México BUHO, (2005)

- Esquivel, Andrea . «Desarrollo y caracterización de nanopartículas a base de zeína estabilizadas con pectina y lactoglobulina.» Tesis para obtener el grado de M.C. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro, México (2013)
- Facultad de química, UNAM . «Facultad de Química .» 02 de 02 de 2016. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf.
- Falcone, P B. Speranza, D. Nobile, M. Corbo, y M. Sinigaglia. «A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative.» *Journal of food protection*. 68 (8): 1664-1670 (2005)
- Faleiro, M.L. «The mode of antibacterial action of essential oils .» *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 8 (5): 1143-1156 (2011)
- FAO/OMS . *Higiene de los alimentos*. Roma.: Italia FAO y OMS , (2009)
- Ferreira, C., Pereira A., Melo L., y Simões M.. «Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology.» *Science and Technology Foundation*, Portugal. 26, (2): 845-854 (2010)
- Food & Agriculture Org. *Risk Assessment of Listeria Monocytogenes in Ready-to-eat Foods: Technical Report*. Roma.: Italia. Food & Agriculture Org. (2004)
- Ford Michael . *Medical Microbiology* . Primera Edicion New York.: Estados Unidos Oxford University Press, (2010)
- Fratamico, Pina. Bassam M., Annous A. y Nereus W. Gunther. *Biofilms in the food and beverage industries*. Primera Edicion. Estados Unidos Woodhead Publishing , 2009.
- Gallocchio, Federica, Simone Belluco, y Antonia Ricci. «Nanotechnology and food: brief overview of the current scenario .» Elsevier, 2015.
- García , R.M., y E. Palou. «Mecanismos de acción antimicrobiana del timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos .» *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 2: 41-51 (2008)
- García Hurtado, María. *Higiene general en la industria alimentaria*. Primera Edicion. México IC Editorial, (2013)
- Garza, Raúl, Silva Teresa, y Hernández Luciano. «Facultad de Química UNAM.» *Bacteriología*. 2002. <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>.

- Giaouris, Efstathios, y otros. «Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods.» *Meat Science*, 97 (83): 298-309 (2014)
- Gómez Gaete, Carolina . «NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS.» *Sociedad de Farmacología de Chile*. 7 (2): 7-16 (2014)
- Gómez, A.I., y A. López. «Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*).» *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3 (1): 33-45 (2009)
- Gomez, J., M. Balaguer, R. Gavara, y P. Hernandez. «Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active curcumin.» *Food Hydrocolloids*, 7 (28):82-91 (2012)
- Goncalves da Rosa, Cleonice, y otros. «Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes.» *Colloids and Surfaces A: Physicochem and Engineering Aspects*, 4. (481): 337-344 (2015)
- Granados, Diódoro, Martínez Martín, López Georgina, Borja Amparo, y Rodríguez Gabriel «Ecología, aprovechamiento y comercialización del orégano (*Lippia graveolens* H.)» *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales* y, 9 (2): 305-321 (2013)
- Hatton, Fiona. *Hyperbranched Polydendrons*. Primera Edición. Liverpool.: (Inglaterra) Springer, (2015)
- HBD Halkman. «Indicator Organisms.» *Encyclopedia of Food Microbiology*, editado por Carl A. Batt y Mary-Lou Tortorello, 358-363. London.: Reino Unido Elsevier, (2014).
- Helander, M., y otros. «Characterization of the action of selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (9): 3590-3595 (1998)
- Indiamart. *Indiamart*. 27 de Abril de 2016.
<http://www.indiamart.com/bhawaniindustry/laboratory-apparatus.html>.
- Juven, B.J., J. Kanner, F. Schved, y H. WEisslowicz. «Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents.» *Journal of Applied Bacteriology*, 76 (6): 626-631 (1994)

- Kaihara, Sachiko, y Keiji Numata. «Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering.» *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (3): 1629-1654 (2013)
- Kintzios E, Spiridion. *Oregano The genera Origanum and Lippia*. New York: Estados Unidos. Taylor & Francis, (2002)
- Kishen, Anil. *Nanotechnology in Endodontics*. Primera Edición. Toronto: Estados Unidos Springer, (2015)
- Koneman, Elmer W. *Diagnóstico Microbiológico*. Primera edición: México. Médica Panamericana, (1997)
- Lambert, R., Skandami P. Coote P, y Nycha G. «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 (2001)
- Lambert, R.J.W., y Pearson J. «Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MCI) and non-inhibitory concentration (NIC) values.» *Journal of Applied Microbiology*, 88 (5): 784-7990 (2009)
- Luo, Yangchao, y Qin Wang. «Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery: A Review.» *Journal of Applied Polymer Science*, 10: 1-12 (2014)
- Manual de la OIE sobre animales terrestres . «Organización Mundial de Sanidad Animal .» 26 de Noviembre de 2004.
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogenes.pdf
- Marriott, Norman G. *Principios de higiene alimentaria*. España Acribia, (2003)
- Martínez Valencia, Biaani Beu, Alfredo Zamarripa Colmenero, José Luis Solís Bonilla, y Lexi Javivi López Angel. «SAGARPA.» Noviembre de 2011.
<http://www.bioenergeticos.gob.mx/wp-content/uploads/2015/06/CALIDAD-FISICOQUIMICA-DE-INSUMOS-BIOENERGETICOS-PARA-LA-PRODUCCION-DE-BIODIESEL-EN-MEXICO.pdf> (último acceso: Febrero de 2016).
- McCabe, Warren L. *Operaciones unitarias en ingeniería química*. Séptima Edición México D.F.: McGraw-Hill, (2007)
- McClements, Julian, y Eric Decker. *Designing functional foods Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption*. Primera Edición. Reino Unido Cambridge: CRC Press, (2009)

- McMurry, John. *Química orgánica*. Octava Edición. México D.F.: Cengage Learning, (2012)
- Muñoz, Amner. «Estudio de especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, trans-anetol o estragol y empleo de fenoles y sus derivados en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas y evaluación de sus actividades biológicas.» Santander : Univesidad Industrial de Santander. España, (2010)
- Myszka, Kamila, y Katarzyna Czaczyk. «Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces - a Review.» *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 61 (3): 175-180 (2011)
- Navia, Diana Paola, Hector Samuel Villada, y Silvio Andrés Mosquera. «Las Biopelículas en la industria de alimentos.» *Facultad de Ciencias Agropecuaria*. 8 (2):118-127 (2010)
- NMX-F-074-SCFI-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.» 2011.
- NMX-F-075-SCFI-2012. «Alimentos-Aceites y grasas vegetales o animales Determinación de la densidad relativa - Método de prueba.» 2012.
- NMX-F-211-1987. «www.colpos.mx» 02 de Septiembre de 2008. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-211-1987.PDF>.
- NOM-091-SSA1-1994 «Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.» <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/091ssa14.html>
- NOM-121-SSA1-1994 «Bienes y servicios. Quesos: Frescos, Maduros y Procesados. especificaciones sanitarias.» <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>
- NOM-121-SSA1-1994 «Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.» <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>
- Olivares, M. A., y A. López. «Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor.» *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*. 7 (1): 78-86 (2013)
- Ortuño, Manuel. *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Primera. España Edición: AIYANA, 2006.

- Paraje, M.G. «Antimicrobial resistance in biofilms .» *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances 2*: 736-744. (2011)
- Parris, Nicholas, Peter H. Cooke, y Kevin Hicks. «Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (12): 4788-4792. (2005)
- Pascual, María del Rosario, y Vicente Calderón . *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid España: Ediciones Díaz Santos, 1999.
- Pérez, E.P, y Malo A. López . «Tecnologías involucradas en el procesamiento mínimo de frutas y hortalizas .» *Temas selectos de Ingenieria de Alimentos*. 5 (2): 13-27 (2011)
- Pino, Francisco A., y Justo Zamora. «Listeriosis de origen Alimentario.» *Revista RECITEIA*, 6 (2): 3-11(2006)
- Primo Yúfera, Eduardo. *Química orgánica básica y aplicada. De la molecula a la industria*. Barcelona España: Reverté, 1995.
- Public Health. *Public Health*. 2009.
http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/es/index.htm#3 (último acceso: 23 de Marzo de 2016).
- Puig-Durán, Fresco J. *Ingeniería autocontrol y auditoría de la higiene en la industria alimentaria*. MUNDI-PRENSA, España 1999.
- Rai, Mahendra, y Kateryna Kon. *Fighting multdrug resistance with herbal extracts, Essential oils and their components*. Primera Edicion Londres.: Inglaterra Academic Press, (2013)
- Ravishankar Rai. *Advances in Food Biotechnology*. Primera Edicion. Reino Unido Mysore: Wiley Blackwell, (2016)
- Reyes, F, Palou E. y López A. «Métodos de evaluacion de la actividad antimicrobiana y de determinacion de los componentes químicos de los aceites esenciales .» *Temas selectos de Ingenieria de Alimentos*. 8 (1): 68-78 (2014)
- Rosas, Marcela, Francisco Solís, Catalina Cervantes, Caludia Ortega, y Erika Romero. «Control sanitario en la preparación de alimentos en el centro de internamiento Especial para Adolescentes (CIEPA), de la poblacion de Palmasola Municipio de Alto Lucero Veracruz México.» *Revista Medica UV* 19 (4): 32-36 (2012)
- Ryman, Danièle. *Aromaterapia. Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales*. Barcelona.: España Kairós, (1994)

- Ryser, Elliont T., y Elmer H. Marth. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. CRC Press. Estados Unidos (2007)
- Sánchez, Barrera Alejandra . *Toxicidad aguda en Artemia franciscana Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especias*. Cuautitlán Izcalli. México: UNAM, Tesis para obtener el grado de QFB. (2015)
- Santos, C, Albuquerque R., Sampaio C, y Keyson D. «Nanomaterials with Antimicrobial Properties: Applications in Health Sciences .» *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 1 (2): 143-154 (2013)
- São, Pedro A., Santo I. Espirito, Silva C, Detoni C y Albuquerque E «The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity.» *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* 6 (3): 1364-1374 (2013)
- Schöbitz, Renate, Luigi Ciampi, y Yanina Nahuelquin. «Listeria monocytogenes Un peligro latente para la industria alimentaria», *Agro Sur* 37 (1): 1-8 (2009)
- Shahraz, Mohammed Shahraz. «*Listeria monocytogenes* - Understanding the interaction of pathogen and host physiology during intracellular growth.» *A thesis submitted to the University of Manchester for the degree of Doctor of Philosophy in the School of Chemical Engineering and Analytical Science*. Reino Unido (2013)
- Shekunov, Boris Y., Pratibhash Chattopadhyay, Henry H. Y. Tong, y Albert H. L. Chow. «Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications.» *Pharmaceutical Research*, 24: 203-227 (2007)
- Shukla, Rishi, y Munir Cheryan. «Zein: the industrial protein from corn.» *Industrial crops and products*. 13 (5): 171-192 (2001)
- Simues, Mmanuel, y Filipe Mergulhco. *Biofilms in bioengineering*. Nova Science Publishers, Portugal (2013)
- Soto , Chilaca G., y Malo A. López . «Nanotecnología en alimentos .» *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5 (1): 11-21 (2011)
- Spinridon E. Kintzios . *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. CRC Press, Estados Unidos (2003)
- Stefano Padulosi, International Plant Genetic Resources Institute. *Oregano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*, 8. Bioersity International, Italia (1997)

- Suresh, Anil. *Co-Relating Metallic Nanoparticle Characteristics and Bacterial Toxicity*. Primera Edición New York.: Estados Unidos. Springer, (2015)
- The Center for Food Security & Public Health. «Iowa State University.» *Institute for International Cooperation in Animal Biologics*. Mayo de (2005). <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>.
- Torrenegra, Miladys, Granados Clemente, Osorio María «Comparación de la Hidrodestilación asistida por Radiación de microondas (MWHd) con Hidrodestilación convencional (HD) en la extracción de Aceite Esencial de *Minthodtachys mollis*.» *Información Tecnológica*. 26 (1): 117-122 (2015)
- Trachoo, Nathanon. «Biofilms and the food industry.» *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 25 (6):807-815 (2003)
- Ultee, A., M. Bennik, y R. Moezelaar. «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. (2002)
- Vanegas, María , Nancy Correa, Ana Morales, Aída Martínez , Laura Rúgeles, y Francy Jiménez . «Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos .» *Revista MVZ Córdoba*, 14 (2): 1677-1683 (2009)
- Vega Portocarrero, E, y A López Malo. «Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas.» *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3 (1): 85-95 (2009)
- Velásques, Carlos, y Acevedo Carlos. «Procedimiento para deshidratación de orégano utilizando gas propano como combustible» *Tecno Lógicas*. 17 (33): 13-20 (2014)
- Vian, Ángel, y Joaquín Ocón . *Elementos de Ingeniería Química* . Quinta. Madrid.: España Aguilar, 1979.
- Wilbrett , Gerhard, y Escobar Jaime. *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. México. Acribia, (2000)
- X-Rite, Incorporated. «X-Rite.» 2002. http://www.mcolorcontrol.com/archivos/L10-001_Understand_Color_es.pdf (último acceso: 19 de Abril de 2016).
- Xue, Jia. «Essential Oil Nanoemulsions Prepared with Natural Emulsifiers for Improved Food Safety.» *University of Tennessee, Knoxville Trace: Tennessee Research and Creative Exchange*. Doctoral DissertationsTennessee, Knoxville, Estados Unidos Mayo de 2015.

- Yangchao, Lou, y Wang Qin. «Zein-Based Micro - and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery : A Review.» *Journal of Applied Polymer Science*, 10 (2): 1-12 (2014)
- Yates, Adèle. «Food Standards Australia New Zealand.» *Agents of foodborne illness*. 20 de Julio de 2013.
<http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/listeria2.pdf>.
- Yunpeng, Wu, Lou Yaguang, y Quin Wang. «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 (2012)

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica del aceite esencial de orégano



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA
HERBARIO IZTACALA



FESI/HI/027/2016

JOSÉ DELBERT MENDOZA ZAVALETA

Alumno de la Carrera de Ingeniería en Alimentos
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM
Presente

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del Proyecto de Tesis de Licenciatura "Comparación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia graveolens* Kunth (VERBENACEAE) (Orégano) y sus derivados fenólicos nanoencapsulados sobre *Listeria innocua*", que se realiza en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Dra. Clara Inés Álvarez Manrique.

Así mismo, le informo que la planta ha sido integrada en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

Nombre Científico	Familia Botánica	Nombre Popular	No. de Registro
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	VERBENACEAE	"Orégano"	2516 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 4 de agosto 2016

M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
Responsable del Herbario IZTA



C.c.p.- Dra. Clara Inés Álvarez Manrique
Directora de Tesis, FES Cuautitlán, UNAM

Av. De los Baños No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepanlta, Estado de México,
C.P. 54090. A. P. 314. Tel/Fax: 5223-1378.
herbario_izta@campus.iztacala.unam.mx

Figura 44. Certificado de la identificación taxonómica del orégano

Anexo 2. Apartado del comparativo de las cartas de Munsell

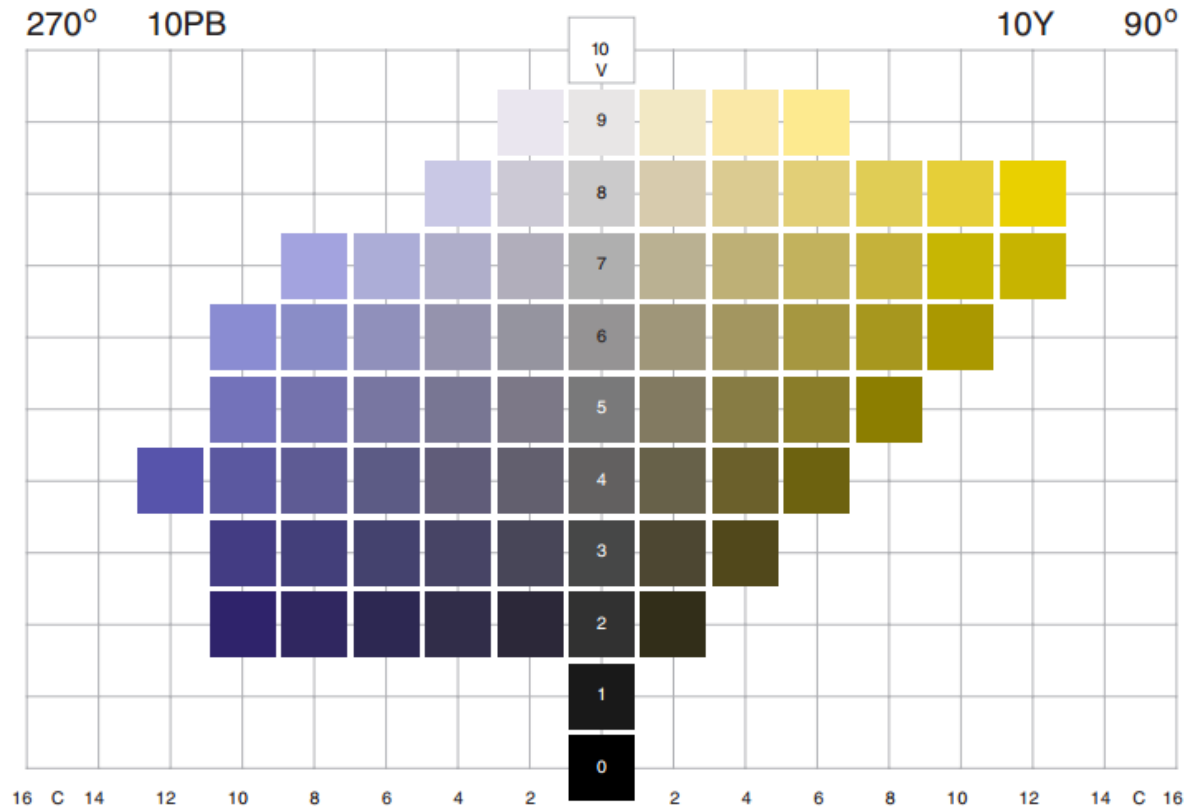


Figura 45. Tablilla de las cartas de Munsell

Anexo 3. Elaboración de las curvas patrón para el AEO, carvacrol y timol.

Espectros de absorción, para determinar la longitud de onda máxima de absorción del AEO, carvacrol y timol.

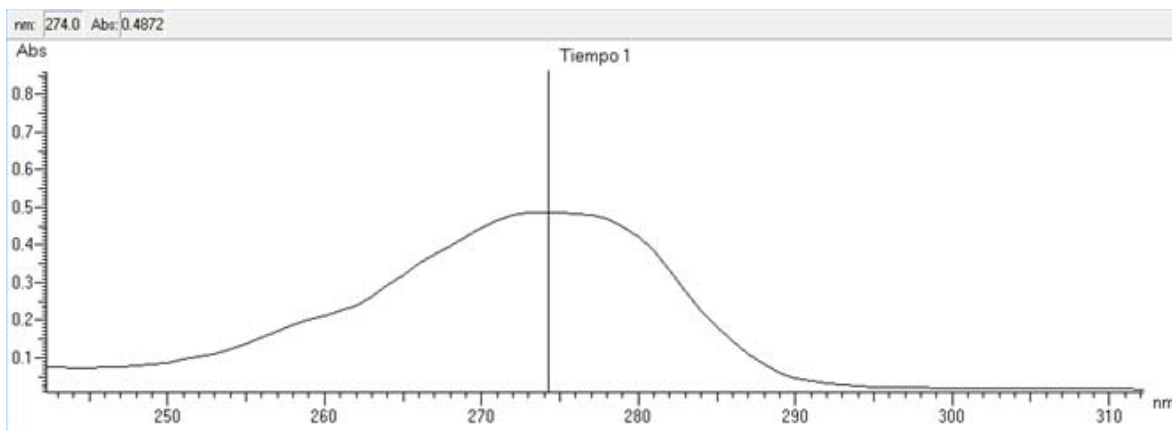


Figura 46. Espectrograma de absorción del AEO entre 250 y 310 nm. Longitud de onda máxima de absorción = 274.0 nm.

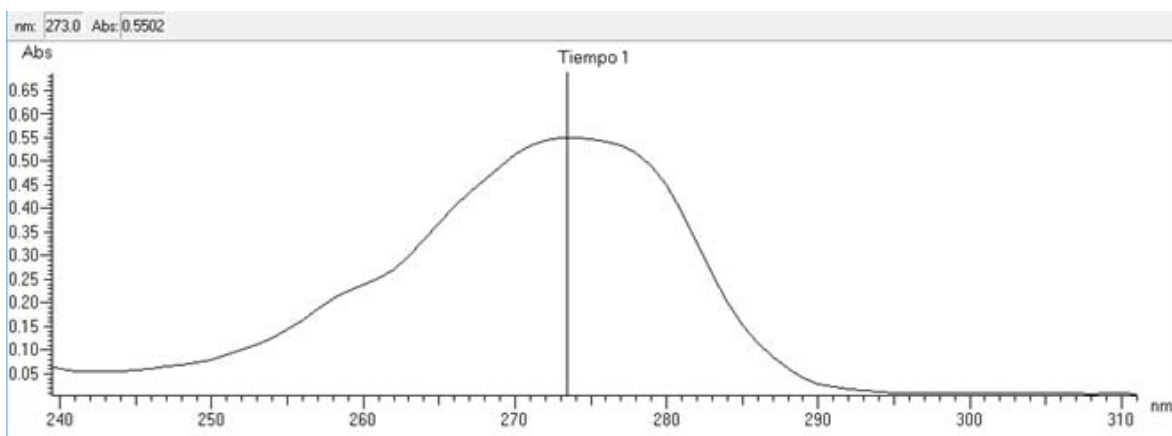


Figura 47. Espectrograma de absorción del Carvacrol entre 240 y 310 nm. Longitud de onda máxima de absorción = 273.0 nm.

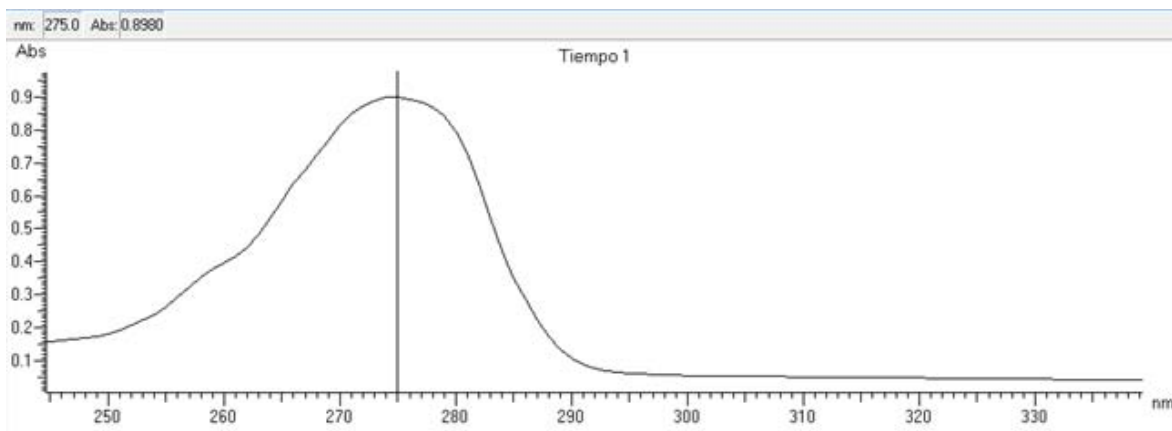


Figura 48. Espectrograma de absorción del Timol entre 245 y 335 nm. Longitud de onda máxima de absorción = 275.0 nm.

Anexo 4. Creación de la curva patrón a partir de soluciones de distinta concentración (10, 15, 20, 25 y 30 $\mu\text{g/ml}$), con la longitud de onda de cada activo, para realizar las lecturas de absorbancia. Y análisis estadístico mediante una prueba *t* de Student, que indico que no existía diferencia significativa entre los grupos de repeticiones para cada activo.

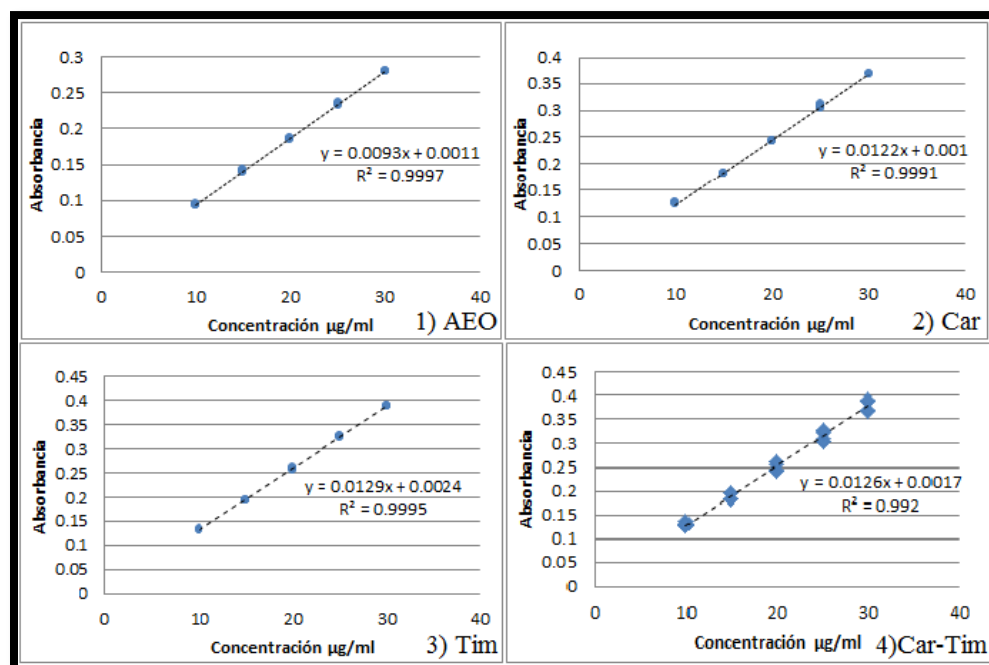


Figura 49. Curvas patrón y la ecuación de la recta, para el cálculo de concentración por espectrofotometría UV, del: Aceite esencial de orégano1) AEO, Carvacrol 2) Car, Timol 3) Tim, y la mezcla carvacrol timol 4) Car-Tim.

Tabla 25 Prueba F para varianzas de dos muestras para el AEO

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.00932789	0.00937876
Varianza	1.5143E-08	5.3349E-09
Observaciones	15	15
Grados de libertad	14	14
F	2.83856298	
P(F<=f) una cola	0.03025454	
Valor crítico para F (una cola)	2.48372574	
Valor crítico < F Varianzas diferentes		

Tabla 26. Prueba t del AEO para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.00937876	0.00932789
Varianza	5.3349E-09	1.5143E-08
Observaciones	15	15
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	23	
Estadístico t	1.3766755	
P(T<=t) una cola	0.09093356	
Valor crítico de t (una cola)	1.71387153	
P(T<=t) dos colas	0.18186711	
Valor crítico de t (dos colas)	2.06865761	
T obtenido < T crítico		
No existe diferencia		

Tabla 27. Prueba F para varianzas de dos muestras para el carvacrol

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.012307	0.012302
Varianza	3.67E-08	3.53E-08
Observaciones	15	15

Grados de libertad	14	14
F	1.038738	
P(F<=f) una cola	0.472158	
Valor crítico para F (una cola)	2.483726	
Valor crítico>F varianzas iguales		

Tabla 28. Prueba t del carvacrol para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.012307	0.012302
Varianza	3.67E-08	3.53E-08
Observaciones	15	15
Varianza agrupada	3.6E-08	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	28	
Estadístico t	0.081132	
P(T<=t) una cola	0.467957	
Valor crítico de t (una cola)	1.701131	
P(T<=t) dos colas	0.935914	
Valor crítico de t (dos colas)	2.048407	
T obtenido < T crítico		
No existe diferencia		

Tabla 29. Prueba F para varianzas de dos muestras para el timol

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.012922	0.013034
Varianza	5.46E-08	2.74E-08
Observaciones	15	15
Grados de libertad	14	14
F	1.99354	
P(F<=f) una cola	0.104583	
Valor crítico para F (una cola)	2.483726	
Valor crítico>F Varianzas iguales		

Tabla 30. Prueba t del Timol para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.013034	0.012922
Varianza	2.74E-08	5.46E-08
Observaciones	15	15
Varianza agrupada	4.1E-08	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	28	
Estadístico t	1.524738	
P(T<=t) una cola	0.069271	
Valor crítico de t (una cola)	1.701131	
P(T<=t) dos colas	0.138541	
Valor crítico de t (dos colas)	2.048407	
T obtenido < T crítico		
No existe diferencia		

Tabla 31. Prueba F para varianzas de dos muestras para el carvacrol + timol

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.24646667	0.25705333
Varianza	0.00837526	0.0082277
Observaciones	15	15
Grados de libertad	14	14
F	1.01793467	
P(F<=f) una cola	0.48697004	
Valor crítico para F (una cola)	2.48372574	
Valor crítico>F Varianzas iguales		

Tabla 32. Prueba t del carvacrol + timol para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0.25705333	0.24646667
Varianza	0.0082277	0.00837526
Observaciones	15	15
Varianza agrupada	0.00830148	
Diferencia hipotética de las medias	0	

Grados de libertad	28
Estadístico t	0.31820871
P(T<=t) una cola	0.37634397
Valor crítico de t (una cola)	1.70113093
P(T<=t) dos colas	0.75268794
Valor crítico de t (dos colas)	2.04840714
T obtenido < T critico	
No existe diferencia	