UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y AMBIENTAL

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES ENCAPSULADOS POR MICROEMULSIONES Y NANOEMULSIONES SOBRE BACTERIAS

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos
para obtener el Grado de Doctor en Ciencia de Alimentos

Mónica Dávila Rodríguez

Directora de tesis:

Dra. María Teresa Jiménez Munguía

Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla

Junio de 2019

Prólogo

En este trabajo se presenta una tesis doctoral en la que se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela, romero y orégano, sin encapsular y encapsulados por microemulsiones y nanoemulsiones, preparadas mediante ultrasonido de alta frecuencia, sobre *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes.* El documento de tesis de dividió en ocho capítulos.

El primer capítulo es un resumen de lo estudiado en la tesis. El segundo capítulo consta de una introducción donde se explica todas las propiedades y características de los aceites esenciales y las razones por las cuales la técnica de encapsulación por emulsión es efectiva para encapsular los mismos, evitando o previniendo ciertos cambios indeseables. De igual manera, en el tercer capítulo se habla de una justificación del por qué evaluar estos aceites esenciales en las bacterias seleccionadas, y se mencionan algunos ejemplos de otros estudios realizados con diferentes aceites o aplicados en distintas muestras, en los cuales han reportado efectos inhibitorios contra diferentes microorganismos. En el cuarto capítulo se mencionan los objetivos planteados para la tesis doctoral (general y específicos). El quinto capítulo es el marco teórico, presentando una revisión bibliográfica de la información más representativa, para abordar los temas como: aceites esenciales, su actividad antimicrobiana y la aplicación de estos en alimentos; los métodos más comunes de encapsulación; las propiedades, la estabilidad y la aplicación de emulsiones en alimentos. En el sexto capítulo se redactaron los materiales y métodos utilizados para realizar el estudio. En el séptimo capítulo se reportaron, analizaron y discutieron los resultados obtenidos; este capítulo se dividió en dos secciones, la primera trata de la caracterización de los aceites esenciales sin encapsular y encapsulados en microemulsiones, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en sistemas modelo; la segunda sección aborda la caracterización y la evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales encapsulados en nanoemulsiones, así como el análisis microbiológico de apio fresco sumergido en estas. En el octavo capítulo, se mencionan las conclusiones y recomendaciones del trabajo. Además, esta tesis contiene en la parte final la bibliografía de los libros y artículos utilizados, así como los anexos y las evidencias de participación de congresos y publicaciones a lo largo de los estudios del Doctorado en Ciencia de Alimentos.

UDLAP

Cholula, Pue., México, a 22 de junio del 2019.

La Dra. María Teresa Jiménez Munguía, profesora del Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental de la Universidad de las Américas Puebla, hace constar que:

la tesis titulada ***"Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales encapsulados por microemulsiones y nanoemulsiones sobre bacterias"***, presentada por la Lic. Mónica Dávila Rodríguez, para optar por el grado de Doctora en Ciencia de Alimentos por la Universidad de las Américas Puebla, ha sido realizada en dicha universidad, bajo su dirección, y que reúne las condiciones necesarias para ser defendida por su autora.

_____

Dra. María Teresa Jiménez Munguía

Directora

El presente trabajo fue realizado con el financiamiento de:

- Beca académica UDLAP y Beca Académica UDLAP Investigación (BAUI)
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora de tesis, a mis profesores y a mis compañeros por su apoyo durante los años cursados en la Universidad. A mis amigos, gracias por todos los momentos compartidos. Agradezco a mi esposo porque ha estado conmigo brindándome en cada momento incondicionalmente su amor y apoyo. A mi mamá porque sin ella no hubiera sido posible llegar hasta esta etapa, enseñándome que todo esfuerzo tiene una gran recompensa. Gracias a Dios porque Él me ha dado sabiduría y entendimiento; y puso a personas importantes para lograr esta formación profesional.

ÍNDICE

Prólogo **i**
Carta de validación firmada **ii**
Agradecimientos **iv**
Índice **v**
Lista de tablas **vii**
Lista de figuras **viii**
I. RESUMEN **1**
II. INTRODUCCIÓN **3**
III. JUSTIFICACIÓN **5**
IV. OBJETIVOS
4.1. General **7**
4.2. Específicos **7**
V. MARCO TEÓRICO **8**
5.1. Aceites esenciales **8**
5.1.1. Actividad antimicrobiana **8**
5.1.2. Canela **10**
5.1.3. Romero **11**
5.1.4. Orégano **12**
5.1.5. Aplicación en alimentos **12**
5.2. Métodos de encapsulación **13**
5.2.1. Secado por aspersión **13**
5.2.2. Recubrimiento por lecho fluidizado **14**
5.2.3. Encapsulación por emulsión **15**
5.2.3.1. Propiedades de las emulsiones **16**
5.2.3.2. Estabilidad de las emulsiones **17**
5.2.3.2.1. Estabilizantes **17**
5.2.3.2.2. Emulgentes **18**
5.2.3.3. Aplicación en alimentos **19**
VI. METODOLOGÍA **20**
6.1. Materiales **20**
6.2. Aceites esenciales **20**
6.2.1. Composición química **20**
6.2.2. Propiedades físicas **20**
6.2.3. Actividad antimicrobiana **20**
6.2.3.1. Preparación del inóculo **20**
6.2.3.2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida **21**
6.3. Encapsulación de aceites esenciales en microemulsiones y nanoemulsiones **21**
6.3.1. Preparación **22**
6.3.2. Caracterización **22**
6.3.2.1. Tamaño de partícula **22**
6.3.2.2. Micrografías **22**
6.3.2.3. Color **23**
6.3.2.4. pH **23**
6.3.2.5. Porcentaje de separación **23**

6.3.2.6. Eficiencia de encapsulación **24**
6.3.3. Actividad antimicrobiana **24**
6.3.4. Curvas de liberación de microemulsiones **25**
6.4. Evaluación del apio fresco **25**
6.4.1. Preparación **26**
6.4.2. Caracterización **26**
6.4.3. Análisis microbiológico **28**
6.4.4. Evaluación sensorial **28**
6.5. Análisis estadístico

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **29**
7.1. Evaluación de aceites esenciales encapsulados en microemulsiones **29**
7.1.1. Caracterización de los aceites esenciales **29**
7.1.2. Microemulsiones **32**
7.1.2.1. Caracterización **32**
7.1.2.2. Curvas de liberación **34**
7.1.3. Actividad antimicrobiana **36**
7.2. Evaluación de aceites esenciales encapsulados en nanoemulsiones **40**
7.2.1. Caracterización de las nanoemulsiones **40**
7.2.2. Actividad antimicrobiana **44**
7.2.3. Evaluación de las nanoemulsiones en apio fresco **45**
7.2.4. Análisis microbiológico del apio **50**
VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES **58**
8.1 Conclusiones **58**
8.2 Recomendaciones **58**
BIBLIOGRAFÍA **60**
ANEXOS **81**
EVIDENCIAS DE PARTICIPACIÓN DE CONGRESOS Y PUBLICACIONES **82**

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Componentes con actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales.

Tabla II. Componentes principales del aceite esencial de canela, del aceite esencial de romero y del aceite esencial de orégano.

Tabla III. Parámetros físicos del aceite esencial de canela, del aceite esencial de romero y del aceite esencial de orégano.

Tabla IV. Parámetros físicos de las microemulsiones aceite en agua (O/W) del aceite esencial de canela (10/90), del aceite esencial de romero (30/70) y del aceite esencial de orégano (45/55).

Tabla V. Tamaño de partícula, fase de separación y eficiencia de encapsulación de las microemulsiones aceite en agua (O/W) del aceite esencial de canela (10/90), del aceite esencial de romero (30/70) y del aceite esencial de orégano (45/55).

Tabla VI. Actividad antimicrobiana reportada como concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de canela, del aceite esencial de romero y del aceite esencial de orégano sin encapsular y encapsulados en microemulsiones aceite en agua (O/W).

Tabla VII. Parámetros físicos de las nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Tabla VIII. Tamaño de partícula, porcentaje de separación y eficiencia de encapsulación de las nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Tabla IX. Parámetros físicos de apio sumergido en nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Tabla X. Resultados de la evaluación sensorial del apio sumergido con nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Tabla XI. Parámetros del modelo de Weibull (b, n), parámetros de ajuste y parámetros de distribución de resistencia para la inhibición de bacterias en el apio sumergido en nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procesos de floculación, coalescencia y separación en dos fases de una emulsión.

Figura 2. Clasificación de emulgentes usados en alimentos.

Figura 3. Micrografías de las microemulsiones aceite en agua (O/W) formuladas con diferentes aceites esenciales: a) canela (10/90), b) romero (30/70) y c) orégano (45/55).

Figura 4. a) Liberación de microemulsión AEC (■) y b) microemulsión AER (•), ambas en agua a 60 rpm y 25 °C. Las líneas continuas representan la estimación del modelo matemático.

Figura 5. Actividad antimicrobiana (µL/mL) reportada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima de bactericida (CMB) de *E. coli* (E) y *L. monocytogenes* (L) con aceite esencial de canela (AEC), aceite esencial de romero (AER), y aceite esencial de orégano (AEO) sin encapsular y encapsulados en nanoemulsiones de aceite en agua O/W (10/90) en sistemas modelo.

Figura 6. Inhibición de *E. coli* (E) y *L. monocytogenes* (L) curvas (puntos) para el apio sumergido en nanoemulsiones O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO). Las curvas de predicción (líneas) se ajustaron con el modelo de Weibull.

Figura 7. Distribución de frecuencias de las resistencias de *E. coli* (E) y *L. monocytogenes* (L) en el apio sumergido en nanoemulsiones O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

I. RESUMEN

Los aceites esenciales (AE) han demostrado actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos como las bacterias, debido a sus componentes principales. La encapsulación por emulsión puede proporcionar protección a los componentes lipídicos en una micro y nanoescala. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela (AEC), aceite esencial de romero (AER) y aceite esencial de orégano (AEO) sin encapsular y encapsulados, formulados mediante ultrasonido de alta frecuencia, en sistemas modelo y aplicados en apio fresco contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. La actividad antimicrobiana se determinó inoculando las bacterias, independientemente, con una población de 10^8 UFC/mL en sistemas modelo y 10^5 UFC/g en apio fresco. Para los sistemas modelo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Las microemulsiones, preparadas por ultrasonido de alta intensidad, presentaron tamaños de partícula de D_{50}:1.98-5.46 µm, mientras que para las nanoemulsiones obtenidas presentaron valores de D_{50}:226–546 nm, ambas con altas eficiencias de encapsulación > 80% y bajas separaciones de fases <10%. En comparación con los AE sin encapsular, las micro- y nano-emulsiones de los diferentes AE fueron más efectivas contra ambas bacterias, debido a que requirieron menos del 50% de los AE para reducir la población bacteriana de 5-8 ciclos log. El modelo de Weibull se utilizó para describir la cinética de la inhibición bacteriana en el apio sumergido en nanoemulsiones de AEC, AER y AEO. Las curvas predichas se ajustaron adecuadamente a los datos experimentales (R^2>0.96), presentando bajos valores de error cuadrático medio (<0.35). Este estudio demostró que el ultrasonido de alta frecuencia es una técnica adecuada, para obtener microemulsiones y nanoemulsiones de AE estables, mostrando ser una buena alternativa a los antimicrobianos convencionales para controlar *E. coli* y *L. monocytgones*, bacterias de gran importancia en la inocuidad de los alimentos.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) have demonstrated antimicrobial activity against different microorganisms such as bacteria, due to its major components. Encapsulation by means of emulsification can provide protection to lipid compounds in a micro and nanoscale. The aim of the study was to evaluate the antimicrobial activity of cinnamon (CEO), rosemary (REO) and oregano essential oils (OEO) without encapsulating and encapsulated by high frequency ultrasound in microemulsions and nanoemulsions applied in fresh celery against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. The antimicrobial activity was determined by inoculating the bacteria, individually, 10^8 CFU/mL in model systems and 10^5 CFU/g in fresh celery. For model systems, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. Microemulsions reported particle size diameter D_{50} of 1.98 to 5.46 μm, while for nanoemulsions the values of D_{50} were 226-546 nm, showing high encapsulation efficiencies > 80% and low phase separations < 10%. Compared with the non-encapsulated EOs, EOs micro and nanoemulsions were more effective against both bacteria studied, requiring less than 50% of the EOs to reduce 5-8 cycles log bacterial population. The Weibull model was applied to describe the kinetics of the bacterial inhibition on celery immersed in CEO, REO, and OEO nanoemulsions. The predicted curves adequately fitted the experimental data (R^2 >0.96), presenting low mean square error values (<0.35). This study demonstrated that high-frequency ultrasound is a suitable technique to obtain stable EOs microemulsions or nanoemulsions, showing to be a good alternative as natural antimicrobials to control *E. coli* and *L. monocytogenes*, being bacteria of high relevance in food safety.

II. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) de hierbas y especias han demostrado tener actividad antimicrobiana contra microorganismos como las bacterias, levaduras y mohos, la cual depende de la composición química de cada uno y su carácter hidrofílico o hidrofóbico, debido a que existe una relación entre la actividad antimicrobiana y la presencia de componentes fenólicos, terpenoides y aldehídos (Kalemba & Kunicka, 2003; Fisher y Philips, 2008; Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2012). Estudios recientes, indican que los componentes del aceite esencial de canela, romero y orégano, influyen en el modo de acción como antimicrobianos, alterando los lípidos de la membrana citoplasmática microbiana, produciendo pérdidas de su impermeabilidad a protones e iones de mayor tamaño, que alteran el transporte de electrones, la desnaturalización de proteínas, la deshidratación y la lisis celular; por lo tanto, se han sugerido los AE como conservadores naturales en los alimentos (Yeon-Ji *et al.*, 2015; Dolçà *et al.*, 2015). Sin embargo, pueden llegar a impactar en los alimentos, ya que cada uno tiene un sabor característico y en ciertas concentraciones puede ser percibido al consumirlo, afectando la aceptabilidad del producto adicionado con dichos aceites. De igual manera, la aplicación directa de AE puede presentar una rápida volatilización de sus componentes (Paredes *et al.*, 2007). Una solución para enmascarar el sabor en los alimentos es la encapsulación (Guevara-Bretón y Jiménez-Munguía, 2008; Niu *et al.*, 2016).

La encapsulación se define como una tecnología que permite atrapar componentes sensibles en una matriz homogénea o heterogénea, para su protección, y dar mayor estabilidad a los componentes (García-Ceja y López-Malo, 2012). La encapsulación de AE constituye una tecnología interesante para utilizar en la industria de alimentos, debido a que extiende la vida útil de sus componentes bioactivos encapsulados en una amplia variedad de materiales que conforman la matriz de la cápsula (Char *et al.*, 2015). Existen diferentes métodos de encapsulación como la coacervación simple, coacervación compleja, el secado por aspersión, el secado por congelación, el recubrimiento de lecho fluidizado, la polimerización interfacial, la inclusión molecular y por emulsión (Alvarenga Botrel *et al.*, 2012; Velázquez-Contreras, Osorio-Revilla, Gallardo-Velázquez 2014).

La encapsulación por emulsión ha estado en investigación continua, es un método todavía poco común, ha mostrado en algunos estudios ventajas como resistencia a condiciones de procesamiento, alta estabilidad limitando su oxidación de los componentes de los AE durante el almacenamiento, así como la prevención de la volatilización de estos aumentando su solubilidad y biodisponibilidad (Qian *et al.,* 2011; Mahfoudhi, Ksouri y Hamdi, 2016).

Los diferentes componentes encapsulados en emulsiones son muy estables durante el almacenamiento y pueden liberarse en condiciones y dosis específicas (Garti y Benichou, 2001; Pays *et al.,* 2002). La liberación controlada de componentes encapsulados puede verse influenciada por diferentes factores como: las condiciones ambientales, la forma y el tamaño de las partículas, la solubilidad bioactiva y la difusividad (Bezerra *et al.,* 2016; Pays *et al.,* 2002). Los sistemas de micro y nanoescala pueden proporcionar una gran área de superficie para la interacción con el componente encapsulado, por lo que las gotas más pequeñas pueden conducir a una transferencia de masa más rápida por el aumento del área interfacial, así como a una difusión más rápida de las gotas de aceite (Lakkis, 2007; Bezerra *et al.,* 2016; Mahfoudhi, Ksouri y Hamdi, 2016).

Las micro y nanoemulsiones pueden prepararse utilizando diferentes técnicas, como la homogeneización a alta presión, microfluidización, homogeneización mecánica a alta velocidad, ultrasonidos, emulsificación espontánea, inversión de fase, emulsificación de membrana, inversión de emulsión y desplazamiento de solvente (Huang, Yu, & Ru, 2010; Walker, Decker, & McClements, 2015; Jin *et al.,* 2016). Al preparar micro y nanoemulsiones usando homogeneizadores ultrasónicos, las ondas ultrasónicas de alta intensidad producen fuertes fuerzas disruptivas que transforman las soluciones inmiscibles de aceite y agua, con la adición de surfactantes, en gotas pequeñas y estables (Ghosh, Mukherjee y Chandrasekaran, 2013).

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha presentado un aumento global en la demanda de los consumidores por alimentos frescos y saludables, ya que aportan vitaminas, minerales y alto contenido de fibra. Sin embargo, la FDA (2015) reporta que el 60% brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos están relacionados con la ingesta de vegetales frescos. Los principales patógenos transmitidos por los alimentos son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* (Imanishi *et al.*, 2014; Kang and Song, 2018; Dewey-Mattia *et al.*, 2018). Los desinfectantes sintéticos (por ejemplo, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno y ácido peroxiacético) se han utilizado ampliamente en vegetales frescos para reducir el número de patógenos y otros microorganismos (Lee, Hong y Kim, 2014). La investigación sobre agentes desinfectantes naturales ha llevado al uso de AE como una alternativa de antimicrobianos (Amrutha, Sundar y Haladay, 2017).

Algunos estudios de micro y nanoemulsiones han demostrado una liberación controlada de componentes encapsulados con actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos. Ghosh *et al.* (2012) estudiaron la encapsulación del aceite esencial de mostaza en microemulsiones mediante el método de inversión de fase, para evaluar su actividad antimicrobiana de *Escherichia coli* en sistemas modelo. Liang *et al.* (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de las emulsiones de aceite esencial de menta contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Los autores concluyeron que esta técnica es eficaz para proteger el aceite esencial sin afectar su actividad antimicrobiana. Donsì *et al*. (2012) estudiaron la encapsulación de carvacrol, limoneno y cinamaldehído en nanoemulsiones preparadas por homogeneización a alta presión y probaron su actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*; sus resultados demostraron que la solubilidad de los componentes lipídicos aumenta cuando se agregan como nanoemulsiones en el medio, lo que promueve su actividad antimicrobiana. A pesar de estos trabajos realizados, aún falta enriquecer la investigación debido a que existen escasos estudios de AE encapsulados por el método de encapsulación por emulsión contra bacterias aplicados en alimentos frescos.

Por otra parte, algunos investigadores han informado que la aplicación de nanoemulsiones es una alternativa para reemplazar los desinfectantes sintéticos. Bhargava

et al. (2015) evaluaron la eficacia de las nanoemulsiones de aceite esencial de orégano formuladas con Tween 80, para inactivar el crecimiento de bacterias transmitidas por los alimentos en lechuga fresca, mencionaron que las nanoemulsiones fueron efectivas contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli*. Ozogul *et al.* (2017) evaluaron los efectos de las nanoemulsiones formuladas con diferentes AE de romero, laurel, tomillo y salvia en la calidad microbiológica de los filetes de trucha arco iris, observaron que los tratamientos con la adición de nanoemulsiones con AE de romero y tomillo fueron los más efectivos, retrasando el crecimiento de bacterias en los filetes y mejorando su calidad organoléptica, sugiriendo el uso de nanoemulsiones como conservantes naturales. Kang y Song (2018) estudiaron la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones de aceite esencial de canela y aceite esencial de orégano para inhibir o inactivar *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella* Typhimurium, para desinfectar hojas de mostaza roja.

La liberación de los AE encapsulados puede determinar su efectividad dependiendo de la aplicación seleccionada, por lo tanto, el desarrollo de modelos matemáticos capaces de describir la liberación de estos componentes establece una herramienta muy útil para la predicción de este comportamiento. Por lo tanto, para confirmar los efectos antimicrobianos de los AE contra las bacterias, es necesario generar más investigación sobre la cinética de inhibición de estos innovadores antimicrobianos naturales contra diferentes microorganismos, tanto en sistemas modelo como aplicados en alimentos. El modelo de Weibull se ha utilizado ampliamente para describir la supervivencia microbiana (Chun *et al.*, 2009).

IV. OBJETIVOS

4.1. General

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de canela, romero y orégano sin encapsular y encapsulados, formulados mediante ultrasonido de alta frecuencia en sistemas modelo y aplicados en apio fresco contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

4.2. Específicos

- Caracterizar los aceites esenciales de canela, romero y orégano sin encapsular y encapsulados por microemulsiones y nanoemulsiones.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sin encapsular y encapsulados por microemulsiones y nanoemulsiones, para inhibir/inactivar algunas bacterias (*E. coli* y *L. monocytogenes*) de interés en alimentos en sistemas modelo.
- Determinar la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones del aceite esencial de canela, aceite esencial de romero y aceite esencial de orégano sobre *E. coli* y *L. monocytogenes*, aplicados en un vegetal (apio).
- Caracterizar y evaluar sensorialmente el apio sumergido en las nanoemulsiones del aceite esencial de canela, aceite esencial de romero y aceite esencial de orégano.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) se definen como mezclas de componentes orgánicos volátiles obtenidos a partir de plantas. Pueden ser sintetizados por todas las partes de la planta, es decir, brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza, y se almacenan en las células secretoras, cavidades, canales, células epidémicas o glandulares. Producen el aroma de muchas de las sustancias vegetales y existen alrededor de 3,000 tipos. Los AE tienen aproximadamente entre 20 y 60 componentes en diferentes concentraciones (Restrepo *et al.,* 2009).

Los aceites esenciales se encuentran en pequeña concentración en la planta, siendo difíciles de obtener en algunas ocasiones. Normalmente, se encuentran en forma líquida, son incoloros y con cierto carácter volátil; se utilizaron primero como medicamentos en el área farmacéutica y después fue necesaria su industrialización para perfumes y sabores en la industria alimentaria (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales se pueden aislar mediante destilación por arrastre de vapor a partir de hierbas y especias y se aplican comúnmente a los productos alimenticios para añadir un sabor particular y así mejorar el producto (Loeffler *et al.,* 2014). Los aceites esenciales tienen componentes de: alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ésteres, éteres y terpenos en proporciones variables. Los componentes principales determinan las propiedades biológicas de cada aceite esencial (Sefu *et al.,* 2015).

5.1.1. Actividad antimicrobiana

Los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas que pueden prolongar la vida útil y mejorar la seguridad alimentaria debido a la presencia de componentes altamente activos, tales como fenoles (eugenol y timol) y aldehídos (aldehído cinámico y perilaldehído) (Acevedo *et al.,* 2013). Varios estudios han demostrado que algunas esencias como: cilantro, canela, orégano, romero, clavo, entre otros, poseen efecto inhibitorio fuerte contra diferentes mohos, bacterias y levaduras, las cuales causan el deterioro en los alimentos.

En los últimos años, la industria alimentaria ha comenzado a utilizar los aceites esenciales como antimicrobianos naturales, ya que han demostrado la eficiencia de sus principales componentes contra diversos microorganismos, además de ser una alternativa contra productos químicos y sintéticos (Bosquez *et al.,* 2010; Faleiro *et al.,* 2005).

En la tabla I, se presentan algunos de los aceites esenciales más comunes utilizados en la industria de alimentos. Se pueden observar los componentes mayoritarios presentes en cada uno, a los cuales se les atribuye actividad antimicrobiana.

Tabla I. Componentes con actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales.

Aceite esencial (AE)	**Nombre científico**	**Componentes mayoritarios**	**% aproximado**
Cilantro	*Coriandum sativum*	Linalol	70
Canela	*Cinnamomum zeylandicum*	Ácido cinámico	5
		Eugenol	75-85
Orégano	*Origanum vulgare*	Carvacrol	80
		Timol	64
		p-cimeno	2-52
		ϒ-terpineno	52
		α-pineno	2-25
Romero	*Rosmarinus officinalis*	Bornilo acetato	0-17
		Alcanfor	2-14
		1,8-cineol	3-89
		Eugenol	75-85
		Limoneno	3-7
Clavo	*Syzygium aromaticum*	Eugenilo acetato	8-15

Adaptada de: Burt, 2004; Narvaéz, 2006; Romeu *et al.,* 2007.

Uno de los aceites esenciales en los que se ha reportado propiedad antimicrobiana es el de orégano (*Origanum vulgare L.*). Los componentes fenólicos presentes en él son: el carvacrol, timol y eugenol (D'Antuono *et al.,* 2000). Este aceite esencial se evaluó en cepas de *Listeria*

monocytogenes para identificar la actividad antimicrobiana contra esta bacteria, encontrando que la concentración mínima inhibitoria fue 0.05-0.35 µL/mL, esto se atribuye a su composición química de cada aceite, ya que el AE orégano estaba compuesto por: 64% timol, 22% ϒ-terpineno y 52% ρ-cimeno (Faleiro *et al.,* 2005).

De igual forma, Bozin *et al.,* (2007) estudiaron la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de romero en diferentes microorganismos, reportaron que el AE de romero tenía 38 componentes químicos de los cuales sus componentes principales son el alcanfor, α-pineno, Z-linalol óxido y borneol. La concentración mínima inhibitoria del AE de romero fue de 30.2 µg, lo cual demuestra el efecto antimicrobiano de sus componentes.

Asimismo, el aceite esencial de canela es otro aceite que posee propiedades antimicrobianas, y se ha reportado que sus principales componentes son el eugenol y el ácido cinámico, los cuales actúan como componentes antimicrobianos. Manso *et al.,* (2011), reportaron que este aceite es un antimicrobiano potente, ya que la concentración mínima inhibitoria del AE de canela para inhibir *Aspergillus flavus* es de 100 ppm mientras que la del aceite esencial de orégano es de 400 ppm, esto se debe a la composición química de cada uno.

5.1.2. Canela

La canela pertenece a la familia *Lauraceae* y muchas especies de canela pueden producir un aceite volátil por destilación. Los aceites de canela más importantes son de *C. zeylanicum*, *C. cassia* y *C. camphora*. Además, en la industria de alimentos es utilizada comúnmente como saborizante (Kordsardouei *et al.,* 2015).

El aceite esencial de canela se obtiene por destilación de las hojas de *cinnamomum*; es un líquido marrón oscuro con un característico olor. El aceite de hoja de canela contiene entre 75-85% de eugenol con una alta actividad antibacterial y contiene 5% de cinamaldehído, el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas. Además, se han identificado 53 componentes en dicho aceite, entre ellos carbonilos, aldehído cinámico, o-metoxialdehído cinámico, hidrocarbonatos (α-pineno, β-

cimeno, α-felandreno), aldehídos (benzílico, cumínico, nonílico, furfural), cetonas (metil amil cetona) y también trazos de alcohol (linalool) entre otros (Narvaéz, 2006; Zainol *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que el aceite de canela posee propiedades antifúngicas y antibacterianas, por lo que ha demostrado ser eficaz contra algunas especies de mohos, levaduras y bacterias. La acción antimicrobiana del aceite esencial de canela involucra granulación del citoplasma, ruptura de la membrana citoplasmática o inactivación y/o inhibición de enzimas celulares (Narvaéz, 2006).

5.1.3. Romero

El romero (*R. officinalis L.*) pertenece a la familia *Lamiaceae*, es una planta arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados. El tamaño varía de 0.5 a 1 m de altura, las flores se caracterizan por un color azul claro con pequeñas manchas violetas (Ávila *et al.*, 2011).

La composición química del romero está formada por diversos componentes como: ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, terpénicos y alcoholes. De acuerdo con Bozin *et al.*, (2007), el aceite esencial de romero posee 38 componentes químicos de los cuales sus componentes principales son el alcanfor, α-pineno, Z-linalol óxido y borneol. El aceite esencial de romero ha sido muy estudiado y algunos estudios afirman que dependiendo del lugar geográfico donde crezcan las plantas será la cantidad y tipos de moléculas bioactivas presentes en cada una de las variedades de romero (Ávila *et al.*, 2011).

Además, ha demostrado que tiene actividad antibacteriana y antifúngica en algunos alimentos a los cuales es añadido, por lo cual es alta su aplicación en la industria alimentaria y la industria farmacéutica. Este aceite esencial se ha probado contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas como: *Salmonella enteritidis, Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica, Shigella flexneri, Listeria monocytogenes serovar* 4b, y *Staphylococcus aureus* (Castaño *et al.*, 2010).

5.1.4. Orégano

El orégano (*Origanum vulgare L.*) pertenece a la familia *Lamiaceae*, es una planta herbácea muy aromática y sus hojas se utilizan como condimento en la preparación de alimentos. El aceite esencial de orégano está conformado con más de 34 componentes activos, de los cuales los principales son los fenoles como carvacrol, timol, α-terpeno y ρ-cimeno (Acevedo *et al.,* 2013; Bastos *et al.,* 2011).

Chávez *et al.,* (2008) han reportado que el orégano posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, antiespasmódicas, antisépticas, debido a que se caracteriza por la potente acción de sus componentes activos antes mencionados que son el carvacrol y el timol. La actividad antimicrobiana depende de la composición química del aceite esencial de orégano, la cual está relacionada con la especie de orégano, condiciones geográficas, períodos de cosecha y método de extracción (Cruz *et al.,* 2007).

En algunos estudios se ha demostrado que el aceite esencial de orégano tiene actividad contra bacterias Gramnegativas como: *Escherichia coli, Salmonella* Typhymurium, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae*; así como con bacterias Grampositivas como: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, con diferentes grados de sensibilidad. De igual manera, este aceite ha presentado capacidad de inhibición en cepas fúngicas, un ejemplo es el *Aspergillus* (*A. flavus, A. terreus* y *A. fumigatus*) presente en los alimentos, llegando a la conclusión de que el aceite esencial de orégano puede ser usado como conservador de alimentos (Lagunas, 2012; Matos *et al.,* 2010).

5.1.5. Aplicación en alimentos

Los aceites esenciales se utilizan en una amplia variedad de alimentos tales como productos de confitería, bebidas no alcohólicas, bebidas alcohólicas destiladas, carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, entre otros (Preedy, 2016; Rodas, 2012).

Debido a la actividad antimicrobiana que poseen los aceites esenciales, se han realizado diferentes estudios, para evaluar dicha propiedad en alimentos como: carnes y sus derivados, productos del mar, lácteos, cereales y tubérculos, frutas y verduras y productos a base de cereales (pastas), donde en efecto se encuentra el poder inhibitorio contra diversos

mohos, levaduras y bacterias. No obstante, tanto consumidores como industrias están creando conciencia sobre el uso de conservadores naturales, para sustituir a los químicos o sintéticos, al evitar el crecimiento microbiano y aumentar la vida útil de productos envasados (Burt, 2004; Perricone *et al.*, 2015).

5.2. Métodos de encapsulación de aceites esenciales

La encapsulación ha sido definida como la tecnología mediante la cual se logra retener a los componentes activos dentro de una matriz polimérica. Esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior. Los propósitos de aplicar una técnica de encapsulación en la industria de alimentos son: 1) proteger el componente activo de la degradación producida por el ambiente (calor, aire, luz, humedad, etc.), 2) liberación controlada del componente activo desde la matriz encapsulante bajo condiciones específicas (pH, temperatura, etc.), 3) modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipulación, por ejemplo, reducir la higroscopicidad, modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros, 4) enmascarar sabores desagradables y 5) separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen (López, 2012).

De acuerdo con Sandoval *et al.*, (2004), existen diferentes métodos de encapsulación y la selección de alguno dependerá de los costos, tamaño de partícula, propiedades físicas y químicas de los materiales, aplicación y mecanismo de liberación deseado. En la industria de alimentos, los métodos con mayor aplicación son: secado por aspersión, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión y tecnología por emulsión. En el caso de los aceites esenciales, la encapsulación es una tecnología utilizada en la industria de alimentos, para prevenir su volatilización y extender la vida útil de algunos componentes químicos presentes (Nedovic *et al.*, 2011; Parra, 2010).

5.2.1. Secado por aspersión

El método de secado por aspersión se basa en atomizar la solución que va a ser secada en forma de gotas muy finas, en el seno de una corriente de gas caliente que generalmente es aire. Tiene como principio la producción de un polvo seco por medio de la atomización de

una emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la emulsión quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Los agentes encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersión y tener buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación (Bringas *et al.,* 2013).

El secado por aspersión es el método más común utilizado en la industria de alimentos, para convertir un líquido a un producto en polvo, se ha utilizado para deshidratar alimentos ricos en azúcares, frutas, productos lácteos, entre otros. Sin embargo, esta técnica se emplea principalmente, para encapsular colorantes, saborizantes, probióticos, vitaminas, minerales, aceites esenciales, entre otros. El material que se produce por este método se recupera en forma de polvo dividido finamente, comprendiendo formas bastante uniformes esféricas o en parte esféricas en un rango estrecho de tamaños de partícula con propiedades físicas, características químicas y densidad de bulto (Expósito *et al.,* 2013). Además, existen diferentes ventajas de este método: protección a la oxidación, retención de sustancias bioactivas o componentes volátiles durante el almacenamiento. Sin embargo, se deben controlar ciertos parámetros durante el proceso como: contenido de sólidos del producto, peso molecular, presión de vapor y concentración de los componentes activos, viscosidad del material de alimentación, temperatura de entrada y salida del aire de suministro, tamaño de partícula y el equipo de secado (Adamiec y Kalemba, 2006; Bringas *et al.,* 2012; Mahdi *et al.,* 2008; Singh y Dixit, 2014).

5.2.2. Recubrimiento por lecho fluidizado

En la industria de alimentos, el recubrimiento por lecho fluidizado es una técnica convencional de secado por aire, en la que se aplica un revestimiento a las partículas de polvo en un proceso continuo o por lotes. Las partículas de polvo se encuentran suspendidas por una corriente de aire a una temperatura específica de modo que se consigue secar de forma rápida, homogénea y controlada al producto alimenticio, y además se pulverizan con la atomización de un material de revestimiento. Gradualmente cada partícula se cubre cada vez que se encuentre en la zona de atomización. En general, el recubrimiento se aplica del

5-50% en función del tamaño de las partículas del material de núcleo y la aplicación del encapsulado (De la Fuente *et al.*, 2004; Velázquez *et al.*, 2008).

El material de revestimiento debe tener una viscosidad aceptable para permitir bombeo y atomización, debe ser térmicamente estable y debe ser capaz de formar una película sobre una superficie de la partícula. Además, puede ser una solución acuosa de derivados de celulosa, dextrinas, proteínas, gomas y/o derivados de almidón. Después se controla la evaporación de su contenido de agua por muchos factores tales como: la velocidad de pulverización, el contenido de agua de la solución de revestimiento, el flujo de aire, la humedad de la entrada de aire en la cámara, la temperatura de la solución de revestimiento, el aire atomizado y el material en la cámara (Zuidam y Nedovic, 2009).

La técnica de lecho fluidizado se usa comúnmente en la industria farmacéutica, para la granulación de los ingredientes activos, ya que se puede controlar o modificar la liberación del fármaco con una película (Spray Systems Corporation, 2016). Recientemente, esta técnica se ha comenzado a aplicar en algunos aceites esenciales como naranja, menta, eucalipto, entre otros; para poder comparar la eficiencia y estabilidad de la encapsulación con respecto a otros métodos (Fendoung *et al.*, 2007; Srivastava y Mishra, 2010; Velázquez, 2008).

5.2.3. Encapsulación por emulsión

La encapsulación por emulsión es una técnica en la que dos líquidos que son inmiscibles se mezclan íntimamente. Un líquido (fase discontinua o dispersa) se dispersa en forma de pequeñas gotas o glóbulos en el otro (fase continua o dispersante). En la mayoría de las emulsiones los dos líquidos involucrados son el agua y el aceite. La fase acuosa puede consistir en soluciones de sales, azúcares, colorantes y materiales coloidales hidrofílicos. La fase oleosa puede consistir en mezclas de aceites esenciales, hidrocarburos, ceras, resinas y en general de materiales hidrofóbicos. Para formar una emulsión estable y mejorar su formación es necesario adicionar un agente emulsionante y aplicar energía mecánica por la acción de dispositivos como agitador de cizallamiento, homogeneizador por ultrasonido, homogeneizador a alta presión, o membranas. Por otro lado, se pueden formar dos tipos de emulsiones: a) si el aceite se dispersa con el agua es una emulsión de aceite en agua, y si el

agua es la fase dispersa se tiene una emulsión de agua en aceite. Además, las emulsiones son sistemas portadores potenciales de diferentes componentes bioactivos.

Algunas aplicaciones de la tecnología por emulsión para encapsular son: aceites esenciales, células vivas probióticas, perfumes, fertilizantes, lípidos, sabores volátiles, vitaminas, entre otros (Sánchez *et al.*, 2001; Pimentel *et al.*, 2009; Lupo *et al.*, 2012; Bringas *et al.*, 2013; Preedy, 2016).

5.2.3.1. Propiedades de las emulsiones

Las emulsiones son termodinámicamente inestables y al dejarlas reposar por algún tiempo, las gotas de la fase dispersa se agregan, pasando primero por el estado conocido como floculación para luego producir la coalescencia y, por último, la separación de dos fases inmiscibles y diferenciables. La floculación es la unión de las gotas pequeñas de fase dispersa con sus bordes distintivos, y la coalescencia es la formación de una gota mayor sin los bordes de las gotas individuales que han floculado. En la Fig. 1, se muestra esquemáticamente el proceso de floculación, coalescencia y separación de fases.

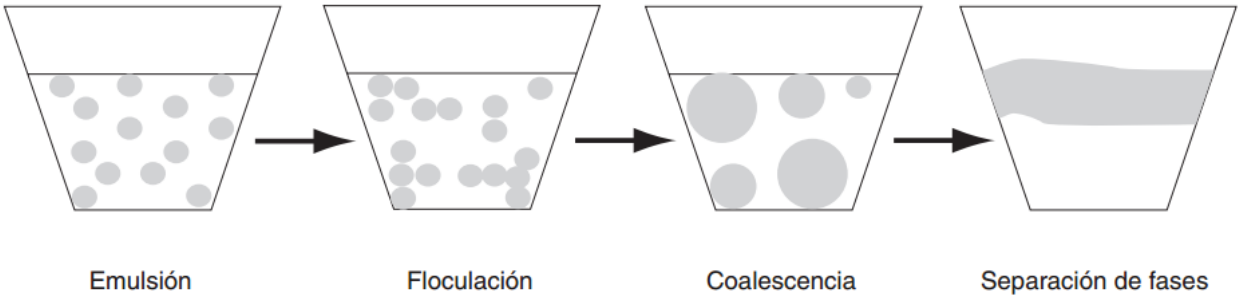


Figura 1. Procesos de floculación, coalescencia y separación en dos fases de una emulsión (Badui, 2013).

De acuerdo al tamaño de las gotas de la fase dispersa las emulsiones se pueden clasificar en macroemulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones. Las emulsiones con un tamaño de partícula en un rango entre 20 a 500 nm se denominan nanoemulsiones (Cardoso-Ugarte, López-Malo y Jiménez-Munguía, 2016).

Existen dos tipos de emulsiones, en las cuales siempre hay presente dos fases, una en forma de aceite (O) y la otra agua (W). La emulsión aceite en agua (O/W) consiste en pequeñas gotas de aceite como fase dispersa contenidas en el agua como fase continua; y en la emulsión de agua en aceite (W/O) las gotas pequeñas de la fase dispersa son de agua y la fase continua es de aceite. En la industria de alimentos son más comunes las emulsiones de tipo O/W. Algunos ejemplos de emulsiones de tipo O/W son la mayonesa, aderezos para ensalada, leche, crema, base para helados y sustitutos de crema para café; mientras que ejemplos de emulsiones W/O son más escasos y los alimentos más representativos son la mantequilla y la margarina (Badui, 2013).

5.2.3.2. Estabilidad de las emulsiones

El modo de preparación de una emulsión es determinante, tanto en su tipo como en su estabilidad. El agente emulsionante debe adicionarse al líquido que formará la fase continua, y posteriormente debe adicionarse el líquido que formará la fase dispersa, aplicando agitación mecánica para formar las pequeñas gotas de esta última. Por lo general, se ha observado que, si la fase dispersante se adiciona gradualmente, en lugar de toda a la vez, el tiempo requerido para formar la emulsión será menor. Entre más pequeños sean los glóbulos de la fase dispersa, mayor será la estabilidad de la emulsión formada. La agitación mecánica puede ser proporcionada por diversos dispositivos. Los instrumentos más utilizados son las batidoras o mezcladores, molinos coloidales, homogeneizadores a presión y aparatos ultrasónicos (Badui, 2013).

5.2.3.2.1. Estabilizantes

Los estabilizantes son aditivos que garantizan las características físicas de las emulsiones y suspensiones, debido a que mantienen homogeneidad del producto y previenen la separación de los diferentes ingredientes que componen su fórmula (Food Ingredients Brasil Inc., 2010).

Asimismo, poseen ciertas características físicas importantes, ya que aportan al alimento o producto al cual son adicionados propiedades como: viscosidad, fácil disolución, textura, cuerpo, consistencia y estabilidad (Aranberri *et al.*, 2006).

Los estabilizantes más utilizados en la industria alimentaria son los polisacáridos y las gomas, a continuación, se mencionan ejemplos: carragenina, caseína, alginatos, goma xantana, goma guar, goma jataí y carboximetil celulosa sódica (Food Ingredients Brasil Inc., 2010).

5.2.3.2.2. Emulgentes

Los emulgentes se definen como aquellos que se aplican a los alimentos, con el fin de mantener una dispersión uniforme de dos o más fases inmiscibles, para reducir la tensión superficial y conseguir una emulsión estable. Por tanto, toda emulsión estable debe estar formada por tres sustancias, dos líquidos inmiscibles entre sí y un agente emulgente apropiado que se adiciona a una de las fases antes de la formación de la emulsión (Hasenhuettl y Hartel, 2008).

Además, los emulgentes son moléculas que poseen una parte hidrofílica y otra lipofílica o hidrofóbica, generalmente contienen una parte no polar y otra polar, por lo tanto se pueden disolver en agua o soluciones acuosas como solventes orgánicos y aceites, presentando mayor afinidad por el agua o por los aceites; esta característica se conoce como balance hidrófilo-lipófobo, y es una propiedad importante para seleccionar el emulgente a emplear para la elaboración de una emulsión simple o múltiple (Martínez, 2002).

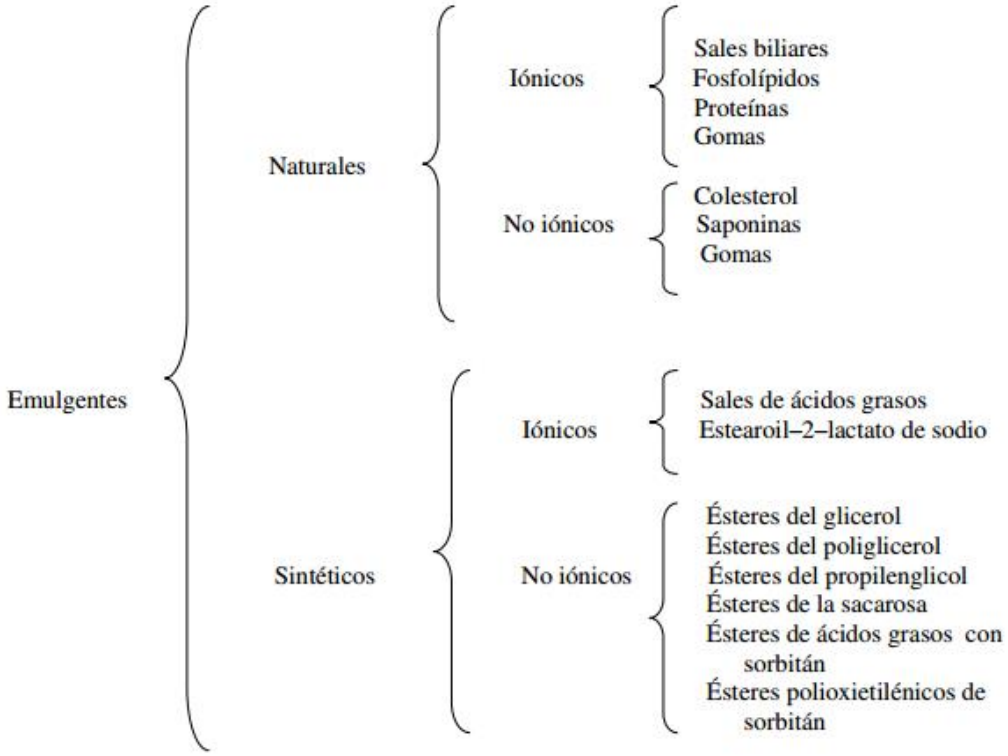


Figura 2. Clasificación de emulgentes usados en alimentos (Kosegarten y Jiménez, 2012).

5.2.3.3. Aplicación en alimentos

Las emulsiones tienen aplicaciones importantes en la industria alimentaria, ya que gran número de alimentos, tanto naturales como procesados, son emulsiones o han estado emulsionados en alguna etapa de su producción. Algunos ejemplos son la leche, la crema, las bebidas de frutas, las fórmulas infantiles, las sopas, las mezclas para panificación, los aderezos, la mayonesa, algunas salsas, postres, helados, mantequilla y la margarina (McClements, 2005).

Además de las aplicaciones anteriormente mencionadas, las emulsiones se han utilizado para encapsular componentes como los aceites esenciales de: orégano, romero, mandarina, naranja, entre otros; para dar estabilidad a su carácter volátil y proteger de factores ambientales, con la finalidad de mantener sus propiedades antimicrobianas.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

Los aceites esenciales de romero y orégano se adquirieron del proveedor Laboratorios Hersol (México) y el aceite de canela por Grupo TECNAAL (México). Para la preparación de las microemulsiones y nanoemulsiones aceite en agua (O/W), se utilizó inulina (Fructagave PR95, México) como estabilizante y Tween 80 (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como emulgente. Las cepas de microorganismos utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Listeria monocytogenes* SCOTT A, obtenidas del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla. Las piezas de apio fresco se obtuvieron en un supermercado de la ciudad de Puebla, México.

6.2. Aceites esenciales

6.2.1. Composición química

La determinación se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, 6850N, Agilent Technologies, EE. UU.). El espectrograma se comparó con la biblioteca NIST (National Institute of Standard Technology Library, EE. UU.), identificando los diferentes componentes presentes en los AE reportados con actividad antimicrobiana.

6.2.2. Propiedades físicas

La determinación del índice de refracción de los AE se realizó mediante un refractómetro digital (ATAGO 1T, Japón). La viscosidad se midió utilizando un viscosímetro Cannon Fenske, y la densidad se determinó siguiendo el método 962.37 de la A.O.A.C. (1995), utilizando picnómetros de vidrio. El pH se midió utilizando un potenciómetro (PC45, Conductronic, México) a 20 ± 5 °C, previamente calibrado con buffers 4 y 7.

6.2.3. Actividad antimicrobiana

6.2.3.1. Preparación del inóculo

Cada bacteria (*E. coli* o *L. monocytogenes*) se inoculó por separado en caldo de soya tripticaseína (TSB, Merck Laboratories, Alemania) y luego se incubaron a 35 °C durante 24

h. De cada caldo, las bacterias se cultivaron en agar soya tripticaseína (TSA, Laboratories Merck, Alemania), y se incubaron a 35 °C durante 24 h, y luego se refrigeraron a 4 °C hasta su uso, no más de 3 semanas. Para reactivar las bacterias, se tomaron dos asadas del agar TSA para inocular 10 mL de caldo TSB, después se incubaron a 35 °C durante 24 h, para lograr aproximadamente ~10^8 UFC/mL, que corresponde al inicio de la fase estacionaria de su curva de crecimiento. Para el análisis de los sistemas modelo con nanoemulsiones, el inóculo se diluyó en una serie de agua peptonada estéril al 0.1 % para ajustar a una población bacteriana de 10^5 UFC/g.

6.2.3.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Se prepararon sistemas modelo agregando diferentes concentraciones (20 µL hasta 1000 µL) de AEC, AER o AEO completando a 10 mL con caldo TSB; y se agregaron 0.5 mL de Tween 80 para una mejor distribución de los AE en el caldo TSB. Posteriormente, se inocularon 0.1 mL de las bacterias reactivadas en 10 mL del sistema modelo, se mezclaron a mano vigorosamente y luego se incubaron a 35 °C durante 24 h. Para confirmar la inhibición bacteriana, se realizó un recuento de placas en agar TSA. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la cantidad de AE que no permitía el crecimiento de *E. coli* o *L. monocytogenes* después de 24 h de incubación a 35 °C en el agar TSA inoculado. Finalmente, los sistemas modelo de caldo TSB se dejaron durante 24 h más en incubación y se llevó a cabo el mismo procedimiento de conteo de placas en agar TSA. La concentración mínima bactericida (CMB) se definió como la cantidad de AE que no permitía el crecimiento de bacterias después de 48 h de incubación en el agar TSA inoculado.

6.3. Encapsulación de aceites esenciales

6.3.1. Preparación

Para las microemulsiones, la fase continua se formó mediante una solución de 5 g inulina/100 g solución acuosa y 3 g Tween 80/100 g solución acuosa. Se utilizaron diferentes concentraciones de AE en la fase oleosa fue dependiendo de la CMI y de la CMB del AE sin encapsular: 10 % para AEC, 30 % AER y 45 % AEO.

Para las nanoemulsiones, la fase continua (90%) se formó con una solución de 5 g inulina/100 g solución acuosa y 3 g Tween 80/100 g solución acuosa, la fase oleosa fue del 10 %, que constituía, individualmente, cada AE: AEC, AER o AEO.

Para ambas preparaciones se utilizó un homogeneizador ultrasónico (Cole Parmer, CP 505, EE. UU.). Para las microemulsiones se aplicó una intensidad de amplitud de onda de 84 µm durante 15 min para AEC, y AER y 30 min para AEO. Para las nanoemulsiones se aplicó una amplitud de onda de 90 µm durante 15 min. Para la preparación de todas las emulsiones se utilizó un vaso doble pared, conectado a un baño de recirculación de agua a 10 °C.

6.3.2. Caracterización

6.3.2.1. Tamaño de partícula

Las distribuciones del tamaño de partícula de la fase dispersa de las microemulsiones se midieron usando un analizador de partículas por difracción láser Microtrac (Bluewave, EE. UU.); y las nanoemulsiones se midieron usando un analizador de partícula Nanotrac (Bluewave, Nanotrac, EE. UU.). El tamaño de partícula se indica como D_{90}, D_{50} y D_{10}, que representan el diámetro, en volumen, del 90%, 50% y 10% de la distribución del tamaño de partícula.

6.3.2.2. Micrografías

Las microemulsiones se observaron directamente bajo un microscopio óptico (Primo Star, Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes se capturaron usando una cámara de microscopio (AxioCam ERc5s, Zeiss, Alemania).

6.3.2.3. Color

Se utilizó un colorímetro de tres estímulos (CR-400, Konica Minolta, Japón) para medir los parámetros de color de las microemulsiones en escala de Hunter (*Lh*, *ah*, *bh*). El valor de Hue se calculó como: Hue= $\tan^{-1}$ (b/a). El resultado del valor de tono en radianes se convirtió a grados (°).

6.3.2.4. pH

El pH se midió utilizando un potenciómetro (PC45, Conductronic, México) a 20 ± 5 ° C, previamente calibrado con buffers 4 y 7.

6.3.2.5. Porcentaje de separación

Para determinar la fase de separación en las microemulsiones inmediatamente después de su preparación, se transfirieron 30 mL del sistema (Ho) a tubos cónicos graduados, y se almacenaron a temperatura ambiente durante 28 días a 20 ± 5 ° C. El volumen de la fase superior de crema (H1) se midió todos los días. La estabilidad se determinó calculando la fase de separación, como la relación H1/Ho, expresada en porcentaje.

Para las nanoemulsiones, dado que eran muy estables, se utilizó un método por centrifugación, y las condiciones fueron a 10,000 rpm durante 10 min a 4 ° C según el método de Kumar *et al.* (2015). El porcentaje de separación de fases se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%\, fase\ de\ separación = \frac{Volumen\ de\ fase\ creomosa}{Volumen\ total\ de\ la\ emulsión} \times 100 \qquad \text{(Ec. 1)}$$

6.3.2.6. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) se evaluó de acuerdo con el método descrito por Yeon *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Para determinar EE, se extrajo el AE libre en la microemulsión o nanoemulsión (FEOM) agregando 0.1 mL de la micro o nanoemulsión a 9 mL de hexano en un tubo de ensayo y mezclando el contenido usando una parrilla de agitación y un agitador magnético durante 15 s a 60 rpm.

De acuerdo con los picos máximos encontrados para cada AE en los espectrogramas, la absorbancia se ajustó a una longitud de onda específica. Se usó un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Modelo 6850; Jenway, Staffordshire, Reino Unido) para determinar los picos de absorbancia máximos en los espectrogramas de los AE disueltos en n-hexano y con un rango de 190 a 500 nm. Los picos máximos para los AE fueron los siguientes: AEC, 310 nm; AER, 225 nm; y AEO, 255 nm. Las curvas de calibración se obtuvieron para cada AE

disuelto en n-hexano y se prepararon en concentraciones estándar (0.5–5.0 µL), que demostraron correlaciones lineales con R^2 de 0.962–0.974.

La EE se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$EE\% = \frac{EOM - FEOM}{EOM} \times 100 \qquad \text{(Ec. 2)}$$

Donde: EOM representa el contenido teórico de aceite esencial de la formulación de micro o nanoemulsión y FEOM es la cantidad libre de aceite esencial medido en la micro o nanoemulsión.

6.3.3. Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de las micro y nanoemulsiones se realizó con el mismo procedimiento reportado anteriormente para los AE sin encapsular. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la cantidad de AE que no permitía el crecimiento de *E. coli* o *L. monocytogenes* después de 24 h de incubación a 35 °C en el caldo TSB inoculado; tomando en cuenta la cantidad de micro o nanoemulsion añadido al sistema. Para corroborar la inhibición de las bacterias a las 24 h de incubación, se realizó un recuento en placa en agar TSA. Finalmente, los sistemas modelo de caldo TSB se dejaron durante 24 h más en incubación y se llevó a cabo el mismo procedimiento de conteo de placas en agar TSA. La concentración mínima bactericida (CMB) se definió como la cantidad de AE que no permitía el crecimiento de bacterias después de 48 h de incubación en el agar TSA inoculado (Delaquis, 2002). Como control se llevó a cabo una prueba para evaluar el posible efecto antimicrobiano de los ingredientes de las micro y nanoemulsiones como la inulina y el emulgente Tween 80, de manera independiente.

6.3.4. Curvas de liberación de microemulsiones

Este estudio se realizó sólo para las microemulsiones de los aceites esenciales. La cantidad de microemulsión dispersada en agua se definió de acuerdo con los valores obtenidos de CMI y CMB del aceite esencial de canela (AEC) y aceite esencial de romero (AER) contra las bacterias estudiadas, para ser liberados en el medio. Para determinar la liberación de AEC y AER, se disolvieron 75 mL de microemulsión de AEC en 500 mL de agua destilada para

obtener 15 µL de AEC/mL y se agregaron 133.3 mL de microemulsión AER a 500 mL de agua destilada para obtener 80 µL de AER/mL. Las microemulsiones se añadieron en agua destilada, manteniendo el sistema agitado a 60 rpm y 25 °C, tomando alícuotas cada 30 min. La cuantificación de la liberación de cada AE se realizó disolviendo 1 mL de muestra en 9 mL de n-hexano, determinando la absorbancia en un espectrofotómetro a 310 nm para AEC y 225 nm para AER.

Los datos de concentración de los AE liberados en diferentes momentos se registraron y se ajustaron a los modelos cinéticos dinámicos, optimizando el mínimo error cuadrado. La ecuación 3 (Ec. 3), se aplicó para describir un modelo cinético de primer orden. Para ajustar una dinámica de segundo orden (Ec. 4) se utilizó una cinética con una pendiente inicial de cero y una pendiente máxima en el punto de inflexión (respuesta típica de forma de S).

$$C(t) = C_{max}[1 - e^{-k_1 t}]$$

(Ec. 3)

$$C(t) = C_{max}[1 - (k_2 t + 1)e^{-k_2 t}]$$

(Ec.4)

Donde: C(t) es la concentración de AE en cada alícuota en determinado tiempo, Cmax es la concentración máxima de AE en el sistema (µL/mL), k_1 y k_2 son constantes de tiempo relacionadas con la velocidad de liberación del AE, y son proporcionales a la pendiente de la línea tangente al punto de inflexión de la respuesta, en unidades de min^{-1}.

6.4. Evaluación del apio fresco

6.4.1. Preparación

El apio se cortó en trozos de 10 mm de ancho, 10 mm de largo y 5 mm de alto hasta un peso de ~ 1 g cada uno con un cuchillo afilado. El apio se desinfectó en tres pasos, utilizando diferentes soluciones mezcladas con un agitador magnético en una parrilla de agitación: 1) se colocaron cinco trozos de apio en un frasco con 100 mL de solución de hipoclorito de sodio al 0.2 % y se agitaron durante 5 min a 238 rpm; 2) luego se transfirieron los trozos a

otro frasco con 100 mL de agua destilada estéril y se agitó durante 5 min a 120 rpm, y 3) luego se repitió el segundo paso, transfiriendo los trozos de apio a diferentes matraces.

6.4.2. Caracterización

Los parámetros de pH y color de las piezas de apio se determinaron por triplicado utilizando el mismo equipo que se mencionó anteriormente. El color de la superficie de las piezas de apio se evaluó directamente. Para medir el pH, antes del análisis, se hizo una mezcla de apio en agua utilizando el equipo mencionado anteriormente. La actividad de agua (a_w) de 1 g de apio se determinó por triplicado utilizando un higrómetro AquaLab 4TE (Decagon Devices, EE. UU.). El contenido de humedad se determinó por triplicado mediante el método 950.46 A.O.A.C. (2000). La textura se midió utilizando un texturómetro Shimadzu (EZ-SX, Japón), se usó una prueba de penetración con una aguja de 1 mm de diámetro para penetrar una distancia de 10 mm a una velocidad de 1 mm/s; se cuantificó la fuerza máxima. Las pruebas se realizaron por triplicado.

6.4.3. Análisis microbiológico

Se agregaron 2 mL de caldo con las bacterias (*E. coli* y *L. monocytogenes*) reactivadas (10^8 UFC/mL) a 93 mL de TSB y se mezclaron perfectamente en frascos separados. Posteriormente, se colocaron 5 trozos de apio y se agitaron en una parrilla utilizando un agitador magnético a 120 rpm durante 20 min. Este procedimiento garantizó la impregnación de las bacterias con una población de ~10^5 UFC/g. Las piezas de apio inoculados se secaron en condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar (Labconco, Class II, EE. UU.), utilizando un mechero Bunsen a temperatura ambiente.

Las piezas de apio inoculadas con *E. coli* y *L. monocytogenes* se colocaron en frascos que contenían 25 mL de nanoemulsión de AEC, AER o AEO. Después, los sistemas se mezclaron en una parrilla con agitación utilizando un agitador magnético en diferentes periodos de tiempo (7.5-360 min) a 120 rpm.

Para las curvas de inhibición bacteriana, las piezas de apio inoculadas con *E. coli* y *L. monocytogenes* en las nanoemulsiones se trasfirieron con una espátula estéril a un mortero de porcelana estéril para su trituración. Posteriormente, se colocó ~1 g de muestra de apio

en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua peptona estéril y se mezcló totalmente. La carga microbiana se evaluó utilizando el método de recuento de placas y agar TSA. Las cajas Petri se incubaron a 35 °C durante 24 h, después se contaron las colonias bacterianas.

Para describir el efecto de las nanoemulsiones de AEC, AER y AEO sobre las curvas de inhibición bacteriana en las piezas de apio inoculadas con *E. coli* y *L. monocytogenes*, la supervivencia se ajustó utilizando el modelo de Weibull.

$$\log N/No = -b/t^n \qquad \text{(Ec. 5)}$$

donde: "No" es el número inicial de células viables (UFC/g), "N" es el número de células de supervivencia (UFC/g) después de un tiempo de tratamiento de exposición t (min), *b* y *n* son los factores de escala y forma de la curva (Peleg y Cole, 1998). Para determinar los parámetros *b* y *n*, se realizó un análisis de regresión no lineal utilizando Minitab 18 Statistical Software (Minitab Inc.; State College, PA, EE. UU.). Las estimaciones para b y n se calcularon utilizando el método de mínimos cuadrados ordinarios predeterminado, que minimiza el error estándar de la curva de regresión. La bondad del ajuste del modelo se evaluó utilizando el coeficiente de regresión (R^2) y el error cuadrático medio (MSE) de la siguiente manera:

$$MSE = \frac{\sum(predicho - observado)}{n-p} \qquad \text{(Ec. 6)}$$

donde: "*n*" es el número de observaciones y *p* es el número de parámetros a estimar.

La distribución de frecuencia de las resistencias se calculó utilizando las siguientes ecuaciones y valores de *b* y *n*:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1}\exp\left(-bt_c^n\right) \qquad \text{(Ec. 7)}$$

donde dΦ / dtc es la distribución de Weibull correspondiente a t_c (una medida de la resistencia o sensibilidad del organismo). El modo de distribución (t_{cm}) representa el tiempo de tratamiento en el que la mayoría de la población bacteriana fue inhibida o inactivada, y la media ($\bar{t}_c$) corresponde al tiempo promedio de inhibición/inactivación con su varianza (σ_{tc}^2).

El coeficiente de sesgo (υ_1) representa el sesgo de la distribución, que está relacionado con los miembros más resistentes de la población (Peleg y Cole, 1998), donde Γ es la función gamma.

$$t_{cm} = \left[(n-1)/nb\right]^{1/n} \qquad \text{(Ec. 8)}$$

$$\bar{t}_c = \left\{\Gamma\left[(n+1)/n\right]\right\}/b^{1/n} \qquad \text{(Ec. 9)}$$

$$\sigma_{tc}^2 = \left\{\Gamma\left[(n+2)/n\right] - \left(\Gamma\left[(n+1)/n\right]\right)^2\right\}/b^{2/n} \qquad \text{(Ec. 10)}$$

$$\upsilon_1 = \frac{\left[\Gamma(1+2/n)/b^{3/2}\right]}{\left[\Gamma(1+2/n)/b^{2/n}\right]^{3/2}} \qquad \text{(Ec. 11)}$$

6.4.4. Evaluación sensorial

Se realizó una prueba de preferencia hedónica para evaluar los atributos sensoriales del apio sin sumergir y sumergidos en las nanoemulsiones de AEC, AER y AEO. Una escala estructurada de nueve puntos para indicar un rango de (1) “Me gusta muchísimo” y (9) “Me disgusta muchísimo”. Los atributos sensoriales evaluados en las piezas de apio fueron: apariencia, color, olor, textura al observar, textura al degustar, sabor y aceptabilidad del producto; con un panel de 25 jueces no entrenados (Wichchukit y O’ Mahony, 2015).

6.5. Análisis estadístico

Las propiedades físicas de los AE, micro y nanoemulsiones, así como la eficiencia de encapsulación, se analizaron mediante un ANOVA y una prueba de comparación de pares de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, utilizando el software estadístico con Minitab V.18 (Minitab Inc. State College, EE. UU.).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Aceites esenciales

7.1.1. Caracterización

La composición química de los aceites esenciales estudiados se muestra en la Tabla II, para el aceite esencial de romero (AER) los principales componentes identificados fueron 1R-pineno (25.87 %), eucaliptol (21.95 %) y alcanfor (23.08 %). Además, para el aceite esencial de orégano (AEO) los principales componentes identificados en este estudio fueron β-cimeno (27.23 %), linalool (29.51 %) y carvacrol (27.34 %). Finalmente, para el aceite esencial de canela (AEC) el principal componente fue el cinamaldehído (50.64 %).

La composición del AER analizado en este estudio fue similar (cualitativamente) a lo reportado por otros autores (Jalalali-Heravi, Moazeni y Sereshti 2011). Los componentes más abundantes reportados como responsables de la actividad antimicrobiana del AER son α-pineno, terpineno, alcanfor, acetato de bornilo, cariofileno, carvacrol and isocarnosol (Genena, Hense, Smania and Souza 2008). Los principales componentes del AEO identificados fueron β-cimeno, linalool y carvacrol, que coinciden con Gilling, Kitajima, Torrey y Bright (2014), quienes encontraron que el carvacrol es uno de los principales componentes del AEO. Otro componente reportado por Pirigharnaei *et al.* (2011) además de carvacrol con 29.85%, fue ϒ-terpineno con 9.56 %, la cantidad de carvacrol obtenida en este estudio fue de 27.34 %; la diferencia en valores puede ser atribuida a diversos aspectos como la ubicación geográfica del sitio de cosecha, el clima y otras condiciones ambientales (Toncer *et al.* 2009). El cinamaldehído fue el componente mayoritario del AEC, lo que coincide con otros autores que reportaron que este es el principal componente con efecto antimicrobiano (Rajeswara, Rajput y Bhattacharya 2007).

Las propiedades físicas de los aceites esenciales (AE) se evaluaron para identificar si afectaban las propiedades de los AE encapsulados en microemulsiones (Tabla III). Los tres parámetros evaluados de los AE estudiados resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre ellos.

Tabla II. Componentes principales del aceite esencial de canela, aceite esencial de romero y aceite esencial de orégano.

Aceite esencial	Componentes	Área del pico (%)
Romero	1R-α-pineno	25.70
	Eucaliptol	21.95
	Alcanfor	23.08
	Camfeno	6.43
	β-pineno	5.50
	α-terpineol	3.75
	Acetato de bornilo	2.35
	Cariofileno	2.39
Orégano	β-cimeno	27.23
	Linalool	29.51
	Carvacrol	27.34
	ϒ-terpineno	4.67
	Cariofileno	4.73
Canela	Cinemaldehído	50.64
	Cariofileno	16.54
	Óxido de cariofileno	12.15
	α-cariofileno	5.47
	ϒ-cadineno	3.82

Los valores de densidad de los AE variaron entre 0.907-1.024 g/cm^3. El AEC demostró el valor más alto de densidad; además, este valor concuerda con lo reportado por Florido *et al.* (2014), ellos reportaron una densidad de 1.027-1.055 g/cm^3. Por otro lado, Albado-Plaus, Saez-Flores y Grabiel-Attaucusi (2001) reportaron una densidad específica de 0.9234 g/cm^3 en AEO, similar a la obtenida en este estudio (0.946±0.009 g/cm^3). Según Genena *et al.* (2008), el AER tiene una densidad de 0.894-0.913 g/cm^3 y el valor obtenido en este estudio fue de 0.907 g/cm^3.

Tabla III. Parámetros físicos del aceite esencial de canela, del aceite esencial de romero y del aceite esencial de orégano.

Parámetro	Romero	Orégano	Canela
Densidad (g/ cm^3) [1]	0.907 ± 0.001^c	0.946 ± 0.009^b	1.024 ± 0.003^a
Viscosidad (P) [1]	0.179 ± 0.001^c	0.302 ± 0.001^b	0.657 ± 0.006^a
Índice de refracción[1]	1.470±0.039 ^{c}	1.507±0.011^b	1.595±0.001^a

1. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se informaron las desviaciones estándar. Diferentes letras en filas son significativamente diferentes ($p < 0.05$) analizadas por la prueba de Tukey.

Los AE suelen presentar viscosidades bajas como los resultados obtenidos en este estudio (0.179-0.657 P). Siddiqui y Ahmad (2013) realizaron un estudio de viscosidad en diferentes aceites, reportando los siguientes datos: aceite de almendra 0.438 ± 0.018 P, aceite de clavo 0.066 ± 0.006 P, aceite de eucalipto 0.337 ± 0.033 P, aceite de nuez 0.296 ± 0.002 P, aceite de canela 0.041 ± 0.001 P, aceite de limón 0.321 ± 0.005 P, aceite de ajo 0.092 ± 0.004 P, aceite de comino negro 0.308 ± 0.009 P y aceite de linaza 0.254 ± 0,005 P.

El índice de refracción representa una característica física importante de los AE y suele estar en un rango entre 1.450 y 1.590. Los valores obtenidos para AER (1.468), AEO (1.490) y AEC (1.540-1.640) coinciden con los valores reportados en la literatura (Rodríguez-Rojo *et al.* 2012).

7.1.2. Encapsulados en microemulsiones

7.1.2.1. Caracterización

Los resultados obtenidos de los parámetros de densidad, viscosidad e índice de refracción de los aceites esenciales encapsulados en microemulsiones se muestran en la Tabla IV. Los valores de densidad de las microemulsiones fueron similares a las de las AE sin encapsular (Tabla III y Tabla IV). Lugovska y Sidor (2014) mencionaron valores de densidades entre 1.03-1.10 g/cm^3 de emulsiones de aceite en agua de aceite de cítricos, que son el mismo tipo de microemulsiones preparadas en este estudio. Se puede observar que los AE suelen tener valores de viscosidad bajos como los resultados obtenidos en este estudio (0.179-0.657 P).

Tabla IV. Parámetros físicos de las microemulsiones aceite en agua (O/W) del aceite esencial de canela (10/90), del aceite esencial de romero (30/70) y del aceite esencial de orégano (45/55).

Parámetro		Romero	Orégano	Canela
Viscosidad (P)[1]		0.189 ± 0.006^a	1.084 ± 0.020^b	0.109 ± 0.001^c
Densidad (g/cm^3)[1]		0.98 ± 0.01^b	0.99 ± 0.01^{ab}	1.02 ± 0.01^a
pH[1]		3.80 ± 0.35^b	4.20 ± 0.07^b	4.77 ± 0.01^a
Parámetros de color	L[1]	87.68 ± 0.22^a	83.78 ± 0.13^b	85.44 ± 0.35^c
	a[1]	-0.81 ± 0.13^a	-0.99 ±0.02^b	-1.84 ± 0.01^c
	b[1]	2.04 ± 0.04^c	3.96 ± 0.06^a	2.98 ± 0.01^b
	H°	111.6± 0.1^b	104.1± 0.2^c	121.6± 0.1^a

1. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se informaron las desviaciones estándar. Diferentes letras en filas son significativamente diferentes ($p < 0.05$) analizadas por la prueba de Tukey.

Entre las propiedades físicas de las microemulsiones, la viscosidad es una de las más importantes, debido a que pueden presentar algún fenómeno de separación como la coalescencia de gotitas de la fase dispersa (Nasery *et al.* 2016). Los valores de viscosidades, densidades y pH obtenidos en este estudio están entre 0.189-1.084 P, 0.98-1.02 g/cm^3 y 3.80-4.77, respectivamente (Tabla IV). La microemulsión de AEO presentó la mayor viscosidad

(1.084 P) a pesar de no ser el AE con mayor viscosidad, este resultado se atribuyó a la alta concentración de AE en la microemulsión, que fue del 45%. El resultado opuesto se obtuvo con la microemulsión de AEC con una viscosidad de 0.109 P formulada con un 10% de AE, a pesar de ser el más viscoso.

Los valores de pH de las microemulsiones estaban dentro del rango de 3.80 a 4.77, solo el pH de la microemulsión preparada con AEC fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que los valores obtenidos para AER y AEO, que pueden atribuirse a su composición química. A partir de los parámetros de color de las microemulsiones estudiadas, se puede observar que se obtuvo la luminosidad más baja (valor L) para AEO ($p < 0.05$) (Tabla IV). En cuanto a los valores del tono (H°) de las microemulsiones, todos presentaban ángulos hacia el color amarillo.

La Tabla V muestra los valores del tamaño de gota de las microemulsiones de AE estudiadas, cabe mencionar que la distribución de diámetro de la población demostró ser unimodal. Los resultados obtenidos del tamaño de gota (D_{50}) determinado para las microemulsiones fueron 2.08 ± 0.13, 3.30 ± 0.06 y 5.30 ± 0.65 µm, para el AEC, AER y AEO, respectivamente. La eficiencia de encapsulación (EE) obtenida con AER (81.97%) fue significativamente más alta ($p < 0.05$) que la obtenida con los otros dos aceites.

Tabla V. Tamaño de partícula, fase de separación y eficiencia de encapsulación de las microemulsiones aceite en agua (O/W) del aceite esencial de canela (10/90), del aceite esencial de romero (30/70) y del aceite esencial de orégano (45/55).

Microemulsión	Romero	Orégano	Canela
D_{50} (µm)	3.71^{b}	5.46^{a}	1.98^{c}
% separación	6.67 ± 0.01^{a}	2.50 ± 0.01^{c}	3.33 ± 0.01^{b}
EE%	81.97 ± 0.01^{a}	80.99 ± 0.01^{b}	79.91 ± 0.01^{c}

Los resultados promedio se informan a partir de mediciones por triplicado. Las diferentes letras de superíndices en filas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los aceites esenciales después del análisis de datos mediante la prueba de Tukey.

La distribución del tamaño de partícula es un indicador muy importante para describir la calidad, estabilidad, uniformidad y dispersabilidad de las microemulsiones. Zhang *et al.* (2017) informaron un promedio de tamaño de partícula de 8.69 µm en nanoemulsiones de

clavo/canela. Los pequeños tamaños de partícula de las microemulsiones obtenidas que aplican ultrasonido de alta frecuencia son lo suficientemente pequeños (1.98-5.46 µm) como para relacionarlos con su buena estabilidad durante el almacenamiento, según lo informado por Cardoso-Ugarte *et al.* (2016). Además, el tamaño de partícula está fuertemente relacionado con las eficiencias de encapsulación (EE) con esta técnica de microemulsión. En este estudio, los valores de EE variaron en función del AE utilizado en la formulación; el valor de EE fue de 80.99 % para la microemulsión de AEO que se formuló con la concentración más alta de AE, mientras que la microemulsión de AEC mostró una EE de 79.91 %. Niu *et al*. (2016) obtuvieron resultados similares al estudiar emulsiones con tres composiciones de fase oleosa y valores de pH diferentes, reportando EE entre 80 y 92%, reportando una buena estabilidad de las emulsiones.

Los diámetros del tamaño de partícula de los AE dispersados en las microemulsiones también se corroboraron por micrografías tomadas en un microscopio óptico, las cuales se muestran en la Figura 3.

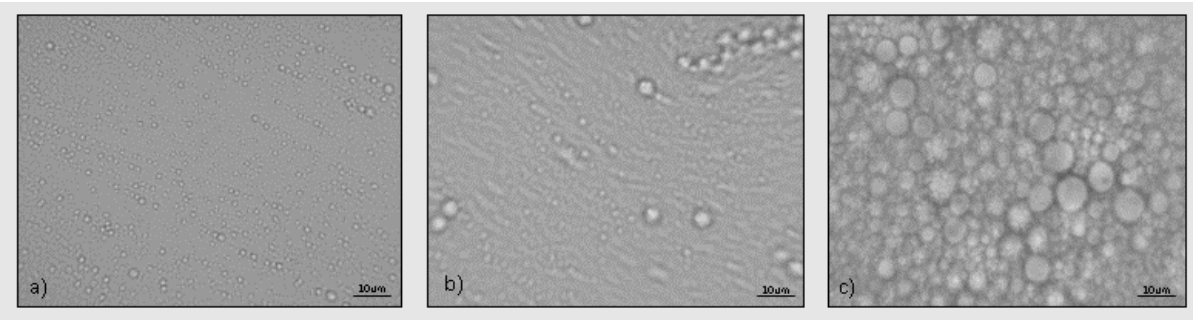


Figura 3. Micrografías de las microemulsiones aceite en agua (O/W) formuladas con diferentes aceites esenciales: a) canela (10/90), b) romero (30/70) y c) orégano (45/55).

7.1.2.1.2. Curvas de liberación

De acuerdo con las curvas de liberación (Fig. 4), la liberación del AEC mostró una tasa constante en los primeros 90 min; seguido de una meseta de 90 a 360 min. Por otro lado, la liberación del AER presentó una liberación retardada de 60 min, pero luego la velocidad de liberación fue constante hasta que pasaron 420 min, presentando una disminución de la velocidad de liberación hasta alcanzar una meseta a los 600 min.

La actividad antimicrobiana de los AE depende de su disponibilidad, en ciertos alimentos, para inhibir el deterioro de los microorganismos (Kaskatepe *et al.*, 2016). En la

Fig. 4, se puede observar que la liberación de 10 µL/mL del AEC encapsulado se obtuvo después de 60 min, y para la liberación de AER la concentración de 60 µL/mL se obtuvo después de 360 min.

Tomičić *et al.* (2018) evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes AE contra *L. monocytogenes*. Los autores informaron que el valor de CMI del AEC fue de 2.56 µL AE/mL y del AER fue de 20.48 µL AE/mL. Además, Kaskatepe *et al.* (2016) reportaron valores de CMI de AEC comercial y natural entre 0.39-12.5 µL AE/mL contra *E. coli*. Para este estudio, estos valores se tomaron como referencia para la liberación de los AE. De acuerdo con la curva de liberación de la microemulsión del AEC (Fig. 4), los valores CMI para ambas bacterias estuvieron disponibles desde los 30 min, mientras que la CMB para *L. monocytogenes* se liberó en 90 min y para *E. coli* en 60 min. Por otro lado, con la microemulsión de AER los valores del CMI se liberaron después de 120 min, para ambas bacterias. Finalmente, la CMB para *L. monocytogenes* y *E. coli*, estuvo disponible después de 210 y 420 min, respectivamente.

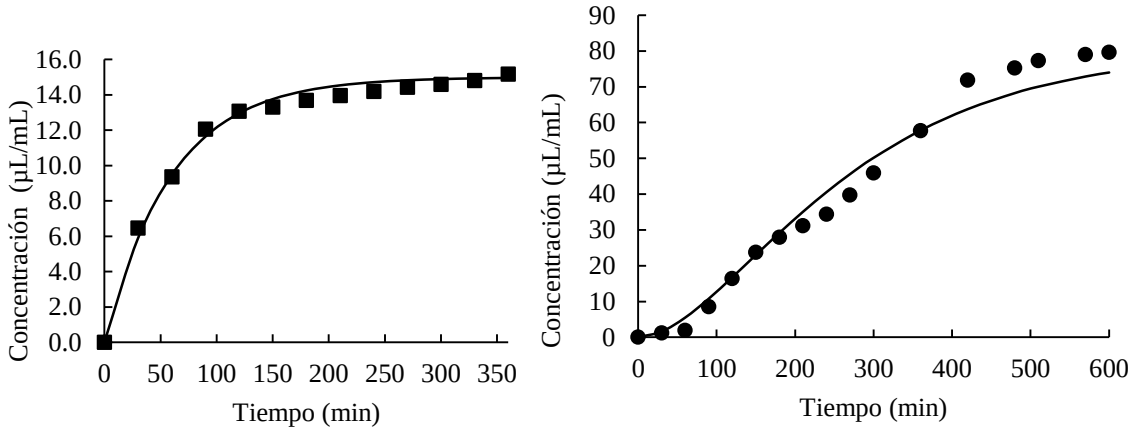


Figura 4. a) Liberación de microemulsión AEC (■) y b) microemulsión AER (•), ambas en agua a 60 rpm y 25 °C. Las líneas continuas representan la estimación del modelo matemático.

Diferentes factores influyen en la velocidad liberación de los AE, primero, la cantidad de AE en la microemulsión; y segundo, el tamaño de la gota lipídica en la microemulsión, el tamaño de gota de las microemulsiones se puede observar en la Tabla V. El tamaño de gota de la microemulsión del AEC era más pequeño que en la microemulsión AER, por lo que se pudo observar que tuvo una mejor liberación en la solución acuosa. Como se muestra en la

Fig. 4, el perfil de liberación para AEC muestra una respuesta monotónica con un rápido aumento al comienzo del proceso y, después de un lapso, la concentración del AEC tiende a alcanzar un valor estacionario, tal comportamiento fue descrito como una cinética de primer orden. Para el AER se puede observar un cambio en la pendiente de la curva de liberación, que describe una respuesta en forma de S; este comportamiento se ajustó a un modelo de segundo orden, como se discutió en Cardoso-Ugalde *et al.* (2017).

Para la liberación del AEC, la cual siguió una cinética de primer orden, k_1 se determinó con un valor de 0.0166, mientras que para la liberación de AER, describiéndose con una cinética de segundo orden, el parámetro k_2 se determinó con un valor de 0.00708. Para ser dimensionalmente consistentes, ambos parámetros tienen unidades de min^{-1} y están directamente relacionados con la tasa de liberación, demostrando así que la liberación del AEC se liberó más rápidamente. Los ajustes de los modelos propuestos se muestran en la Fig. 4; el coeficiente de correlación (R^2) entre los datos experimentales y la estimación del modelo estuvo en un rango entre 0.974 y 0.993. Los AE encapsulados en microemulsiones por ultrasonido de alta frecuencia pueden ser efectivos como antimicrobianos naturales en sistemas acuosos durante largos períodos de tiempo. En base a estos resultados se demuestra que la formulación de las microemulsiones (concentración de la fase oleosa en la acuosa) afecta el comportamiento de la liberación de los aceites esenciales en soluciones acuosas.

7.1.3. Actividad antimicrobiana

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla VI, se puede observar que *E. coli* es menos resistente al efecto inhibitorio y bactericida para el AEC sin encapsular que *L. monocytogenes,* pero mostró una resistencia similar al AER que con AEO sin encapsular. Las microemulsiones de los AE estudiadas (canela, romero y orégano) demostraron ser más efectivas contra *E. coli* y *L. monocytogenes*, en comparación a los AE sin encapsular (Tabla VI).

Tabla VI. Actividad antimicrobiana reportada como concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de canela, del aceite esencial de romero y del aceite esencial de orégano sin encapsular y encapsulados en microemulsiones aceite en agua (O/W).

Aceites esenciales		*Listeria monocytogenes*		*Escherichia coli*	
		CMI	**CMB**	**CMI**	**CMB**
Romero	**Sin encapsular**	5.0	7.5	5.0	7.5
	Encapsulado	1.5	6.0	1.5	3.0
Orégano	**Sin encapsular**	9.0	9.0	9.0	9.0
	Encapsulado	2.25	2.25	4.5	4.5
Canela	**Sin encapsular**	1.2	1.2	1.0	1.0
	Encapsulado	0.5	1.0	0.2	0.8

La resistencia de las bacterias Gramnegativas a los componentes de los AE se asocia con el papel protector de la capa de membrana proteica o pared celular de los lipopolisacáridos, que limitan la difusión de la velocidad de los componentes hidrofóbicos a través de la capa de lipopolisacáridos. Esta afirmación es confirmada por Zhang *et al.* (2017), quienes mencionaron que las nanoemulsiones de una mezcla de AE de clavo/canela mostraron una mayor actividad antimicrobiana contra cuatro microorganismos probados: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus* que cuando se utiliza la mezcla de AE directamente.

La CMI y la CMB del AEC sin encapsular fue de 1.2% (v/v) para *L. monocytogenes* y para *E. coli* fue de 1.0%. La actividad antimicrobiana del AEC se atribuye a su componente principal, el cinamaldehído; su modo de acción radica en la unión del grupo carbonilo a las proteínas celulares presentes en su estructura química, evitando la acción de las enzimas de aminoácidos-descarboxilasas. El AEC encapsulado presentó diferentes CMI y CMB para las bacterias estudiadas; para *E. coli* fue de 0.2% y 0.8%, mientras que para *L. monocytogenes*

fue de 0.05% y 1.0%, respectivamente; demostrando que el AEC encapsulado es más efectivo que el AEC sin encapsular.

Por otro lado, AER presentó una CMB más alta que la CMI para ambas bacterias cuando se aplica sin encapsular o encapsulado. Se ha reportado un comportamiento similar para la CMI y CMB de AE de orégano, canela, albahaca y romero contra bacterias como *S. aureus, L. monocytogenes, B. cereus*, Y. *enterocolitica, E. coli* y S. *Typhimurium*. obteniendo valores más altos para de CMB (Mello *et al.* 2012). El alcanfor es uno de los principales componentes antimicrobianos del AER y el mecanismo de acción antimicrobiano se debe a su carácter lipofílico, debido a que atraviesa fácilmente la membrana citoplásmica de las células de los microorganismos, causando daños en la pared y fugas de macromoléculas. Además, la actividad antimicrobiana de este aceite esencial se debe a la presencia de otros componentes como fenoles, aldehídos y alcoholes, que han demostrado la inhibición de diferentes cepas bacterianas como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus. Faecalis* (Yañez y Cuadro 2012).

Dolçà *et al.* (2015) evaluaron el AER microencapsulado por coextrusión/gelificación contra *Escherichia coli*. Dichos autores obtuvieron una reducción del recuento de bacterias del 91.05-99.41% (UFC/mL) con las microcápsulas secas. Una desventaja es el proceso que evaluaron, ya que es más complicado que la encapsulación por microemulsión, porque consta de 8 pasos y más tiempo (3 h) para la formación de las microcápsulas.

Raeisi, Tabaraei, Hashemi y Behnampour (2016) estudiaron la calidad microbiana de la carne de pollo incorporando AEC y AER individualmente y en combinación, contra *L. monocytogenes*. La concentración de los AE individuales o combinados evaluados fue de 0.5%. El recuento inicial de bacterias (0 día) fue de 3.2 log UFC/g, que aumentó después de 15 días de almacenamiento hasta 8.9 log UFC/g. Cuando los AE se utilizaron en combinación, se observó un efecto más fuerte en la preservación de la calidad microbiana (6.3 log UFC/g). En comparación con nuestro estudio, los aceites esenciales de canela y romero encapsulados en microemulsiones, individualmente, fueron más efectivos porque después de 24 h de almacenamiento, con un inóculo inicial más alto (8 log UFC/mL), la población de bacterias se inhibió completamente.

Respecto al AEO sin encapsular, presentó resultados con el mismo valor de CMI y CMB para *L. monocytogenes* y *E. coli* (9%). En este estudio, el carvacrol es uno de los componentes principales de la AEO, que tiene un grupo hidroxilo en el anillo fenólico; este componente ha demostrado la capacidad de alterar la membrana celular externa causando la fuga de protones e iones de potasio, y la inhibición de la síntesis de ATP del microorganismo (Fisher y Phillips 2008; Semeniuc, Pop y Rotar 2017). Dorman y Deans (2000) confirmaron este mecanismo antimicrobiano del carvacrol, estudiando la inhibición de diferentes bacterias patógenas. El AEO encapsulado, presentó un efecto antimicrobiano diferente para las bacterias estudiadas, para *L. monocytogenes* la CMI y la CMB fue de 2.25% y para *E. coli* fue de 4.5%. Por lo tanto, el AEO encapsulado demostró ser más eficiente para la inhibición de bacterias, en comparación con el uso de aceite esencial sin encapsular, siendo *E. coli* menos resistente que *L. monocytogenes*.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sin encapsular y encapsulados se puede observar por medio de los porcentajes de reducción de la CMI o la CMB para cada bacteria. Se obtuvo una reducción de CMI y CMB de 75 % y 20 % con el AEC de *E. coli*; mientras que para *L. monocytogenes* la reducción de CMI y CMB fue de 60 % y 20 %, respectivamente. Al evaluar la actividad antimicrobiana del AER, la CMI fue 70% menor para ambas bacterias cuando se encapsuló, y la CMB se redujo en un 20% para *L. monocytogenes* y en un 60% para *E. coli*. En el caso de AEO, la reducción en la CMI y CMB fue del 75% para *L. monocytogenes* y del 50% para *E. coli* aplicando el aceite encapsulado. El proceso de microencapsulación ha demostrado mejorar el efecto antimicrobiano de los AE y proporciona una actividad prolongada a lo largo del tiempo, como lo demuestran también Teodoro *et al*. (2014).

Arana-Sánchez *et al.* (2010) microencapsularon tres AEO mexicanos mediante secado por pulverización, su actividad antimicrobiana se mostró al determinar el CMB frente a 10^8 UFC/mL de *E. coli.* Observaron que los AEO microencapsulados disminuyeron el CMB hasta cuatro veces en comparación con los AEO sin encapsular. A pesar de los buenos resultados contra las bacterias, confirmaron que el uso del secado por atomización como técnica de microencapsulación, ésta cambió la composición de los OE; además las eficiencias de encapsulación variaron entre 53 y 81%.

En otro estudio realizado por Speranza *et al.* (2015) reportaron que el tamaño de gota de los aceites influyó en la actividad antimicrobiana de las emulsiones; observaron que cuando el área de superficie específica de las emulsiones era mayor, la actividad antimicrobiana era más efectiva contra los microorganismos estudiados. Además, las gotitas dispersas aumentaron el área interfacial y, por lo tanto, las interacciones en el medio son mayores (Nuñez *et al.* 2000). Por lo que, el pequeño tamaño de gota de las microemulsiones obtenidas con el homogeneizador ultrasónico demostró promover la actividad antimicrobiana de los AE contra las bacterias evaluadas.

7.2. Nanoemulsiones

7.2.2. Caracterización

Los valores de pH de las nanoemulsiones de AEC, AER y AEO estaban dentro del rango de 4.69–5.84 (Tabla VII). De Godoi *et al.* (2017) reportaron valores de pH entre 2.72 y 4.93 para nanoemulsiones que contenían AE de *Ecucalyptus globulus*. Pengon, Chinatangkul, Limmatvapirat y Limmatvapirat (2018) evaluaron las propiedades físicas de las nanoemulsiones de aceite de coco y reportaron valores de pH de < 6.0. Los valores son similares a los obtenidos en este estudio, aunque las tres nanoemulsiones fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). Las viscosidades de las nanoemulsiones de AEC y AER fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) de la de la nanoemulsión AEO (Tabla VII), que presentó la mayor viscosidad (1.993 mPa.s). Sugumar, Mukherjee y Chadrasekaran (2015) evaluaron la formación y caracterización de la nanoemulsión AE de eucalipto utilizando un método simple de mezcla y calentamiento y reportaron viscosidades de 2–16 mPa.s. Las viscosidades de las nanoemulsiones en este estudio fueron similares a las reportadas en la literatura. Las pequeñas diferencias en los valores pueden atribuirse al tipo de AE. Las densidades (Tabla VII) fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre las tres muestras, la nanoemulsión del AEC tuvo la densidad más alta con 1.018 g/cm^3. Lugovska y Sidor (2014) mencionaron valores de densidad de nanoemulsiones de 1.005–1.020 g/cm^3, lo cual concuerda con obtenidos en este esta investigación. Las nanoemulsiones son sistemas que se asemejan a la "leche"; por lo tanto, los valores obtenidos para el parámetro de color "*Lh*" (luminosidad) fueron >80, con una tendencia al color blanco (Tabla VII). Los valores de *Lh* más bajos se obtuvieron para la nanoemulsión de AEO y los más

altos para la nanoemulsión de AEC, respectivamente. Las nanoemulsiones estudiadas presentaron valores positivos para el parámetro *bh*, por lo que indica una tendencia al color amarillo, y valores negativos para el parámetro *ah*, indican una tendencia al color verde, lo cual concuerda con su apariencia. Los parámetros de color *ah* y *bh* fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre las tres nanoemulsiones.

Las distribuciones de tamaño de partícula demostraron que los diámetros de las gotitas de aceite eran unimodales entre las tres nanoemulsiones (Tabla VIII). El tamaño de gota de la nanoemulsión AEC fue el más pequeño con valores de D_{90}: 296 nm, D_{50}: 226 nm y D_{10}: 176 nm, mientras que la nanoemulsión AEO tuvo el mayor tamaño de gota con valores de D_{90}: 680 nm, D_{50}: 546 nm, y D_{10}: 414 nm. De Godoi *et al.* (2017) evaluaron la estabilidad de las nanoemulsiones que contenían un 5% de aceite *E. globulus* 30 días después de su preparación y reportaron un tamaño de partícula entre 75.57 y 488.93 nm. Los resultados de la distribución del tamaño de partícula de la gota demostraron que el homogeneizador ultrasónico de alta frecuencia fue eficaz para la preparación de nanoemulsiones, considerando que, en este trabajo, las nanoemulsiones se formularon utilizando un 10% de AE. Ghosh *et al.* (2013) sugirieron que el ultrasonido de alta frecuencia proporciona suficiente energía para generar intensas fuerzas disruptivas y minimizar el tamaño de las gotas de las nanoemulsiones. Además, esta técnica de homogeneización también proporciona valores altos de EE (82.8–98.9%) y baja separación de fases (0.00–8.32 %) en las nanoemulsiones, promoviendo una alta estabilidad durante el almacenamiento (Tabla VIII). Niu, Pan, Su y Yang (2016) mencionaron que las nanoemulsiones altamente estables suelen presentar EE's > 80%, lo que corrobora los resultados obtenidos. La nanoemulsión del AEC fue la más estable, y esta estabilidad se relacionó con tener el tamaño de partícula más pequeño, la EE más alta y sin separación de fases. La separación de fases y la EE (Tabla VIII) fueron significativamente diferentes entre las nanoemulsiones preparadas ($p < 0.05$).

Tabla VII. Parámetros físicos de las nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO)

Aceite esencial	**pH**	**Viscosidad (mPa.s)**	**Densidad (g/cm^3)**	**Color**		
				Lh	***ah***	***bh***
AEC	4.69 ± 0.03^{c}	1.844 ± 0.010^{b}	1.018 ± 0.002^{a}	87.25 ± 0.28^{a}	-0.89 ± 0.01^{c}	2.76 ± 0.02^{a}
AER	5.58 ± 0.04^{b}	1.843 ± 0.012^{a}	1.004 ± 0.001^{c}	84.81 ± 0.70^{c}	-1.33 ± 0.07^{b}	2.28 ± 0.01^{c}
AEO	5.84 ± 0.03^{a}	1.993 ± 0.019^{b}	1.011 ± 0.002^{b}	81.21 ± 0.33^{b}	-1.74 ± 0.01^{a}	3.28 ± 0.01^{b}

Nota: Los valores son la media de tres réplicas ± desviación estándar. Los medios que contienen letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla VIII. Tamaño de partícula, porcentaje de separación y eficiencia de encapsulación de las nanoemulsiones O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Aceite esencial	**Tamaño de partícula (nm)**			**Separación de fases (%)**	**Eficiencia de encapsulación (%)**
	D_{90}	**D_{50}**	**D_{10}**		
AEC	296^{c}	226^{c}	176^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	98.9 ± 0.2^{a}
AER	299^{b}	267^{b}	241^{b}	2.17 ± 0.20^{b}	97.0 ± 0.1^{b}
AEO	680^{a}	546^{a}	414^{a}	8.32 ± 0.21^{a}	82.8 ± 0.2^{c}

Nota: Los valores son la media de dos réplicas ± desviación estándar. Los medios que contienen letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

7.2.3. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

La actividad antimicrobiana de los AE sin encapsular y encapsulados en nanoemulsiones evaluadas en sistemas modelo (TSB) inoculados con *E. coli* o *L. monocytogenes* se muestra en la Fig. 5. Las pruebas de control mostraron que la inulina y el Tween 80 no tienen efecto antimicrobiano, ya que los recuentos de bacterias no se redujeron.

En comparación con las nanoemulsiones de AER y AEO, la nanoemulsión de AEC mostró un efecto inhibidor en aproximadamente una décima parte de la concentración de las otras dos evaluadas. Además, se observó que la nanoencapsulación reduce la CMI y la CMB de los AE probados en un promedio de 50 %. Los valores de CMI y CMB del AEC para *L. monocytogenes* y *E. coli* fueron de 1.56 µL/mL, mientras que los de la AEC nanoemulsión fueron 0.75 µL/mL para *L. monocytogenes* y 1.0 µL/mL para *E. coli*. Por otro lado, la CMI del AER para *L. monocytogenes* fue de 12.5 µL/mL y la CMB fue de 25 µL/mL. Los valores de CMI y CMB del AER para *E. coli* fueron de 25 µl/mL. Mientras que la CMI y la CMB para la nanoemulsión del AER fueron 15 µL/mL para ambas bacterias. En el caso del AEO la CMI y la CMB para ambas bacterias fue de 50 µL/mL, y para la nanoemulsión del AEO fue de 10 y 15 µL/mL para *L. monocytogenes* y *E. coli*, respectivamente.

Se observó que las nanoemulsiones del AEC, AER y AEO son más efectivas contra *E. coli* y *L. monocytogenes* que las AE sin encapsular aplicados directamente. Zhang *et al.* (2017) reportaron el mismo comportamiento en la evaluación de las nanoemulsiones de clavo/canela, que mostraron una mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S.* Typhimurium y *Staphylococcus aureus* que los AE aplicados directamente.

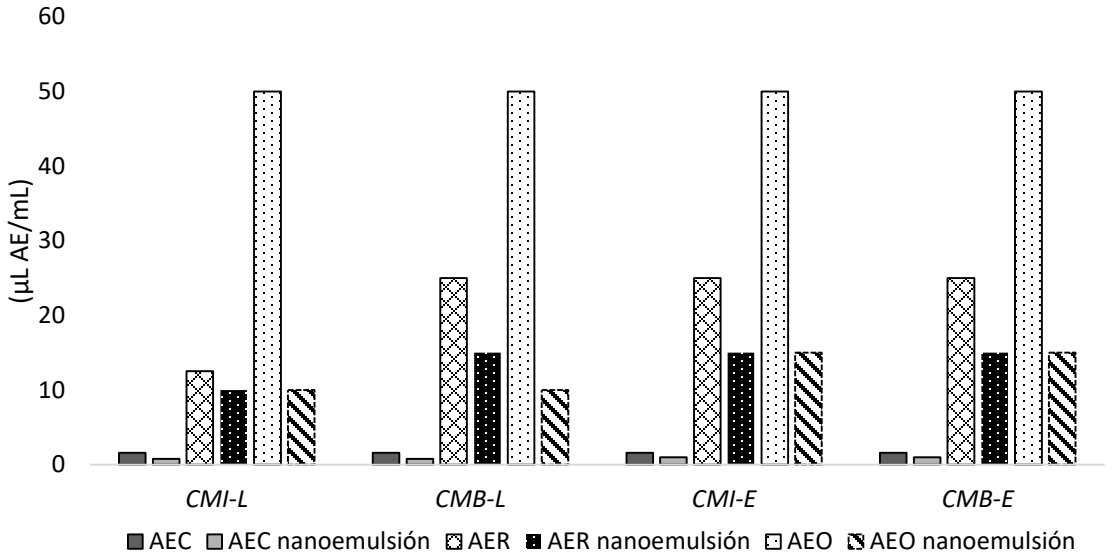


Figura 5. Actividad antimicrobiana (µL/mL) reportada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima de bactericida (CMB) de *E. coli* (E) y *L. monocytogenes* (L) con aceite esencial de canela (AEC), aceite esencial de romero (AER), y aceite esencial de orégano (AEO) sin encapsular y encapsulado en nanoemulsiones de aceite en agua O/W (10/90) en sistemas modelo.

7.2.4. Evaluación en apio fresco

El apio es un alimento fresco caracterizado por tener un alto contenido de humedad, un factor importante en la evaluación de su calidad. La deshidratación del apio afecta su color y apariencia, reduciendo el consumo. Los valores de a_w para el apio estuvieron en un rango entre 0.993 y 0.998 (Tabla IX), similares (> 0.95) a los reportados por Nicetin, Loncar, Filipovic y Knezevic (2015). La a_w de la muestra control fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la muestra del apio sumergido con las nanoemulsiones del AEC o AER, pero no de la del apio fresco sumergido con la nanoemulsión del AEO ($p > 0.05$).

Los valores de pH obtenidos de las muestras estaban entre 5.89 a 6.36 (Tabla IX), lo que concuerda con los valores (5.70–6.80) reportados por la FDA (2007). El pH de la muestra de control de apio fresco fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la del apio sumergido con nanoemulsiones AER y AEO, pero no con la nanoemulsión AEC. Martelo, Cortés y Suárez (2011) determinaron el contenido de humedad del apio enriquecido con vitamina E usando ingeniería de matrices y obtuvieron contenidos de humedad entre 93-95

%, *Lh* entre 48-52, *ah* entre 8.5−19.0, y *bh* entre 27-31. Los valores de pH estaban dentro del rango de 5.0-5.5. Los resultados obtenidos concuerdan con los mencionado anteriormente (Tabla IX). Saputro, Bintoro y Pramono (2016) evaluaron el apio a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento e informaron que los valores de *ah* eran negativos (verde) y que los valores de *bh* eran positivos (amarillo). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en este estudio (*ah* entre −8.17 y −13.73; *bh* entre 19.18 y 26.38), confirmando el color característico del apio (tonos verdes). Las *Lh* y *bh* del control fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) de las del apio tratado con las diferentes nanoemulsiones.

Tabla IX. Parámetros físicos de apio sumergido en nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Parámetro		Control	AEC	AER	AEO
a_w		0.993 ± 0.002[c]	0.996 ± 0.001[ab]	0.998 ± 0.001[a]	0.994 ± 0.002[bc]
Humedad (% p/p)		93.96 ± 0.21[b]	93.97 ± 0.03[b]	92.78 ± 0.01[c]	94.56 ± 0.04[a]
pH		5.89 ± 0.02[c]	5.87 ± 0.01[c]	6.22 ± 0.01[b]	6.36 ± 0.02[a]
	Lh	51.52 ± 0.21[c]	58.82 ± 0.45[a]	56.62 ± 0.51[ab]	57.00 ± 0.62[b]
Color	***ah***	-13.73 ± 0.14[d]	- 8.17 ± 0.17[a]	-9.92 ± 0.33[b]	-11.86 ± 0.22[c]
	bh	26.38 ± 0.28[a]	19.43 ± 0.32[b]	19.45 ± 0.20[b]	19.18 ± 0.14[b]
Textura	**Firmeza (N)**	10.42 ± 0.41[ab]	10.86 ± 0.07[a]	10.16 ± 0.02[bc]	9.63 ± 0.35[c]

Nota: Los valores son la media de dos réplicas ± desviación estándar. Los medios que contienen letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla X. Resultados de la evaluación sensorial del apio sumergido con nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Muestra de apio	Apariencia	Color	Aroma	Textura	Sensación en la boca	Sabor	Aceptabilidad general
Control	8.4 ± 0.8^{a}	8.6 ± 0.6^{a}	7.9 ± 1.3^{a}	8.5 ± 0.5^{a}	8.7 ± 0.5^{a}	8.1 ± 1.0^{a}	8.2 ± 0.6^{a}
AEC	7.6 ± 1.9^{a}	8.3 ± 0.7^{a}	6.2 ± 2.6^{ab}	7.9 ± 1.1^{a}	8.3 ± 1.1^{ab}	5.2 ± 2.6^{b}	5.7 ± 2.3^{b}
AER	8.5 ± 0.8^{a}	8.6 ± 1.1^{a}	5.6 ± 2.4^{b}	8.5 ± 0.5^{a}	7.8 ± 1.4^{ab}	3.9 ± 1.8^{bc}	4.8 ± 2.1^{bc}
AEO	8.2 ± 1.0^{a}	8.3 ± 1.0^{a}	7.3 ± 1.9^{ab}	8.1 ± 0.7^{a}	7.6 ± 1.8^{b}	3.5 ± 2.2^{c}	4.0 ± 2.0^{c}

Nota: Los valores son el promedio de 25 evaluaciones sensoriales de jueces no entrenados. Los promedios que contienen letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La textura de los alimentos es un atributo de los más importantes porque está relacionado con la firmeza del producto. La firmeza en la muestra de apio control fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al apio sumergido con la nanoemulsión del AEO, pero similar a las muestras con las nanoemulsiones del AEC y AER (Tabla IX). Los atributos sensoriales evaluados en el apio sin sumergir y sumergidos en las nanoemulsiones de los AE fueron apariencia, color, amor, textura, sensación en la boca, sabor y aceptabilidad general. Los análisis estadísticos mostraron que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la apariencia, color y atributos sensoriales de textura (Tabla X). El olor y la sensación en la boca de la muestra control de apio fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la de las muestras del apio impregnadas con las nanoemulsiones; en contraste, el sabor y la aceptabilidad general del apio fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), excepto en las muestras de apio sumergido en las nanoemulsiones del AEC y AER.

La apariencia es la primera impresión que perciben los consumidores, siendo el factor más importante en la aceptabilidad de los productos alimenticios. El color, es el atributo externo más fácil de evaluar, es un factor decisivo para los consumidores de alimentos como el apio, donde el verde intenso se asocia con una mayor frescura (López, 2003). El apio sumergido en las nanoemulsiones de AEC, AER y AEO se calificó como "me gusta mucho" por su apariencia (puntuación promedio entre 7.6 y 8.4) y "me gusta extremadamente" por color (puntación promedio entre 8.3 y 8.6) (Tabla X). El aroma del apio que contenía nanoemulsiones de AEC y AEO fue "me gusta" (puntuación promedio entre 6.2 y 7.3) y el de apio sumergido con nanoemulsión de AER "no me gusta ni me disgusta" (puntuación promedio 5.6). La textura de todas las muestras se evaluó como "me gusta mucho" (puntación promedio entre 7.9 y 8.5).

En general la muestra de apio más aceptada fue la que contenía nanoemulsión del AEC, con los siguientes puntajes: sensación en la boca, 8.3 (me gusta mucho); sabor, 5.2 (no me gusta ni me disgusta); y aceptabilidad general, 5.7 (me gusta ligeramente). El apio sumergido con nanoemulsión del AEO recibió las puntuaciones más bajas de la siguiente manera: sensación en la boca, 7.6 (me gusta moderadamente); sabor, 3.5 (me disgusta moderadamente); y aceptabilidad general, 4.0 (me disgusta ligeramente). No se encontraron reportes en la literatura sobre el efecto del apio tratado con aceites esenciales en los atributos

sensoriales. Sin embargo, Ayala-Zavala *et al.* (2009) informaron que las notas de aroma de las verduras recién cortadas se pueden relacionar con las notas de hierbas y especias. Por lo tanto, los AE podrían combinarse con las notas aromáticas de la aplicación vegetal. Gutiérrez *et al.* (2008) probaron los AE en rebanadas de lechuga y zanahoria cortadas en ensalada y realizaron un análisis sensorial. Sus resultados revelaron que las zanahorias tratadas se calificaron bien en la aceptación general; sin embargo, las rodajas de zanahoria tratadas con soluciones que contenían albahaca, bálsamo de limón o AE de tomillo, en los atributos: sabor ácido y aroma químico fueron mal evaluados. Los autores atribuyeron estas puntuaciones sensoriales al bajo pH de las soluciones de los AE. En la lechuga, los AE se evaluaron por debajo de la aceptabilidad (excepto cuando utilizaron AE de orégano y mejorana) y reportaron un sabor ácido fuerte y un aroma químico intenso. Gutiérrez *et al.* (2008) concluyeron que el sabor de la lechuga es más débil que el de las zanahorias, por lo que el impacto sensorial de las OE podría ser mayor en la lechuga.

7.2.5. Análisis microbiológico

Las muestras de apio inoculados con *L. monocytogenes* y *E. coli* disminuyeron significativamente la población bacteriana al ser sumergidas en las nanoemulsiones del AEC, AER y AEO después 5-10 minutos de contacto. Estos efectos fueron más notorios cuando se incrementó el tiempo de contacto; sin embargo, los valores de CMI y CMB de los AE sin encapsular y encapsulados en los sistemas modelo fueron más bajos que los obtenidos cuando se usaron las nanoemulsiones para inhibir a las bacterias en el apio. Burt (2004) mencionó que la actividad antimicrobiana de los AE en los alimentos se reduce cuando se compara con la evaluación en medios de cultivo debido a sus interacciones con los componentes de los alimentos, como las proteínas, los lípidos y los hidratos de carbono. De igual manera, los componentes químicos, el tiempo de contacto, la temperatura, la carga microbiana y las propiedades físicas y químicas de la superficie de los alimentos pueden influir en la respuesta bacteriana a los desinfectantes (De Medeiros *et al.*, 2016). Mazarei y Rafati (2019) mencionaron que la encapsulación, a micro o nano-escala, evita la reactividad de los componentes de los AE con agua, oxígeno y/o luz, y también disminuye su volatilización. Es así como se recomiendan a las nanoemulsiones para liberar los

componentes activos de los AE hacia las membranas bacterianas, proporcionando la protección requerida contra la oxidación y la pérdida de sustancias volátiles.

Se observó que la nanoemulsión del AEO fue la más efectiva para la inhibición de bacterias (Fig. 6), debido a que inhibió tanto a *E. coli* como a *L. monocytogenes* antes de los 60 min con una reducción de 5 ciclos logarítmicos. Sin embargo, como se discutió anteriormente, la nanoemulsión de AEO tuvo el valor más alto de separación de fase (8.32%), lo que podría explicar su difusión más rápida en los medios y, por lo tanto, una inhibición más rápida de las bacterias en la superficie del apio. La nanoemulsión del AEO también mostró la EE más baja (82.8%), por lo que se deduce que el AEO libre en la nanoemulsión también pudo estar en contacto instantáneo con la bacteria, afectando su respuesta de supervivencia. En comparación, la nanoemulsión del AEC fue efectiva para inhibir ambas bacterias después de 90 minutos de contacto con las muestras de apio, mientras que la nanoemulsión del AER fue efectiva solo después de 300 minutos de contacto (Fig. 6).

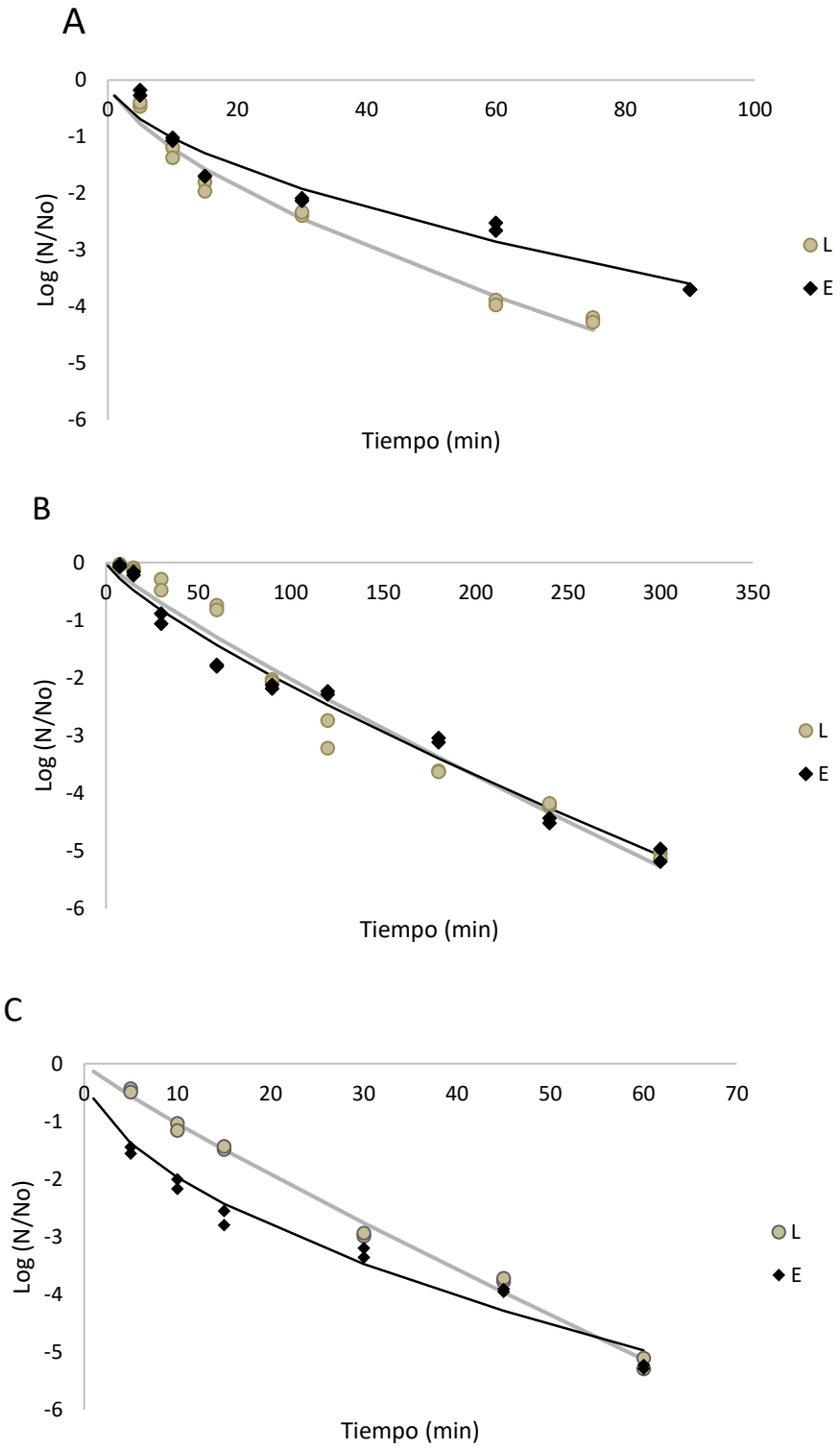


Figura 6. Inhibición de *E. coli* (E) y *L. monocytogenes* (L) curvas (puntos) para el apio sumergido en nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO). Las curvas de predicción (líneas) se ajustaron con el modelo de Weibull.

El modelo de Weibull se ajusta adecuadamente a las curvas de supervivencia de las bacterias inoculadas en el apio sumergido en las nanoemulsiones del AEC, AER o AEO (Tabla XI). Las curvas experimentales se correlacionaron adecuadamente con los datos predichos, con valores significativos de R^2 y MSE (Fig. 6, Tabla XI). Los valores de MSE más pequeños (0.148–0.345) y valores más altos de R^2 (0.966–0.996) revelan la capacidad del modelo para describir los datos (De Oliveira, Soares y Piccoli, 2013). La distribución de Weibull es un modelo flexible no lineal que ha demostrado que describe bien la inhibición de los microorganismos por diferentes factores, como los antimicrobianos naturales (Corte, Fabricio, Salvatori y Alzamora, 2004). El modelo considera que existe heterogeneidad entre las células microbianas dentro de una población microbiana, y el tiempo de inhibición de cada bacteria varía según varios factores. La curva de supervivencia podría asumirse como la forma acumulativa de la distribución subyacente de un tiempo de inhibición individual (Schenk y Guerrero, 2008). El parámetro "*n*" o el parámetro de forma fue < 1 para las curvas de inhibición analizadas, como se esperaba según la notoria concavidad ascendente (Tabla XI, Fig. 6). La concavidad ascendente indica que las células sobrevivientes podrían tener la capacidad de adaptarse a los factores de estrés aplicados (Coronel, Jiménez, López-Malo y Palou, 2011).

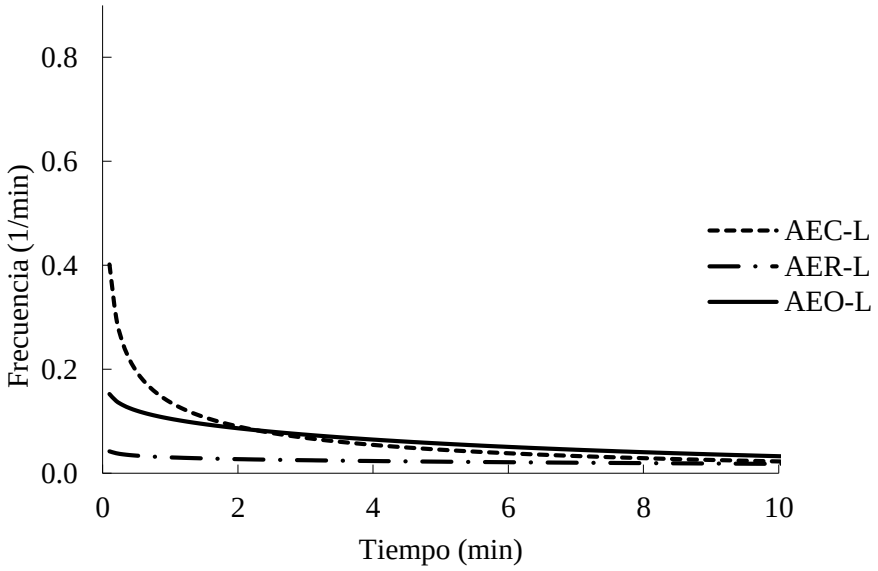
Tabla XI. Parámetros del modelo de Weibull (b, n) y parámetros de ajuste y parámetros de distribución de resistencia para la inhibición de bacterias en el apio sumergido en nanoemulsiones aceite en agua O/W (10/90) del aceite esencial de canela (AEC), del aceite esencial de romero (AER) y del aceite esencial de orégano (AEO).

Nanoemulsión	**Bacteria**	***b***	***n***	**MSE**	**R^2**	**Media (min)**	**Moda (min)**	**Varianza (min^2)**	**Coeficiente de sesgo (-)**
AEC	*E. coli*	0.274	0.572	0.288	0.966	15.2	--	818.3	10.4
	L. monocytogenes	0.275	0.643	0.223	0.987	10.2	--	288.8	13.0
AER	*E. coli*	0.057	0.787	0.245	0.989	43.5	--	3126.9	0.5
	L. monocytogenes	0.036	0.873	0.345	0.983	47.8	--	3016.3	2.9
AEO	*E. coli*	0.599	0.517	0.302	0.981	4.8	--	123.1	3.8
	L. monocytogenes	0.133	0.892	0.148	0.996	10.1	--	130.1	152.8

En la Figura 7, se muestran las distribuciones de frecuencia para la inhibición bacteriana en las muestras de apio inoculado con las bacterias estudiadas, las cuales fueron sumergidas en las nanoemulsiones del AEC, AER o AEO. Se observó que *E. coli* era más resistente que *L. monocytogenes* a las nanoemulsiones. Estos resultados concuerdan con los reportados por De Medeiros *et al.* (2016), quienes mencionaron que *E. coli* tenía una mayor tolerancia a los AE que la *L. monocytogenes*, lo cual se atribuye al hecho de que las bacterias Gramnegativas son generalmente menos sensibles a los AE que las Grampositivas. La mayor tolerancia en bacterias Gramnegativas es el resultado de tener una membrana externa, lo que limita la difusión de componentes hidrófobos a través de la capa de lipopolisacáridos. Para tener un efecto antimicrobiano, la concentración de AE en el medio debe ser suficiente para permitir que su difusión en la membrana externa y la bicapa lipídica alcance la membrana bacteriana. Mazarei y Rafati (2019) probaron la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones del AE de *Satureja khuzestanica* frente a patógenos seleccionados transmitidos por los alimentos, informaron que la hidrofobicidad de algunos compuestos lipofílicos del AE poseen una afinidad por las membranas celulares microbianas que cambian sus propiedades fisicoquímicas. Estas interacciones (componentes-membranas celulares) se reflejan en la disposición de los lípidos y la estabilidad de la bicapa, disminuyendo la integridad de la membrana. Gutierrez *et al.* (2008) evaluaron la eficacia de algunos AE contra los patógenos transmitidos por los alimentos y las bacterias dañinas, mencionaron que la eficacia antimicrobiana podría depender de la composición química del AE y sugirieron que los componentes principales ejercen un importante efecto inhibitorio contra las bacterias, pero también los componentes menores contribuyen a la actividad antibacteriana y puede tener un efecto sinérgico.

La mayoría de la población se redujo en los primeros 10 min de tratamiento, pero los valores de los medios de distribución variaron entre 4.8 y 47.8 minutos, lo que indica el efecto de las nanoemulsiones evaluadas. Además, los valores de varianza podrían indicar que las células de *E. coli* y *L. monocytogenes* sobrevivieron al tratamiento, especialmente cuando se usó nanoemulsión con AER. Los perfiles de distribución de frecuencia para nanoemulsiones del AEC y AEO fueron diferentes a los de las nanoemulsiones del AER, con AEC y AEO mostraron distribuciones más estrechas y valores de media, moda y varianza más bajos (Tabla XI, Fig. 7). Esto sugirió que las poblaciones de *E. coli* o *L.*

monocytogenes eran en promedio no solo más sensibles, sino que también tenían una sensibilidad más uniforme a la aplicación de la nanoemulsión.



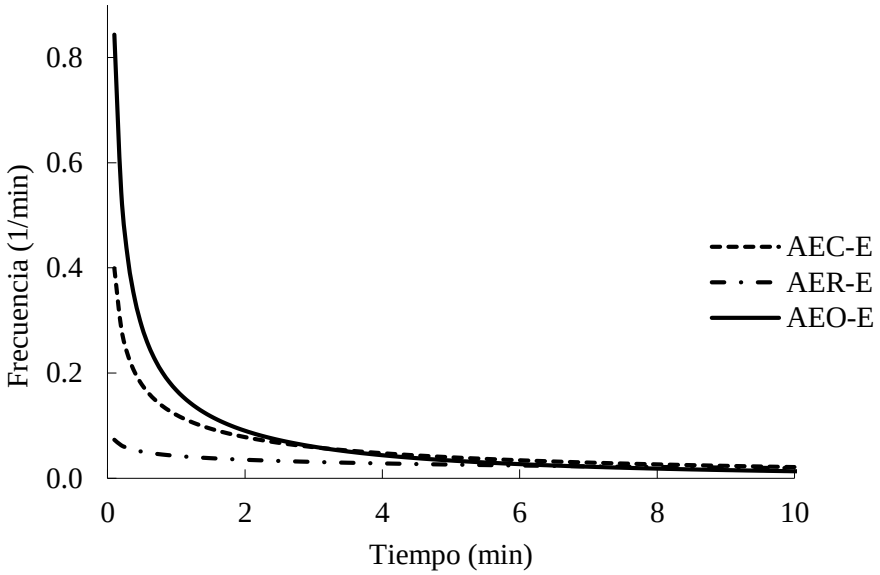


Figura 7. Distribución de frecuencias de las resistencias de *E. coli* (E) y *L. monocytogenes* (L) en el apio sumergido en nanoemulsiones de aceite esencial de canela (AEC), aceite esencial de romero (AER) y aceite esencial de orégano (AEO)

Diversas investigaciones han mencionado que los AE encapsulados en nanoemulsiones son una buena alternativa a los desinfectantes sintéticos para controlar los microorganismos que se encuentran en los alimentos. Donsì *et al.* (2015) evaluaron una nanoemulsión de AE de mandarina contra *L. innocua* en judías verdes y reportaron una reducción de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos en la población de bacterias. Ghosh, Mukherjee y Chandrasekaran (2014) evaluaron las bacterias nativas en el jugo de naranja utilizando una nanoemulsión aceite/agua formulada con aceite de sésamo obteniendo una reducción significativa de población bacteriana. Walker *et al.* (2016) evaluaron la eficacia antimicrobiana de AE de mejorana en lechuga, col rizada y rúcula inoculadas con *Salmonella* y la compararon con un tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio (250 ppm). Los autores encontraron que la inmersión en una solución de AE de mejorana al 0.5 % mostró una eficacia antimicrobiana similar a la del hipoclorito, sugirieron que se pueden usar el AE para reducir o reemplazar el hipoclorito de sodio durante la desinfección de vegetales. Kang y Song (2018) estudiaron la capacidad de las nanoemulsiones del AEC y AEO para inhibir *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 y *S.* Typhimurium en hojas de mostaza roja, y reportaron reducciones de la población microbiana entre 0.1–0.6 log (UFC/g) con diferentes tratamientos, y mencionaron que las nanoemulsiones no afectaron las características sensoriales de las hojas de mostaza roja durante el almacenamiento. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con la literatura, debido a que las nanoemulsiones del AEC, AER y AEO dieron como resultado una reducción de 5 ciclos logarítmicos en *E. coli* y *L. monocytogenes* en el apio.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

La encapsulación por emulsión mediante el ultrasonido de alta frecuencia demostró ser una técnica efectiva para encapsular aceites esenciales en microemulsiones y nanoemulsiones estables, obteniendo pequeños tamaños de partícula, bajos porcentajes de fase de separación y altas eficiencias de encapsulación. Por otro lado, los aceites esenciales encapsulados fueron más efectivos que los aceites esenciales sin encapsular contra *E. coli* y *L. monocytogenes*, por lo que se sugiere su uso como antimicrobianos naturales para reemplazar los desinfectantes sintéticos.

El uso de microemulsiones y nanoemulsiones pueden ser menos costoso que la aplicación directa de los componentes activos extraídos y purificados de los aceites esenciales, debido a la cantidad necesaria para inhibir o inactivar las bacterias.

En este estudio las nanoemulsiones demostraron el uso potencial para reducir los recuentos bacterianos en las muestras de apio fresco, siendo la nanoemulsión de aceite esencial de orégano la más efectiva para inhibir *E. coli* y *L. monocytogenes*. Sin embargo, la selección del aceite esencial encapsulado en nanoemulsión debe considerar el posible impacto en los atributos sensoriales del alimento recién cortado al tratar. El modelo de Weibull y su distribución asociada ayudaron a explicar los efectos observados de las nanoemulsiones en la inhibición bacteriana.

8.2. Recomendaciones

Para futuros estudios o investigaciones se recomienda:

- Evaluar otras bacterias que sean de interés en el área de alimentos.
- Utilizar otro método más rápido para la evaluación de la actividad antimicrobiana, tal vez hubiera permitido estudiar más sistemas, otros aceites, sus mezclas o sus componentes mayoritarios.

- Además de las nanoemulsiones, se recomienda también aplicar las microemulsiones en alimentos para evaluar su efecto antimicrobiano de los aceites esenciales encapsulados por ambas técnicas.
- Se sugiere evaluar la aplicación de las emulsiones en otros alimentos frescos de origen vegetal y/o animal.
- Estudiar una técnica diferente de aplicación de las emulsiones al producto alimenticio.
- Para realizar el análisis sensorial se sugiere aplicar la nanoemulsión horas previas a la evaluación para que se volatilicen un poco los sabores intensos y característicos de los aceites esenciales y sean muestras con puntuación aceptable para los jueces.

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. (1995). Official Methods of Analysis. Association of Analytical Chemist. Washington, D.C. USA.

A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis of Association of Official Agriculture Chemist. Association of Analytical Chemist, Washington. D.C.

Acevedo, D., Navarro, M. y Monroy, L. (2013). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (Origanum vulgare). *Información Tecnológica*, 24 (4): 43-48.

Adamiec, J. y Kalemba, D. (2006). Analysis of microencapsulation ability of essential oils during spray drying. *Drying Technology*, 24: 127-132.

Albado-Plaus E, Saez-Flores G, y Grabiel-Ataucusi S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Heredinana*, 12 (1): 16-19. doi:10.20453/rmh.v12i1.660

Alvarenga Botrel D, Vilela Borges S, Victória de Barros Fernandes R, Dantas Viana A, Maria Gomes da Costa J, y Reginaldo Marques, G. (2012). Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science & Technology*, 47 (11): 2289–2296. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03100.x

Amrutha, B., Sundar, K., y Shetty, P. H. (2017). Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 79: 152–159. doi:10.1016/j.lwt.2017.01.031

Arana-Sánchez A, Estarrón-Espinosa M, Obledo-Vázquez E N, Padilla-Camberos E, Silva-Vázquez R, y Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β-cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology,* 50 (6): 585–590. doi:10.1111/j.1472-765x.2010.02837.x

Aranberri, I., Binks, B., Clint, J. y Fletcher, P. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polimeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros,* 7 (3): 211-231.

Ávila, R., Navarro, A., Vera, O., Dávila, R., Melgoza, N. y Meza, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis L.*) una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar,* 15 (43): 23-36.

Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., y Del-Toro-Sánchez, L. (2009). Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. *Journal of Food Science, 74*(7): R84-R91.

Badui, S. 2013. Química de los alimentos. México, Pearson Educación.

Bastos, M., Damé, L., Souza, L., Bender, D., Alves, R. y Braga, R. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Revista Cubana de Plantas Medicinales,* 16 (3): 260-266.

Bezerra, F. M., Carmona, O. G., Carmona, C. G., Lis, M. J., y de Moraes, F. F. (2016) Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices. *Cellulose,* 23 (2): 1459-1470. doi:10.1007/s10570-016-0882-5.

Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R. P., y Zhang, Y. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*, 47, 69–73. doi:10.1016/j.fm.2014.11.007

Bosquez, E., Ronquillo, E., Bautista, S., Verde, J. y Morales, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against Coletotrichum gloeosporioides and Rhizopus stolonifer in stored papaya fruit and the possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57: 132-137.

Bozin, B., Mimica, N., Samojlik, I. y Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19): 7879-7885.

Bringas, M., Beldarraín, T. y Pino, J. (2013). Microencapsulación de cepas lácticas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 23(3): 68-77.

Bringas, M., Valdés, D. y Pino, J. (2012). Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated lime essential oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 1511-1517.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Cardoso-Ugarte, G A, López-Malo A, y Jiménez-Munguía M. T. (2016) Application of nanoemulsion technology for encapsulation and release of lipophilic bioactive

compounds in food. In: A.M. Grumezescu (ed) Emulsions, 1 edn. Academic Press Elsevier, UK, pp 227-256.

Cardoso-Ugarte, G. A., Ramírez-Corona, N., López-Malo, A., Palou, E., San Martín-González, M. F. and Jiménez-Munguía, M. T. (2017) Modeling phase separation and droplet size of W/O emulsions with oregano essential oil as a function of its formulation and homogenization conditions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39 (7): 1065-1073. doi:10.1080/01932691.2017.1382370

Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., y Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista Vitae*, 17 (2): 149-154.

Char C, Cisternas L, Pérez F, y Guerrero, S. (2015) Effect of the emulsification on the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Food Science*, 1: 1-6. doi:10.1080/19476337.2015.1079558

Chávez, L., Díaz, F., Escalante, G. y Estrada, E. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *Revista de Ciencia e Investigación Médica Estudiantil*, 13 (2): 45-48.

Chun, H., Kim, J., Chung, K., Won, M., y Song, K. B. (2009). Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* enterica serovar Typhimurium, and *Campylobacter jejuni* in ready-to-eat sliced ham using UV-C irradiation. *Meat Science*, 83: 599–603. doi:10.1016/j.meatsci.2009.07.007

Coronel, C. P., Jiménez, M. T., López-Malo, A., y Palou, E. (2011). Modelling thermosonication inactivation of *Aspergillus flavus* combining natural antimicrobial at different pH. *Procedia Food Science*, 1: 1007–1014. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.151

Corte, F., Fabricio, S., Salvatori, D. M., y Alzamora, S. M. (2004). Survival of *Listeria innocua* in apple juice as affected by vanillin or potassium sorbate. *Journal of Food Safety*, 24: 1–15. doi:10.1111/j.1745-4565.2004.tb00372.x

Cruz, M., Gastélum, M., Silva, R. y Nerváez, G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano y de su aceite esencial sobre cinco especies del género Vibrio. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3): 261-267.

D'Antuono, L. Galleti, G. y Bocchini, P. (2000). Variability of essential oil content and composition of Origanum vulgare L. *Annals of Botany*, 86 (3): 471-478.

De Godoi, S. N., Quatrin, P. M., Sagrillo, M. R., Nascimento, K., Wagner, R., Klein, B., y Ourique, A. F. (2017). Evaluation of stability and in vitro security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. *BioMed Research International*, 1–10. doi:10.1155/2017/2723418

De la Fuente, S., Rodríguez, G., Riera, E., Gallego, J.A. y Mulet, A. (2004). *Desarrollo de un sistema de secado mediante fluido asistido por ultrasonidos de potencia*. Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia, España.

De Medeiros Barbosa, I., da Costa Medeiros, J. A., de Oliveira, K. Á. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M., y de Souza, E. L. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*,

Listeria monocytogenes and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. *Food Control*, 59: 468–477. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.017

De Oliveira, T. L. C., Soares, R. de A., y Piccoli, R. H. (2013). A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 93(3), 645–651. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.004

Delaquis, P. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and *eucalyptus* essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2): 101–109. doi:10.1016/s0168-1605(01)00734-6

Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., y Crowe, S. J. (2018). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009–2015. MMWR. *Surveillance Summaries*, 67 (10): 1–11. doi:10.1002/9781118543504.ch10

Dolçà C, Ferrándiz M, Capablanca L, Franco E, Mira E, López F, y García, D. (2015) Microencapsulation of Rosemary Essential Oil by Co-Extrusion/Gelling Using Alginate as a Wall Material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 5 (3): 121–130. doi:10.4236/jeas.2015.53010

Donsì F, Annunziata M, Vincensi M, y Ferrari, G. (2012) Design of nanoemulsion based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, 159: 342-350. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.07.001

Donsì, F., Marchese, E., Maresca, P., Pataro, G., Vu, K. D., Salmieri, S., y Ferrari, G. (2015). Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating

containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. *Postharvest Biology and Technology*, 106: 21–32. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.02.006

Dorman H J, y Deans, S. G. (2000) Antimicrobials agents from plants: antibacterial activity of volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x

Expósito, I. Bringas, M. y Pino, J. (2013). Microencapsulación de aceite esencial de mandarina: selección del contenido de aceite esencial. *Ciencia y Tecnología*, 23(1): 45-48.

Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venancio, F., Teixeira, A., Figueiredo, C., Barroso, J. y Pedro, L. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8162-8168.

Fendoung, G., Elmafadi, S., Ngassou, M. y Poncelet, D. (2007). Encapsulation of essential oil of *Eucalyptus globulus* by adsorption and coating in fluidized bed. Cartel. XV International Workshop on Bioencapsulation, Viena, Austria: Universidad de Ngaounderé.

Fenema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Fisher K, y Phillips, C. (2008) Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Food Science and Technology*, 19 (3): 156-164. doi:10.1016/j.tifs.2007.11.006

Florido P M, Andrade I M G, Capellini M C, Carvalho F H, Aracava K K, Koshima C C, y Gonçalves, C. B. (2014) Viscosities and densities of systems involved in the deterpenation of essential oils by liquid-liquid extraction: New UNIFAC-VISCO parameters. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 72: 152–160. doi:10.1016/j.jct.2013.11.026

Food and Drug Administration (2015). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2015: Annual Report.https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/2015FoodBorneOutbreaks_508.pdf Accessed 12 March 2019.

Food and Drug Administration. (2007). Approximate pH of Food and Food products. Unites States. Report. http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/266402.pdf Accessed 12 March 2019.

Food Ingredients Brasil Inc. (2010). Estabilizantes. Recuperado 10 de abril 2016, de: http://www.revista-fi.com/materias/145.pdf

García-Ceja, a. y López-Malo, A. 2012. Biopolímeros utilizados en la encapsulación. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 (1): 84-97.

Garti, N., y Benichou, A. (2001) Double emulsions for controlled-release applications: Progress and Trends, In Sjoblom J: (ed) Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology. EE.UU. 409-442.

Genena A K, Hense H, Smânia Junior A, y Souza, S. M. de (2008) Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts

obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciencia y Tecnologia de Alimentos,* 28 (2): 463–469. doi:10.1590/s0101-20612008000200030

Ghosh V, Mukherjee A, y Chandrasekaran, N. (2012) Mustard oil microemulsion formulation and evaluation of bactericidal. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (4): 2-5.

Ghosh, V., Mukherjee, A., y Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1): 338–344. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.08.010

Ghosh, V., Mukherjee, A., y Chandrasekaran, N. (2014). Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114: 392–397. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.10.034

Gilling, D.H., Kitajima, M., Torrey, J. R. y Bright, K. R. (2014) Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology,* 116: 1149-1163. doi:10.1111/jam.12453

Guevara-Bretón, N. A. y Jiménez-Munguía, T. 2008. Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2 (1): 36-49.

Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., y Bourke, P. (2008). Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection, 71*(9): 1846-1854.

Hasenhuettl, G. y Hartel, R. (2008). Food emulsifiers and their applications. EE. UU.: Springer.

Huang, Q., Yu, H., y Ru, Q. (2010). Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1): R50–R57. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x

Imanishi, M., Manikonda, K., Murthy, B. P., y Gould, L. H. (2014). Factors Contributing to Decline in Foodborne Disease Outbreak Reports, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (9): 1551–1553. doi:10.3201/eid2009.140044

Jalali-Heravi, M., Moazeni, R. S., y Sereshti, H. (2011) Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography* A 1218 (18): 2569–2576. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.048

Jin, W., Xu, W., Liang, H., Li, Y., Liu, S., y Li, B. (2016). Nanoemulsions for food: properties, production, characterization and applications. In: A.M. Grumezescu (Ed) Emulsions, 1st ed. (pp. 1-36). UK: Academic Press Elsevier.

Kalemba, D., y Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10): 813-829. doi:10.2174/0929867033457719

Kang, J.-H., y Song, K. B. (2018). Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium on red mustard leaves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45: 447–454. doi:10.1016/j.ifset.2017.09.019

Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Simsek, D., Erol, H. B., y Erdem, S. A. (2016). Comparison of the contents and antimicrobial activities of commercial and natural cinnamon oils. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(4). doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000150.

Kordsardouei, H., Barzegar, M., Sahari, M. y Ebrahimipour, S. (2015). Influence of different temperatures and times on antiradical properties of Zataria multiflora Boiss and Cinnamon zeylanicum essential oils by using DPPH method. *Agriculture technology and biological sciences*, 12 (5): 441-447.

Kosegarten, C. y Jiménez, M. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 (2): 1-18.

Kumar, S., Chaturvedi, V.K., Kumar, B., Kumar, P., Somarajan, S.R., Misha, A.K., y Sharma, B. (2015). Effect of alum co-adjuvantation of oil adjuvant vaccine on emulsion stability and immune responses against haemorhagic septicaemia in mice. *Iranian Journal of Microbiology*, 7 (2): 79-87.

Lagunas, R. (2012). *Las plantas medicinales y aromáticas del huerto biointesivo*. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

Lakkis, J. M (2007) Encapsulation and controlled release technologies in food systems. In: Lakkis J (ed) Blackwell Publishing, 1st edn. USA.

Lee, H.-H., Hong, S.-I., y Kim, D. (2014). Microbial reduction efficacy of various disinfection treatments on fresh-cut cabbage. *Food Science & Nutrition*, 2(5): 585–590. doi:10.1002/fsn3.138

Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhong, F., y Huang, Q. (2012) Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (30): 7548–7555. doi:10.1021/jf301129k

Loeffler, M., Beiser, S., Suriyarak, S., Gibis, M. y Weiss, J. (2014). Antimicrobial efficacy of emulsified oil components against weak acid-adapted spoilage yeasts in clear and cloudy apple juice. *Journal of Food Protection*, 77 (8): 1325-1335.

López, A. (2003). Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas del campo al mercado. Food and Agriculture Organization. Argentina. http://www.fao.org/3/a-y4893s.pdf Accessed 12 March 2019.

López, A. (2012). *Desarrollo de sistemas de encapsulación de componentes para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Lugovska O., y Sidor, V. (2014) Influence ratio of water and oil phase of emulsions on viscosity, particle size and turbidity of products. *Journal of Faculty of Food Engineering*, XIII (3): 224-227.

Lupo, B., González, C. y Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos: técnicas y aplicaciones. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1): 130-151.

Mahdi, S., Assadpoor, E., He, Y. y Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26: 816-835.

Mahfoudhi N., Ksouri R., y Hamdi, S. (2016) Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and applications

in food industry. In: A.M. Grumezescu (ed) Emulsions. Academic Press Elsevier, UK, pp 365-404.

Manso, S., Nerín, C. y Gómez, R. (2011). Antifungal activity of essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), oregano (*Origanum vulgare*) and lauramide argine ethyl ester (LAE) against the mold *Aspegillus flavus*. *Italian Journal of Food Science*, 6: 151-156.

Martelo, Y.J., Cortes, M., y Suarez, H. (2011). Desarrollo de apio mínimamente procesado fortificado con vitamina E, utilizando la ingeniería de matrices. *Dyna*, 78 (165): 28-39.

Martínez, J. (2002). *Evaluación de una mezcla de estabilizantes y emulsificantes en la elaboración de un helado cremoso con grasa vegetal sobre las características de la mezcla base y del producto final*. Tesis de especialidad. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Matos, A., Quispe, S., Quito, M. y Beltrán, S. (2010). Evaluación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano microencapsuladas en β-ciclodextrina aplicados en cultivos microbianos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (1): 18-24.

Mazarei, Z., y Rafati, H. (2019). Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, *100*: 328-334.

Mc Clements, D.J. (2005). Food emulsions: principles, practices and techniques. 2nd Ed. CRC Academic Press. EE. UU.

Mello, S., Cunha, A., Neudía, G., Luiz, F., y Wernecj, C. (2012) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciencia Rural Santa María,* 42 (7):1300-1306. doi:10.1590/s0103-84782012000700026

Narvaéz, S. (2006). *Evaluación del efecto antifúngico in vitro del aceite esencial de hoja de canela puro y microencapsulado*. Tesis de licenciatura, Universidad Zamorano, Honduras.

Nasery, S., Hoseinpour, S., Phung, L. T. K., y Bahadori, A. (2016) Prediction of the viscosity of water-in-oil emulsions. *Petroleum Science and Technology,* 34 (24): 1972–1977. doi:10.1080/10916466.2016.1233248

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. y Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science,* 1: 1806-1815.

Nicetin, M. Loncar, B. Filipovic, V., y Knezevic, V. (2015). The change in microbiological profile and water activity due to the osmotic treatment of celery leaves and root. *Journal on Processing and Energy in Agriculture,* 19 (4): 193-196.

Niu, F., Pan, W., Su, Y., y Yang, Y. (2016) Physical and antimicrobial properties of thyme oil emulsions stabilized by ovalbumin and gum arabic. *Food Chemistry,* 212: 138–145. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.172

Nuñez, G. A., Sanchez, G., Gutierrez, X., Silva, F., Dalas, C., Rivas, H. (2000) Rheological behavior of concentrated bitumen in water emulsions. *Langmuir*, 6: 6497-6502. doi:10.1021/la990412p

Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes (1a. ed.). España: AIYANA Ediciones.

Ozogul, Y., Yuvka, İ., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A. R., Öz, M., y Ozogul, F. (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT-Food Science and Technology*, 75: 677–684. doi:10.1016/j.lwt.2016.10.009

Paredes, M., Gastélum, M., Silva, R. y Nevárez, G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano y de su aceite esencial sobre cinco especies del género vibrio. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3): 261-267.

Parra, R. A. (2010). Microencapsulación de alimentos. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 63(2), 5669-5684.

Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., y Leal-Caldron, F. (2002) Double emulsions: how does release occur. *Journal Control Release*, 79 (1-3): 193-205. doi:10.1016/s0168-3659(01)00535-1

Peleg, M., y Cole, M. (1998). Reinterpretation of microbial Survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38 (5), 353-380. doi:10.1080/10408699891274246

Pengon, S., Chinatangkul, N., Limmatvapirat, C., y Limmatvapirat, S. (2018). The effect of surfactant on the physical properties of coconut oil nanoemulsions. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(5): 409–414. doi:10.1016/j.ajps.2018.02.005

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M., Sinigaglia, M. y Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a revier on their interaction with food components. Frontiers in Microbiology, 6: 1-7.

Pimentel, D., Campos, R., Lobato, C., Pedroza, R. y Vernon, E. (2009). Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. Food Research International, 42(2): 292-297.

Pirigharnaei M, Zare S, Heidary R, Khara J, EmamaliSabzi R, Kheiry F (2011) The essential oils compositions of Iranian Oregano (*Origanum vulgare L.*) populations in field and provenance from Piranshahr district, West Azarbaijan province, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine,* 1 (2): 106-114. doi 10.22038/AJP.2011.129

Preedy, V. (2016).Essential oils in food preservation, flavor and safety. EE. UU: Elsevier.

Qian, c., Decker, E. A., Xiao, H., y McClements, D. J. 2011. Comparison of biopolymer emulsifier performance in formation and stabilization of orange oil in water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (2): 47-55.

Raeisi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., y Behnampour, N. (2016) Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during

refrigeration. *International Journal of Food Microbiology*, 238: 139–145. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.042

Rajeswara, B. R., Rajput, D. K., y Bhattacharya, A. K. (2007) Essential oil composition of petiole of *Cinnamomum verum* Bercht. And Presl. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 16 (1): 38-41.

Restrepo, J., Vinasco, L., Jaramillo, L. y Colmenares, A. (2009). Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*Cymbopogon citratus*) en β-ciclodextrinas usando CO^2 supercrítico. *Ingeniería y Competitividad*, 11(2): 9-19.

Rodas, M. (2012). *Análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor*. Tesis de licenciatura. Universidad Rafael Landívar, Guatemala.

Rodríguez-Rojo, S., Varona, S., Núñez, M., y Cocero, M. J. (2012) Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. *Industrial Crops and Products*, 37 (1): 137–140. doi:10.1016/j.indcrop.2011.11.026

Romeu, C., Botta, E. y Díaz, Y. (2007). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y evaluación in vitro de su actividad acaricida. *Fitosanidad*, 11 (2), 75-78.

Sánchez, M.C., Berjano, M., Guerrero, A. y Gallegos, C. (2001). Evolución de la cinética de encapsulación por emulsión y de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua preparadas con dos tipos de agitadores. *Grasas y Aceites*, 52(4): 222-228.

Sandoval, A., Rodríguez, E. y Ayala., A. (2004). Encapsulación de aditivos para la industria de alimentos. *Revista de Ingeniería y Competitividad*, 5(2): 73-83.

Saputro, E. Bintoro, V.P., y Pramono, Y.B. (2016). Color, pigment and residual nitrite of dendeng sapi naturally cured at various level of celery leaves and incubation temperatures. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 41 (2): 99-105. doi:10.14710/jitaa.41.2.

Schenk, M., y Guerrero, S. (2008). Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food Bioprocess Technology*, 1, 384-392. doi:10.1007/s11947-007-0029-7

Sefu, G., Satheesh, N. y Berecha, G. (2015). Antifungal activity of ginger and cinnamon lead essential oils on mango anthracnose disease causing fungi. *Journal of Science and Technology*, 7 (2): 26-34.

Semeniuc, C. A., Pop, C. R., Rotar, A.M. (2017) Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (2): 403–408. doi:10.1016/j.jfda.2016.06.002

Siddiqui, N., y Ahmad, A. (2013) A study on viscosity, surface tension and volume flow rate of some edible and medicinal oils. *International Journal of Science* 2 (6): 1318-1326.

Singh, S. y Dixit, D. (2014). A review on spray drying: emerging technology in food industry. *International Journal of Applied Engineering and Technology*, 4(1): 1-8.

Solórzano-Santos, F., y Miranda-Novales, M. (2012) Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology,* 23 (2): 136-141. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005

Speranza, P., Badan, Ribeiro, A. P., Cunha, R. L., Macedo, J. A., Macedo, G. A. (2015) Influence of emulsion droplet size on antimicrobial activity of interesterified Amazonian oils. *LWT - Food Science and Technology,* 60 (1): 207–212. doi:10.1016/j.lwt.2014.07.022

Spray Systems Corporation. (14 de marzo de 2016). Fluid bed processing. Obtenido de http://www.spray.com/pharmcatalog/pdf/c12_fluid_bed_processing.pdf

Srivastava, S. y Mishra, G. (2010). Fluid bed technology: overview and parameters for process selection. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2 (4): 236-246.

Sugumar, S., Mukherjee, A., y Chandrasekaran, N. (2015). Nanoemulsion formation and characterization by spontaneous emulsification: Investigation of its antibacterial effects on *Listeria monocytogenes*. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 9(1): 23-28. doi:10.4103/0973-8398.150033

Teodoro, R. A. R., de Barros Fernandez, R. V., Botrel, D. A., Borges, S.V., y de Souza, A. U. (2014) Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough. *Food process and Bioprocess Technology,* 7 (9): 2560-2569. doi:10.1007/s11947-014-1302-1

Tomičić, R., Čabarkapa, I., Varga, A., y Tomičić, Z. (2018). Antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food and Feed Research*, 45(1): 37–44. doi:10.5937/ffr1801037t.

Toncer, O., Karaman, S., Kizil, S., y Diraz, E. (2009) Changes in essential oil composition of Oregano (*Origanum onites L.*) due to diurnal variations at different development stages. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37 (2): 177-181. doi:10.15835/nbha3723188

Velázquez, C. Vital, M.A., Osorio, G. y Gallardo, T. (2008). Aceite esencial de naranja en un secador de lecho por fuente fluidizado con sólidos inertes y secado por aspersión. Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Ingeniería Bioquímica y Biofísica. Instituto Politécnico Nacional, México.

Velázquez-Contreras, C., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velázquez, T. (2014) Encapsulation of orange oil in spout-fluid bed dryer with a draft tube on a bed of inert solids. *Drying Technology*, 32: 1718-1726. doi:10.1080/07373937.2014.924525

Walker, J. F., Santos, P. D. S., Schmidt, C. A., Bittencourt, T. C. C. D., y Guimarães, A. G. (2016). Antimicrobial ACTIVITY OF MARJORAM (*Origanum Majorana*) essential oil against the multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund inoculated in vegetables from organic farming. *Journal of Food Safety*, *36*(4): 489-496.

Walker, R. M., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2015). Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant

concentration and particle size. *Journal of Food Engineering*, 164: 10-20. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.028

Wichchukit, S., y O'Mahony, M. (2015). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (11): 2167-2178. doi:10.1002/jsfa.6993

Yañez, X., Cuadro, O. F. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas,* 10 (1): 52-61.

Yeon-Ji, J., Ji-Yeon, C., Yun-Joong, K., Sang-Gi, M., Geun-Pyo, H., y Mi-Jung, C. (2015). Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *Food Science and Technology* 60: 444-451. doi:10.1016/j.lwt.2014.09.041

Zainol, N., Ming, S., y Darwis, Y. (2015). Development and characterization of cinnamon leaf oil nanocream for topical application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77 (4): 422-433.

Zhang S, Zhang M, Fang Z, y Liu Y. (2017) Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. *Food Science and Technology,* 75: 316–322. oi:10.1016/j.lwt.2016.08.046

Zuidam, N. y Nedovic, V. (2009). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.EE UU: Springer.

ANEXOS

Nombre: _____ Fecha: _____ Clave del producto: _____

Se le está proporcionando una muestra de apio con un número codificado. Degustar la muestra y evaluar con respecto a los diferentes atributos que se encuentran en la tabla, marcar una "X" donde usted perciba la característica del producto.

Escala	Apariencia	Color	Olor	Textura al observar	Textura al degustar	Sabor	Aceptabilidad del producto
Me gusta muchísimo							
Me gusta mucho							
Me gusta moderadamente							
Me gusta ligeramente							
No me gusta ni me disgusta							
Me disgusta ligeramente							
Me disgusta moderadamente							
Me disgusta mucho							
Me disgusta muchísimo							

Comentarios: _____

EVIDENCIAS DE PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

Difusión de resultados

- **Artículo de revisión.** (2017). Mónica Dávila Rodríguez y María Teresa Jiménez Munguía. Aceites esenciales encapsulados: métodos de formación, eficiencia y estabilidad. Revista Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos. 17-27. Puebla, México.
- **Artículo de revisión.** (2017). Ana Cecilia Lorenzo Leal, Gabriela Ríos Corripio, Mónica Dávila Rodríguez y Jorge Fernando Vélez Ruiz. Artículo de revisión. ReCiTeIA, Vol. 2. Número 2, 29-54.
- **Artículo científico.** (2019). Mónica Dávila Rodríguez, Aurelio López-Malo, Enrique Palou, Nelly Ramírez- Corona y María Teresa Jiménez Munguía. Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary and oregano essential oils on fresh celery. (2019). LWT-Food Science and Technology, doi: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.014
- **Artículo científico.** (2019). Mónica Dávila Rodríguez, Aurelio López-Malo, Enrique Palou y María Teresa Jiménez Munguía. Essential oils microemulsions prepared by high-frequency ultrasound: physical properties and and antimicrobial activity. (2019). Journal of Food Science and Technology. Enviado.
- **Artículo de revisión.** (2019). Mónica Dávila Rodríguez y María Teresa Jiménez Munguía. Essential oils: properties, encapsulation methods, efficiency and stability. En proceso.
- **Capítulo de libro.** (2018). Mónica Dávila-Rodríguez, Aurelio López-Malo, Nelly Ramírez-Corona y María Teresa Jiménez-Munguía. *Modeling of the Controlled Release of Essential Oils Encapsulated by Emulsification*. Technology, Science, and Culture: A Global Vision. (Eds) IntechOpen. pp: 77-81.

Participación a congresos

- 2016. Study of the Antimicrobial Activity of Rosemary (Rosmarinus officinalis) Oil Encapsulated in Microemulsions against Escherichia coli and Listeria monocytogenes. Congress Latin Food 2016 meeting, which includes the IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety, and the 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting. Cancún, Quintana Roo. México.
- 2017. Evaluación de las Propiedades Físicas, Químicas y Funcionales de Claras de Huevo Fresca y Secadas por Aspersión. XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Ixtapa Zihuatanejo, Gro. México.
- 2017. Antimicrobial activity of cinnamon essential oil encapsulated in simple emulsion against bacteria. 2nd International Conference on Food Chemistry and Nutrition. Vancouver, Canada.

- 2017. Liberación del aceite esencial de canela encapsulado por microemulsion y su efectividad antimicrobiana. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria y Congreso Nacional sobre Sustentabilidad ante el Desperdicio de Alimentos. Chihuahua, México.
- 2018. Release of essential oils encapsulated in microemulsion by high-frequency ultrasound. 5th International ISEKI Food Conference. University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- 2018. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales encapsulados por microemulsiones sobre bacterias. 3er Congreso de Ingeniería Bioquímica. Ponencia. Instituto Tecnológico Superior de Atlixco. Atlixco, Puebla.
- 2018. Structural and antimicrobial evaluation of cinnamon essential oil encapsulated by high-frequency ultrasound using FTIR spectroscopy against bacteria. 8th Food Science, Biotechology & Safety Congress. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- 2018. Modelling of the controlled release of essential oils encapsulated by emulsification. First Colloquium: "Technology, Science and Culture: A Global Vision ". Universidad de las Américas Puebla. San Andrés Cholula, Puebla, México.
- 2019. Emulsiones alimentarias. 1er Simposio de Tecnología y Ciencia de Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. Ponencia.

AMEPAL A.C.

Latin Food 2016

IAFP´s 5th Latin American Symposium in Food Safety
7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting

AMECA

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that the presentation entitled:
Study of the Antimicrobial Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Oil Encapsulated in Microemulsions against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*.
Authored by:

Dávila-Rodríguez, M., Jiménez-Munguía, M.T., López-Malo, A.

Was presented in Latin Food 2016, held in Cancun Q. Roo, México. November 9 - 11, 2016.

Dr. José Santos García Alvarado
President of AMEPAL

Dr. Hugo Sergio García Galindo
President of AMECA

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

AMEPAL

Latin Food 2016

IAFP´s 5th Latin American Symposium in Food Safety
7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting

AMECA

CERTIFICATE OF AWARD

This certificate is proudly presented to:

Dávila-Rodríguez, M., Jiménez-Munguía, M. T., López-Malo, A.

For their oustanding contribution entitled:
Study of the antimicrobial Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Oil Encapsulated in Microemulsions against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*

THAT HAS BEEN AWARDED 1ST PLACE IN POSTER PRESENTATION

Presented at Latin Food 2016 in Cancun, Q.R. Mexico, November 9-11, 2016

Dr. José Santos García Alvarado
President of AMEPAL

Dr. Hugo Sergio García Galindo
President of AMECA

AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Ingeniería Química en el Desarrollo Sostenible de Nuevos Procesos y Productos

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Mónica Dávila Rodríguez, Ana Cecilia Lorenzo Leal, Gabriela Ríos Corripio, María Teresa Jiménez Munguía

Por la presentación del trabajo:

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FUNCIONALES DE CLARA DE HUEVO FRESCA Y SECADAS POR ASPERSIÓN

ID: 401

XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo de 2017

Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ

XXXVIII ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

SEGURIDAD ALIMENTARIA 2017

CONGRESO INTERNACIONAL DE INOCUIDAD ALIMENTARIA
CONGRESO NACIONAL SOBRE SOSTENIBILIDAD ANTE EL DESPERDICIO DE ALIMENTOS

Otorgan la presente

CONSTANCIA

a: Mónica Dávila-Rodríguez

Por su participación como **ASISTENTE** en el Congreso de Seguridad Alimentaria 2017, llevado a cabo del 15 al 17 de Noviembre del 2017, Chihuahua, Chih.

Valor curricular 25 horas

Dr. Pedro Javier Martínez Ramos
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón
Presidente AMEPAL, A.C

Dra. Juliana Morales Castro.
Coordinadora de la Red REDSA PDA

AMEPAL A.C.

SEGURIDAD ALIMENTARIA 2017
CONGRESO INTERNACIONAL DE INOCUIDAD ALIMENTARIA
CONGRESO NACIONAL SOBRE SOSTENIBILIDAD ANTE EL DESPERDICIO DE ALIMENTOS

103-75

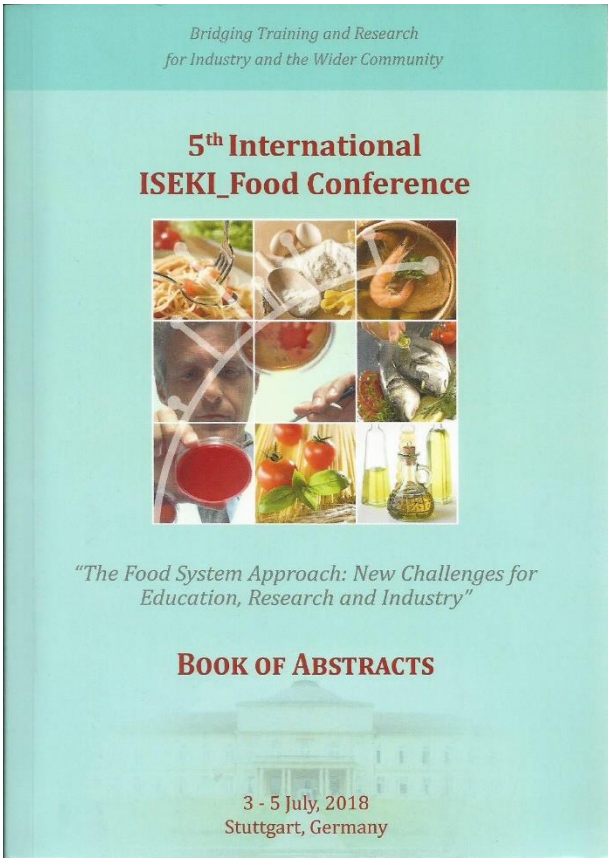
Liberación del Aceite Esencial de Canela Encapsulado por Microemulsión y su Efectividad Antimicrobiana

Dávila-Rodríguez, M., López-Malo, A., Jiménez-Munguía, M.T.
Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Química e Ingeniería de Alimentos. Exhacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula, Puebla. 72810. México.
Correo para correspondencia: mariat.jimenez@udlap.mx

El aceite esencial de canela (AEC) ha presentado actividad antimicrobiana contra diferentes microrganismos, la cual depende de sus componentes mayoritarios, entre ellos, el cinamaldehido. Por otra parte, la encapsulación por emulsión es un método poco estudiado, que ha mostrado ser una técnica que ofrece estabilidad a los componentes lipídicos y, además, previene la volatilización de algunos compuestos volátiles como los presentes en los aceites esenciales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad antimicrobiana del AEC encapsulado en emulsión contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, así como estudiar la liberación del AEC encapsulado, cuando éste se dispersa en un medio acuoso. El AEC se encapsuló en una microemulsión aceite en agua (10/90), preparada por homogeneización ultrasónica a una amplitud de 84µm durante 10 min. La actividad antimicrobiana del AEC contra ambas bacterias, se evaluó determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) en caldos de cultivo soya tripticaseína. Para estudiar la liberación del AEC en emulsión, ésta se adicionó en agua, manteniendo el sistema en agitación a 1 rpm a 25°C y tomando un muestreo cada 30 min. La cuantificación del AEC liberado, se realizó mediante su disolución en hexano y determinación en un espectrofotómetro a 310 nm. Como resultado se obtuvo que el AEC encapsulado presentó diferentes CMI y CMB para las bacterias estudiadas, para *E. coli* fue de 10 y 12.5, mientras que para *L. monocytogenes* fue de 2.5 y 8 (µL AEC/mL solución), respectivamente. Para la curva de liberación del AEC, se calculó la cantidad de emulsión en el agua, de acuerdo al valor máximo de CMB del AEC encapsulado, encontrado contra las bacterias. El tiempo de liberación del AEC fue de 360 min hasta obtener una concentración de 15 µL AEC/mL solución. La microemulsión del AEC demostró ser eficaz contra bacterias teniendo una rápida velocidad de liberación de acuerdo con la curva realizada, por lo que la aplicación de la emulsión en un sistema acuoso, en presencia de las bacterias estudiadas, sugiere ser efectivo como un producto formulado con antimicrobiano natural.

Palabras clave: aceite esencial canela, encapsulación, microemulsión, liberación

AMEPAL A.C.



#287: Release of essential oils encapsulated in microemulsion

Nelly RAMÍREZ-CORONA*, Mónica DÁVILA-RODRÍGUEZ, María Teresa JIMÉNEZ-MUNGUÍA, Aurelio LÓPEZ-MALO, Enrique PALOU

Universidad de las Americas Puebla, San Andres Cholula, Puebla, Mexico
**Corresponding Author (nelly.ramirez@udlap.mx)*

Emulsion encapsulation has shown to be a technique that offers stability to lipid components and controlled release under specific conditions. Encapsulated essential oils (EO) have demonstrated different antimicrobial activity against bacteria, with respect to the non-encapsulated EO. It is important to study the release of EO, in aim to identify the time in which these will be available to exhibit its antimicrobial activity against bacteria. The aim of this study was to evaluate the release of encapsulated cinnamon oil (CEO) and rosemary essential oil (REO) in oil-in-water (O/W) microemulsions. The CEO and REO microemulsions were dispersed in water, under stirring at 1 rpm and 25°C. The quantification of the CEO and REO release was determined in a spectrophotometer at 310 and 225 nm, respectively. A concentration of 10 µL CEO/mL was obtained after 60 min, while a concentration of 60 µL REO/mL was obtained after 360 min. These CEO and REO concentrations corresponds to reported bactericidal concentrations for 108 CFU/mL bacteria. The encapsulated EO will be effective, as natural antimicrobials, for long periods of time. Furthermore, in order to describe the release rate of EO, experimental data was fitted to a second order kinetic model with two parameters. The proposed model adequately describes the effect of the evaluated conditions on the EO release rate.

Keywords
essential oils, encapsulation, controlled release
Acknowledgements
Dávila-Rodríguez M. thanks to UDLAP for the financial support provided during her studies

3er Congreso Ingeniería Bioquímica

Inocuidad Alimentaria

SEP

PUEBLA

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Instituto Tecnológico Superior de Altixco

Otorga el presente

Reconocimiento

a:

Dra. Mónica Dávila Rodríguez

Por su valiosa participación con la conferencia:

"Actividad antimicrobiana de aceites esenciales encapsulados por microemulsión sobre bacterias"

en el marco del ***"3er. Congreso de Ingeniería Bioquímica"*** *celebrado del 21 al 23 de marzo de 2018 en la ciudad de Atlixco, Puebla.*

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ATLIXCO

M.B.A. Guillermo Antonio Almazán Smith
Director General

El Consorcio Nacional de Recursos de Información Científica y Tecnológica
Otorga el presente

R E C O N O C I M I E N T O

a

Mónica Dávila Rodríguez

Por su participación en el
Séptimo Seminario *Entre Pares*
con una duración de 16 hrs.

Puebla, Pue.
10 y 11 de septiembre de 2018

Mtra. Margarita Ontiveros y Sánchez de la Barquera
Coordinadora General
Consorcio Nacional de Recuersos de Información Científica y Tecnológica

Latin Food 2018

8th Food Science, Biotechnology & Safety Congress

MEXICAN ASSOCIATION OF FOOD SCIENCE

Food for Health 2018

AWARDS THE PRESENT CERTIFICATE TO:

Dávila-Rodríguez, M., Ríos-Corripio, M. A., López-Malo, A., Jiménez-Munguía, A. M. T.

IN RECOGNITION FOR THEIR PARTICIPATION AS AUTHORS OF THE WORK:

Structural and antimicrobial evaluation of cinnamon essential oil encapsulated by high-frequency ultrasound using FTIR spectroscopy against bacteria (POSTER)

DR. GUSTAVO HIDEL GUTIÉRREZ LÓPEZ
PRESIDENT OF THE AMECA DIRECTING COUNCIL 2017-2019

DR. NICOLÁS OSCAR SOTO CRUZ
VICE PRESIDENT OF THE AMECA DIRECTING COUNCIL PRESIDENT OF THE ORGANIZING DIRECTING COMMITTEE

DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN
SECRETARY OF THE DIRECTING COUNCIL PRESIDENT OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE

DR. SANTOS GARCÍA
PRESIDENT OF FOOD FOR HEALTH

Puerto Vallarta, Jalisco, México, 14-16 November 2018

Chapter

Modeling of the Controlled Release of Essential Oils Encapsulated by Emulsification

Mónica Dávila-Rodríguez, Aurelio López-Malo, Nelly Ramírez-Corona and María Teresa Jiménez-Munguía

Abstract

Encapsulated essential oils (EO) by different techniques have demonstrated antimicrobial activity against bacteria, compared to the nonencapsulated ones. The study of the EO release is important, in order to predict the time in which it will be available to exhibit its antimicrobial activity to inhibit or inactivate specific microorganisms. The objective of this study was to analyze and model the release of cinnamon essential oil (CEO) and rosemary essential oil (REO) encapsulated by emulsification using high-frequency ultrasound. A concentration of 10 μL/mL was obtained for OEO after 60 min in aqueous solution under stirring, while for REO, a concentration of 60 μL/mL was obtained after 360 min. The CEO microemulsion droplet size was smaller than in REO microemulsion, thus enhancing its release in the aqueous solution. The release profiles were fitted to different kinetic models; a first-order kinetic described CEO microemulsion release, while a second-order kinetic was used for REO microemulsion release. The encapsulated EO by high-frequency ultrasound can be applied as water-soluble natural antimicrobial additives in different food systems with long-term release periods.

Keywords: natural antimicrobials, release kinetics, encapsulation, high-frequency ultrasound

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Nutrición

Otorga la presente

FACULTAD DE NUTRICIÓN

CONSTANCIA

A

DRA. MÓNICA DÁVILA RODRÍGUEZ

Como: Ponente durante el Primer Simposio de ciencia y tecnología de los alimentos, con el tema "Emulsiones alimentarias".
Horas: 1
Sede: Facultad de Nutrición

Cuernavaca, Morelos. 4 de abril 2019

U A E M
FACULTAD DE NUTRICION

Dr. Joaquín Salgado Hernández
Director de la Facultad de Nutrición

Por una humanidad culta

UA EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA 2017-2023