

NANO-EMULSIFICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL Y RETICULACIÓN IÓNICA COMO ESTRATEGIA DUAL DE ENCAPSULACIÓN: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-MICROBIANA

Pérez-Calderón, John^a; Orjuela-Palacio Juliana^a Giménez, Belén^a; Zaritzky Noemí^{a,b}

^aCentro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos CIDCA (UNLP-CONICET-CIC). La Plata, CP: 1900, Argentina. ^bDepto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, CP: 1900, Argentina.
jperezcalderon@ext.ing.unlp.edu.ar.com

1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones de procesamiento y conservación de los alimentos influyen fuertemente para que estos pueden constituir un vehículo de agentes perjudiciales que afectan la salud humana, [1]. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en economías desarrolladas y emergentes. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud han centrado esfuerzos en generar las medidas pertinentes por el aumento en la incidencia de estas enfermedades. Una problemática actual que varios gobiernos e instituciones público/privadas han mostrado interés en atender la listeriosis, la cual es transmitida por la *Listeria monocytogenes*, bacteria patógena Gram-positiva. La listeriosis es una de las ETA de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico [2]. *Listeria monocytogenes* es un microorganismo ubicuo que sobrevive mucho tiempo en los alimentos, por lo cual constituye una gran preocupación para la industria agroalimentaria, por este motivo investigar en el control de este patógeno es de interés para la tecnología e higiene de los alimentos. Para evitar la contaminación con dicho patógeno se emplean inhibidores microbianos de origen sintético, pero dichos compuestos pueden ser tóxicos produciendo problemas en la salud humana; por tal motivo el uso de metabolitos secundarios de las plantas (sustancias bioactivas de origen naturales) es una alternativa para tratar este problema [3]. Dentro de los compuestos bioactivos se encuentran los aceites esenciales.

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie de amplia distribución siendo el bulbo la parte consumida. A este vegetal se le ha atribuido importantes efectos benéficos debido a la presencia de compuestos organosulfurados los cuales se encuentran en el aceite esencial [4]. El disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo, disulfuro de alilo y disulfuro de propilo, entre otros son los compuestos que se pueden encontrar en el aceite esencial de ajo; por esa razón el aceite esencial de ajo posee mayor actividad antimicrobiana, antimutagénica y anticancerígenas en comparación a los extractos acuosos de ajo [5]. Sin embargo, las limitaciones de usar el aceite esencial de ajo industrialmente se deben a su volatilidad, fuerte olor, insolubilidad en agua y su baja estabilidad fisicoquímica susceptible a la degradación foto-oxidativa [6,7]. Por lo tanto establecer estrategias de encapsulación que aseguren la disponibilidad del aceite esencial de ajo para posteriores aplicaciones es un tema de interés.

El quitosano (Q) es un polímero biodegradable con baja toxicidad, alta capacidad de encapsulación y liberación controlada [8]. Por estas razones se usa frecuentemente como biopolímero susceptible a formar nano y micro encapsulados por medio de reacciones de reticulación iónica utilizando tripolifosfato de sodio (TPP) [9] permitiendo la encapsulación [10]. La limitación de esta metodología surge en la naturaleza de los compuestos bioactivos a encapsular, la cual debe ser polar. En el caso del aceite esencial de ajo, su naturaleza apolar y consecuente baja solubilidad en medios acuosos hace necesario generar una etapa previa de

nano-emulsificación. El objetivo de este trabajo consistió en establecer una metodología de dos pasos consecutivos para encapsular aceite esencial de ajo emulsionado en una matriz de Q-TPP. Por otra parte, se planteó la caracterización fisicoquímica del sistema obtenido y la evaluación de su efectividad en el control microbiológico de la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*.

Palabras Claves: Aceite esencial de ajo, quitosano, nanoencapsulación, listeria

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de ajo frente a *Listeria monocytogenes*

La dosis de aceite esencial de ajo usada en el proceso de encapsulación se seleccionó en base a previa determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a *L. monocytogenes*. Para esto se partió del cultivo puro del microorganismo crecido en agar nutritivo; posteriormente las suspensiones bacterianas se dispusieron en solución fisiológica. Se ensayaron diferentes muestras seriadas de aceite esencial de ajo (AEA) variando la dosis entre los rangos de 0,02 – 11,214 g AEA / L. Los diferentes tubos de ensayo inoculados se incubaron a 37°C durante 24 y 48 h. La CMI representa la muestra que menor dosis de aceite esencial de ajo produce inhibición de la bacteria, hecho evidenciado por la no generación de turbidez en el tubo de ensayo (resultado positivo +), además de comprobación por crecimiento en placa.

2.2. Formación del sistema nano-encapsulado de aceite esencial de ajo

La nano-encapsulación del aceite esencial de ajo se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se formuló una emulsión O/W constituida por 100 mL de solución de Q al 1 % (p/v) y una dosis determinada de aceite esencial de ajo según la CMI establecida, como emulsificante se empleó 0,16 g de Tween 80. El proceso de emulsificación se llevó a cabo empleando un homogenizador de alta velocidad (IKA, Alemania) mezclando los componentes (10 min-13500 rev/min). Posteriormente la pre-emulsión se sometió a ultra-sonicación (750 W-40 %) usando una punta sonicadora (Onmi, Estados Unidos) durante 5 min. La segunda etapa (Figura 1) consistió en adicionar TPP a la emulsión O/W formada, partiendo de una solución de 0,5 % (p/v); la proporción Q-TPP ensayada fue 74-26 (m:m). (Figura1)

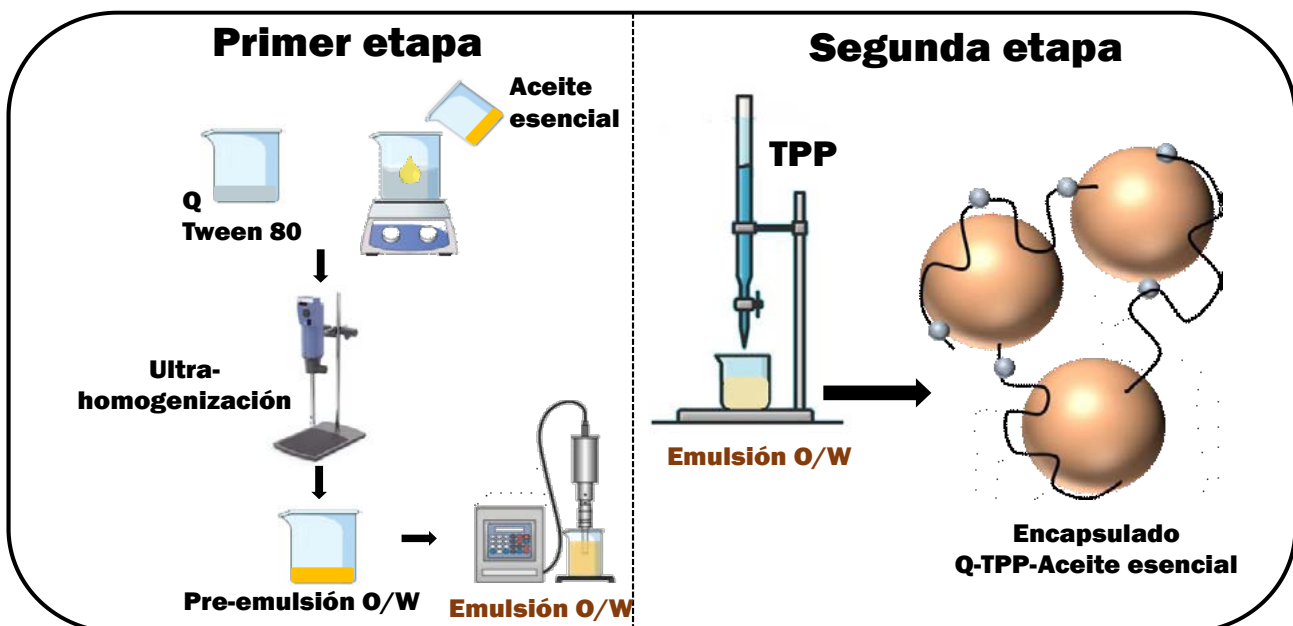


Figura 1. Metodología experimental para la obtención del sistema encapsulado de aceite esencial de ajo.

2.3. Caracterización del sistema nano-encapsulado de aceite esencial de ajo

El diámetro hidrodinámico de las gotas de aceite esencial de ajo en la emulsión O/W y el de las nanopartículas formadas se determinó por dispersión dinámica de luz usando un Nanoparticle Analyzer SZ-100-Z (Horiba, Japon). Asimismo, el potencial-Z se estableció por movilidad electroforética empleando un Nanoparticle Analyzer SZ-100-Z (Horiba, Japon) operado a 532 nm usando una celda con electrodo de carbono de 6 mm.

Para estudiar la cinética de obtención de los sistemas se usó un analizador óptico vertical de barrido (Quick Scan Beckman Coulter Fullerton, USA) el cual permite obtener perfiles de retrodispersión de la luz (%) en función de la posición de la celda de medición (cm). La caracterización estructural se llevó a cabo usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) acoplado un accesorio de reflexión total atenuada (ATR).

2.4. Capacidad de encapsulación

La capacidad de encapsulación del sistema se determinó según protocolo propuesto por Tavares y col., [11]. Para esto se partió de 10 mg del sistema encapsulado Q-TPP-aceite esencial de ajo (muestra seca), el cual se disolvió y mantuvo en agitación durante 10 minutos usando 40 mL de etanol durante. Finalmente, la mezcla se sometió a ultra-sonicación (750 W-40 % 10 minutos). La suspensión resultante se centrifugó a 2500 rev/min. Partiendo del sobrenadante obtenido se cuantificó la cantidad de aceite esencial de ajo por medio de espectrofotometría- UV a 220 nm usando un espectro U-1900 Hitachi UV-VIS (HITACHI, Japón). Con los resultados obtenidos se determinó la capacidad de encapsulación del sistema. La capacidad de encapsulación (Ec%) se calculó usando la ecuación 1 donde M_i es la cantidad de aceite esencial presente en el sistema encapsulado y M_0 es la concentración inicial usado en la formulación de la O/W.

$$Ec\% = \frac{M_i}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

2.5. Evaluación *in-vitro* del efecto antimicrobiano

La actividad antimicrobiana del sistema encapsulado Q-TPP- aceite esencial de ajo frente a *L. monocytogenes* se ensayó mediante el método de difusión en disco. Se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* (cepa L261, provista por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP), la cual previamente fue activada; para esto de la muestra descongelada se tomó 1mL del cultivo el cual se sembró en un tubo con TSB (caldo triptona soja), posteriormente se inculó por 24 h a 37°C. Al día siguiente, se tomó 1 mL del caldo crecido y se sembró nuevamente en un tubo con TSB. Se realizaron 3 repiques. Luego se procedió a inocular con 1 mL de la suspensión de una concentración de 10^8 UFC/mL en cajas de Petri (D= 90 mm) con medio PALCAM. Para la preparación del medio, este fue completamente disuelto y esterilizado; después de enfriar, se añadió asépticamente al medio el contenido rehidratado de un vial de suplemento selectivo de Listeria (PALCAM) que contenía polimixina B, acriflavina y ceftazidima.

El ensayo de difusión consistió en colocar sobre el medio inoculado, discos de papel filtro (D= 30mm) embebidos con 1 mL de la suspensión de encapsulado. Se colocaron 3 discos por cada caja de petri dispuestos equidistantemente. Se llevó a incubación a 37 °C durante 24-48 h y se midieron los halos de inhibición formados usando programa Image J

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de la emulsión O/W

La primera etapa de síntesis del sistema encapsulado consistió en la formulación de la emulsión O/W (Figura 1, etapa 1). Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de ajo. La Tabla 1 muestra que los rangos de dosis ensayada. Entre las dosis de 11,214 a 0,541 g aceite esencial de ajo /L se presentó inhibición de *L. monocytogenes* (resultados positivos). Posteriormente se sembró en placa el microorganismo (UFC X 10^6) y se comprobó

que la dosis de 0,514 g aceite esencial de ajo /L corresponde a la CMI.

Tabla 1. Dosis de suspensiones de aceite esencial de ajo (AEA) para la inhibición de *L.monocytogenes*. [+] corresponde a inhibición, [-] a no inhibición

Dosis (g AEA / L)	11,214	2,175	1,628	1,083	0,812	0,541	0,108	0,054	0,022
Resultado	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]	[-]	[-]	[-]

Partiendo de la CMI determinada, se elaboró la emulsión O/W (punto 2.2) utilizando una solución de quitosano y como emulsificante Tween 80. La emulsión resultante se caracterizó determinando el diámetro hidrodinámico de las gotas de aceite por medio de DLS siendo 178 (DE=5) nm. El potencial-Z del sistema emulsionado fue +39,7 (DE=1,8) mV, esto se debe a las cargas positivas aportadas por el quitosano ya que este es un biopolímero policationico [9].

3.2. Proceso y caracterización del sistema encapsulado

El sistema encapsulado de aceite esencial de ajo se obtuvo por gelificación inotrópica. Se agregaron gotas tripolifosfato de sodio (TPP) sobre la emulsión O/W (Figura 1, segunda etapa). La Figura 2-a muestra la fotografía del sistema obtenido, el cual consistió en una suspensión que con el tiempo da lugar a la formación de dos fases constituida por un sedimento que corresponde al sistema encapsulado de Q-TPP-aceite esencial. Partiendo de la relación Q-TPP ensayada (74-26 m:m) se generó el sistema encapsulado debido a la neutralización de cargas promovido por la interacción electrostática y reticulación iónica entre las cadenas poliméricas del Q y el TPP [9,12]. Se determinó el diámetro hidrodinámico de los encapsulados por medio de DLS siendo 113 (DE= 11) nm, por lo cual según este tamaño el sistema se puede clasificar como un nanoencapsulado. El potencial-Z fue +15,6 (DE= 3,8) mV debido a la presencia de los grupos aminos superficiales vacantes en el sistema [13]; comparando este resultado con el potencial-Z de la emulsión (+39,7 mV), se puede afirmar que la reducción del mismo se debe a la neutralización de cargas entre el Q y el TPP. Se estudió la cinética de desestabilización del proceso de síntesis usando un analizador óptico vertical de barrido (Quick Scan Beckman Coulter Fullerton, USA). La Figura 2-b muestra el perfil de retrodispersión de la luz (%) en función de la posición de la celda (cm); puede observarse que la reacción de síntesis del sistema genera dos zonas con comportamientos diferentes: la zona inferior del tubo (valores altos de retrodispersión %) corresponde a los nanoencapsulados. La reacción de síntesis inicia su proceso de estabilización al cabo de 17 min el cual sedimenta completamente a las 17 h de reacción.

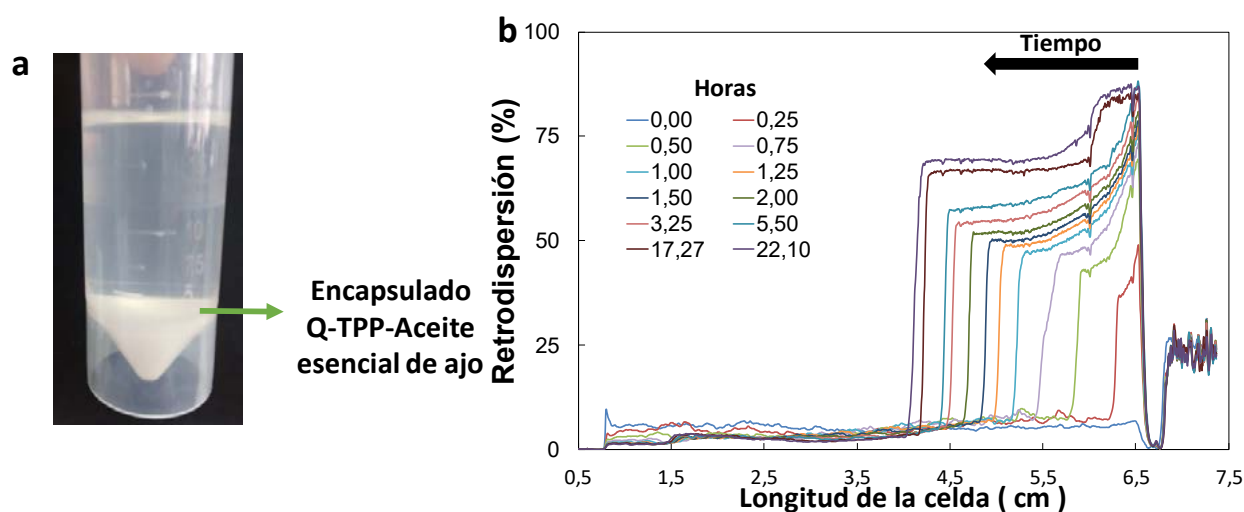


Figura 2. a. Sistema encapsulado de aceite esencial de ajo (sobrenadante) obtenido por gelificación inotrópica; b. cinética de síntesis del sistema encapsulado obtenido a partir de los perfiles de retrodispersión en función de longitud de la celda (cm).

El Ec% determinado fue 68 % (DE= 4), en comparación, microencapsulados de β -ciclodextrinas tuvieron un Ec% de 11 % [14], por otra parte sistemas nano-encapsulados de Q-TPP-aceite esencial de orégano mostraron un Ec% de 54 % [15]. Por lo cual los nanoencapsulados formulados por la esta estrategia son un buen sistema portador de aceite esencial de ajo.

Los espectros ATR-FTIR permitieron caracterizar los sistemas obtenidos, para esto se comparó los espectros de la muestra control (sistema encapsulante sin aceite esencial de ajo) con el sistema portador en presencia de aceite (Figura 3). La eficiente incorporación del aceite esencial en el sistema se comprobó por la presencia del pico ubicado en 1638 cm^{-1} correspondiente al estiramiento vibracional del grupo arilo (C=C) aportado por los constituyentes del aceite esencial de ajo tales como tetrasulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo, sulfuro de dialilo y disulfuro de dialilo [11]. Se observó el desplazamiento del pico ubicado a 1557 cm^{-1} para el sistema control a 1544 cm^{-1} en el encapsulado con presencia de aceite esencial, esto se debe a la interacción efectuada entre el sistema portador y los componentes del bioactivo alterando la vibración de flexión del grupo amida II característico del quitosano, el cual se solapa con la flexión del grupo amino en 1549 cm^{-1} [16].

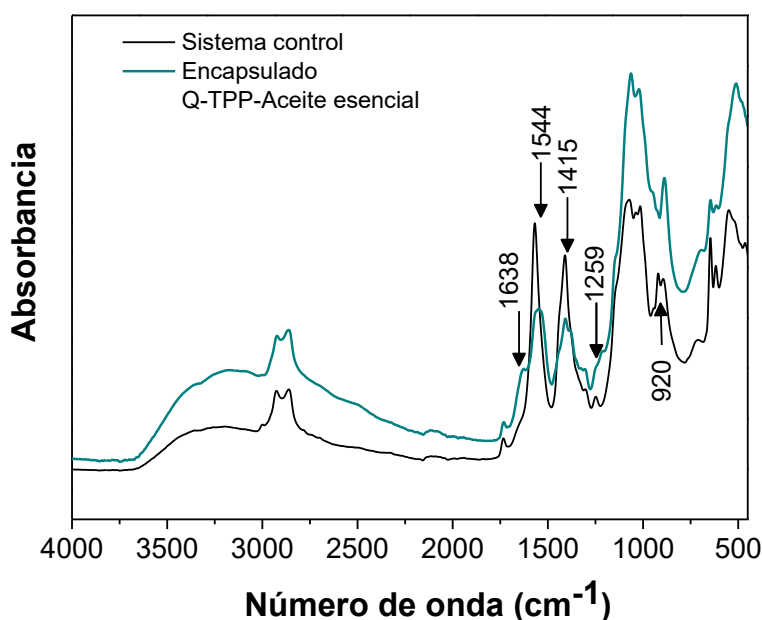


Figura 3. Espectros ATR-FTIR del control (sistema encapsulante sin presencia de aceite esencial de ajo) y encapsulado de quitosano (Q)-tripolifosfato de sodio (TPP)-aceite esencial

En el sistema encapsulado se presentó la reducción en la intensidad del pico ubicado a 1415 cm^{-1} debido al grupo amida I y aparición del pico a 1385 cm^{-1} producido por la vibración de flexión simétrica modo tijera del grupo amida I, esto podría indicar que la presencia de aceite esencial en el sistema interviene en la estabilidad electrostática entre el quitosano y el TPP. El control muestra a 920 cm^{-1} y 1259 cm^{-1} señales características para los estiramientos P-O-C y -P=O, respectivamente; esto confirma la reticulación iónica entre el quitosano y el TPP para la formación de los nanoencapsulados [10], estos picos no se presentan en el sistema encapsulado con presencia de aceite esencial.

3.3. Efectividad antimicrobiana del sistema encapsulado

Se investigó el efecto antimicrobiano de los encapsulados frente a *L. monocytogenes* mediante la difusión en disco en una placa con medio PALCAM inoculada con 10^8 UFC/mL del patógeno. Se dispusieron discos de papel estériles embebidos con los nanoencapsulados. La Figura 4 corresponde al medio PALCAM inoculado con *L. monocytogenes* e incubado a 37 °C por 24 hs, en la cual se puede observar los halos de inhibición presentados por el sistema Q-TPP-aceite

esencial de ajo (Figura 4-a) y el control (Figura 4-b) (sistema sin aceite esencial). Como se evidencia las fotografías, el nanoencapsulado presentó actividad antimicrobiana siendo el porcentaje de inhibición de 47% (DE= 8). Las placas tratadas con el sistema Q-TPP-aceite esencial afectaron la naturaleza de las bacterias, impidiendo así su desarrollo normal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hoda y col., [17], donde la combinación de quitosano y aceite esencial de ajo presentó un halo de inhibición frente a *L. monocytogenes*. Por lo tanto, esta estrategia de combinar aditivos alimentarios podría prolongar la vida útil del producto cuando se incorpora, por ejemplo, en nanomateriales de envasado de alimentos funcionalizados.

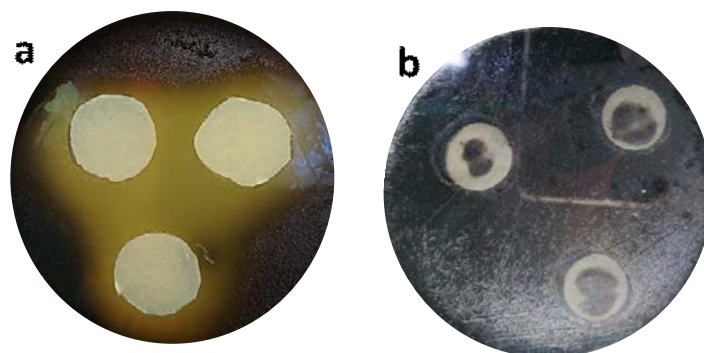


Figura 4. Inhibición de *Listeria monocytogenes* usando los nanoencapsulados de aceite esencial de ajo empleando metodología de difusión en disco

4. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar un sistema nanoencapsulado de aceite esencial de ajo usando quitosano y tripolifosfato de sodio. Por medio de las determinaciones realizadas tales como medición de diámetro hidrodinámico, potencial-Z y los perfiles de retrodispersión se caracterizó el proceso de obtención en las etapas de procesamiento. El nanoencapsulado formulado tuvo un alto porcentaje de encapsulación del aceite esencial, por lo cual este sistema permitió la vehiculización de este bioactivo permitiendo evaluar el desempeño de inhibición frente a la *Listeria monocytogenes*

REFERENCIAS

- [1] M.E. Sotelo-Boyás, Z.N. Correa-Pacheco, S. Bautista-Baños, M.L. Corona-Rangel, Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens, *LWT - Food Sci. Technol.* 77 (2017) 15–20.
- [2] A. Muñoz, M. Vargas, L. Otero, G. Díaz, V. Guzmán, Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008, *Biomédica*. (2011).
- [3] J.L. de Oliveira, E.V.R. Campos, M. Bakshi, P.C. Abhilash, L.F. Fraceto, Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises, *Biotechnol. Adv.* (2014).
- [4] M.E. Rybak, E.M. Calvey, J.M. Harnly, Quantitative Determination of Allicin in Garlic: Supercritical Fluid Extraction and Standard Addition of Alliin, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 682–687.
- [5] Y. Pranoto, V.M. Salokhe, S.K. Rakshit, Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil, *Food Res. Int.* 38 (2005) 267–272.
- [6] A.M. Bakry, S. Abbas, B. Ali, H. Majeed, M.Y. Abouelwafa, A. Mousa, L. Liang, Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 143–182.
- [7] M. Corzo-Martínez, N. Corzo, M. Villamiel, Biological properties of onions and garlic, *Trends*

- Food Sci. Technol. 18 (2007) 609–625.
- [8] A.K. Chaudhari, V.K. Singh, S. Das, Deepika, J. Prasad, A.K. Dwivedy, N.K. Dubey, Improvement of in vitro and in situ antifungal, AFB1 inhibitory and antioxidant activity of *Origanum majorana* L. essential oil through nanoemulsion and recommending as novel food preservative, *Food Chem. Toxicol.* 143 (2020) 111536.
- [9] J. Lamarra, S. Rivero, A. Pinotti, Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid, *Mater. Sci. Eng. C.* 67 (2016) 717–726.
- [10] N. Upadhyay, V.K. Singh, A.K. Dwivedy, A.K. Chaudhari, N.K. Dubey, Assessment of nanoencapsulated *Cananga odorata* essential oil in chitosan nanopolymer as a green approach to boost the antifungal, antioxidant and in situ efficacy, *Int. J. Biol. Macromol.* 171 (2021) 480–490.
- [11] L. Tavares, L. Santos, C.P.Z. Noreña, Microencapsulation of organosulfur compounds from garlic oil using β -cyclodextrin and complex of soy protein isolate and chitosan as wall materials: A comparative study, *Powder Technol.* 390 (2021) 103–111.
- [12] J.M. Orjuela-Palacio, J. Pérez-Calderón, N.E. Zaritzky, Síntesis de nanoencapsulados de quitosano como sistemas portadores de fitosanitarios, *Cienc. y Tecnol. Agropecu.* 24 (2023).
- [13] H. Jonassen, A.-L. Kjøniksen, M. Hiorth, Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate, *Biomacromolecules.* 13 (2012) 3747–3756.
- [14] J. Wang, Y. Cao, B. Sun, C. Wang, Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes, *Food Chem.* 127 (2011) 1680–1685.
- [15] S.F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi, Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study, *Carbohydr. Polym.* (2013).
- [16] X. Liu, L. Zhang, Removal of phosphate anions using the modified chitosan beads: Adsorption kinetic, isotherm and mechanism studies, *Powder Technol.* 277 (2015) 112–119.
- [17] Hoda R.A. El-Zehery, Rashed A. Zaghloul, Hany M. Abdel-Rahman, Ahmed A. Salem, K.A. El-DougDoug, Novel strategies of essential oils, chitosan, and nano- chitosan for inhibition of multi-drug resistant: *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29 (2022), 2582-2590,