



## FORMACIÓN DE NANOHIÓXIDOS BASADOS EN BRUCITA Y LIMONENO: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA

### Nanohydroxides based on limonene and brucite formation: Characterization and antimicrobial evaluation

iD	Luis Camilo Toro Chacon
iD	Jorge Manuel Silva Jara*
iD	Carlos Arnulfo Velázquez Carriles
iD	Alejandra Monserrat Castorena Sánchez
iD	María Esther Macías Rodríguez

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamento de Farmacobiología, Guadalajara, México

\* [jorge.silva@academicos.udg.mx](mailto:jorge.silva@academicos.udg.mx)

#### RESUMEN

La brucita es un nanohidróxido con la capacidad de intercambiar aniones sin que su estructura laminar sea afectada, lo que les permite retener compuestos en su espacio intersticial entre lámina y lámina o adsorberlos. Por lo que la formación de nanocompuestos basados en brucita se presenta como una alternativa novedosa, sencilla y segura para dar valor agregado y estabilizar compuestos bioactivos, como el limoneno, con posible aplicación en la industria alimentaria con la finalidad de garantizar la inocuidad de los alimentos. Para tal fin se sintetizó la brucita por el método de co-precipitación e intercambio iónico y se formó el nanocompuesto limoneno-brucita, estos nanomateriales fueron caracterizados por difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y microscopía electrónica de barrido, además se evaluó su actividad antimicrobiana contra los patógenos alimentarios *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se confirmó la obtención de la brucita y la formación del nanocompuesto limoneno-brucita mediante las pruebas de caracterización. Por otro lado, el nanocompuesto limoneno-brucita obtuvo una mayor inhibición contra las dos bacterias evaluadas en comparación con sus componentes por separado. Estos resultados sugieren la posible aplicación de estos nanocompuestos en la industria alimentaria para garantizar la inocuidad de los alimentos.

**Palabras claves:** *Hidroxisal laminar, inocuidad alimentaria, limoneno, nanocompuesto.*

#### ABSTRACT

Brucite is a nanohydroxide with the ability to exchange anions without affecting its laminar structure, which allows it to retain compounds in its inter-lamellar space or adsorb them. Therefore, the formation of nanohydroxydes based on layered hydroxide salts is presented as a novel, simple and safe alternative to add value and stabilize bioactive compounds, such as limonene, with possible application in the food industry in order to guarantee food safety. In the present study, brucite (HSLMg) was synthesized through precipitation and limonene-brucite nanohydroxides (L-HSLMg) were obtained with ionic interchange; antimicrobial activity against food pathogens *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Fecha de recepción: 27-08-2022

Fecha de aceptación: 28-10-2022

Fecha de publicación: 04-04-2023

was assessed. Brucite and nanohydroxide formation was confirmed with X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM). Both materials exhibited antimicrobial activity, L-HSLMg producing the highest inhibition. These results suggest that limonene-brucite nanohydroxides could be used for food systems applications, guarantying food safety.

**Keywords:** *Lamellar hydroxysalt, food safety, limonene, nanocomposite.*

## I. INTRODUCCIÓN

El limoneno es un compuesto bioactivo volátil que se caracteriza por tener un olor a limón, ser líquido a temperatura ambiente y extraerse principalmente como aceite esencial de gran variedad de frutos cítricos (1,2), siendo la mayor composición monoterpénica de frutos como la lima dulce (3,4). Gracias a que este compuesto es Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS, *por sus siglas en inglés*) (5) uno de sus usos es como aditivo alimentario a nivel industrial (6,7) y dentro de sus propiedades beneficiosas se destaca su actividad antimicrobiana (1,8,9).

Por su parte, la brucita es un nanohidróxido o hidroxial laminar (HSL) del hidróxido de magnesio,  $Mg(OH)_2$  (10), éstas estructuras catiónicas simples se caracterizan por formar láminas de octaedros, en donde el catión  $Mg^{2+}$  está coordinando con 6 aniones  $OH^-$  unidos entre sí por fuerzas de Van der Waals con la capacidad de intercambiar aniones sin que su estructura laminar sea afectada, lo que les permite retener compuestos en su espacio intersticial entre lámina y lámina o adsorberlos (11,12). Dentro de las propiedades de estos nanohidroxidos se destaca su alta estabilidad química, térmica y biocompatibilidad, así como su fácil preparación y degradación (13,14). En cuanto a sus aplicaciones, se han usado HSL de zinc en compuestos bioactivos como la nisina, manteniendo su actividad durante 25 días, y proporcionándole estabilidad térmica, química y enzimática (10).

Por esto, la formación de nanohidroxidos basados en hidroxiales laminares se presenta como una alternativa novedosa, sencilla y segura para dar valor agregado y estabilizar compuestos bioactivos con posible aplicación en la industria alimentaria para la conservación de frutas, verduras y productos empacados, garantizando así su inocuidad.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Formación de brucita y nanohidróxido limoneno-brucita

La brucita (HSLMg) fue sintetizada mediante precipitación disolviendo 12 g de cloruro de

magnesio hexahidratado (Golden Bell) y 4.86 g de glucosa (Sigma Aldrich) en 300 mL de agua destilada, agregando posteriormente gota a gota con agitación constante hidróxido de sodio 0.1 M (Golden Bell) hasta alcanzar un pH de 10.5; una vez finalizado el goteo la solución se dejó en agitación durante 24 h. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con agua destilada por centrifugación (1580R, Labogene) a 10,000 rpm durante 10 min a 25 °C, y el sedimento se secó en un horno de convección forzada (FE-291, Felisa) durante 48 h.

Para la formación del nanocompuesto limoneno-brucita (L-HSLMg) se preparó una solución de 50 mL de agua destilada con limoneno (5 mg/mL) y se agregaron 500 mg de la HSLMg; este sistema se dejó en agitación constante, tomando alícuotas del sobrenadante cada 15 min y midiendo en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Termo Scientific) a una longitud de onda de 233 nm hasta alcanzar una absorbancia constante. Finalmente, se realizaron lavados como se mencionó anteriormente.

### Caracterización de los nanomateriales

Se generaron difractogramas en un difractómetro de Rayos-X (Panalytical Empyrean, Malvern) con radiación  $CuK\alpha$  desde 5° hasta 70° con un paso de 0.02 y un tiempo de colecta de 30 s por paso. Los espectros FT-IR fueron recolectados en un espectrofotómetro Cary 630 (Agilent Technologies) en un intervalo de 4000 a 500  $cm^{-1}$  con 32 scans por muestra y resolución nominal de 4  $cm^{-1}$ . Las micrográficas fueron registradas en un microscopio FE-SEM (Mira 3LMU, Tescan) con un voltaje de aceleración de 10 kV.

### Evaluación antimicrobiana

Se llevó a cabo el método de microdilución en placa usando cepas patógenas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 previamente sembradas en caldo soya tripticasa (CST) a 37 °C durante 24 h. Se transfirieron 20  $\mu$ L de los nanomateriales (50 mg/mL), 20  $\mu$ L de bacteria ( $1 \times 10^6$  cel/mL) y 160  $\mu$ L de CST a cada pozo de una microplaca de 96 pozos. Se incubó por 24 h a 37 °C y posteriormente se midió la absorbancia



a 600 nm en un lector de microplacas (iMark, BioRad). Como control positivo se usó ampicilina (0.1 mg/mL) y negativo CST sin inocular.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con estadística descriptiva (promedio  $\pm$  SD) mediante un análisis simple de varianza ANOVA en conjunto con la prueba de Tukey's HSD ( $\alpha=0.05$ ) usando el software estadístico Statgraphics Centurion XIX, versión 19.2.02 (Stat Point), todas las pruebas se realizaron por triplicado.

## III. RESULTADOS

### Formación de brucita y nanohidróxido limoneno-brucita

En la curva de adsorción de limoneno en el hidróxido HSLMg (Figura 1), se observa una disminución dependiente del tiempo hasta alcanzar una absorbancia de 0.11 después de 60 min.

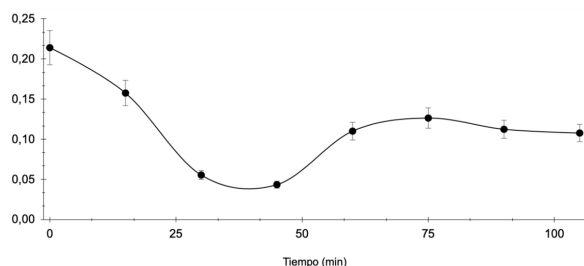


Figura 1. Absorbancia del limoneno en el sobrenadante del sistema de formación del nanohidróxido limoneno-brucita (L-HSLMg).

### Caracterización de los nanomateriales

De acuerdo con la base de datos JADE, el difractograma de la HSLMg (Figura 2) presenta los picos característicos de la brucita; por otro lado, los picos del nanohidróxido L-HSLMg en comparación con los del HSLMg presentan una mayor intensidad y están ubicados en el mismo ángulo de difracción.

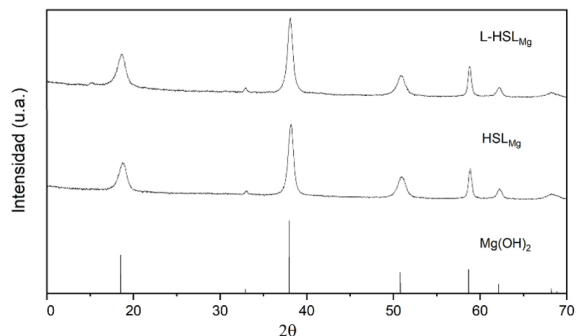


Figura 2. Difractogramas de brucita según la base de datos JADE ( $Mg(OH)_2$ ), sintetizada (HSLMg) y nanohidróxido limoneno-brucita (L-HSLMg).

En el espectro FT-IR del nanocompuesto L-HSLMg comparado con el espectro de la HSLMg (Figura 3) se observa un alargamiento en el pico de número de onda de aproximadamente  $3200\text{ cm}^{-1}$  característico para vibraciones de grupos funcionales OH- de intensidad alta, así como un cambio en los picos que se presentan en las longitudes de onda de vibraciones de entre  $1400\text{ cm}^{-1}$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$  pertenecientes a grupos funcionales OH- de intensidad media.

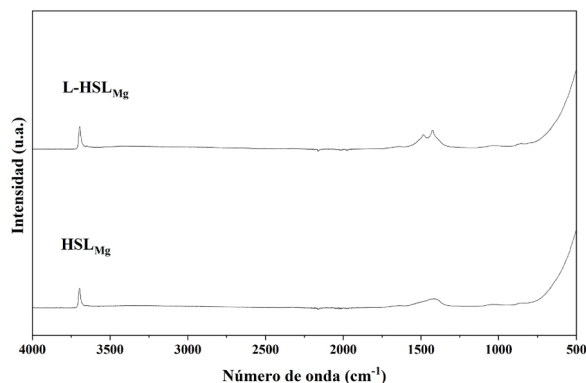


Figura 3. Espectros FT-IR de brucita (HSLMg) y nanohidróxido limoneno-brucita (L-HSLMg).

En la micrografía de la HSLMg (Figura 4A) se observa la estructura laminar característica de la brucita con tamaños de partícula menores a 500 nm; por su parte, en la del L-HSLMg (Figura 4B), además de observar la estructura laminar, se observan diferencias morfológicas en forma de pequeños grumos.

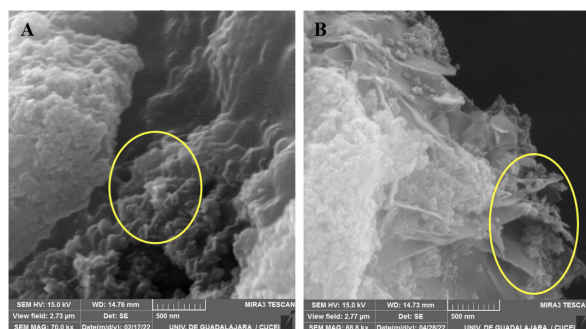


Figura 4. Micrografías de brucita (HSLMg) (A) y nanohidróxido limoneno-brucita (L-HSLMg) (B).

### Evaluación antimicrobiana

El porcentaje de inhibición de *E. coli* y *S. aureus* en presencia de los materiales HSLMg y L-HSLMg se muestran en la Figura 5. Se puede observar que para ambas cepas se alcanzan valores de inhibición de alrededor del 75 % con L-HSLMg, siendo un efecto estadísticamente significativo comparando con la inhibición obtenida por la HSLMg y el limoneno puro.

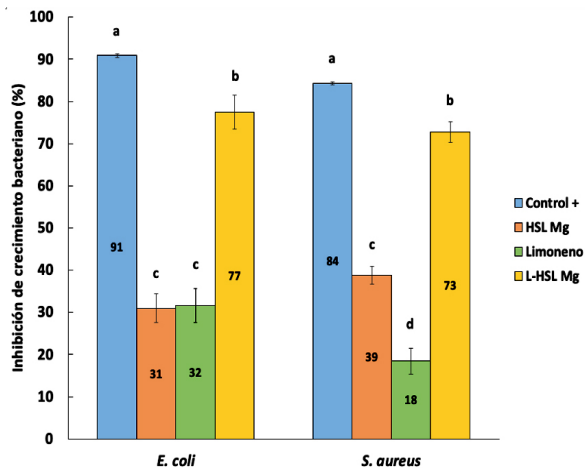


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano con brucita (HSLMg), limoneno y nanohidróxido limoneno-brucita (L-HSLMg) en *E. coli* y *S. aureus* (Control + = Ampicilina 0.1 mg/mL). Letras diferentes (a, b, c, d) representan valores estadísticamente distintos ( $p < 0.05$ ;  $n=3$ ).

#### IV. DISCUSIÓN

Debido a que se presentó una reducción en la absorbancia superficial del limoneno durante el proceso de formación del nanohidróxido L-HSLMg, se presume que las partículas de HSLMg sedimentadas adsorbieron y/o intercalaron el limoneno, como se ha reportado en otros trabajos (10). Los difractogramas muestran los picos característicos reportados para la brucita, con lo que se corrobora la obtención del compuesto (15,16), sin embargo, al no existir desplazamiento de la primera señal se puede asumir que el limoneno no se intercaló en el espacio interlamilar. Por otro lado, la aparición de una pequeña señal en el ángulo de  $11^\circ$  podría sugerir la presencia del compuesto orgánico (17). Por su parte, en los espectros FT-IR el aumento de la absorbancia en picos característicos de grupos funcionales OH- en el nanocompuesto L-HSLMg en comparación con la HSLMg es evidencia de la interacción de estos grupos con los grupos funcionales metilo del limoneno y así como lo reporta Velazquez-Carriles et al. (10, 18, 19) esto indica la presencia del compuesto bioactivo en la HSLMg. En la micrografía de la HSLMg se observa que se obtuvo la estructura deseada para este compuesto puesto que es parecida a la que se observa en la investigación reportada por Wang et al. (13, 20, 21) mientras que en la del nanohidróxido L-HSLMg los grupos que se observan en la estructura laminar son atribuidos a la presencia del limoneno entre y sobre las

láminas de HSLMg.

Se ha reportado que los nanohidróxidos de magnesio pueden producir especies reactivas de oxígeno, lo que les confiere actividad antimicrobiana al provocar daño en la pared celular (22-24). Además, Zhu et al. (25) demostraron que estos compuestos favorecen la fuga de componentes celulares como ácidos nucleicos, lo que inhibe la síntesis de proteínas. El nanocompuesto L-HSLMg produjo inhibiciones superiores al HSLMg y limoneno, potenciando así la actividad como lo reportó Han et al. (1) al presentar un efecto sinérgico entre el nanohidróxido y el compuesto bioactivo. Estos resultados sugieren que estos nanohidróxidos podrían exhibir actividad antimicrobiana contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

#### V. CONCLUSIONES

Se logró obtener HSLMg y se formó el nanohidróxido L-HSLMg, siendo esto confirmado con pruebas espectrofotométricas, de DRX, FT-IR y SEM. Por su parte, la evaluación antimicrobiana de estos nanocompuestos fue realizada en dos cepas patógenas alimentarias, *E. coli* y *S. aureus*, las cuales mostraron una mayor inhibición en crecimiento cuando se usó el nanocompuesto L-HSLMg, demostrando que para estas bacterias la HSLMg no solo mantiene la actividad antimicrobiana del compuesto bioactivo sino que también la potencializa. Estos resultados dejan al descubierto lo promisorio que podría ser el uso de estos nanocompuestos en la industria alimentaria con el propósito de garantizar la inocuidad de los alimentos.

#### VI. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico (Beca No. 1108684) para la realización del proyecto.

#### VII. CONFLICTO DE INTERESES

No existen intereses particulares por parte de los autores o de la Universidad de Guadalajara que pudiesen afectar directa o indirectamente los resultados.





## VIII. REFERENCIAS

1. Han Y, Sun Z, Chen W. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*. 2020; 25(1), 33.
2. Jongedijk E, Cankar K, Buchhaupt M, Schrader J, Bouwmeester H, Beekwilder J. Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016; 100(7), 2927-2938.
3. Arafat Y, Altemimi A, Ibrahim SA, Badwaik LS. Valorization of sweet lime peel for the extraction of essential oil by solvent free microwave extraction enhanced with ultrasound pretreatment. *Molecules*. 2020; 25(18), 4072.
4. Khandare RD, Tomke PD, Rathod VK. Kinetic modeling and process intensification of ultrasound-assisted extraction of d-limonene using citrus industry waste. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2021; 159(1), 108181.
5. U.S. Food and Drug Administration (FDA) [Página principal en Internet], US Department of health, CFR - Code of Federal Regulations Title 21; 2021 [actualizada en marzo de 2022; acceso 20 agosto 2022]. [aprox. 19 pantallas]. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=182&showFR=1>
6. Djordjevic D, Cercaci L, Alamed J, McClements DJ, Decker EA. Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dodecyl sulfate-chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(9), 3585-3591.
7. Ravichandran C, Badgujar PC, Gundev P, Upadhyay A. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food and Chemical Toxicology*. 2018; 120(1), 668-680.
8. Varano A, Shirahigue LD, Azevedo FA, Altenhofen da Silva M, Ceccato-Antonini SR. Mandarin essential oil as an antimicrobial in ethanolic fermentation: Effects on *Limosilactobacillus fermentum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*. 2022; 74(6), 981-991.
9. Andriotis EG, Papi RM, Paraskevopoulou A, Achilias DS. Synthesis of d-limonene loaded polymeric nanoparticles with enhanced antimicrobial properties for potential application in food packaging. *Nanomaterials*. 2021; 11(1), 191.
10. Velázquez-Carriles CA, Carbajal-Arizaga GG, Silva-Jara JM, Reyes-Becerril MC, Aguilar-Uscanga BR, Macías-Rodríguez ME. Chemical and biological protection of food grade nisin through their partial intercalation in laminar hydroxide salts. *Journal of Food Science and Technology*. 2020; 57(9), 3252-3258.
11. Montaña-González PA. Hidroxisales laminares como materiales para la encapsulación de moléculas biológicamente activas y su posterior liberación modulada [tesis de Maestría]. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2019.
12. de Faria, JM, Muniz LA, Netto JFZ, Firak DS, De Sousa FB, da Silva Lisboa F. Application of a hybrid material formed by layered zinc hydroxide chloride modified with spiropyran in the adsorption of Ca<sup>2+</sup> from water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021; 631(1), 127738.
13. Wang X, Yu M, Li L, Fan X. Synthesis and morphology control of nano-scaled magnesium hydroxide and its influence on the mechanical property and flame retardancy of polyvinyl alcohol. *Materials Express*. 2019; 9(6), 675-680.
14. Martínez DR, Carbajal GG. Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances en Química*. 2012; 7(1), 87-99.
15. Saoud KM, Saeed S, Al-Soubaihi RM, Bertino MF. Microwave assisted preparation of magnesium hydroxide nano-sheets. *American Journal of Nanomaterials*. 2014; 2(2), 21-25.
16. Dong H, Unluer C, Yang EH, Al-Tabbaa A. Recovery of reactive MgO from reject brine via the addition of NaOH. *Desalination*. 2018; 429(1), 88-95.
17. Ray J, MacNaughtan W, Chong PS, Vieira J, Wolf B. The effect of limonene on the crystallization of cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2012; 89(3), 437-445.

18. Boev B, Jovanovski G, Makreski P. Minerals from Macedonia. XX. Geological setting, lithologies, and identification of the minerals from Rzanovo Fe-Ni deposit. *Turkish Journal of Earth Sciences*. 2009; 18(4), 631-652.
19. Liu X, Sato T, Opiso E, Yoneda T. Adsorption and co-precipitation behavior of fluoride onto Mg-bearing minerals in Si-Al-Mg mineral system at hyperalkaline conditions. *Clay Science*. 2012; 16(2), 49-57.
20. Carré C, Zanibellato A, Jeannin M, Sabot R, Gunkel-Grillon P, Serres A. Electrochemical calcareous deposition in seawater. A review. *Environmental Chemistry Letters*. 2020; 18(4), 1193-1208.
21. Moore DE, Lockner DA. Comparative deformation behavior of minerals in serpentinized ultramafic rock: Application to the slab-mantle interface in subduction zones. *International Geology Review*. 2007; 49(5), 401-415.
22. Pan X, Wang Y, Chen Z, Pan D, Cheng Y, Liu Z, et al. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)<sub>2</sub>. *ACS applied materials & interfaces*. 2013; 5(3), 1137-1142.
23. Wang Y, Zhao J, Sha L, Zhu Y, Li X. Design of broad-spectrum antimicrobial polyethylene terephthalate fabrics by coating composited natural brucites. *Journal of Materials Science*. 2018; 53(3), 1610-1622.
24. Wang Y, Sha L, Zhao J, Li Q, Zhu Y, Wang N. Antibacterial property of fabrics coated by magnesium-based brucites. *Applied Surface Science*. 2017; 400(1), 413-419.
25. Zhu Y, Tang Y, Ruan Z, Dai Y, Li Z, Lin Z, et al. Mg(OH)<sub>2</sub> nanoparticles enhance the antibacterial activities of macrophages by activating the reactive oxygen species. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2021; 109(11), 2369-2380.