



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA

Departamento de Química y
Medio Ambiente

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARERRA

**“NANO ENCAPSULACIÓN DE D-LIMONENO COMO ANTIMICROBIANO Y
SUS EFECTOS SOBRE *Listeria monocytogenes*”**

Trabajo de título para optar al título profesional de técnico universitario en:
GESTIÓN DE CALIDAD EN ALIMENTOS

Alumno: Javiera Paz Moreno Solar
Profesor Guía: María Elisa Escobar Peña

2020-2021

RESUMEN

KEYWORDS: Nano encapsulación – D-limoneno – *Listeria monocytogenes* – Antimicrobiano natural.

En los últimos años, la búsqueda de productos frescos y listos para el consumo ha aumentado entre consumidores y, con ello, la supervivencia y replicación de microorganismos patógenos. Dentro de estos se encuentra la *Listeria monocytogenes*, causante de la enfermedad listeriosis en humanos, este microorganismo se caracteriza por estar presente tanto en la cadena de producción como en los alimentos debido a su fácil adhesión en superficies bióticas como abióticas la convierte en una fuente potencial de contaminación. Además, esta bacteria posee una tasa de mortalidad relativamente alta y su capacidad para replicarse en condiciones de refrigeración la hace una gran amenaza para la seguridad alimentaria.

La aplicación de tratamientos térmicos es la tecnología más comúnmente utilizada en las industrias alimentarias para inactivar microorganismos patógenos y hacer que los productos alimenticios sean seguros. Sin embargo, la aplicación de altas temperaturas puede tener un impacto negativo en los atributos nutricionales y sensoriales de los alimentos. Por tanto, uno de los métodos atractivos y eficaces para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es la aplicación de antimicrobianos naturales en alimentos, pudiendo ser una alternativa a los conservantes sintéticos. El uso de antimicrobianos naturales puros tiene algunas limitaciones, como la baja estabilidad en condiciones adversas, absorción y la liberación no controlada, lo que puede disminuir su función. Para poder superar estos inconvenientes, se han ideado métodos de encapsulación avanzadas que ha potenciado la actividad anti-listerial.

En el presente trabajo, a través de un análisis bibliográfico, se revisarán estudios recientes sobre el D-limoneno, un antimicrobiano natural de origen vegetal que está presente en los frutos cítricos, el cual se adicionara de manera directa o nano encapsulada en la formulación de alimentos y su impacto para controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. De la misma manera, se estudiará con tratamientos térmicos en condiciones isotérmicas y dinámicas mediante la utilización de un Termorresistor Mastia, buscando la disminución los tiempos de exposición a altas temperaturas aplicados por

tratamientos tradicionales, para poder mantener mayormente así sus atributos sensoriales y nutricionales del alimento. Por otra parte, evidenciar que la nano encapsulación mejora el efecto antimicrobiano de las moléculas activas, tanto por su liberación controlada, como por la compatibilidad con el alimento, sin dejar de lado la seguridad del alimento frente a bacterias de tipo patógenas como es el caso de *Listeria monocytogenes*.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES.....	4
1. Listeria monocytogenes.....	4
1.1. Descripción general	4
2. Antimicrobianos naturales	6
2.1. Descripción general y tipos	6
2.2. Limitaciones de la aplicación directa de aceites esenciales en la industria de alimentos ..	10
3. Nanotecnología.....	10
3.1. Nano encapsulación	12
3.2. Sistemas de nano encapsulación.....	12
3.2.1. Sistemas de encapsulación orgánica	12
3.2.1.a. Emulsiones.....	13
3.2.2. Sistema de encapsulación inorgánica.....	19
3.2.2.a. Arcilla	19
3.2.2.b. Partículas de sílice mesoporosas	20
3.2.2.c. Zeolitas	20
CAPÍTULO II	22
1. Materiales	22
A) Microorganismo	22
B) Antimicrobiano.....	22
C) Nano emulsionante.....	22
D) Medios utilizados para la investigación	22
E) Materiales de laboratorio	23
2. Descripción de Equipos.....	23
2.1. Termorresistómetro	24
2.2. Homogeneizador Ultrasónico Ultra Turrax	25

2. 3.	Masterizer 2000	26
3.	Metodología	27
3.1.	Preparación de la nano emulsión	27
3.2.	Limpieza y desinfección del Termoresistómetro Mastia	27
3.3.	Tratamiento térmico isotérmico y dinámico	28
3.4.	Inoculación de L.monocytogenes, diluciones decimas y plaqueo	29
4.	Diagrama de Flujo	30
1.	Método matemático	31
<i>CAPÍTULO III</i>		<i>35</i>
1.	Resultados	35
2.	Discusión	39
3.	Conclusión	41
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>		<i>42</i>

Índice de Figura

Figuras 1-1 Límites para el crecimiento de L.monocytogenes	4
Figuras 1-2Tinción de gram Listeria monocytogenes.....	5
Figuras 2-1 Clasificación por familia de antimicrobianos según su origen	7
Figuras 2-2Propiedades físicas-química de D-limoneno	9
Figuras 1-3Escala nano métrica	11
Figuras 2-3 Representación esquemática de diferentes sistemas de encapsulación orgánicos en alimentos.....	13
Figuras 2-1Fotografía del Termorresistometro Matia, en el laboratorio de calidad y seguridad alimentaria de la Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos en la Universidad Politécnica de Cartagena.	24
Figuras 2-2Homogeneizador ultrasónico ultra turrax.Marca IKA.....	25
Figuras 2-3Materizer 2000 (Malvem Instruments, Worcestershire, Reino Unido)	26
Figuras 4-1 Diagrama de flujo de D-limoneno nano emulsionado con lecitina de soja sometido a tratamientos térmicos para la inactivación de L.monocytogenes	30
Figuras 5-1 Modelo de predicción.	33
Figuras 1-1 Curva de supervivientes obtenidas en condiciones Isotérmicas.	36
Figuras 1-2Parametros del modelo Geeraerd.....	37
Figuras 1-3 Comparación entre predicciones basadas en datos isotérmicos y curvas de supervivientes para tratamiento dinámico.....	38

SIGLAS Y SIMBOLOGÍA

Siglas

OMS: organización mundial de la salud

FAO: Organización de las Naciones Unidas para los Alimentos y la Agricultura.

ACHIPIA: Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad de los Alimentos.

ISO: International Organization for Standardization.

MINSAL: Ministerio de Salud.

ETA: Enfermedad transmitida por los alimentos

TSA: Agar Triptona Soja.

UFC: Unidad formadora de colonias

LCT: Acido graso de cadena larga

MCT: Acido graso de cadena media

SCT: Acido graso de cadena corta

Si: Silicio

Al: Aluminio

ATCC: American Type Culture Collection

Simbología

μ L: Microlitro

μ M: Micrómetro

mM: Milímetro

mL: Mililitro

g: gramos

INTRODUCCIÓN

Para poder crear un alimento que sea seguro, inocuo y de calidad para el consumidor se deben de cumplir ciertos estándares a lo largo de toda la cadena de producción, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para poder cumplirlos (FAO/OMS, 2019) Sin embargo, el aumento de la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos que se ha producido en las últimas décadas está relacionado, en muchos países, con un aumento de las enfermedades ocasionadas por la presencia de microorganismos en los alimentos (OMS, 2015)

La listeriosis transmitida por los alimentos (ETA), presenta una tasa de letalidad alta, entre el 20-30%. Esta enfermedad afecta, sobretodo, a personas más susceptibles como inmunodeprimidos, mujeres embarazadas y adultos mayores, por lo que se le considera un patógeno oportunista. La ubicuidad de este microorganismo y su capacidad de crecer en forma de biopelículas le permite estar presente en plantas procesadoras de alimentos, como productos “listos para consumir” los que tienen mas probabilidades de estar contaminados (Magalhaes, y otros, 2014).

En Chile, durante los años 2008 y 2009, se presentó un aumento de casos notificados por listeriosis que afectó principalmente a la región metropolitana, generando el retiro de algunos alimentos involucrados tales como queso y cecinas, lo que detuvo la infección, sin embargo, esta ha vuelto a aparecer progresivamente desde el año 2012 (MINSAL, 2013). En el año 2017, el MINSAL informo que la SEREMI de salud metropolitana detectó la presencia de la bacteria *Listeria* en una muestra del producto *Arrollado de Cerdo a Granel* de la marca *Llanquihue* «lo que nos llevó a pedir a la SEREMI de Salud de Los Lagos realizara una revisión de la fábrica donde se producen estos productos y tuvimos el hallazgo de la presencia de este patógeno en la línea de producción de arrollado de cerdo, arrollado de huaso y pernil». Lo anterior generó que se ordenara detener la producción y distribución de estos tres productos, junto con procederse al retiro de todos los puntos de distribución como supermercados u otros a nivel nacional. El presente año 2020, la SEREMI de salud notificó la presencia de *L.monocytogenes* en

salmones ahumados, debido a 32 casos de personas afectadas por la bacteria, de los cuales 22 fallecieron, 8 sufrió de meningitis y dos embarazadas sufrieron aborto. En el país, la *L. monocytogenes* está incluida en el reglamento de enfermedades de notificación obligatoria a través de la vigilancia de laboratorio, para lo cual se deben derivar las cepas aisladas de enfermedad invasora al Instituto de Salud Pública.

Los tratamientos contra este patógeno son de gran relevancia para cumplir con los estándares esperados antes mencionados, pero sin perder ni alterar la calidad de los productos de consumo. Es por ello que la industria alimentaria se ve forzada a reducir la intensidad de los tratamientos o buscar nuevas tecnologías alternativas que puedan complementar y/o sustituir los tratamientos térmicos. En consecuencia, se ha manifestado un gran interés en la utilización de antimicrobianos naturales, entre ellos se encuentran los aceites esenciales su acción se debe a su capacidad de interactuar con la membrana de las células microbianas pudiendo penetrarla y causarle una degradación celular. Sin embargo, el inconveniente es que estos son susceptibles a degradación oxidativa, tienen características aromáticas pronunciadas y son inmiscibles a medios acuosos, lo que dificulta su aplicación a productos alimenticios al momento de su utilización directa. Es por ello que en los últimos años aparece una nueva tecnología conocida como nano encapsulación. Esta es aplicable por diferentes métodos, ya sea orgánico a través de emulsiones, fibras y liposomas o inorgánicos como arcilla, partículas de sílice (FAO/OMS, 2019) sílice mesoporosa y zeolitas. Esta técnica proporciona resultados muy prometedores, trabajando a escala nanométrica (100nm a 0,2nm) e implicando un aumento de la presencia del agente antimicrobiano en la matriz del alimento. Este puede interactuar con los microorganismos relevantes transmitidos por ellos, y en este caso, *L.monocytogenes*.

Con el fin de disminuir la presencia de esta bacteria en la industria alimentaria, se realizará un estudio de la nano encapsulación de D- Limoneno como antimicrobiano natural a través de una nano emulsión, con la intención de encontrar una alternativa a tratamientos térmicos. La aplicación de esta técnica podría reducir los tiempos de presión y temperatura, bajar la adición de compuestos químicos, y disminuir la concentración de antimicrobianos. Así, mejorará el impacto sobre las características fisicoquímicas y

aumentará la vida útil del alimento. Por tanto, los objetivos de este estudio es la recopilación bibliográfica a cerca de la nano encapsulación de D-limoneno como antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes*. Esto se comparará con los efectos combinados de un tratamiento térmico con una nano emulsión de D-limoneno utilizando lecitina de soja, sobre la inactivación de *L.monocytogenes*.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES

1. *Listeria monocytogenes*

1.1. Descripción general

La listeriosis es una enfermedad causada por el consumo de alimentos contaminados con el microorganismo *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria puede ser aislada de suelo, agua, vegetales y contenido fecal de una amplia gama de animales. Es un contaminante común en alimentos frescos y procesados, de origen animal y vegetal (hortalizas), leches y lácteos no pasteurizados, carne de vaca, cerdo y aves, embutidos fermentados o ahumados y pescado ahumados. Además, puede crecer en ausencia de oxígeno, como en alimentos envasados al vacío o con atmósfera modificada, afectando principalmente a personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas y recién nacidos. Una de las características más relevante es que es capaz de producir biofilm en alimentos y en procesadoras de alimentos, siendo capaz de resistir las acciones de limpieza y desinfección rutinarias. Crece en un rango de temperatura de -1,5 a 45°C con un óptimo de 30 a 37°C, soporta concentraciones adversas de pH y altas concentraciones NaCl. Debido a estas características puede estar presente en líneas de proceso de alimentos y colonizar (Benadolf, 2008)

VARIABLES	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	-1,5	30-37	45
pH	4,0	6,0-8,0	9,6
Actividad de agua	0,90	0,97	-

Figuras 1-1 Límites para el crecimiento de *L.monocytogenes*

Fuentes: Yousef, 1999; ESR, 2001.

Al ser aislado en laboratorio, se observa como bacilo Gram positivo corto regular, no esporulado, anaerobio facultativo, no forma cápsula, crece con facilidad en medio enriquecido con sangre de cordero entre 18 a 24 horas a través de incubación por aerobiosis. Las colonias son pequeñas, blanco grisáceas y presentan hemolisis que excede escasamente el borde de la colonia. Las pruebas convencionales para su identificación son: Tinción de Gram, catalasa (+), oxidasa (-), hidrolisis de esculina y el hipurato de sodio (+) pero no la urea, gelatina ni caseína (-), fermentación de glucosa y maltosa (+), motilidad (+) a través de flagelos peritricos cuando se cultivan a 20- 25°C y no móviles a 37°C, prueba de CAMP es (+) (Magalhaes, y otros, 2014)



Figuras 1-2 Tinción de gram Listeria monocytogenes

Fuentes: Food science, 2014

Mediante el examen de proteínas de superficie específicas de grupo, como los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), existen al menos 13 serotipos (es decir, 1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) han sido reconocidos en *L. monocytogenes*.

1.2. Técnicas utilizadas para su inactivación y sus efectos sobre alimentos

La pasteurización (75°C durante 15 minutos) y esterilización (120°C durante 4 minutos) son los métodos más utilizados para inactivar la *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. Por otro lado, existen varias sustancias que se emplean como conservantes en los alimentos y que tienen efecto contra la *Listeria monocytogenes*, como los ácidos orgánicos (láctico, acético, benzoico, cítrico y sórbico), así como otros componentes antimicrobianos como el fenol (componente del humo) y el nitrito (componente de las sales de curación). La industria también aplica radiación UV-C en superficie, envasado y algunos alimentos. Otra manera de inactivarla es la utilización de conservantes biológicos, como las bacterias ácido lácticas (BAL) o sus metabolitos, como la bacteriocina. Y entre las técnicas emergentes se destaca el proceso por alta presiones. Todos estos tratamientos, con mayor o menor eficacia, se usan solos o combinados contra *L. monocytogenes*.

El tratamiento térmico es uno de los métodos más utilizados en la actualidad para la preservación de alimentos y que garantiza la destrucción de patógenos, reduciendo los riesgos microbianos a niveles seguros, además de proporcionar seguridad alimentaria dentro de la industria. Sin embargo, la aplicación de este tratamiento lleva a una reducción de propiedades nutricionales y organolépticas en los alimentos tratados. Esto es algo que el consumidor busca evitar, demandando que sea un alimento mínimamente procesado sin adición de aditivos químicos y frescos. (Yusty, 2018)

2. Antimicrobianos naturales

2.1. Descripción general y tipos

Los antimicrobianos naturales, son compuestos capaces de disminuir o eliminar microorganismos patógenos o alterantes presentes en los alimentos. Por consecuencia,

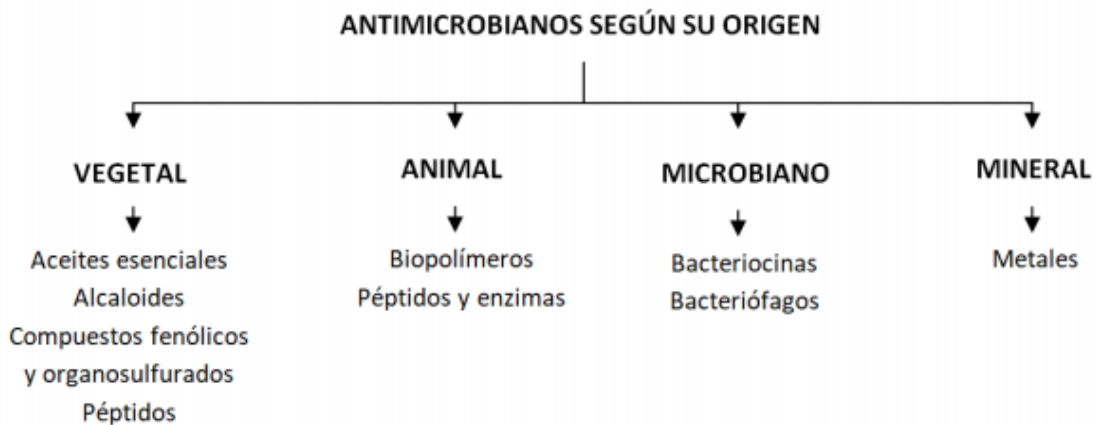
previene su deterioro para ser utilizado con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor.

Los efectos que produce la adición de antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo;

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Por consiguiente, algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo, algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos. Este último mecanismo también acarrea la muerte celular, excepto en el caso de las esporas de *Bacillaceae*. (Saucedo & Nereyda, 2011)

Los antimicrobianos naturales pueden clasificarse según su origen, pudiendo ser animal, encontrando desde biopolímeros hasta péptido o enzimas. En los de origen vegetal, se incluyen compuestos fenólicos proveniente de cortezas, tallos, hojas, flores y ácidos orgánicos presente en frutos. En cuanto a los de origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos. Por último, se encuentran los minerales como antimicrobianos de origen mineral. (Cabañero, 2020)



Figuras 2-1 Clasificación por familia de antimicrobianos según su origen

Fuente: CABAÑERO M.G. 2020 Julio

El agente antimicrobiano de origen vegetal es proveniente de plantas y especies. Dentro de estos se encuentran los aceites esenciales, compuestos fenólicos y péptidos. La *International Organization for Standardization* (ISO) define el aceite esencial como un “Producto obtenido de una materia prima natural de origen vegetal por destilación al vapor, hidrodestilación, destilación seca o por proceso mecánico del pericarpio de frutos cítricos, separando, si necesario, la fase acuosa por proceso físico (decantación).” (ISO, 2014). Estos son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen por diferentes métodos de extracción, a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas). Algunos de ellos indican actividad antibacteriana y antifúngica, evaluadas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y una alternativa para la preservación de alimentos.

Los aceites de frutos cítricos han sido evaluados como posibles alternativas a los antimicrobianos basados en productos químicos debido a los componentes que lo constituyen. En especial en el químico tipo limoneno, el cual ejerce un amplio espectro en actividad antimicrobiana, demostrando ser eficaz frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. entérica* y *Saccharomyces bayanus*. (Argote, y otros, 2017)

El limoneno, pertenece al grupo de los terpenos, que son metabolitos secundarios que le otorgan características organolépticas (sabor y aroma) de las plantas y que constituyen a la mayor parte de los aceites esenciales. La actividad antimicrobiana de los terpenoides puede explicarse por al menos cinco mecanismos de acción; estos incluyen, daño en la estructura y función de la membrana debido a la capacidad hidrofóbica de los aceites que le permite incorporarse en los lípidos de la membrana bacteria y mitocondrial, perturbando su estructura y, por consecuencia, su permeabilidad. Esto da a lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares vitales, inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, interferencia de procesos metabólicos esenciales e inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos. Estos mecanismos de acción pueden verse influenciados por varios factores, como las características de las células bacterianas (bacterias Gram positivas y negativas), condiciones ambientales y fisicoquímicas (la

hidrofobicidad, la concentración del compuesto, la temperatura y el pH). (Gallegos, Bañuelos, Delgadillo, Meza, & Echavarría, 2019)

Propiedades físico-químicas D-Limoneno

Aspecto Y Olor:	Líquido incoloro a amarillo pálido, olor cítrico
Punto de autoignición:	458 ° F (237 ° C)
Punto de Ebullición:	349 ° F (176 ° C)
Límites de inflamabilidad (explosivo) (% en volumen en el aire):	Inferior: 0.7 % Superior: 6.1%
Punto de inflamación:	> 110 ° F (43 ° C)
Índice de refracción:	1,471 a 1,474
Óptica de Rotación:	96 ° a 104 °
Punto de fusión:	-140 ° F (-96 ° C), se espesa en -108 ° F (-78 ° C)
Solubilidad (en agua):	Insoluble
Gravedad Específica:	0,838 a 0,843 a 68 ° F (20 ° C)
Presión de Vapor:	<2 mmHg a 68 ° F (20 ° C)
Tasa de Evaporación (BuAc = 1):	0,2

Figuras 2-2 Propiedades físicas-química de D-limoneno

Fuentes: Meza Ipanoque EIMI, 2016-2017

El nombre Químico del D -limoneno es Dipenteno, 1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexano. Sus propiedades toxicológicas presentan un efecto agudo: Se ha demostrado que tiene baja toxicidad oral (LD50 > 5 g/kg) y baja toxicidad dérmica (LD50 > 5g/kg) cuando se probó en conejos. También mostró una baja toxicidad por inhalación (RD50 > 1 g/kg) cuando se probó en ratones. La capacidad de irritación cutánea del D-limoneno en cobayas y conejos se considera moderada y baja respectivamente. La inhalación puede causar irritación en la nariz, garganta y tracto respiratorio. (Roth, 2017)

2. 2. Limitaciones de la aplicación directa de aceites esenciales en la industria de alimentos

Algunos antimicrobianos, como los aceites esenciales, son muy volátiles. Su incorporación directa provoca que se pierdan las características propias del alimento. Asimismo, presentan baja solubilidad en agua y son susceptibles de oxidarse, pudiendo perder su efecto antimicrobiano en la dosificación. (Moyano & Matiacevich, 2019)

Además, la adición del antimicrobiano al alimento provoca que se produzcan interacciones con el resto de los ingredientes, pudiendo afectar negativamente a la funcionalidad del antimicrobiano. La interrelación con los diversos componentes podría alterar su mecanismo de acción, como, por ejemplo, impidiendo la penetración en la membrana de la célula del microorganismo, sin conseguir destruirlos. Esto conllevó a la necesidad de encapsularlos o inmovilizarlos. (Cabañero, 2020)

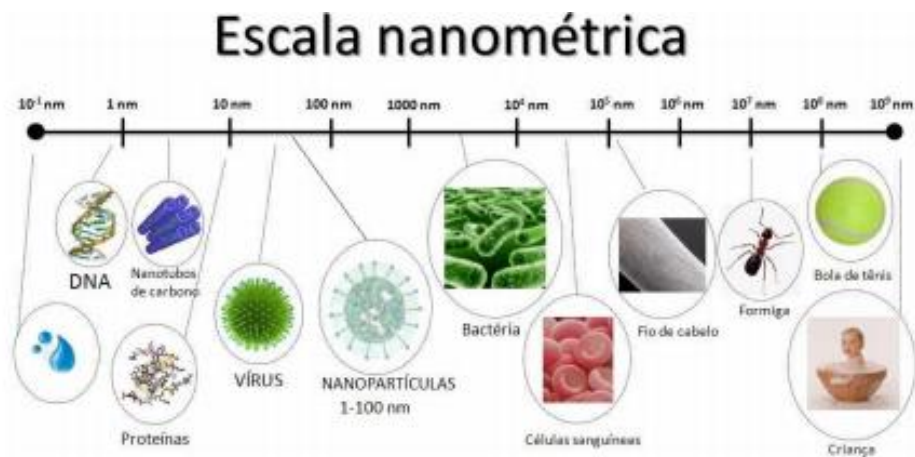
3. Nanotecnología

La nano tecnología, es una técnica capaz de dirigir la materia a escala nanométrica, es decir, entre los 100 nanómetros (nm) hasta el tamaño de los átomos (aproximadamente 0,2 nm). A estas escalas, las propiedades de los materiales pueden ser muy diferentes debido a su reducción dimensional. Para la industria alimentaria, tiene posibles aplicaciones como en aspectos relacionados con la producción, elaboración de materiales, investigación y desarrollo de productos, al igual que el manejo de productos seguros.

La *organización mundial de la salud (OMS)* define a la nano tecnología como, el diseño, producción y aplicación de estructuras, dispositivos, sistemas y materiales mediante el control del tamaño y la forma de los materiales a escala atómica y molecular. Trabaja con estructuras de menos de 100 nm de tamaño (un nanómetro es la milmillonésima parte (10^{-9}) de un metro). El interés de esta tecnología radica en el hecho

de que el pequeño tamaño conlleva propiedades físicas y químicas que difieren significativamente de las habituales a mayor escala. La *National Nanotechnology Initiative* de los Estados Unidos define: “Nanotecnología es la manera en que los descubrimientos en la nano escala son puestos a trabajar. La nanotecnología es más que juntar nano materiales requiere la habilidad de manipular y controlar esos materiales de forma útil” (NNI, 2007). Por otro lado, la FAO define a la nanotecnología como el diseño de los materiales que se producen intencionalmente con características estructurales a escala entre 1 y 100 nm que pueden tener propiedades diferentes a las de los productos ordinarios (FAO, 2011)

Todas las definiciones anteriores son muy semejantes, sin embargo, las propiedades físicas, químicas y biológicas de las nano partículas cambian de manera fundamental de las propiedades individuales de átomos y moléculas. Estas son capaces de auto ensamblarse y tienen diferente reactividad, dureza, conductividad, solubilidad, velocidad de absorción y biodisponibilidad respecto de las partículas macro. Estas características de las nano partículas dan origen a nuevos ingredientes y otras formas de elaborar alimentos con estructuras y propiedades diferenciales que incrementan o mejoran sus funcionalidades, adquiriendo mayor valor comercial.



Figuras 1-3 Escala nano métrica

Fuente: Google

3.1. Nano encapsulación

La nano encapsulación es un proceso que permite empaquetar compuestos en estructura nano métricas a través de diferentes técnicas. Dentro de estas existen procedimientos fisicoquímicos (coacervación simple o complejo, emulsión-evaporación / emulsión - extracción, fusión en caliente), procedimientos químicos (poli condensación interfacial, complejación, gelificación) y, por último, procedimientos mecánicos (lecho fluido, spray, extrusión, electrostatic droplet generation, spinning disk, TROMS, fluidos supercríticos). (Lopez, 2012)

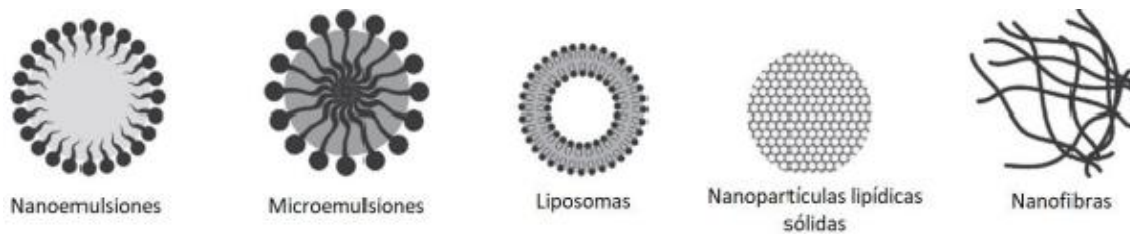
Las ventajas que presenta es la protección al material activo nano encapsulado frente a condiciones ambientales como calor, luz, humedad, entre otras. Además, entrega mayor facilidad de manejo de sustancias, mejora de estabilidad, otorga propiedades contra la oxidación y degradación, mejora la solubilidad, provee una liberación controlada de componentes activos, enmascara sabor y olor desagradable y mejora la biodisponibilidad de los compuestos. (Soto, 2018)

3.2. Sistemas de nano encapsulación

Los nano materiales utilizados para la fabricación de una nano capsula pueden ser de tipo orgánico o inorgánico. (Cabañero, 2020)

3.2.1. Sistemas de encapsulación orgánica

El sistema de encapsulación orgánico es compuesto por biomateriales como son los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, donde las nano partículas pueden presentarse en estado líquido, semisólido o sólido a temperatura ambiente. Estas pueden estar presente en diferentes sistemas de encapsulación, ya sea como emulsión, liposomas o fibras.



Figuras 2-3 Representación esquemática de diferentes sistemas de encapsulación orgánicos en alimentos

Fuente: CABAÑERO M.G. 2020 Julio.

3.2.1.a. Emulsiones

Las emulsiones, están constituidas por dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa a través del otro en forma de pequeñas gotas. Están constituidos por dos fases una llamada dispersante, discontinua o interna la cual es el líquido disperso y la fase continua o externa que es el líquido circulante.

El método de nano encapsulación de dichas emulsiones presentan una ventaja para la industria de alimentos ya que se pueden fabricar con ingredientes que sean compatibles con ellos. Esto se debe a que estas pueden ser de aceite en agua (O/W), en la cual se encapsulan agentes activos lipofílicos que actúan llegando a la membrana de los microorganismos a través de la fase acuosa. O de agua en aceite (W/O), que se pueden utilizar para encapsular compuestos hidrófilos. También se han diseñado emulsiones dobles, dúplex o múltiples. Son emulsiones de emulsiones, estas están formadas por tres fases que puede ser fase acuosa disuelta en fase oleosa y contenida a su vez en fase acuosa (W/O/W) o viceversa (O/W/O). (Jafari, Paximda, Mondala, Assadpour, & Mehrine, 2017)

Cuando se va a preparar una nano emulsión, la fase oleosa es muy importante debido a que sus cualidades influyen en la estabilidad de la emulsión. Los factores de estabilidad pueden ser por la proporción de polar (soluble en agua) a componentes no

polares (insolubles en agua) de un aceite, con una gran cantidad de componentes polares que conducen a cambios de la estructura no homogénea a lo largo del tiempo (maduración de Oswald). El peso molecular, la tensión interfacial, la estabilidad química ante estrés, la densidad y la viscosidad de las fases oleosas influyen también en el proceso de emulsión.

Algunos aceites que forman parte de la industria de alimentos pueden ser, maíz, oliva, soja, aceite de girasol, coco, maní, canola, pescados, semillas de algodón, linaza y algas. Estos pueden estar conformados por triglicéridos que pueden ser de cadena larga (LCT), de cadena media (MCT) y cadena corta (SCT), ácidos grasos libres o aceites esenciales. Se pueden utilizar también aceites minerales, sucedáneo de grasas, ceras o una combinación de ellos.

Una de las otras propiedades más importantes para preparar una nano emulsión, es el uso del emulsionante apropiado, que actuará sobre la superficie de la fase dispersa, atribuyendo una buena distribución de las gotas y, así, obstaculizando la agregación de estas, teniendo comportamiento interfacial específico, disminuyendo la tensión entre las fases aceite y agua, otorgando una mayor estabilidad a la nano emulsión. Existen distintos tipos de emulsionantes que se han investigado en la industria alimentaria, categorizados como tensoactivos de moléculas pequeñas, fosfolípidos, proteínas o polisacáridos (por ejemplo, caseína, β -lactoglobulina), hidrocoloides y almidones modificados. Dentro de los tensoactivos de moléculas pequeñas, para la formulación de una nano emulsión existen los no iónicos (por ejemplo, Serie Span y Tween, en su mayoría 40, 60, y 80), esterres de polioxietileno (por ejemplo, Brij), monoglicéridos, esterres de azúcar y esterres de poliglicerol de monolaurato.

Otro punto es que el tipo de emulsionante viene determinado por la técnica de homogeneización aplicada. Se considera que los tensoactivos de molécula pequeña producen nanoemulsiones de forma eficaz independientemente del método utilizado. Por el contrario, las proteínas y los polisacáridos no suelen ser adecuados para formular pequeñas gotas.

El tamaño de la gota de una emulsión varía del orden de 10 a algunos cientos de nanómetros, siendo indicativo de su característica de nano emulsión. Para poder realizarla existen dos métodos relevantes. Por un lado, se encuentra el de alta energía en el cual se utilizan técnicas de homogenización a alta velocidad, válvula de alta presión homogeneizadora, microfluidizador y dispositivos basados en ultrasonido. Y, por otro lado, el método de baja energía, donde se pueden aplicar técnicas de inversión de fase mezcla, inversión de fase alternando las condiciones de fase y emulsificación de membrana. (Jafari, Paximda, Mondala, Assadpour, & Mehrine, 2017)

A través de la literatura de investigación científica, se han encontrado distintos usos de emulsiones para encapsulación de antimicrobiano natural como el caso de (Mate, Periago, & Palop, 2016) que comprobaron la eficacia de este método. Encapsulando aceite esencial de D-limoneno, el cual se nano emulsificó con una fase acuosa mezclando agua destilada estéril y propilenglicol y una fase oleosa se mezcla Tween 80 con D-limoneno, se estudió el efecto combinado de un tratamiento térmico con una nano emulsión de D-limoneno en la inactivación de *L. monocytogenes* en caldo de soja tríplico (TSB). Resulto ser que la resistencia térmica de *L.monocytogenes* se redujo de dos a cinco veces cuando se añadió 0,5mm de D-limoneno directamente al medio de calentamiento. Por otro lado, cuando se adicionó la misma concentración de D-limoneno en el medio de calentamiento, pero en forma de nano emulsión, la resistencia al calor se redujo cien veces a las temperaturas de calentamiento ensayadas. Por tanto, el sistema de adición de antimicrobiano nanoemulsificado permitiría reducir en gran medida la intensidad de los tratamientos térmicos que se aplican en la industria alimentaria.

En otro artículo, por (Ghazy, Fouad, Seleh, Kholif, & Morsy, 2020), se estudió la preparación asistida por ultrasonido de nano emulsiones de extractos de anís y su bioactividad frente a diferentes bacterias patógenas. La actividad antimicrobiana de la nanoemulsión se probó contra siete especies de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos. Los resultados mostraron que el extracto contenía anetol (37%), naringenina (21%) y taxifolina (13%) como los principales componentes fitoquímicos. La nanoemulsión de extracto de anís mostró una mayor actividad antimicrobiana contra la

mayoría de los patógenos probados. Además, se comportó mejor que el extracto a granel como agente antimicrobiano contra algunas bacterias patógenas transmitidas por los alimentos.

Finalmente, (Gonzales & Beloso, 2019) investigó con el objetivo de diseñar y caracterizar una nanoemulsión antimicrobiana a base de almidón oxidado (OS) y cera de abeja (CA) y su posible aplicación como recubrimiento comestible. Se determinó el efecto aditivo de la combinación de dos antimicrobianos naturales, el arginato láurico (LAE) y la natamicina (NAT), en la inhibición de tres hongos deterioradores *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* y la bacteria *Salmonella saintpaul*, logrando reducir hasta en un 50% la concentración encontrada para cada antimicrobiano de manera individual. Por otro lado, las nanoemulsiones a base de almidón oxidado, cera de abeja y antimicrobianos empleando Tween 80 como emulsionante, bajo un proceso de microfluidización, mostraron las mejores características fisicoquímicas, reológicas, y de mojabilidad. Sin afectar el efecto antimicrobiano, mostró una interacción significativa entre el tipo de emulsionante y el proceso de emulsificación, hallando un uso potencial como recubrimiento comestible sobre productos frescos.

3.2.1.b. Liposomas

Los liposomas pertenecen al sistema de encapsulación y han demostrado ser eficientes en la captación, protección y biodisponibilidad de una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfipáticas. Estos sistemas pueden desarrollarse dependiendo de la naturaleza y uso de compuestos activos a través de diferentes métodos. Dentro de los más comunes de ellos se encuentra la devaporación a fase inversa e hidratación de películas, los cuales estos generan liposomas unilaminares o plurilamelares, respectivamente, a escala nanométrica. Los liposomas son vesículas lipídicas, compuestas por fosfolípidos organizados en bicapas. Estas vesículas poseen una fase acuosa interna y está suspendida en una fase acuosa externa, pudiendo encapsular en su estructura moléculas o compuestos activos de carácter hidrosoluble, liposoluble o anfipático, ya sea en forma conjunta o separada. Son de gran ayuda como protectores y

transportadores de sustancias y compuestos activos que presentan problemas de solubilidad o son sensibles a factores físicos, químicos, degradativos y desactivación. (Ramirez, 2015)

Algunas de las aplicaciones de liposomas como sistema de encapsulación en la industria alimentaria han sido reportadas por (Loku, Becerra, Kohli, Fisher, & Choidhary, 2017) donde se utilizó liposomas que contienen D-limoneno, evaluando su eficacia, en arándanos, contra hongos (*Botrytis cinérea* y *Penicillium chrysogenum*) y bacterias causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (*Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*). Además, la investigación evaluó la vida útil prolongada de los arándanos. La actividad antibacteriana contra *E. coli* mostraron reducciones de 0,99 y 1,6 log 10 en UFC mL⁻¹ a 10 µM y 50 µM, respectivamente, en 48 h. La reducción de log 10 fue 1,6 a 10 µM y 3,4 a 50 µM para *L. monocytogenes*. Como resultado de esta investigación, el D-limoneno encapsulado en liposomas mostró una buena estabilidad física y una fuerte actividad antimicrobiana in vitro en comparación con el D-limoneno libre. Por lo que se pudo concluir que el limoneno encapsulado en liposomas podría ser una buena alternativa de tratamiento post-cosecha para prolongar la vida útil de almacenamiento de las bayas en temporada corta de arándanos.

En otro artículo, de (Pabas, Shariatifar, Beikzadeh, & Jahed, 2018), utilizaron nanoliposomas para encapsular aceite esencial de la planta Satureja para medir las características de calidad de la carne de cordero. Se incorporó un recubrimiento de quitosano, debido a que es un biopolímero que suministra compuestos bioactivos lipofílicos, que ayudan en la formación del liposoma, y produce efecto sinérgico antimicrobiano al utilizarse en la encapsulación de aceites esenciales. En este caso, la encapsulación en liposomas aportó muchas ventajas, ya que permitió una liberación más controlada del aceite esencial, prolongó la actividad antimicrobiana, y mantuvo los atributos sensoriales. Además, el límite para el recuento total viable en carne fresca es de 7 ciclos logarítmicos UFC/g. Las muestras sin recubrimiento superaron este límite a los 9 días. Añadiendo un recubrimiento de quitosano se aumentó a 12 días. Y las muestras con recubrimiento de quitosano y aceite esencial de Satureja lograron permanecer los 20 días

indicados de almacenamiento, sin superar el valor límite, ya que el recuento fue de 4.85 ciclos logarítmicos UFC/g.

Finalmente, (Ghorbanzade, Jafari, Akhavan, & Hadavi, 2017) utilizaron aceite esencial de pescado en nano liposomas e investigaron su aplicación en la fortificación de yogur. Los aceites de pescado tienen muchos beneficios dietéticos, pero debido a sus fuertes olores y rápido deterioro, su aplicación en formulaciones alimentarias es limitada. Por esta razón, en este estudio se utilizó nano-liposoma para nanoencapsular aceite de pescado y se utilizó aceite de pescado encapsulado para fortificar el yogur. Las propiedades fisicoquímicas del yogur producido, incluido el pH, la acidez, la sinéresis, la composición de ácidos grasos, el índice de peróxido y las pruebas sensoriales, se investigaron durante tres semanas de almacenamiento a 4 ° C. La encapsulación de nano-liposomas resultó en una reducción significativa de la acidez, sinéresis y índice de peróxido. Los resultados de los análisis de cromatografía de gases revelaron que después de 21 días de almacenamiento, el yogur enriquecido con aceite de pescado nanoencapsulado tenía un contenido más alto de DHA y EPA que el yogur que contenía aceite de pescado libre.

3.2.1.c. Fibras

Son polímeros que tienen la capacidad de formar fibras, en las que en su interior se pueden incorporar compuestos bioactivos. El método más utilizado es el electrohilado, electrospinning o electrospun. En este se produce una repulsión de cargas que causa una fuerza opuesta a la tensión superficial que, al superarla, expulsa un chorro cargado eléctricamente, estirándose hasta que alcanza la placa colectora, y favoreciendo la incorporación del disolvente. Al evaporarse el solvente durante el proceso, se consigue una fibra seca y porosa con una relación superficie-volumen elevada. Por lo tanto, la estructura y tamaño de las moléculas le otorga la ventaja que favorece la liberación controlada del compuesto encapsulado.

Actualmente, este método se ha investigado, como lo hicieron (Surenthiran, Cui, & Lin, 2019), que realizaron una encapsulación de florotanino, tanino que se encuentra en algas pardas, en nanofibras fabricadas de alginato de sodio y oxido de polietileno, mediante un proceso de electrohilado. Se obtuvieron nano fibras lisas con un diámetro promedio de 331nm. Así, se evaluó la capacidad de conservación de las nanofibras activas frente a *S. enteritidis* sobre pollo a 4 y 25°C. El recuento de células disminuyó drásticamente de 6,20 a 3,28 log UFC / 4°C y disminuyó de 8,80 a 2,53 log UFC / 25°C. Además, se llevó a cabo una evaluación sensorial y se comparó con nitrito de sodio. Se encontró que el uso de nanofibras aumentaba significativamente la vida útil del pollo sin alterar su calidad sensorial.

Otro ejemplo es el de (Wang, Hao, Wang, Chen, & Jiang, 2017), en el cual se encapsuló curcumina en zeína, una proteína del maíz con excelentes propiedades de barrera al oxígeno y resistencia térmica, características vitales para la realización de envases de uso alimentario. Este estudio comprobó la actividad antibacteriana de las nanofibras obtenidas, mostrando eficacia de inhibición contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, aunque fue más significativa en la primera.

3.2.2. Sistema de encapsulación inorgánica

3.2.2.a. Arcilla

Las arcillas se encuentran en gran parte de los suelos y sedimentos debido a que son en su mayor parte meteorización de silicatos, grupo de minerales de mayor abundancia en la tierra. Se considera arcilla, como todas las fracciones con un tamaño de grano inferior a 2µm. (García & Suarez)

En el estudio de (Lee, Seo, & Park, 2017) se encapsuló aceite de tomillo en nanotubos de haloisita para un sistema de envasado antimicrobiano. Los diámetros de las

zonas de inhibición frente a *Escherichia coli* fueron de 26 ± 2 y 40 ± 1 mm, con una concentración de 100 y 200 mg de nano cápsulas con aceite esencial de tomillo, respectivamente.

3.2.2.b. Partículas de sílice mesoporosas

Las nano partículas de sílice mesoporosas, están constituidas por una matriz de sílice (SiO_2) y se caracterizan por la presencia de poros de un diámetro comprendido entre los 2 a 50nm. Esta característica les proporciona una superficie interna que les permite almacenar compuestos en su interior. Además, poseen una elevada área de superficie que permite almacenar grandes cantidades de carga, gran porosidad y volumen de poro modificable, buena estabilidad química y térmica, no tóxico y biocompatible con el organismo humano, y alta estabilidad. (Linás & Garcia, 2017)

La investigación de (Gaviña, 2015) estudió la actividad antimicrobiana de macropartículas de sílice sobre *Escherichia coli*. Los resultados mostraron que el ácido caprílico anclado no fue capaz de inhibir completamente el microorganismo en ninguna de las concentraciones estudiadas y, por tanto, la concentración mínima de bactericida necesaria sería superior 2640 mg/mL.

3.2.2.c. Zeolitas

Las zeolitas son aluminosilicatos (mineral que contiene oxido de aluminio y sílice) de metales alcalinos o alcalino-terrosos predominantemente de sodio y calcio. Se caracterizan por una estructura micro porosa que le confiere propiedades adsorbentes y una gran capacidad de intercambio catiónico debido a un desequilibrio de cargas, por la relación entre Si (silicio) y Al (aluminio). (Wilmer, Hernani, & Wilson, 2006)

Un estudio realizado por (Martín, 2016) investigó la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en alginato de calcio con microestructuras modificadas. Resultó en que el *L. plantarum* encapsulado tuvo una supervivencia significativamente mayor al *L. plantarum* libre de 4.69 log UFC/g durante las condiciones gastrointestinales in vitro. Tanto las cápsulas obtenidas por goteo como por atomización conservaron viabilidades para ejercer beneficios a la salud. Sin embargo, las segundas confirieron una mayor protección durante las condiciones simuladas, siendo de 7.77 log UFC/g.

CAPÍTULO II

1. Materiales

A) Microorganismo

Obtención de cepa (ATCC) son microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología, esta fue proporcionada por la colección española de cultivo tipo (Valencia, España) para *Listeria monocytogenes*.

B) Antimicrobiano

El antimicrobiano utilizado es el D-limoneno, el cual se obtuvo de la sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.

C) Nano emulsionante

Lecitina de soja comercial (Karott, Alicante, España).

D) Medios utilizados para la investigación

- Agua de peptona tamponada (BPW).
- Agar Triptona-Soja (TSA).
- Agua destilada estéril.

E) Materiales de laboratorio

- Pipetas automáticas de 100- 1000 μ L y de 10-100 μ L.
- Puntas para la pipeta automáticas.
- Gradillas.
- Mecheros.
- Placas Petri.
- Jeringuilla Hamilton.
- Frasco de tapa rosca de vidrio de 500ml y 100ml.
- Alcohol.
- Agua estéril.
- Probeta de 50mL.
- Frasco de vidrio graduado (vaso precipitado 50mL).
- Espátula (cuchara).
- Pipeta Pasteur.
- Tubos de ensayo.

2. Descripción de Equipos

- Autoclave RAYPA.
- Estufa programada a 37°C.
- Baño termostático RAYPA.
- Homogeneizador Ultrasónico ultra- turrax 300-500rpm.
- Termoresistómetro Mastias.
- Mastersizer 2000.
- Balanza digital.
- Vórtex.

Los tratamientos térmicos se llevan a cabo en el Termoresistómetro Mastias, un equipo patentado por la Universidad Politécnica de Cartagena. Dicho instrumento ha sido diseñado para determinar la resistencia de los microorganismos al calor a lo largo del tiempo, en medios líquidos, o bien, en alimentos con una consistencia semilíquida o finamente particulados (como por ejemplo una crema, un batido, etc.). Además, permite

estudiar tanto el comportamiento de los microorganismos en condiciones isotérmicas como en dinámicas.

2. 1. Termorresistómetro

El termorresistómetro consiste en un tanque de acero presurizado, calentado por una resistencia eléctrica y homogeneizado mediante una hélice de agitación. La temperatura del instrumento se controla mediante un autómata programable. Está dotado de un puerto para adicionar los microorganismos, por medio de una jeringuilla y una aguja estéril tipo Hamilton. En él se pueden realizar tratamientos isotérmicos (temperatura constante a través del tiempo) y no isotérmicos (rampas de temperatura, la temperatura aumenta de manera gradual y constante durante el tiempo deseado hasta una temperatura final).



Figuras 2-1 Fotografía del Termorresistómetro Matia, en el laboratorio de calidad y seguridad alimentaria de la Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos en la Universidad Politécnica de Cartagena.

La nano emulsión se preparó utilizando un homogeneizador ultrasónico, el cual es muy efectivo para conseguir un tamaño de glóbulos o partículas pequeño y uniforme a la hora de procesar formulaciones de polvo-líquido o líquido-líquido. Las altas fuerzas de

cizallamiento hidráulico generadas por los ultrasonidos rompen los aglomerados, las gotas y los tejidos celulares en fragmentos más pequeños produciendo un producto de tamaño uniformemente fino. Cuando se mezclan líquidos inmiscibles en una emulsión, la distribución y el tamaño de las gotas son un factor clave para la estabilidad de la emulsión. Los ultrasonidos pueden crear gotas muy finas y con una distribución uniforme de tamaños (Hielscher, 2020).

2. 2. Homogeneizador Ultrasónico Ultra Turrax

El homogeneizador Ultrasónico Ultra Turrax consta de un indicador digital de velocidad con un rango de velocidad de 3.000 a 25.000 rpm, dos herramientas dispersoras, funcionamiento silencioso y su desviación de velocidad es del 1%.



Figuras 2-2 Homogeneizador ultrasónico ultra turrax. Marca IKA

Para la determinación del tamaño de las gotas de aceite se utilizó el método de dispersión de luz láser. El Mastersizer 2000 es un analizador de partículas simultáneo de tamaño y

forma, que integra la tecnología de difracción láser con análisis dinámico de imágenes. Los datos son recopilados por un software que entrega el tamaño y forma de las partículas.

2. 3. Masterizer 2000

El Mastersizer 2000 está constituido por un banco óptico el cual ofrece mediciones de 10 nm a 3,5 mm. La muestra dispersa pasa a través de la zona de medición del banco óptico, donde un haz de luz ilumina las partículas. Luego, una serie de detectores mide con precisión la intensidad de la luz dispersa por las partículas en la muestra, para la longitud de onda de la luz roja y la de la luz azul, y en una amplia variedad de ángulos. Por otro lado, ofrece unidades de dispersión de la muestra que garantiza que las partículas lleguen al área de medición del banco óptico en la concentración correcta y en un estado estable y adecuado de dispersión para garantizar mediciones precisas y reproducibles. Por último, presenta un software que controla el sistema durante el proceso de medición y analiza los datos de dispersión para calcular la distribución de tamaño de partícula.



Figuras 2-3Materizer 2000 (Malvem Instruments, Worcestershire, Reino Unido)

3. Metodología

3.1. Preparación de la nano emulsión

Para la preparación de la fase acuosa, se tomó 20mL de agua destilada estéril en una probeta y con una espátula se retira 10 g de lecitina de soja comercial, pesados en una balanza digital. Ambos se mezclan en un frasco de vidrio graduado que se lleva al baño termostato durante 1 hora a 50°C, para permitir la hidratación de la lecitina. Una vez lista la fase acuosa, se extraen 2,5g digital con una espátula y pesado en la balanza digital. Estos se depositaron en un frasco de vidrio graduado estéril y se le adicionaron 3,23 ml de D-limoneno con pipeta Pasteur. Por último, se añadió, con probeta, agua destilada estéril para obtener un volumen final de 20mL.

La nano emulsión se preparó utilizando un homogeneizador de ultrasonido ultraturrax a 300-500rpm durante 15 minutos, en condiciones asépticas. La concentración final de D-limoneno en la nano emulsión fue de 1M. La nano emulsión se distribuyeron en tubos de ensayo pre-esterilizados y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. El tamaño de las gotas se determinó al principio y al final del experimento, y a través del método de luz laser utilizando Mastersizer 2000, descrito anteriormente. No se encontraron diferencias en la distribución del tamaño de gotas a lo largo de la investigación.

3.2. Limpieza y desinfección del Termoresistómetro Mastia

El termoresistómetro, antes de su utilización, debe seguir un protocolo de limpieza y esterilidad que asegure que se esté trabajando en condiciones estériles para evitar contaminaciones durante el desarrollo de los experimentos. Por lo tanto, se hicieron una serie de pasos.

En primer lugar, se procede con un enjuague del vaso principal de acero inoxidable de capacidad 400 mL del termorresistómetro. Para ello se ha de desenroscar dicho vaso y enjuagarlo con agua tibia tanto por fuera como por dentro. Una vez enjuagado, se le adiciona, aproximadamente, 10-20 mL de amoniaco y se adiciona agua tibia dejando un espacio en torno a 1,5 cm hasta la altura superior del vaso. Con esta solución se sumergen las partes del termorresistómetro de manera que limpie y desinfecte la hélice. Tras el enjuague con amoniaco, se repite el mismo proceso tres veces, pero exclusivamente con agua. Una vez limpio, se enrosca el vaso principal en el termorresistómetro lleno de agua tibia con una holgura de 1,5 cm hasta la parte superior del vaso. Se enciende el aparato y para esterilizar los conductos y limpiarlos, se programa el termorresistómetro a una temperatura de 135°C. Se enciende el motor para iniciar la agitación, se conecta la fuente de calor y la de frío y se abre la válvula de presión. Una vez programado se le da a “RUN” de manera que se inicie el aumento de temperatura. Cuando se alcanza la temperatura programada, se deja a esa temperatura dos minutos para que esterilice bien los componentes. Para la esterilización del conducto de toma de muestra es esencial purgar con vapor para esterilizar su interior. Finalmente, se programa el termorresistómetro a una temperatura de unos 25°C, para poder realizar las manipulaciones de preparación del experimento. Para poder introducir el medio para el estudio se apaga el motor, las fuentes de calor y frío, la válvula de presión y se desconecta el conector rápido de presión que está conectado a la fuente de presión externa (nitrógeno seco), de manera que la presión sea cero. Posteriormente, se vuelve a conectar el cable y se desenrosca el vaso principal de acero inoxidable, se desecha el agua y se rellena del medio a estudiar.

3.3. Tratamiento térmico isotérmico y dinámico

El vaso del termoresistor se llenó con 400mL del medio. En este caso, fue agua peptonada tamponada (BPW) pre-esterilizada, suplementada o no, con 0,5mM de D-limoneno nano emulsionado. Los tratamientos térmicos se realizaron a 50,0°C (0,25,50,75 y 100 minutos), 52,5°C (0,10,20,30,40 y 50 minutos), 55,0°C (0,10,20,30 y 40 minutos)

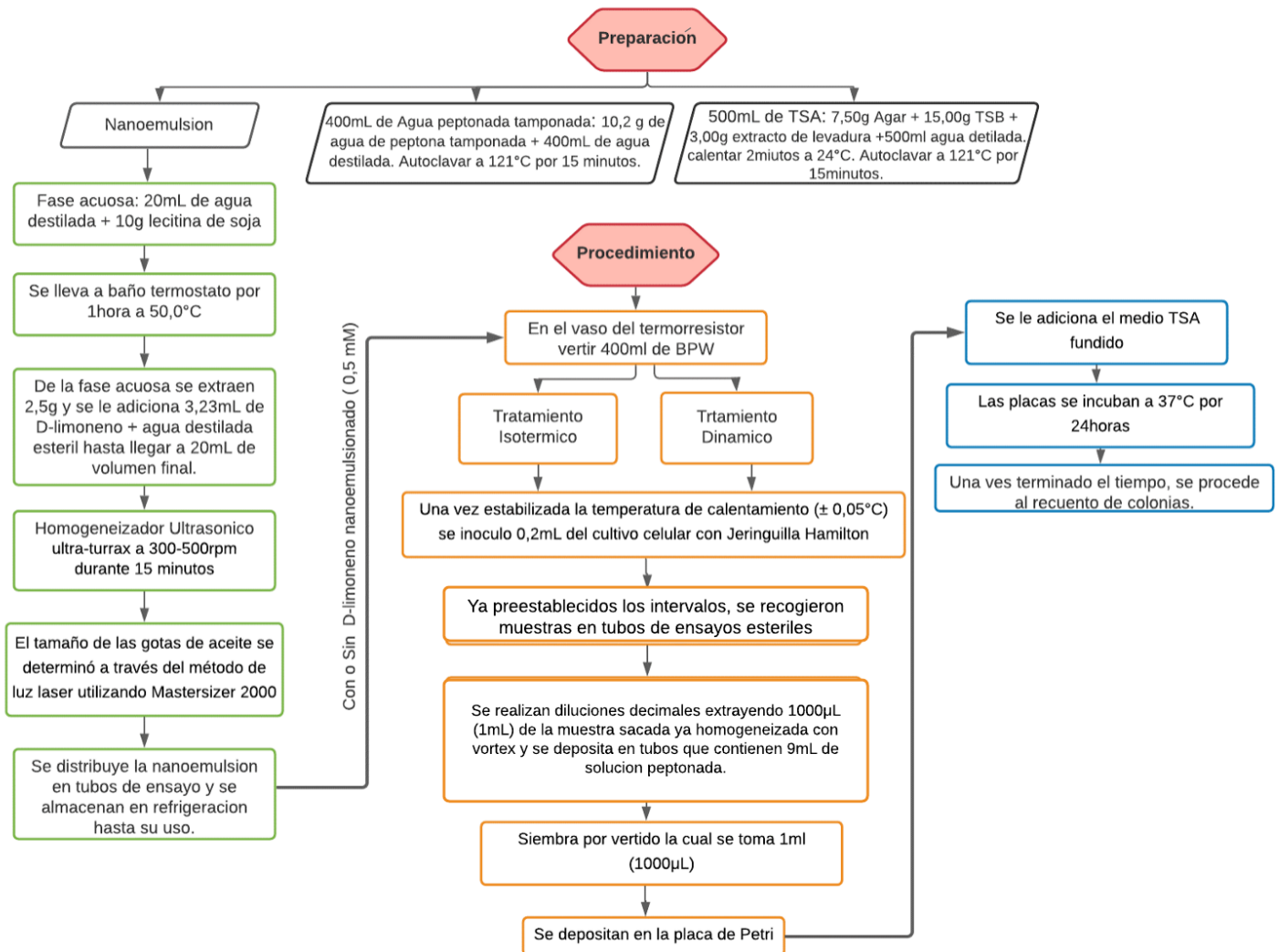
y 57,5°C (0,5,10 y 15 minutos) para el tratamiento isotérmico. Para los experimentos dinámicos, la temperatura inicial se fijo en 40°C, luego se aplico de 1, 10 a 20 °C por minuto.

3.4. Inoculación de *L. monocytogenes*, diluciones decimas y plaqueo

Una vez estabilizada la temperatura de calentamiento, $\pm 0,05^\circ\text{C}$, se inoculó 0,2mL del cultivo celular con Jeringuilla Hamilton a través del puerto del termoresistor. Cabe mencionar que todo el experimento se homogeneizo utilizó la hélice de agitación del termoresistor.

Ya preestablecidos los intervalos, se recogieron muestras en tubos de ensayo estériles, que se enfrían en hielo para detener la temperatura del tratamiento. Estas muestras se extrajeron a través de un conducto presente en el termoresistor. Luego, se realizaron diluciones decimales con pipeta automática extrayendo 1000 μL (1mL) de la muestra obtenida y se depositó en tubos que contenían 9mL de agua peptonada. Después se elimina la punta y la siguiente se conserva hasta llegar a 10^{-6} . De las diluciones realizadas en los tubos de ensayo se homogenizaron con vórtex, posteriormente se procedió a la siembra por vertido la cual se tomó 1ml (1000 μL) con pipeta automática y punta correspondiente y se depositaron en la placa de Petri, luego se le adicionaron el medio TSA fundido, seguido de esto, se hacen movimientos circulares y hacia delante y atrás para homogeneizar. Para esto, es importante que el inóculo con el agar debe tener una temperatura entre los 45 y 50°C para evitar la muerte de los microorganismos o que se comience a solidificar y forme grumos que impide la correcta distribución del inóculo. Las placas se incuban a 37°C por 24 horas. Cada tratamiento se ensayó se realizó por triplicado en experimentos independientes realizados en diferentes días. Una vez cumplido el tiempo de la incubación de las placas, se procedió a hacer un recuento de colonias, donde se consideraron las placas que contienen entre 30 a 300 colonias.

4. Diagrama de Flujo



Figuras 4-1 Diagrama de flujo de D-limoneno nano emulsionado con lecitina de soja sometido a tratamientos térmicos para la inactivación de *L.monocytogenes*

Fuente: Elaboración propia. Moreno.J 2020.

1. Método matemático

Se utilizó una aplicación web llamada Bioinactivation FE (<https://opada-upct.shinyapps.io/bioinactivationFull/>) para modelos de inactivación microbiana, que posee funciones como simulación de curva de supervivencia, generación de intervalos de predicción y ajustes de modelos isotérmico y dinámicos.

Este incluye un modelo de predicción para simular la respuesta microbiana durante el tratamiento de procedimiento isotérmico o no isotérmico. Para ello se seleccionó el modelo de inactivación, que pueden ser Bigelow, Peleg, Mafart o Geeraed y se ingresaron los parámetros del modelo que caracterizan la resistencia térmica microbiana obtenidas a través de literatura. Se debe tener en cuenta que los tratamientos isotérmicos pueden simular la misma temperatura para cada punto de tiempo. Luego, Bioinactivation resuelve ecuaciones diferenciales del modelo de inactivación utilizando algoritmos que trae el paquete. El recuento microbiano se ingresa manualmente en la herramienta y solo requiere consistencia (por ejemplo, usar las mismas unidades para el parámetro N_0 y los recuentos microbianos experimentales, o para el valor D y el tiempo transcurrido). También se ingresa el perfil de temperatura del tratamiento en diferentes puntos de tiempo. Al ingresar los datos genera un gráfico de la predicción del modelo y los datos experimentales. Además, esta herramienta, calcula error medio (ME), error cuadrado medio (RMSE), de población-log, criterio de información Akaike, criterio de información Bayesiano y exactitud (A_f) y factores de sesgos (B_f).

Para el modelo Isotérmico, se utilizan los recuentos microbianos obtenidos en los diferentes experimentos por inactivación isotérmica realizados a diferentes niveles de temperatura. Este se debe ingresar a una tabla con la densidad microbiana obtenida como fracción logarítmica de sobrevivientes ($\log_{10} S = \log_{10} N / N_0$), el tiempo transcurrido y la temperatura del experimento. La aplicación genera un gráfico de predicciones del modelo y datos experimentales para cada temperatura. Además, se reporta una tabla con valores estimados y desviaciones estándar, así como intervalos de confianza al nivel de confianza del 95%.

Para el modelo no isotérmico, se requiere ingresar la densidad microbiana y el perfil de temperatura del tratamiento. Se elige el algoritmo de Levenberg-Marquardt o Markov-Chain Monte Carlo (MCMC). Bioinactivation FE informa un gráfico que compara las observaciones experimentales con las predicciones del modelo para la estimación inicial y los límites inferior y superior. Este algoritmo es menos intensivo en computación, pero puede converger en soluciones subóptimas para los modelos no lineales utilizados para describir la inactivación microbiana. El método MCMC es un método estocástico (conjunto de variables aleatorias que dependen de un parámetro) que puede ser mejor para tratar problemas no lineales, aunque el usuario debe evaluar el número de iteraciones necesarias para su convergencia. Bioinactivation FE facilita el cambiar entre ambos métodos. Por lo tanto, se recomienda realizar el ajuste del modelo utilizando ambos algoritmos (así como diferentes números de iteraciones para el método MCMC) y comparar los resultados.

Para el modelo de inactivación microbiana, se puede acceder a diferentes modelos de predicción. En este caso, se utilizó el modelo de Bigelow, el cual considera varios parámetros. La tasa de inactivación se cuantifica mediante el valor D ($D(T)$), que representa el tiempo necesario para aplicar un estrés térmico a una temperatura determinada con el fin de reducir la carga microbiana en un 90%. Supone que el valor D sigue una relación exponencial con la temperatura. Por otro lado, la sensibilidad de las células bacterianas a los cambios de temperatura (T) se cuantifica utilizando el valor z (z), que es igual al aumento de temperatura necesario para provocar una reducción de diez veces del valor D .

El modelo Geeraerd, que también se utilizó, incluye todo lo mencionado del modelo anterior y también supone que la inactivación microbiana bajo un estrés constante es log-lineal. Sin embargo, incluye términos adicionales para tener en cuenta los efectos del hombro y la cola. El hombro se modela bajo el supuesto de que existe una sustancia teórica representada como C (c) que inhibe la inactivación microbiana. El efecto de cola se modela utilizando el término log-logístico de modo que el número de microorganismo

no puede llegar a ser inferior a la altura de la cola, utilizando la terminación N (res) (Garre, Clemente, Fernandez, Lidqvist, & Egea, 2018)

En este experimento debemos considerar las siguientes ecuaciones:

- Unidad formadora de colonia (en ml):

$$UFC/mL = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias por placa } \times \text{ el factor de dilución}}{mL \text{ de la muestra sembrada}}$$

- Modelos de predicción

	Primary model	Secondary model
Bigelow	$\frac{d \log_{10} N}{dt} = -\frac{1}{D(T)}$	$\log_{10} D(T) = \log_{10} D_{ref} - \frac{T-T_{ref}}{z}$
Peleg	$\frac{d \log_{10} N}{dt} = -b(T) \cdot n \cdot \left(-\frac{\log_{10} S}{b(T)}\right)^{\frac{n-1}{n}}$	$b(T) = \ln(1 + e^{k_b(T-T_c)})$
Mafart	$\frac{d \log_{10} N}{dt} = -p \left(\frac{1}{\delta(T)}\right)^p t^{p-1}$	$\log_{10} \delta(T) = \log_{10} \delta_{ref} - \frac{T-T_{ref}}{z}$
Geeraerd	$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{1+C_c} k_{max}(T) \left(1 - \frac{N_{res}}{N}\right) N$ $\frac{dC_c}{dt} = -k_{max}(T) \cdot C_c$	$k_{max}(T) = k_{ref} 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}}$

Figuras 5-1 Modelo de predicción.

Muestra las ecuaciones diferenciales y algebraicas que definen estos modelos, donde N representa la densidad microbiana en el tiempo t, generalmente expresada como UFC / ml.

Fuente: Garre.Carazo.Fernandez.Lindqvist. Egea, (2018, 1 de octubre).

- Inactivación microbiana:

Se utilizo modelo Geeraerd de primer orden, el cual introduce coeficientes (α y β).

$$\frac{dN}{dt} = \alpha * k_{max} * \beta * N(t)$$

En este caso, α y β son coeficientes para describir la curva de supervivencia sigmoidea. α describe los efectos de hombro (desviaciones de la linealidad en la curva de supervivencia que tiene lugar en el inicio del tratamiento térmico). Ninguna de las curvas de supervivencia obtenidas muestra efecto en hombros donde luego se fijó en todos los casos en uno, por lo que no tiene ningún impacto. $N(t)$ es el recuento microbiano en el momento del tratamiento, t .

Por otro lado, β describe colas (desviaciones al final del tratamiento), la ecuación utilizada para este es la siguiente: $\beta = 1 - \frac{N_{tail}}{N}$. N_{tail} es la altura de la cola, demostrado con una asíntota en la curva de supervivencia. Experimento sin la adición de D-limoneno no tenía cola. Por esa razón el parámetro se fijó en uno en aquellos. Por otro lado, las curvas de supervivencia en las que se añadió limoneno al medio de calentamiento sí tenía cola.

Tanto α como β toman valores entre cero y uno, por lo que K_{max} representa la tasa máxima de inactivación. En lugar de K_{max} , en este artículo se informó el valor D ($D_T = \frac{\ln 10}{K_{max}}$). Este parámetro representa el tiempo que debe mantenerse en un estrés por calor para reducir la carga microbiana en un 90%. La tasa de inactivación microbiana tiene una fuerte dependencia de la temperatura, esta relación se utilizó el modelo Bigelow de segundo orden que asume una relación log lineal entre los valores D y temperatura. Esto se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} D(T) = \text{Log}_{10} D_{ref} - \frac{T - T_{ref}}{Z}$$

Donde Z es el valor del microorganismo, que requiere un aumento de temperatura diez veces para reducir el valor D . Este modelo introduce una temperatura de referencia (T_{ref}) sin ningún significado biológico, pero con un impacto positivo en la identificación del parámetro D_{ref} en el valor D estimado en el T_{ref} .

Para condiciones isotérmicas y en ausencia de hombro se utiliza el modelo Geeraerd:

$$N(t) = (N_0 - N_{tail}) e^{-\frac{\ln 10}{D} t} + N_{tail}$$

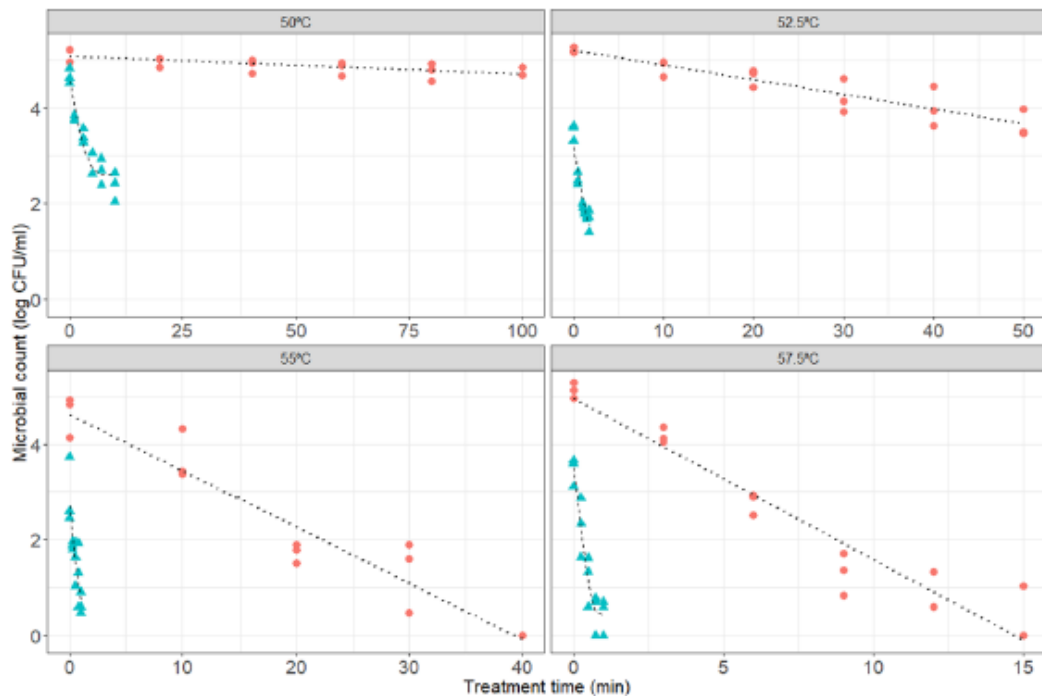
Las estimaciones de los parámetros N_0 , N_{cola} , y D se han calculado a partir del experimento isotérmico por ajustes a los datos experimentales. Los experimentos se estimaron

utilizando algoritmo de ajuste en un paso Rithm, donde los modelos para cada temperatura de tratamiento se estiman en un paso en el cual los parámetros se estiman secuencialmente. Para el caso de la condición no isotérmica, se utiliza el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Se estiman los intervalos de predicción para la respuesta microbiana en condiciones no isotérmicas. Se considera que cada parámetro del modelo sigue una distribución normal con desviación medio y estándar estimada a partir del experimento isotérmico.

CAPÍTULO III

1. Resultados

En la figura1-1, se compara las curvas de supervivencia obtenidas en condiciones isotérmicas para muestras de control sin nano partículas de D-limoneno emulsionado añadido al medio de calentamiento y aquellas con D-limoneno nano emulsionado. La adición del antimicrobiano natural al medio de calentamiento tiene un impacto dramático en la resistencia de *L.monocytogenes* al tratamiento. A los 50,0°C el tratamiento de control no pudo reducir el recuento microbiano. Sin embargo, a la misma temperatura suplementado con D-limoneno nano emulsificado, redujo el recuento microbiano por 3 ciclas logarítmicas después de 15 minutos. Este nivel de inactivación es similar al alcanzado para el tratamiento de control a 57,5°C después del mismo tiempo de tratamiento (15minutos). En consecuencia, la adición del antimicrobiano natural nano emulsificado permite reducir la temperatura de tratamiento de 57,5°C a 50,0°C sin un impacto negativo en la seguridad del producto con respecto a *L.monocytogenes*.



Figuras 1-1 Curva de supervivientes obtenidas en condiciones Isotérmicas.

Los puntos rojos indican tratamiento sin la adición del limoneno nano emulsificador. Las muestras con limoneno se muestran con triángulos azules. Las líneas puntuadas son ajustes del modelo con y sin limoneno. Las facetas representan diferentes temperaturas de tratamiento a diferentes escalas del eje X. Fuente: [Garre, A., Espín, JF, Huertas, JP 2020](#)

En la Figura 1-2 se comparan los recuentos microbiológicos de *L.monocytogenes* observados para las muestras de control (puntos rojos) y los suplementados con D-limoneno nano emulsificado para tratamientos no isotérmicos con diferentes velocidades de calentamiento. Para el calentamiento con una velocidad de calentamiento 1°C/min (Fig.A), la adición del antimicrobiano nano emulsionado reduce el tiempo necesario para provocar una reducción logarítmica de 3 en el recuento de *L.monocytogenes* de 22 min a 12 min. Asimismo, para el tratamiento con una velocidad de calentamiento de 10°C/min, el tiempo se redujo de 2,5 min a 1,5 min. Finalmente, para el tratamiento con una velocidad de calentamiento de 20°C/min, el tiempo para lograra la reducción de 3 unidades logarítmicas es reducido del 1,25 min a 0,6 min. En consecuencia, la adición de

D-limoneno nano emulsificado también es eficaz al reducir la intensidad del tratamiento térmico en condiciones isotérmicas.

	Parameter	Value
Control samples	D-value at 53.75 °C	16.10 ± 0.85 min
	z-value	4.95 ± 0.18 °C
Samples with nanoemulsified limonene	D-value at 53.75 °C	0.64 ± 0.07 min
	z-value	7.45 ± 0.79 °C
	log N_{int} at 50 °C	2.60 ± 0.14 log CFU/ml
	log N_{int} at 52.5 °C	1.16 ± 0.61 log CFU/ml
	log N_{int} at 55 °C	0.42 ± 0.48 log CFU/ml
	log N_{int} at 57.5 °C	0.42 ± 0.17 log CFU/ml

Figuras 1-2 Parámetros del modelo Geeraerd

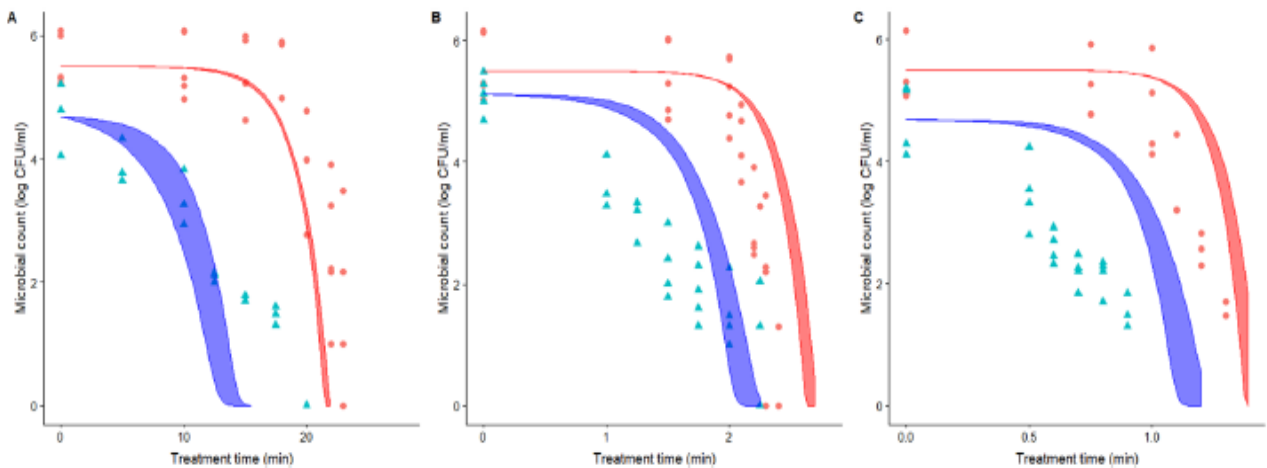
Parámetros del modelo (\pm error estándar) del modelo de Geeraerd estimados a partir de experimento de inactivación isotérmica.

Fuente: Fuente: [Garre, A., Espín, JF, Huertas, JP 2020](#)

Por otro lado, el modelo Geeraerd fue capaz de describir la respuesta microbiana en todos los casos analizados. El modelo matemático permite cuantificar el impacto del limoneno nano emulsificado sobre la resistencia térmica de las células microbianas. En la figura 1-3 se presentan los parámetros del modelo estimado para cada condición. Para las muestras de control, se estimó un valor D de 16,1min (\pm 0,9min) a 53,8°C. Cuando se adicionó el antimicrobiano natural al medio de calentamiento, el valor D se redujo en un factor de 25 ($0,6 \pm 0,1$ min a 53,8°C). Por lo tanto, según la predicción del modelo, la adición del limoneno nano emulsificado permitiría reducir la duración del tratamiento de inactivación a 53,8°C en un factor de 25 reduciendo así la carga microbiana, sin afectar la seguridad microbiana del producto.

Para cada tratamiento en el que se le añadió limoneno nano emulsificado al medio, se observa un efecto con cola, cuya altura disminuye con la temperatura de tratamiento ($2,6 \pm 0,1$ log UFC/ml a 50,0°C, $1,2 \pm 0,6$ log UFC/ml a 52,5°C, $0,4 \pm 0,5$ los UFC/ ml a 55°C, $0,4 \pm 0,2$ log UFC /ml a 57,5°C). Estos efectos de cola son comunes en la inactivación microbiana y puede atribuirse a varias causas. Por un parte, puede ser un

indicador de una fracción de población microbiana que es más resistente al tratamiento debido a la variabilidad propia entre células. Otra explicación es que son artefactos causados por error de muestreo, en diferentes escenarios experimentales. En consecuencia, los efectos de colas observados a 55,0 y 57,5°C podrían ser artefactos, mientras que los observados a 50,0 y 52,5°C, son representativos de una subpoblación resistente.



Figuras 1-3 Comparación entre predicciones basadas en datos isotérmicos y curvas de supervivientes para tratamiento dinámico

Comparación entre predicciones basadas en datos isotérmicos y curvas de supervivientes para tratamiento dinámico con una velocidad de calentamiento de (A) 1°C/min, (B) 10°C/min, (C) 20°C/min. Los puntos rojos indican tratamientos sin la adición de D-limoneno nano emulsionado. Las muestras con limoneno se encuentran en triángulos azules. Las cintas representan los intervalos de predicción (95% de confianza) basado en experimento isotérmico para muestras de control rojo y muestras con limoneno nano emulsionado azul.

Fuente: [Garre, A., Espín, JF, Huertas, JP 2020](#)

2. Discusión

La demanda del consumidor por alimentos de alta calidad y que presenten atributos frescos (sensoriales y nutricionales) está en aumento, presentando un desafío a la industria alimentaria para los próximos años. Esto conlleva al desarrollo de tecnologías novedosas para el procesamiento, conservación y estabilidad del alimento. En esa dirección, la aplicación de nano tecnología para potenciar el efecto antimicrobiano de los antimicrobianos naturales emulsionados se presenta como una tecnología con una buena perspectiva para la inactivación microbiana.

En diferentes estudios se han analizado los efectos de los antimicrobianos naturales con la aplicación de nano tecnología. Sin embargo, el presente estudio se enfoca en la aplicación de D-limoneno como antimicrobiano con efectos sobre *L.monocytogenes*, en la que diferentes investigadores han, de igual manera, estado estudiando. El caso de (Mate, Periago, & Palop, 2016), cuando el D-limoneno estuvo presente en nano emulsión, observó una reducción de 100 veces en la resistencia térmica de *L.monocytogenes* a todas las temperaturas del tratamiento en caldo de soja trípico. En un estudio similar de (Loku, Becerra, Kohli, Fisher, & Choidhary, 2017) se utilizó liposomas que contenían D-limoneno, para evaluar la eficacia contra algunos tipos de hongos y bacterias (*E.coli* y *L.monocutognes*) en los arándanos, evaluando su vida útil. Se demostró una buena estabilidad física y una fuerte actividad antimicrobiana in vitro, en comparación con D-limoneno libre. En otro estudio, se quiso evaluar el efecto antimicrobiano de la adición en conjunto de nisina y D-limoneno frente a *Listeria monocytogenes* en caldo de cultivo TSB, pudiendo comparar el efecto con una adición directa de los mismos al medio y una con nano emulsión elaborada a partir de estos dos antimicrobianos, los investigadores (Matéo, Periago, & Palop, 2014) a través de los datos obtenidos mostraron una disminución de los recuentos en 2 unidades logarítmicas a los 90 minutos cuando se aplicó la nisina y el D-limoneno en forma directa con respecto a la población inicial en tiempo 0, y de 4 unidades logarítmicas a los 90 minutos en el caso cuando se aplicó la nano emulsión. En ambos casos la concentración inicial de microorganismo fue de 10^6 UFC/ml. Demostrando que

el efecto sinérgico de manera más evidente en la aplicación de los antimicrobianos nano emulsionados.

Dentro de los resultados obtenidos por el presente estudio, se observa un menor impacto asociado al medio de calentamiento, lo que puede tener una gran importancia en la eficacia del antimicrobiano nano emulsionado. Esta puede estar asociada al emulsionante utilizado, ya que la lecitina de soja tiene un peso molecular mayor que el Tween 80, pudiendo interferir con la membrana bacteriana y el antimicrobiano. La lecitina de soja, tiene una baja solubilidad en agua pero cuando se encuentra en soluciones acuosas los fosfolípidos que presenta forman una bicapa lipídica, micelas o estructuras laminares, según la hidratación y temperatura en que se encuentre, lo que la hace promover ligeramente la concentración de la fase acuosa de los aceites esenciales, haciéndola diferente a otros emulsionantes, y como consecuencia, mejora notablemente la actividad bactericida de estos mismos aceites esenciales. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se utiliza Tween 80 y propilenglicol, se observa una pérdida del efecto bactericida en las nano emulsiones. Por otro lado, considerando que existe un efecto negativo, sobre todo en la calidad de los productos alimentarios cuando se le aplica tratamientos térmicos, la reducción en la intensidad del tratamiento permitida por el antimicrobiano nano emulsionado mejora la calidad del producto, sin afectar la seguridad del producto con respecto a *L.monocytogenes*.

En la Figura 1-3, el gráfico B y C se observa que la respuesta de *L.monocytogenes* al tratamiento dinámico fue irrelevante, ya que este desarrolló una respuesta adaptativa a través del tratamiento. Esta respuesta fisiológica es debido a un aumento de temperatura de manera paulatina, lo que permite que las células desarrollen una respuesta aumentando su resistencia. Este tipo de respuesta suele llamarse “aclimatamiento por estrés”. El gráfico A demuestra cómo afecta esta respuesta fisiológica, aumentando la carga microbiana (valor D) con respecto al tiempo y temperatura determinada.

En el gráfico B, las muestras sin limoneno son más sensible al estrés térmico, por lo que supone que, al aumentar la tasa de calentamiento, aumenta el efecto del tratamiento.

Las muestras suplementadas con limoneno nano emulsificador, al inicio del tratamiento, advierten una alta reducción de carga microbiana (alta velocidad de calentamiento da como resultado una mayor inactivación microbiana). No obstante, al final del tratamiento ($t = 2\text{min}$), el recuento microbiano es más alto según los experimentos isotérmicos. Esto se podría explicar debido a que las células presentan respuestas fisiológicas al tratamiento aumentando su resistencia térmica.

En el caso del grafico C, la alta velocidad de calentamiento tiene un impacto en la respuesta microbiana, pudiendo reducir la resistencia al estrés térmico. Este efecto da como resultado un recuento microbiano más bajo que el basado en el experimento isotérmico.

3. Conclusión

Como ha quedado demostrado en el presente estudio de investigación, la conservación de alimentos dentro de la industria tiene un papel protagónico. Esta actúa asegurando la inocuidad del alimento, inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos y dando estabilidad a través de la inhibición de los microorganismos alterantes que pueden estar presente en el alimento. En ese sentido, la aplicación de un antimicrobiano puede contribuir a la seguridad del alimento como también lo hace la aplicación de tratamientos térmicos. Sin embargo, estos últimos favorecen las alteraciones en propiedades fisicoquímicas del alimento y los prejuicios sobre los aditivos sintéticos. Es por ello que se investigó si al utilizar una nueva tecnología y una antimicrobiano natural (D-limoneno), con efectos sobre *Listeria monocytogenes*, se podría atenuar o eliminar las limitaciones que presenta lo anterior. A través de los resultados obtenidos y la información recopilada, la aplicación de nano tecnología para producir una nano emulsión en base de aceite esencial natural emulsionado utilizando una sustancia natural (lecitina de soja). Esta

puede, efectivamente, solucionar varios de dichos inconvenientes aumentando el efecto antimicrobiano del aceite esencial, así como aumentando su estabilidad.

Si bien los resultados son prometedores en el aporte de los antimicrobianos naturales para reducir la intensidad de los procesos de pasteurización, aún existen varias limitaciones tecnológicas antes de que el antimicrobiano pueda utilizarse a gran escala en la producción de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHIPIA. (2017). *Listeria monocytogenes*. *Ministerio de agricultura*, 1-9. Recuperado el 11 de Octubre de 2020, de <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-04-Listeria-v01.pdf>
- Alarcon, J., & Matiacevich, S. (2019). Active emulsions based on alginate and lemongrass/citral essential oils: effect of encapsulating agents on physical and antimicrobial properties. *International Journal of Food Properties*, XXII(2), 1952-1965. Recuperado el 5 de Octubre de 2020, de [file:///C:/Users/gabriela%20s/Downloads/53544-Texto%20del%20art%C3%ADculo-101711-2-10-20161018%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/gabriela%20s/Downloads/53544-Texto%20del%20art%C3%ADculo-101711-2-10-20161018%20(2).pdf)
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (29 de Agosto de 2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, XV(2), 1-9. Recuperado el 07 de Octubre de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
- Avalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2016). Nano tecnología en la Industria Alimentaria I: Aplicaciones. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.*, X(2), 1-7.
- Benadolf, D. (2008). *Listeria monocytogenes*. *Revista Chil Infect*, XXV(5), 350. Recuperado el 9 de Octubre de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v25n5/art05.pdf>

- Cabañero, G. (2020). Encapsulación de antimicrobianos naturales en sistemas nano y micro estructurados: Técnicas y aplicaciones en tecnología de alimentos. *Tesis Grad Cs. Tecnol. Univ. Politecnica de Valencia*, 1-44. Recuperado el 15 de septiembre de 2020, de <https://riunet.upv.es/>
- FAO. (2011). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización mundial de la salud. *Reunión conjunta FAO/OMS de Expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimenticios y agropecuarios: posible consecuencias para la inocuidad de alimentos*, 1-144. Recuperado el 20 de Octubre de 2020, de <http://www.fao.org/3/a-i1434s.pdf>
- FAO/OMS. (2019). Inocuidad de los alimentos es asunto de todos. *Día mundial de la inocuidad de los alimentos*, 1-8. Recuperado el 21 de Septiembre de 2020, de <http://www.fao.org/3/ca4449es/ca4449es.pdf>
- Gallegos, P., Bañuelos, R., Delgadillo, L., Meza, C., & Echavarría, F. (2019). Actividad Antimicrobiana de cinco compuestos Terpenoides: Carvacrol, limonene, linalool, beta terpineno y timol. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, XXII, 241- 248. Recuperado el 12 de Octubre de 2020, de <https://pdfs.semanticscholar.org/c11b/a9ad9c764c58baaded8d9a5eded06c7c1513.pdf>
- García, E., & Suárez, M. (s.f.). Las arcillas: propiedades y usos. *Univ.Complutense.Madrid*, 1-25. Recuperado el 25 de Octubre de 2020, de <http://campus.usal.es/~delcien/doc/GA.PDF>
- Garre, A., Clemente, M., Fernández, P., Lidqvist, R., & Egea, J. (octubre de 2018). Bioinactivation FE: Una aplicación web gratuita para el modelado isotérmico y la inactivación microbiana dinámica. *Food Research International*, CXII, 353-360. Recuperado el 3 de Noviembre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918305040>
- Garre, A., Espina, J., Huerta, J., Periago, P., & Palop, A. (Febrero de 2020). Limonene nanoemulsified with soya lecithin reduces the intensity of non-isothermal treatments for inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Scientific Reports*, 3656. Recuperado el 3 de Octubre de 2020, de <https://www.nature.com/articles/s41598-020-60571-9>

- Gaviña, A. (2015). Estudio de la actividad antimicrobiana de micropartículas de sílice sobre *Echerichia coli*. *Universidad Politecnica de Valencia*, 1-55. Recuperado el Octubre de 2020, de <https://riunet.upv.es>
- Ghazy, O., Fouad, M., Seleh, H., Kholif, A., & Morsy, T. (2020). Preparación asistida por ultrasonidos de nanoemulsión de extracto de anís y su bioactividad frente a diferentes bacterias patógenas. *Food Chemistry*, 341(2). Recuperado el 22 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881462032121X>
- Ghorbanzade, T., Jafari, S., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *National Library of medicine*, 52-146. Recuperado el 21 de octubre de 2020, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27596403/>
- Gonzales, C., & Belloso, O. (19 de Febrero de 2019). Diseño y caracterización de una nanoemulsión antimicrobiana basado en almidón y cera de abeja para su uso como recubrimientos comestible. *Univ. Autonoma de Queretano*, 1-100. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de <http://ring.uaq.mx/bitstream/123456789/1150/1/RI007619.pdf>
- Hielscher. (25 de Mayo de 2020). Homogeneizadores ultrasónicos para procesamiento de líquidos. *Tecnología de Ultrasonido*. Recuperado el 4 de Noviembre de 2020, de <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-homogenizers-for-liquid-processing-3.htm>
- ISO. (2014). Materia prima aromáticas naturales. *Asociación Española de Normalización y Certificación*.
- Jafari, S., Paximda, P., Mondala, I., Assadpour, E., & Mehrine, M. (2017). Encapsulación por nanoemulsiones. *Nanocapsulation Technologies for the food and nutraceutical industries*, 36-73. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128094365000021>
- Lee, M., Seo, H., & Park, H. (1 de Abril de 2017). Aceite de tomillo encapsulado en nanotubos de halosita para sistema de envasado antimicrobiano. *Revista de ciencias de los alimentos*, 82(4), 922-932. Recuperado el 26 de Octubre de 2020,

- de <https://koreauniv.pure.elsevier.com/en/publications/thyme-oil-encapsulated-in-halloysite-nanotubes-for-antimicrobial->
- Llinás, M., & Garcia, D. (2017). Nanopartículas de Sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Universidad Ramon Llull*, 1-12. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de <https://core.ac.uk/download/pdf/39152365.pdf>
- Loku, A., Becerra, N., Kohli, P., Fisher, D., & Choidhary, R. (2017). Eficacia antimicrobiana de los liposomas que contienen D-limoneno y su efecto sobre la vida útil de los arandanos. *Postharvest Biology and Technology*, 128, 130-137. Recuperado el 23 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521416306378>
- Lopez, A. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuesto para la producción de extractos antioxidantes de yerba mate. *Tesis grado de magister en Tegnologia y higiene en alimentos*, 1-155. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/24904/Documento_completo_.pdf?sequence=1
- Magalhaes, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., & Teixeira, T. (2014). *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Food Safety*, 1, 450-461. Recuperado el 11 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128001013>
- Martín, F. (2016). Encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en alginato de calcio con microestructura modificada. *Univesidad Veracruzana*, 1-112. Recuperado el 23 de Octubre de 2020, de <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/Flor-de-Maria-Ortiz-Martin.pdf>
- Mate, J., Periago, P., & Palop, A. (Enero de 2016). Cuando se nanoelsiona el D-limoneno reduce la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes*unas cien veces. *Food Control*, 59, 824-829. Recuperado el 12 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515301080>
- Matéo, J., Periago, P., & Palop, A. (2014). Efectos combianados de nisina y D-limoneno sobre *Listeria monocytogenes* aplicados mediante nanoemulsiones. *Workshop en Investigación Agroalimentaria*, 1-4. Recuperado el 10 de Noviembre de 2020, de

<https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/4508/ecn.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Meza, E. (2016). Extracción y evaporación del aceite esencial de las cascara de naranja dulce (*Citrus sinensis*). *Universidad Guataquil*, 1-76. Recuperado el 12 de Octubre de 2020, de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/20142/1/BCIEQ-T-0203%20Meza%20Ipanaqu%C3%A9%20Eduardo%20Ignacio.pdf>
- MINSAL. (2013). Informe de situación de *Listeria monocytogenes*. *Departamento de epidemiologia*, 1-3. Recuperado el Septiembre de 2020, de <http://www.repositoriodigital.minsal.cl/bitstream/handle/2015/1011/3160.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Moyano, A., & Matiacevich, S. (2019). Active emulsions based on alginate and lemongrass/citral essential oils: effect of encapsulating agents on physical and antimicrobial properties. *International Journal of Food Properties*, 1952-1965. Recuperado el octubre de 2020, de <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/10942912.2019.1698605?scroll=top&needAccess=true>
- NNI. (2007). National Nanotechnology Initiative. *Euroresidentes vida inteligente*. Recuperado el Septiembre de 2020, de <https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia>
- OMS. (2015). Datos cifras sobre las enfermedades de transmisión alimetaria. *Inocuidad de los alimentos*. Recuperado el Septiembre de 2020, de https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/fergonepager_es.pdf?ua=1
- Pabas, M., Shariatifar, N., Beikzadeh, S., & Jahed, G. (Septiembre de 2018). Efectos de los recubrimientos de quitosano incorporado con aceite esencial de planta Satureja libre o nanoencapsulado sobre las características de calidad de la carne de cordero. *Food Control*, 91, 185-192. Recuperado el 23 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713518301543>
- Ramirez, M. (2015). Liposomas como Nanotrasportadores de antioxidante y Estudio de tasa de Liberación. *Tendencia de innovación en la Industria Alimentaria*, 215-288. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LBpOCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA215&dq=nanoencapsulacion+a+traves+de+liposomas+&ots=cT0-OTtdOh&sig=KaUb-IPZ0spD1XybNxa4zK_LyNk#v=onepage&q=nanoencapsulacion%20a%20traves%20de%20liposomas&f=false

- Roth. (2017). Identificación de la sustancias o mezcla. *Rotichrom*, 1-18. Recuperado el septiembre de 2020, de <https://www.carlroth.com/medias/SDB-5198-ES-ES.pdf>
- Saucedo, R., & Nereyda, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhan*, 7, 1-19. Recuperado el Octubre de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>
- Soto, K. (2018). Desarrollo y caracterización de nanofibras electro estiradas con amplio espectro antimicrobiano como alternativa de empaque activo. *Universidad Autonoma Queretara*, 1-184. Recuperado el 26 de Octubre de 2020, de <file:///C:/Users/gabriela%20s/Downloads/RI007924.pdf>
- Surendhiran, D., Cui, H., & Lin, L. (2019). Encapsulación de florotanina en nanofibras mezcladas de alginido/PEO para preservar la carne de pollo de la contaminación por Salmonella. *Food Packaging and Shelf Life*, 21. Recuperado el 25 de Octubre de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214289418304101?via%3Dihub>
- Wang, H., Hao, L., Wang, P., Chen, M., & Jiang, S. (2017). Release Kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. *Food Hydrocolloids*, 437-446. Recuperado el Octubre de 2020
- Wilmer, A., Hernani, G., & Wilson, L. (2006). Las zeolitas y su aplicación en la descontaminación de efluentes mineros. *Scielo*, 111-118. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642006000600017
- Yusty, M. (2018). Inactivación de *Listeria monocytogenes* por calor en condiciones isotérmicas en un entorno ácido. *Universidad Politecnica de Cartagena*, 1-95. Recuperado el 11 de Octubre de 2020, de

<https://repositorio.upct.es/xmlui/bitstream/handle/10317/6737/tfg-barina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>