

## Efecto combinado de nisina y *D*-limoneno sobre *Listeria monocytogenes* aplicados mediante nanoemulsiones

J. Maté, P. M. Periago, A. Palop

Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, España. [j\\_ms\\_86@hotmail.com](mailto:j_ms_86@hotmail.com)

### RESUMEN

La nisina y el *D*-limoneno son compuestos naturales con carácter antimicrobiano. Durante la última década, algunas investigaciones han llegado a la conclusión de que el empleo combinado de algunos aceites esenciales con la nisina podría presentar cierto efecto sinérgico. Entre los principales inconvenientes del empleo de estos compuestos en la industria alimentaria destacan su baja estabilidad debido a su naturaleza oxidativa, su pronunciado carácter aromático y a su carácter hidrofóbico. El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto sinérgico de nisina y *D*-limoneno en *Listeria monocytogenes*, al aplicarlos mediante una nanoemulsión. Los resultados evidenciaron un notable efecto sinérgico al emplearse de manera combinada la nisina con el *D*-limoneno, siendo este efecto más evidente al aplicarlos en forma de nanoemulsión que por medio de la adición directa de los mismos. Los datos mostraron una disminución de los recuentos en 2 unidades logarítmicas cuando se aplicaron la nisina y el *D*-limoneno de manera directa, y de 4 unidades logarítmicas en el caso de aplicarlos en forma de nanoemulsión. Estos datos ponen de manifiesto que el empleo de aceites esenciales en forma de nanoemulsión podría tener numerosas aplicaciones en la industria alimentaria solventando los problemas anteriormente mencionados.

**Palabras clave:** Antimicrobianos naturales, seguridad alimentaria, método CPI, carácter hidrofóbico.

### 1. Introducción

Durante los últimos años, la industria alimentaria ha favorecido la introducción, de antimicrobianos de origen natural en contra de los de origen sintético, ya que ha quedado documentado que los de origen natural generan menores problemas de intolerancias en humanos e incluso que algunos de los de origen sintético podrían generar sustancias tóxicas y carcinogénicas en nuestro organismo [1].

Se han desarrollado varios experimentos donde se ha evaluado el carácter antimicrobiano del *D*-limoneno frente a diferentes patógenos alimentarios como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Saccharomyces bayanus* entre otros [3]. En muchos de estos casos se obtuvieron resultados satisfactorios. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de los

aceites esenciales, que los hacen inmiscibles en agua, la susceptibilidad de los mismos a la degradación oxidativa, la cual disminuye considerablemente su efecto, y su pronunciado carácter aromático, ha reducido su empleo por parte de la industria alimentaria.

Algunos grupos de investigación han centrado su atención en solventar estos problemas. Bien por medio de la combinación de varios aceites esenciales [4], o la combinación de los mismos con otras sustancias con carácter antimicrobiano como podría ser la nisina [5]. En estos casos se apreció efecto sinérgico, lo cual aumentó la efectividad de ambas sustancias al emplearlas conjuntamente. Este efecto sinérgico paliaría en cierta medida, la disminución del efecto de los aceites esenciales por la degradación oxidativa y, por otro lado, permitiría disminuir las dosis de los mismos, disminuyendo el rechazo a usarlos por su fuerte aroma. Pero no solventaría el problema de la

inmiscibilidad de los aceites esenciales en medio acuoso. Para ello, en los últimos dos años, ha comenzado a aplicarse la tecnología de nanoemulsiones, por medio del método de Inversión de Fase Catastrófica (CPI). El método CPI se encuentra entre los catalogados de “baja energía”. Además cuenta con las ventajas de su escaso coste y el aprovechamiento de la energía química almacenada en el sistema. La nanoemulsión presenta dos fases o componentes, una fase acuosa (A) constituida por una mezcla de agua y propilenglicol y una fase oleosa (O), preparada a partir de una mezcla del aceite que se pretende emulsionar con Tween 80. Las nanoemulsiones, debido a su tamaño subcelular, proporcionan un enfoque eficaz para mejorar la estabilidad física de las sustancias activas encapsuladas y aumentar la distribución de los agentes antimicrobianos en matrices de alimentos donde se encuentran los microorganismos [6]. Aun habiendo pocos estudios actualmente, las nanoemulsiones con aceites esenciales han demostrado que presentan excelentes propiedades antimicrobianas contra una amplia variedad de microorganismos, siendo incluso necesarias menores cantidades de los mismos para conseguir un efecto similar o incluso mayor [7].

Tan sólo hay constancia de un estudio, publicado a finales de 2013, donde se evaluó el efecto antimicrobiano de una nanoemulsión elaborada a partir de los antimicrobianos nisina y D-limoneno. En el mismo se evaluó dicho efecto frente a bacterias Gram positivas de las especies *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, bacterias Gram negativas de la especie *E. coli* y hongos de la especie *S. cerevisiae*. Para ello se representaron los datos en forma de concentraciones mínimas inhibitorias e imágenes de microscopía electrónica de barrido [9].

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de la adición conjunta de nisina y D-limoneno frente a *Listeria monocytogenes* en caldo de cultivo TSB (tryptic soy broth), comparando el efecto de la adición directa de los mismos al medio de cultivo, con el efecto de la adición de una nanoemulsión elaborada a partir de estos dos antimicrobianos. Para ello se prepararon nanoemulsiones mediante el método CPI (Inversión de Fase Catastrófica), se desarrollaron curvas de supervivencia por medio de recuento en placa y curvas de crecimiento por absorbancia a distintas concentraciones de antimicrobianos.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En los experimentos se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* CECT 4032. Fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las células se hicieron crecer a 37°C en caldo TSB (Scharlau Chemie S. A., Barcelona, España) complementado con 0,5% de glucosa (p/v). Los cultivos se mantuvieron a -80°C en glicerol al 30% como crioprotector. Para preparar los inóculos se hacía crecer el microorganismo durante toda la noche en TSB a 37°C.

### 2.2 Antimicrobianos

La nisina se obtuvo de Sigma Aldrich Chemie, (Steinheim, Alemania). Fue disuelta en etanol al 50% (v/v) (Panreac, Barcelona, España). La solución de trabajo fue preparada a una concentración final de 30 µM y almacenada en refrigeración hasta su uso. Las concentraciones ensayadas de nisina fueron 0.075 µM para los estudios de inactivación y 0.0375 µM para los de crecimiento.

El D-limoneno se obtuvo de sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania). Fue disuelto en etanol al 95% (v/v) (Panreac, Barcelona, España). La solución de trabajo fue preparada a una concentración final de 100 mM y almacenada en oscuridad y en condiciones de refrigeración hasta su uso. La concentración ensayada de D-limoneno fue 1 mM en todos los experimentos.

### 2.3 Preparación de la nanoemulsión con inversión de fase catastrófica (CPI)

Para la elaboración de la nanoemulsión de nisina y D-limoneno se siguió el protocolo desarrollado por Zhang et al., 2013. Con el objetivo de comprobar la estabilidad de la nanoemulsión, los experimentos se hicieron por duplicado y con una separación entre experimentos de ocho semanas, no apreciándose diferencias significativas.

### 2.4 Curvas de supervivencia

Para realizar el recuento de formas viables se partió de un inóculo preparado 24 horas antes del experimento en caldo TSB e incubado a 37 °C. A continuación se sembraron tubos con 4 mL de caldo TSB previamente atemperado a 37°C, presentando éstos una concentración inicial de aprox. 10<sup>6</sup> ufc/mL. Seguidamente se añadieron los antimicrobianos a las concentraciones

indicadas anteriormente y se incubaron a 37°C. Se tomaron muestras cada 30 min, hasta 90 min. Posteriormente se realizó la siembra en placa por duplicado en medio TSA de cada una de las diluciones adecuadas en agua de peptona (Scharlau). Las placas fueron incubadas durante 24h a 37°C.

### 2.5 Curvas de crecimiento

El crecimiento en presencia de los antimicrobianos se determinó mediante absorbancia en un Bioscreen C (Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Se partió de tubos con 4 mL de caldo TSB que contenían una concentración inicial de  $10^3$  ufc/mL. Seguidamente se añadieron los antimicrobianos a las concentraciones indicadas anteriormente y se pipetearon 400  $\mu$ L del cultivo con los antimicrobianos en cada uno de los pocillos de la microplaca del Bioscreen. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, midiéndose densidades ópticas en intervalos de 15 minutos a un rango de longitudes de onda de 420-580 nm (*wideband*).

El cálculo de los parámetros de crecimiento (duración de la fase de latencia y velocidad de crecimiento) se realizó mediante el modelo de Baranyi y Roberts (1993), a través del software DMFit.

## 3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en el recuento de supervivientes, para los casos en los que se aplicaron los antimicrobianos nisina y *D*-limoneno de manera individualizada y directa, a las concentraciones anteriormente indicadas, no mostraron diferencias significativas con respecto al control, no fue así al aplicar el *D*-limoneno en forma de nanoemulsión, donde se obtuvo una disminución de la población, a los 90 minutos, de dos ciclos logarítmicos con respecto al control (Figura 2). Por otro lado, al combinar los antimicrobianos, se apreció una disminución evidente de la población inicial del microorganismo; en el caso de la aplicación directa de los antimicrobianos se obtuvo una disminución de hasta 3 ciclos logarítmicos a los 90 minutos respecto a la población inicial a tiempo 0. Mientras que al aplicar los antimicrobianos en forma de nanoemulsión, a los 90 minutos, esta disminución fue de 4 ciclos logarítmicos respecto a la población inicial a tiempo 0 (Figura 1). En ambos casos se partió de una concentración inicial del microorganismo de  $10^6$  ufc/mL.

Las curvas de crecimiento por medio de densidades ópticas en el Bioscreen mostraron, en los casos donde se empleó la emulsión de limoneno de manera individual y la combinación de antimicrobianos de manera directa, un aumento de la fase de latencia con respecto al control de 10.9 y 10.4 horas respectivamente (Tabla 1), con velocidades de crecimiento de 0.027 y 0.037 uds D.O. por hora, siendo en este caso la velocidad de crecimiento del control de 0.120 uds. D.O. por hora. Además en ambos casos se pudo apreciar una menor densidad óptica final, la cual fue levemente mayor al emplear los antimicrobianos de manera combinada. Al ser aplicados en forma de emulsión, se pudo comprobar la inhibición del crecimiento del microorganismo durante las 100 horas que duró el experimento (Figura 3). En todos los casos se partió de una concentración inicial del microorganismo de  $10^3$  ufc/mL.

Si bien no existen muchos trabajos en los que se haya evaluado el efecto antibacteriano de las nanoemulsiones, los datos obtenidos en nuestro experimento coinciden con los datos publicados [8], lo que indica que la aplicación de nisina y *D*-limoneno en forma de nanoemulsión sería más eficaz frente a *L. monocytogenes*, que cuando los compuestos son añadidos directamente al medio. El empleo de los antimicrobianos en forma de nanoemulsión da lugar, a priori, a un producto miscible en medio acuoso, estable a lo largo del tiempo y, al potenciar notablemente el efecto antimicrobiano de esta combinación, se estaría contrarrestando en cierta medida la pérdida de eficacia que sufren los aceites esenciales debida a la oxidación. Además de conseguir disminuir las concentraciones utilizadas hasta límites organolépticamente aceptados.

## 4. Conclusiones

Existe un efecto sinérgico al emplear de manera combinada la nisina y el *D*-limoneno, frente al microorganismo objeto de estudio. Este efecto sinérgico se manifestó de manera mucho más evidente al aplicar los antimicrobianos en forma de nanoemulsión.

Como futuras pruebas o análisis pendientes de realizar, sería conveniente realizar un ensayo de vida útil en algún producto alimenticio para evaluar el efecto de esta nanoemulsión en alimentos. También se debería realizar un análisis organoléptico, por medio de un panel de catadores, de los productos diana para evaluar la aceptación por el consumidor. Otros ensayos pendientes de realizar serían los relacionados

con el estudio de la termorresistencia de estos compuestos en forma de nanoemulsiones, no sólo para evaluar la estabilidad de las mismas al aumentar la temperatura, sino para comprobar si existiría cierto efecto sinérgico al emplear estas dos técnicas de manera conjunta.

### 5. Agradecimientos

Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación y fondos FEDER a través de los proyectos AGL- 2010-19775 y AGL2010-22206-C02-02.

### 6. Referencias bibliográficas

[1] Fleming-Jones M.E., Smith, R.E. 2003. Volatile organic compounds in foods: A five year study. *J. agr. food. chem.* 51(27): 8120–8127.

[2] Sun J. 2007. D-Limonene: Safety and clinical applications. *Altern. Med. Rev.* 12(3): 259.

[3] Chikhoun A., Hazzit M., Kerbouche L., Baaliouamer A., Aissat K. 2013. *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: Chemical composition and biological activities. *J. Essent. Oil Res.* 1–8.

[4] Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* 26(2): 142–150.

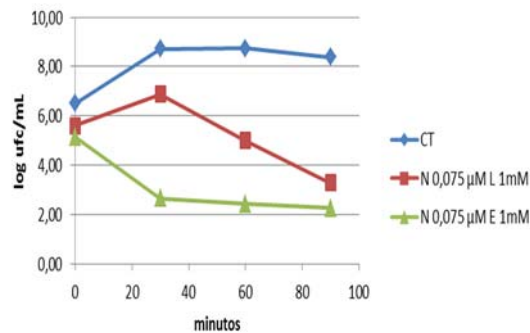
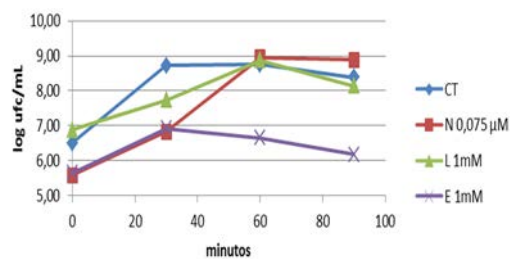
[5] Periago PM., Palop A., Fernandez PS. 2001. Combined Effect of Nisin, Carvacrol and Thymol on the Viability of *Bacillus cereus* Heat-Treated Vegetative Cells. *Food Sci. technol. int.* 7: 487-492.

[6] Weiss J., Gaysinsky S., Davidson M., McClements J. 2009. Nanostructured encapsulation systems: Food antimicrobials. *Global issues in food science and technology.* 425–480.

[7] Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Sci. Technol.* 44(9): 1908–1914.

[8] Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., Liang H. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsión. 2013. *Food chem.* 150: 307-312.

### Tablas y Figuras



Figuras 1 y 2. Recuento de supervivientes durante los primeros 90 minutos tras la adición de los antimicrobianos. Se partió de una concentración inicial de microorganismo de  $10^6$  ufc/mL. Se evaluaron concentraciones de nisina (N) 0,075 µM y D-limoneno (L) y emulsión de D-limoneno (E) a 1 mM y sus combinaciones.

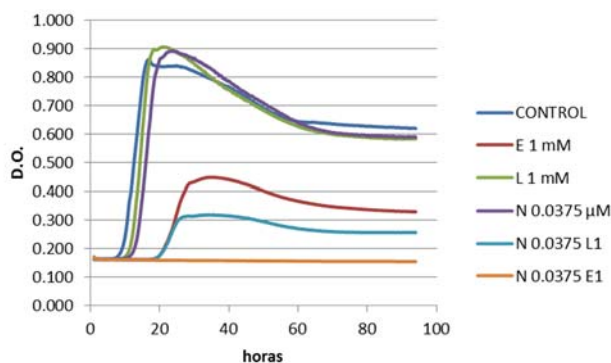


Figura 3. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 37°C en caldo TSB. Se partió de una concentración inicial de microorganismo de  $10^3$  ufc/mL. Se evaluaron concentraciones de nisina (N) 0,12 ppm (p/v) y D-limoneno (L) y emulsión de D-limoneno (E) a 1 mM.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *listeria monocytogenes* a 37°C en caldo TSB.

	VEL. CREC	E. S. (VEL. CREC.)	LAT.	E. S. (LAT.)
CT	0.120	0.002	9.726	0.050
E1 mM	0.037	0.001	20.67	0.087
L1 mM	0.148	0.003	11.98	0.065
N 0.0375 µM	0.125	0.003	13.30	0.080
N 0.0375 L1mM	0.027	0.001	20.10	0.173
N 0.0375 E1mM	0.000	0.000	0.000	0.000

\*VEL. CREC.: Velocidad de crecimiento (unidades de D.O. por hora). E. S.: Error estándar. LAT: Duración de la fase de latencia en horas.