

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



**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE
DE ACEITES ESENCIALES ENCAPSULADOS POR LAS TÉCNICAS DE
EMULSIÓN O EMULSIÓN-ATOMIZACIÓN EN SISTEMAS MODELO Y
ALIMENTOS**

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener
el grado de Doctora en Ciencia de Alimentos

NANCY RUÍZ GONZÁLEZ

Asesora

DRA. MARÍA TERESA JIMÉNEZ MUNGUÍA

Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla

2020



Cholula, Pue., México, a 8 de junio del 2020.

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 efectividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales encapsulados por las técnicas de emulsión o emulsión-atomización en sistemas modelo y alimentos”*, presentada por Nancy Ruíz González, 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.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'María Teresa Jiménez Munguía', is positioned above the printed name.

Dra. María Teresa Jiménez Munguía

Directora de tesis

El presente trabajo fue realizado con el financiamiento de:

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

Agradecimientos

Agradezco a mi asesora la Dra. María Teresa Jiménez, a mis profesores especialmente al Dr. Aurelio López-Malo, Dr. Enrique Palou, Dra. Emma Maní, Dr. José Ángel Guerrero y Dra. Nelly Ramírez y a mis compañeros, especialmente a Ruth Hernández, por acompañarme, orientarme y ayudarme en la realización de mi tesis doctoral. A mis padres Silvia González y Héctor Ruiz y a mi hermana Erika Ruíz por enseñarme el valor del trabajo y del esfuerzo constante. A mi esposo Ángel Vieyra por su ejemplo de perseverancia y por su ayuda incondicional para cumplir esta meta. A mi hija Regina Vieyra quien ha sido un motivo de infinita alegría. A Dios por haberme dado la oportunidad de vivir esta experiencia.

Prólogo

En esta tesis doctoral se evaluó la actividad antimicrobiana o antioxidante de los aceites esenciales de orégano, tomillo y hojas de clavo, utilizados de manera individual o en mezclas, encapsulados por las técnicas de emulsión o emulsión-atomización, en sistemas modelo o en alimentos. El documento de tesis se dividió en ocho capítulos. El primer capítulo consta de un resumen de la investigación de la tesis. El segundo capítulo consta de una introducción, donde se presentan las características de los aceites esenciales y sus mezclas, así como sobre la importancia de la encapsulación por emulsión y emulsión – atomización. En el tercer capítulo se escribe la justificación del tema de investigación. En el cuarto capítulo se describen tanto el objetivo general como los objetivos específicos planteados para la investigación. El quinto capítulo corresponde al marco teórico, en el que se presenta una revisión bibliográfica de la información más representativa sobre los aceites esenciales, utilizados de manera individual o en mezclas, las diferentes técnicas para encapsularlos, su actividad antimicrobiana y antioxidante y su aplicación en sistemas modelo y en alimentos. En el sexto capítulo se redactaron los materiales y métodos utilizados para la investigación. En el séptimo capítulo se reportaron, analizaron y discutieron los resultados obtenidos; este capítulo se dividió en tres secciones. La primera sección trata sobre la actividad antimicrobiana y la caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales de orégano, tomillo y hojas de clavo, no encapsulados y nanoencapsulados por emulsificación, contra *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, en sistemas modelo. La segunda sección del capítulo séptimo trata sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano, tomillo y una mezcla binaria de los mismos, nanoencapsulados por emulsificación y aplicados en alimentos. Finalmente, la tercera sección del capítulo séptimo trata sobre la estabilidad de las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales de orégano y tomillo microencapsulados por emulsión – atomización. El octavo capítulo contiene las conclusiones y recomendaciones del trabajo. En la parte final de la tesis se incluye la bibliografía utilizada, así como los comprobantes de participación en congresos y publicaciones que se llevaron a cabo en el transcurso de mis estudios de Doctorado en Ciencia de Alimentos.

Índice

Carta de validación firmada por el Comité Tutorial	i
Agradecimientos	iii
Prologo	iv
Índice	v
Lista de tablas	1
Lista de figuras	2
I. RESUMEN EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS	3
II. INTRODUCCIÓN	8
III. JUSTIFICACIÓN	10
IV. OBJETIVOS	12
4.1 General	12
4.2 Específicos	12
V. MARCO TEÓRICO	13
5.1 Aceites esenciales	13
5.1.1 <i>Actividad antimicrobiana y antioxidante</i>	14
5.1.1.1 Orégano	14
5.1.1.2 Tomillo	15
5.1.1.3 Clavo	15
5.1.2 <i>Actividad antimicrobiana de mezclas</i>	16
5.1.3 <i>Técnicas de encapsulación</i>	16
5.1.3.1 Emulsión	18
5.1.3.2 Atomización	20
5.1.3.3 Otras técnicas	21
5.1.4 <i>Encapsulación y uso como antimicrobianos en sistemas modelo</i>	22
5.1.5 <i>Encapsulación y uso como antimicrobianos en alimentos</i>	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Materiales	25
6.2 Métodos	25
6.2.1 <i>Caracterización de aceites esenciales</i>	25
6.2.1.1 Caracterización química	25
6.2.1.2 Propiedades físicas	26
6.2.2 <i>Preparación y caracterización de nanoemulsiones</i>	26
6.2.2.1 Propiedades físicas	26
6.2.2.2 Eficiencia de encapsulación	27
6.2.2.3 Estabilidad	27
6.2.3 <i>Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y nanoemulsiones en sistemas modelo</i>	28
6.2.3.1 Cultivo microbiano	28
6.2.3.2 Concentración mínima inhibitoria	28
6.2.3.3 Concentración mínima bactericida	29
6.2.4 <i>Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de nanoemulsiones en sistemas modelo</i>	29
6.2.5 <i>Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones y de una mezcla binaria de las mismas en alimentos</i>	30
6.2.5.1 Caracterización fisicoquímica de jugos	30

6.2.5.2	Concentración mínima inhibitoria	30
6.2.5.3	Curvas de inhibición microbiana	31
6.2.5.4	Modelo de Weibull	31
6.2.6	<i>Atomización de nanoemulsiones y caracterización de polvos</i>	32
6.2.6.1	Propiedades fisicoquímicas	33
6.2.6.2	Eficiencia de encapsulación	34
6.2.7	<i>Propiedades antioxidantes y estabilidad durante el almacenamiento de polvos</i>	34
6.2.7.1	Porcentaje de inhibición del DPPH	34
6.2.7.2	Índice de peróxidos	35
6.2.7.3	Estabilidad	35
6.2.8	<i>Análisis estadístico</i>	35
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1	Caracterización de aceites esenciales	36
7.1.1	<i>Caracterización química</i>	36
7.1.2	<i>Propiedades físicas</i>	37
7.2	Caracterización de nanoemulsiones (10% de sólidos)	38
7.2.1	<i>Propiedades físicas</i>	38
7.2.2	<i>Eficiencia de encapsulación</i>	39
7.2.3	<i>Estabilidad</i>	39
7.3	Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y nanoemulsiones (10% de sólidos) en sistemas modelo	42
7.4	Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de nanoemulsiones (10% de sólidos) en sistemas modelo	44
7.5	Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones (10% de sólidos) y de una mezcla binaria de las mismas en jugo verde y jugo de tomate	47
7.6	Caracterización de nanoemulsiones (20% de sólidos) para su secado por atomización	52
7.6.1	<i>Propiedades físicas</i>	52
7.7	Caracterización de polvos	53
7.7.1	<i>Propiedades fisicoquímicas</i>	53
7.7.2	<i>Eficiencia de encapsulación</i>	56
7.8	Propiedades antioxidantes y su estabilidad durante el almacenamiento de polvos	58
VIII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
8.1	Conclusiones	61
8.2	Recomendaciones	62
	REFERENCIAS	64
	PUBLICACIONES Y PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	76
	EVIDENCIAS	78

Lista de tablas

Tabla I. Caracterización química de los aceites esenciales

Tabla II. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Tabla III. Propiedades físicas y estabilidad de las nanoemulsiones de los aceites esenciales

Tabla IV. Estabilidad de las nanoemulsiones de los aceites esenciales durante su almacenamiento a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$

Tabla V. Efecto de las mezclas de las nanoemulsiones de aceite esencial de orégano y aceite esencial de tomillo sobre las bacterias estudiadas de acuerdo a las proporciones de la concentración mínima inhibitoria y el índice de las concentraciones fraccionales inhibitorias correspondientes

Tabla VI. Caracterización fisicoquímica de jugo verde y jugo de jitomate

Tabla VII. Parámetros del modelo de Weibull correspondientes a la inhibición de *Staphylococcus aureus* en jugo verde y jugo de jitomate

Tabla VIII. Propiedades físicas y estabilidad de las nanoemulsiones de los aceites esenciales previo al secado por atomización

Tabla IX. Propiedades fisicoquímicas y eficiencia de encapsulación de los polvos

Lista de figuras

Figura 1. Tamaño de gota de las nanoemulsiones

Figura 2. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (no encapsulados y nanoencapsulados) contra las bacterias estudiadas mediante la concentración mínima inhibitoria

Figura 3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (no encapsulados y nanoencapsulados) contra las bacterias estudiadas mediante la concentración mínima bactericida

Figura 4. Curvas de inhibición de *Staphylococcus aureus* en jugo verde (puntos). Las curvas de predicción se ajustaron con el modelo de Weibull (líneas)

Figura 5. Curvas de inhibición de *Staphylococcus aureus* en jugo de jitomate (puntos). Las curvas de predicción se ajustaron con el modelo de Weibull (líneas)

Figura 6. Distribución de frecuencias de las resistencias de *Staphylococcus aureus* en jugo verde y jugo de jitomate

Figura 7. Estabilidad de las propiedades antioxidantes de los polvos de durante su almacenamiento a $45\pm 1^\circ\text{C}$

I. RESUMEN

Antecedentes y objetivos: Las propiedades funcionales de los aceites esenciales (AEs) son atribuidas a sus componentes, muchos de los cuales tienen actividad antioxidante y antimicrobiana contra bacterias patógenas y deteriorativas en alimentos. Los AEs son compuestos inestables, por lo que la encapsulación es una forma de protegerlos y de incrementar su funcionalidad.

En este estudio, se evaluó la efectividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial de orégano (AEO), aceite esencial de tomillo (AET) y aceite esencial de hojas de clavo (AEHC), utilizados de manera individual o en mezclas, encapsulados por las técnicas de emulsión o emulsión-atomización, en sistemas modelo y en alimentos.

Material y métodos: Los AEs fueron caracterizados en base a sus propiedades fisicoquímicas. Las nanoemulsiones fueron preparadas al 5% p/p de los AEs y 10% p/p de sólidos (inulina) y fueron caracterizadas en base a sus propiedades físicas, eficiencia de encapsulación y estabilidad. Con el objetivo de estabilizar las nanoemulsiones mediante secado por atomización, se aumentaron los sólidos al 20% p/p (inulina y goma arábiga 1:1). Las nanoemulsiones se caracterizaron en base a sus propiedades físicas y fueron secadas por atomización a dos temperaturas de entrada (160 ó 180°C) y dos flujos de alimentación (5 ó 10 g/min). Los polvos fueron caracterizados en base a sus propiedades fisicoquímicas y eficiencia de encapsulación.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana en sistemas modelo de los AEs y las nanoemulsiones de AEO, AET y AEHC, se utilizó el método de la microdilución para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*. Por otro lado, se determinó la actividad antimicrobiana en sistemas modelo de las mezclas binarias de las nanoemulsiones más efectivas (AEO y AET), usando también el método de la microdilución y haciendo mezclas en diferentes proporciones de la CMI de las nanoemulsiones contra *E. coli* y *S. aureus*. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana

en alimentos (jugo verde o jugo de jitomate) de las nanoemulsiones de AEO y AET y de una mezcla binaria de las mismas (probada en sistemas modelo), se obtuvo la CMI de las nanoemulsiones contra el microorganismo más resistente (*S. aureus*) y se hicieron curvas de inhibición microbiana, las cuales fueron ajustadas mediante el modelo de Weibull. Los jugos fueron caracterizados, mediante sus propiedades fisicoquímicas. Finalmente, en cuanto a la estabilización de las nanoemulsiones de AEO y AET mediante secado por atomización, se llevó a cabo la evaluación de las propiedades antioxidantes, mediante pruebas de inhibición del DPPH e índice de peróxidos, además se llevó a cabo una prueba de estabilidad de los polvos en almacenamiento a $45\pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 y 14 días. Los resultados fueron analizados estadísticamente.

Resultados y conclusiones: En cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana en sistemas modelo de los AEs y de las nanoemulsiones de AEO, AET y AEHC se observó que la CMI de los AEs contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*, disminuyó entre 27-60%, cuando los AEs fueron nanoencapsulados. Para el AEO nanoencapsulado y no encapsulado se obtuvieron los valores más bajos de la CMI y la CMB para los microorganismos probados. Por otro lado, en cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana en sistemas modelo de las mezclas binarias de las nanoemulsiones más efectivas (AEO y AET), se encontraron tres mezclas binarias (25-75%, 50-50% y 75-25% de la CMI) con carácter aditivo contra *E. coli* y *S. aureus*. En cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana en alimentos (jugo verde o jugo de jitomate) de las nanoemulsiones de AEO y AET así como de una mezcla binaria de las mismas (probada en sistemas modelo), se observó que la mayoría de la población microbiana se redujo a los pocos minutos de la aplicación de las nanoemulsiones y los valores de las medias de la distribución de frecuencia de resistencia variaron entre 1.75 y 12.09 min. Los perfiles de distribución de frecuencia para los tratamientos formulados con la mezcla binaria (50-50% de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET), mostraron distribuciones estrechas y valores de media y varianza bajos, lo que sugirió que la población de *S. aureus* es en promedio más sensible y con una sensibilidad más uniforme a la aplicación de la mezcla binaria de nanoemulsiones, y más aún cuando se aplicó en jugo verde. Se observaron diferentes comportamientos en jugo verde y jugo de jitomate, lo cual puede deberse a la diferencia entre sus propiedades fisicoquímicas. El modelo de Weibull se adaptó

adecuadamente a las curvas de inhibición de *S. aureus*. Finalmente, en cuanto a la estabilización de las nanoemulsiones de AEO y AET mediante secado por atomización, se observó que las mejores condiciones de secado fueron 160°C y 10 g/min, ya que se obtuvieron los más altos valores de porcentaje de inhibición del DPPH ($73.34 \pm 0.22\%$) y los valores más bajos de índice de peróxidos (0.63 ± 0.12 meq/Kg), además de que estas condiciones fueron las que mejor preservaron las propiedades antioxidantes de los AEs microencapsulados durante las pruebas de almacenamiento acelerado. Los polvos secados bajo estas condiciones podrían utilizarse en futuros estudios para su aplicación en alimentos como agentes antioxidantes o antimicrobianos.

ABSTRACT

Background and objectives: Functional properties of essential oils (AEs) are attributed to their components, many of which exhibit antioxidant and antimicrobial activity against pathogenic and spoilage microorganisms in a wide variety of foods. However, AEs are unstable compounds; therefore, they can be encapsulated for a better protection and increase their functionality.

In this study, the antimicrobial and antioxidant activities of oregano essential oil (AEO), thyme essential oil (AET) and clove leaves essential oil (AEHC), used individually or in mixtures, encapsulated by emulsification or emulsification-atomization, in model an in food systems, were evaluated.

Material and Methods: The AEs were characterized based on their physicochemical properties. Nanoemulsions were prepared, using 5% (w/w) of AEs and 10% (w/w) of solids (inulin), and then characterized based on their physical properties, encapsulation efficiency and stability. In order to stabilize the nanoemulsions by spray drying, the solids were increased to 20% (w/w) using inulin and gum arabic (1:1). The nanoemulsions were characterized based on their physical properties and were spray dried at two inlet temperatures (160 and 180°C) and two feeding rates (5 and 10 g/min). Powders were characterized based on their physicochemical properties and encapsulation efficiency.

The microdilution antimicrobial assay was carried out to evaluate the minimum inhibitory concentration (CMI) and minimum bactericidal concentration (CMB) of the AEs and their nanoemulsions of AEO, AET and AEHC, against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*, in model systems. On the other hand, the antimicrobial activity of the binary mixtures of the most effective nanoemulsions (AEO and AET), was determined in model systems, using the microdilution antimicrobial assay and through combinations in different proportions of the CMI of the nanoemulsions, against *E. coli* and *S. Aureus*. For the antimicrobial activity evaluation in food systems (tomato juice or green juice), of the AEO and AET nanoemulsions and their binary mixture (previously evaluated in model systems), the CMI of the nanoemulsions against the most resistant microorganism (*S. aureus*) and microbial inhibition curves were obtained, which were adjusted by the

Weibull model. The juices were characterized by their physicochemical properties. Finally, regarding the stabilization of AEO and AET nanoemulsions by spray drying, the evaluation of the antioxidant properties was carried out by inhibition of the DPPH radical and peroxide index analysis. In addition, a powder stability test was carried out in storage at $45\pm 1^\circ\text{C}$ for 7 and 14 days. Results were statistically analyzed.

Results and conclusions: Regarding the evaluation of antimicrobial activity of AEs and nanoemulsions of AEO, AET and AEHC, in model systems, it was observed that the CMI of AEs against *E. coli*, *S. aureus* and *S. Typhimurium*, decreased among 27-60%, when the AEs were nanoencapsulated. For nanoencapsulated and non-encapsulated AEO, the lowest CMI and CMB values were obtained, for all the target microorganisms. On the other hand, in the antimicrobial activity evaluation of the most effective binary mixtures of nanoemulsions (AEO and AET), in model systems, three binary mixtures were found with additive activity, against *E. coli* and *S. aureus* (25-75%, 50-50% and 75-25% of CMI). Regarding the antimicrobial activity evaluation in food (green juice or tomato juice) of the AEO and AET nanoemulsions and their binary mixture (previously evaluated in model systems), it was observed that, the microbial population was reduced a few minutes after the application of the nanoemulsions and values of the means varied between 1.75 and 12.09 min. The frequency distribution profiles for the treatments formulated with the binary mixture (50-50% of the CMI of the nanoemulsions of AEO and AET), showed narrow distributions and low mean and variance values, which suggested that the population of *S. aureus* is more sensitive to the application of the binary mixture of nanoemulsions and even more, when applied in green juice. Different behaviors were observed in green juice and tomato juice, which may be due to the difference between their physicochemical properties. The Weibull model was well adapted to the inhibition curves of *S. aureus*. On the other hand, in the stabilization of the AEO and AET nanoemulsions by spray drying, it was observed that the best drying conditions were 160°C and 10 g / min, because the highest percentage inhibition of the DPPH values ($73.34 \pm 0.22\%$) and the lowest peroxide index values (0.63 ± 0.12 meq / Kg) were obtained. In addition, these conditions were the ones that best preserved the antioxidant properties of microencapsulated AEs during accelerated storage evaluation.

II. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AEs) son producidos como metabolitos secundarios de plantas aromáticas (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011). Éstos y sus componentes han ganado un creciente interés en el área de alimentos, debido a que provienen de fuentes naturales, su uso es seguro, son amigables con el ambiente y tienen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Bakry *et al.*, 2015).

Las propiedades antimicrobianas de los AEs se deben a sus componentes, de los cuales los compuestos fenólicos son los más importantes (Sakkas y Papadopoulou, 2017). El mecanismo de acción de los componentes antimicrobianos depende del tipo de microorganismo a inhibir o inactivar. Estos compuestos pueden causar daño celular o intervenir en los procesos metabólicos de los microorganismos (Hernández-Hernández, Regalado-González, Vázquez-Landaverde, Guerrero-Legarreta y García-Almendarez, 2014).

Por otra parte, los compuestos fenólicos también son responsables de las propiedades antioxidantes de los AEs, estos compuestos tienen la habilidad de prevenir la oxidación al donar un átomo de hidrógeno a un radical libre, para formar un compuesto más estable (León-Méndez, Osorio y Gil, 2015). La degradación de los lípidos debido a la oxidación es uno de los factores que pueden acortar la vida útil de los alimentos, lo cual ocurre durante el almacenamiento de materia prima, así como durante el procesamiento, tratamiento y almacenamiento de los alimentos (Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López y Pérez-Álvarez, 2007).

Los AEs se han estudiado con el objetivo de aprovechar todos sus beneficios. Sin embargo, son químicamente inestables cuando se encuentran expuestos a ciertas condiciones ambientales como son la luz, la humedad, el oxígeno y las temperaturas elevadas, lo que puede ocasionar la pérdida de sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Misharina, 2003).

La encapsulación es una forma de proteger a los AEs. En este proceso, pequeñas partículas o gotas de aceite son rodeadas por un revestimiento o son contenidas en una matriz formando

pequeñas cápsulas (Bakry *et al.*, 2015). Mediante un proceso de difusión, el aceite puede atravesar los materiales de la cápsula, para liberarse de manera controlada en el sitio requerido. Existen diversas técnicas de encapsulación de AEs entre las cuales se encuentran emulsificación, secado por atomización, sistema coaxial de electrospray, liofilización, coacervación, polimerización in situ, extrusión, tecnología de fluidos supercríticos y lecho fluidizado (Bakry *et al.*, 2015).

Entre los procesos de encapsulación de AEs se distingue la encapsulación por emulsión, en la cual, pequeñas gotas de AE son cubiertas con soluciones acuosas de polímeros (Zuidam y Nedovic, 2010). Con el fin de proporcionar una mayor estabilidad a los encapsulados por emulsión, éstos pueden ser secados mediante un proceso controlado de secado por atomización; en este proceso se atomiza la sustancia líquida, formando pequeñas gotas en una corriente de gas caliente en la cual, el solvente se evapora produciendo una película delgada de material encapsulante (Lupo-Pasin, González-Azón y Maestro-Garriga, 2012). La técnica de encapsulación más común para AEs es el secado por atomización (Bakry *et al.*, 2015).

Por otro lado, es importante mencionar que los AEs individuales pueden ser utilizados también en mezclas, con lo cual se puede incrementar su eficiencia, mediante el uso de mezclas sinérgicas, disminuyendo su dosis efectiva. Lo anterior impacta directamente en la calidad sensorial de los productos en los cuales son adicionados (Ouedrhiri *et al.*, 2016). Sin embargo, al momento no se cuenta con estudios sobre encapsulación de mezclas de AEs.

Finalmente, vale la pena señalar que los estudios de la aplicación de AEs encapsulados en alimentos aún son escasos.

Por todo lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar la efectividad antimicrobiana o antioxidante del aceite esencial de orégano (AEO), aceite esencial de tomillo (AET) o aceite esencial de hojas de clavo (AEHC) utilizados de manera individual o en mezclas, encapsulados por las técnicas de emulsión o emulsión-atomización, en sistemas modelo o en alimentos.

III. JUSTIFICACIÓN

Las nuevas demandas de los consumidores han sugerido la necesidad de desarrollar alimentos funcionales, así como nuevas técnicas de conservación de alimentos. Los AEs y sus componentes han demostrado tener actividad antimicrobiana y antioxidante en sistemas modelo y en alimentos (Burt, 2004). El AEO es uno de los AEs con mayor capacidad antioxidante y antimicrobiana (Rodríguez-García *et al.*, 2015), el AET comparte ciertos componentes con el AEO lo que lo hace también muy efectivo, en cuanto al AEHC no existe mucha investigación, los estudios se han enfocado en el aceite esencial de flores de clavo, por lo que su estudio resulta de gran interés. Los AEs se han estudiado de manera individual y también en mezclas, con el propósito de encontrar mezclas sinérgicas que permitan reducir la dosis efectiva y con ello al aplicarlos en alimentos lograr una mejor aceptación sensorial por parte de los consumidores (Burt, 2004). Por otro lado, la encapsulación de AEs por el método de emulsión utilizando homogenización ultrasónica, es un método que permite lograr tamaños de partícula nano (Ruíz-González, López-Malo, Palou, Ramírez-Corona y Jiménez Munguía, 2019), lo cual puede facilitar la difusión de los agentes activos en el medio en el que se aplican, mientras que la encapsulación por emulsión-atomización se puede utilizar para estabilizar las emulsiones. Si bien existen diversos estudios que validan la efectividad de mezclas de componentes extraídos de los AEs, es importante señalar que hasta el momento no se han encontrado estudios sobre mezclas de AEs encapsulados en sistemas modelo o en alimentos, por lo que su estudio resulta de gran interés.

Sobre la evaluación de AEs encapsulados por emulsión o por emulsión-atomización en sistemas modelo existen algunos estudios, sin embargo, es posible formular nuevas emulsiones, lo que puede afectar sus características fisicoquímicas y la efectividad de los AEs como antioxidantes o antimicrobianos contra las bacterias patógenas, siendo las más comunes en alimentos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium* (Bakry *et al.*, 2015). En cuanto a la aplicación de nanoemulsiones de AEs como antimicrobianos en alimentos, no existen muchos estudios hasta el momento, por lo que su aplicación en diferentes tipos de alimentos resulta interesante. Se ha observado que los jugos son productos que tienen una corta vida de anaquel debido a que son susceptibles al deterioro microbiano y enzimático (Winniczuk y Parish, 1997), además, estos alimentos pueden ser

vehículos de microorganismos patógenos causantes de enfermedades (Dewanti-Hariyadi, 2013), por lo que resulta de gran importancia el estudio de nuevos agentes antimicrobianos aplicados en este tipo de alimentos. En cuanto a la estabilización de emulsiones de los AEs mediante secado por atomización existen algunos estudios, sin embargo, resulta interesante observar cómo se afectan las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones y la capacidad antioxidante de los AEs, al variar las condiciones de flujo y temperatura durante el proceso de secado por atomización, para futuras aplicaciones en alimentos.

Por otra parte, retomando algunas investigaciones en la materia de interés, se han llevado a cabo estudios sobre la actividad antimicrobiana de los AEs en sistemas modelo, los cuales tienen una mayor efectividad antimicrobiana al ser encapsulados (Hernández-Hernández *et al.*, 2014; Ayala-Zavala *et al.*, 2008). La aplicación de AEs encapsulados y aplicados en alimentos frescos es aún escasa. Puede mencionarse el estudio realizado por Teodoro, De Barros, Botrel, Borges y De Souza (2014), quienes probaron la efectividad del aceite esencial de romero encapsulado para inhibir a *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* en masa fresca para pan. Fernández-Serrano (2015), estudió el efecto anti fúngico del aceite esencial de canela encapsulado aplicado en mermelada de fresa. Por otro lado, se han realizado estudios para evaluar las propiedades del AEO, AET y aceite esencial de flores de clavo encapsulados por atomización, en los cuales la encapsulación resultó una buena opción para conservar sus propiedades antioxidantes (Arana-Sánchez *et al.*, 2010; Ghaderi-Ghahfarokhi, Barzegar, Sahari y Azizi, 2016; Cetin-Babaoglu, Bayrak, Ozdemir y Ozgun, 2017).

IV. OBJETIVOS

4.1 General

- Evaluar la efectividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de orégano, tomillo y hojas de clavo, utilizados de manera individual o en mezclas, encapsulados por las técnicas de emulsión o emulsión-atomización, en sistemas modelo y en alimentos.

4.2 Específicos

- Caracterizar los aceites esenciales a estudiar (orégano, tomillo y hojas de clavo).
- Seleccionar las mezclas de agentes estabilizantes y emulgentes a utilizar para la preparación de las emulsiones que serán usadas en la encapsulación de los aceites esenciales.
- Determinar las condiciones de operación del secado por atomización que serán usadas para encapsular los aceites esenciales previamente encapsulados por emulsión.
- Obtener aceites esenciales individuales o las mezclas binarias de los mismos, encapsulados por emulsión o emulsión - atomización y caracterizarlos.
- Evaluar la efectividad antioxidante y antimicrobiana, sobre diferentes microorganismos, de los aceites esenciales individuales o de mezclas binarias, encapsulados por emulsión o emulsión-atomización, en sistemas modelo.
- Evaluar la efectividad antimicrobiana de los aceites esenciales individuales y de una mezcla binaria de los mismos, encapsulados por la técnica de emulsión en jugo de jitomate y jugo verde.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Aceites esenciales

Los AEs son una mezcla de varias sustancias químicas aromáticas y volátiles, obtenidos a partir de material vegetal, incluyendo flores, semillas, hojas, cortezas, madera, frutos y raíces. Los AEs son incoloros o ligeramente amarillentos, por lo general son menos densos que el agua, son casi siempre rotatorios, tienen un índice de refracción alto y son solubles en disolventes orgánicos como etanol, éter y cloroformo (Sánchez, García y Heredia, 2010). Éstos han ganado un creciente interés en el área de alimentos, debido a que provienen de fuentes naturales, su uso es seguro, son amigables con el ambiente y tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas. El uso de AEs se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes en alimentos, con la finalidad de sustituir las sustancias sintéticas por naturales (Bakry *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, los AEs tienen propiedades antimicrobianas, las cuales dependen principalmente de tres factores, como son su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo contra el que actúan (López-Malo, Palou, León-Cruz y Alzamora, 2006; Fisher y Phillips, 2008). La forma en la que actúan los AEs de acuerdo a su carácter (hidrófilo o hidrófobo), se debe a que tienen la capacidad de alterar la membrana celular externa de los microorganismos, lo cual produce fugas de varias sustancias (iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos), lisis celular y finalmente la muerte del microorganismo. Con respecto a sus componentes, ellos pueden alterar la estructura de la membrana del citoplasma, inhibiendo el transporte de electrones o actuar como potenciales agentes desnaturizantes de proteínas, disolventes o deshidratantes. (Hernández-Hernández *et al.*, 2014). Con respecto al tipo de microorganismos contra los que actúan, algunos estudios han documentado que los componentes de los AEs tienen un mayor efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-negativas (Moraes-Lovison, Marostegan, Peres y Menezes, 2016).

Con respecto a las propiedades antioxidantes de los AEs, se ha estudiado que se deben a sus componentes, siendo los más importantes los compuestos fenólicos. Estos componentes tienen la habilidad de prevenir la oxidación al donar un átomo de hidrógeno a un radical libre, para formar un compuesto más estable (León-Méndez *et al.*, 2015). La degradación de los

lípido debido a la oxidación es uno de los más importantes factores que acortan la vida útil de los productos alimenticios, lo cual ocurre durante el almacenamiento de materias primas y el procesamiento, tratamiento y almacenamiento de los productos alimenticios. Existen algunos estudios donde se ha observado el gran potencial de los AEs al retardar la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento de los alimentos (Viuda-Martos *et al.*, 2007).

5.1.1 Actividad antimicrobiana y antioxidante

Existe una gran variedad de AEs, los cuales pueden ser obtenidos de diferentes partes de las plantas y tienen diferentes aplicaciones en alimentos, entre las que destacan su uso como agentes antimicrobianos y antioxidantes. Entre los AEs comúnmente utilizados en alimentos se encuentran los siguientes:

5.1.1.1 Orégano

Este AE proviene del *Origanum vulgare*, que es una planta en forma de un pequeño arbusto, sus hojas son ovales y anchas, con vellosidades y con bordes enteros y ligeramente dentados. La mayoría de las especies del género *Origanum* provienen de la zona mediterránea. El clima, la estación y el suelo, pueden afectar la composición del AE que contiene la planta. El AEO contiene más de 30 ingredientes, incluyendo carvacrol, timol, α -terpineno, γ -terpineno, terpinen-4-ol, p-cimeno, α -terpineol y sabineno. Los primeros dos componentes constituyen alrededor del 78% al 82% del total del AE, son compuestos fenólicos y son los principales responsables de las características de olor y de las actividades antioxidante y antimicrobiana (Olmedo, Nepote y Grosso, 2014). El AEO es uno de los AEs más efectivos para el control antimicrobiano y sus componentes fenólicos han demostrado permear y despolarizar la membrana citoplasmática bacteriana, conduciendo así a la muerte celular (Bakry *et al.*, 2015). El AEO tiene la capacidad de actuar contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* 0157:H7 (Bhargava, Conti, Da Roch y Zhang, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que entre las hierbas y las especias que se estudian extensamente, las plantas de la familia *Lamiaceae* (*Labiatae*) poseen una actividad antioxidante significativa (Tsimidou y Boskou, 1994). Dentro de esta familia se encuentra el orégano (*Origanum vulgare* L.) que es una de las plantas aromáticas más utilizadas y cuyos AEs son particularmente ricos en mono y sesquiterpenos (De Falco *et al.*, 2013). Con base

en numerosos estudios se estableció que el AEO, rico en timol y carvacrol, tiene una actividad antioxidante significativa en el proceso de oxidación de la manteca de cerdo (Tsimidou y Boskou, 1994).

5.1.1.2 Tomillo

El AET proviene de la planta del género *Thymus*, siendo la especie y tipo más común el *Thymus vulgaris*. Es una planta aromática, herbácea y perenne. Es nativa de las regiones templadas de Europa, África del Norte y Asia. El tomillo es un aditivo alimentario y una fuente de AEs. Sus actividades antioxidante y antimicrobiana, se le atribuyen a la presencia de carvacrol, cinamaldehído, timol, geraniol y eugenol (Sipailiene, Venskutonis, Baranauskiene y Sarkinas, 2006). Recientemente se ha encontrado que la incorporación de AET en películas comestibles aumenta la vida de anaquel de los alimentos listos para consumo (Jouki, Yazdi, Mortazavi y Koocheki, 2014). También se ha reportado que el AET ha resultado útil para inhibir a *L. monocytogenes* y *Listeria innocua* (Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Por otro lado, existen estudios en donde se ha observado el poder antioxidante del AET en alimentos, lo cual se puede ver reflejado en un nivel bajo de peróxidos en los alimentos en los cuales fue aplicado (Ganjali-Dashti, Mirlohi, Ganjali-Dashti, Jafari y Bahreini-Esfahani, 2015).

5.1.1.3 Clavo

Se ha reportado el uso del aceite esencial de flores de clavo, existiendo escasa información sobre el uso del AEHC. El aceite esencial de clavo se obtiene de la destilación de las flores y hojas de las plantas de clavo e (*Eugenia aromática* o *Eugenia caryophyllata*). Recientemente se ha reportado su actividad antimicrobiana y antioxidante (Song, Lee, Al Mijan y Song, 2014). El aceite de clavo ha sido utilizado en la industria de alimentos como un saborizante. Por otro lado, existen estudios donde se han investigado distintas formas de conservar su actividad antioxidante y se ha reportado su uso como antioxidante en aceite de soya (Chatterjee y Bhattacharjee, 2013).

5.1.2 Actividad antimicrobiana de mezclas

En relación a las mezclas de los AEs, el efecto sinérgico mostrado por algunas mezclas, puede contribuir a su aplicación exitosa como preservativos naturales en alimentos. El uso de mezclas sinérgicas de AEs, tiene la ventaja de incrementar su efectividad y disminuir su dosis efectiva. Existen algunos estudios sobre AEs utilizados en mezclas, como el de Ouedrhiri *et al.* (2016), quienes estudiaron el efecto antimicrobiano de mezclas de AEs de *Origanum compactum*, *Origanum majorana* y *Thymus serpyllum*, contra microorganismos patógenos de interés en alimentos, observando que el mejor efecto sinérgico contra *B. subtilis*, se logró con la mezcla de 28%, 30% y 42% de *O. compactum*, *O. majorana* y *T. serpyllum* respectivamente, mientras que para *E. coli*, este efecto se logró con *O. compactum* y *O. majorana*, en una proporción de 75% y 25%, respectivamente. Por su parte, Magi, Marini y Facinelli (2015), evaluaron la actividad antimicrobiana de mezclas de AEs de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lavanda angustifoli*, *Mentha piperita* y *Melaleuca alternifolia* y *carvacrol*. Los resultados mostraron que la mezcla de AEs de tomillo-orégano, tuvieron la más alta actividad antimicrobiana. Por otro lado, Lv, Liang, Yuan y Li (2011), examinaron la efectividad de mezclas de AEs contra cuatro microorganismos de interés en alimentos. Los resultados mostraron que cuatro tipos de mezclas de AEs tuvieron un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana; orégano-albahaca contra *E. coli*, albahaca-bergamota contra *S. aureus*, orégano-bergamota contra *B. subtilis* y orégano-perilla contra *Saccharomyces cerevisiae*. En otro estudio conducido por Matan *et al.* (2006), reportaron que la mezcla de AEs de canela y clavo mostró actividad inhibitoria contra microorganismos deteriorativos en alimentos, siendo *Clostridium rubum* y *E. coli* las bacterias patógenas más susceptibles. Así también, Nguetack *et al.* (2012) observaron un efecto sinérgico de los AEs de *Cymbopogo citratus*, *Ocimum gratissimum* y *T. vulgaris* contra *Penicillium expansum*. Los resultados mostraron que, de las veintitrés mezclas de AEs probadas, cuatro de ellas mostraron efecto sinérgico contra este microorganismo.

5.1.3 Técnicas de encapsulación

La encapsulación de los AEs representa un enfoque eficiente y viable para incrementar su estabilidad, protegiéndolos de las interacciones con los alimentos y con el medio ambiente. El proceso de encapsulación consiste en la formación de una estructura multi-componente en

forma de partículas compuestas, por lo general, de dos sustancias: el material del núcleo y el agente encapsulante (Adamiec, 2009). En el caso de los antimicrobianos, la encapsulación puede incrementar la concentración de los componentes en las áreas de los alimentos donde los microorganismos se localizan, por ejemplo, en fases acuosas o en interfaces líquido-sólido (Weiss, Gaysinsky, Davidson y McClements, 2009). Por otro lado, algunos autores han reportado que la encapsulación de AEs puede prolongar su actividad antioxidante durante el almacenamiento (Almeida *et al.*, 2013).

El material y el proceso de encapsulación son factores que influyen significativamente en la actividad antimicrobiana y antioxidante de los AEs encapsulados (Beirao da Costa, Duarte y Bourbon, 2012; Wang, Lu, Wu y Lv, 2009). La elección de los materiales de encapsulación es un paso importante para el éxito del proceso; dichos materiales pueden ser seleccionados de una gran variedad de polímeros naturales y sintéticos como gomas, proteínas, maltodextrina, carboximetil celulosa de sodio y gelatina (Wang *et al.*, 2009). Entre ellos, los carbohidratos como los almidones modificados y las maltodextrinas, son considerados generalmente como buenos agentes encapsulantes, ya que tienen baja viscosidad y un alto contenido de sólidos, buena solubilidad y su uso conduce a bajas cantidades de AE no encapsulado en la superficie (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley y Saurel, 2007). En el trabajo realizado por Beirao da Costa *et al.* (2012), estudiaron el efecto del tipo de agente encapsulante a utilizar para preparar microcápsulas de AEO, utilizando una combinación de gelatina y sacarosa, almidón de arroz o inulina, mediante la técnica de secado por atomización. Al encapsular con la matriz de gelatina y sacarosa, las micropartículas exhibieron una alta actividad antimicrobiana y antioxidante, mientras que, al encapsular con matrices de inulina y almidón de arroz, las micropartículas resultaron más estables, de acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar la importancia en la selección de los materiales de encapsulación en el uso potencial de los encapsulados. Por otro lado, el proceso de obtención de los encapsulados tiene una gran influencia sobre la solubilidad de las partículas, ya que, dependiendo del procedimiento empleado, se alcanzarán escalas micro o nano. Algunas de las técnicas más utilizadas para encapsular AEs son la encapsulación por emulsión, la coacervación, la gelación ionotrópica, la inclusión molecular, el secado por atomización, la liofilización, el recubrimiento en lecho fluidizado y la co-cristalización, entre otras (Zuidam y Heinrich, 2010).

Existen diversas técnicas para la obtención de microcápsulas. La selección de una u otra dependerá del material de encapsulación, del compuesto activo a encapsular, de la aplicación final y de los costos del proceso.

Los métodos de encapsulación se pueden dividir de acuerdo a su naturaleza:

Los procesos físicos están basados en sistemas muy técnicos de combinación de materias, algunos tienen su inicio en la formación de una emulsión por agitación. Algunos de ellos son emulsión, secado por atomización, liofilización y extrusión.

Los procesos físico-químicos y algunos procesos químicos están basados en la interacción de las macromoléculas y polímeros que constituyen las membranas y también es la emulsión el punto de partida. Algunos de ellos son coservación y gelificación iónica (Bakry *et al.*, 2015).

Algunos de los principales métodos de encapsulación son los siguientes:

5.1.3.1 Emulsión

Las técnicas de encapsulación por emulsión, es de las más extendidas para la obtención de microcápsulas. Una emulsión es un tipo de coloide o estado coloidal en el que dos líquidos no miscibles se mezclan, uno de los líquidos disperso en pequeñas gotas en el otro (Bakry *et al.*, 2015). La ventaja de estos sistemas es que son de fácil preparación y bajo costo, sin embargo, son muy inestables cuando son expuestos al calor, congelación, secado, pH extremo y altas concentraciones de minerales (McClements, Decker, Park y Weiss, 2009). La formación de una emulsión es un paso clave para la microencapsulación de AEs. Es generalmente aplicada para la encapsulación de AEs o sus componentes en soluciones acuosas, las cuales pueden ser utilizadas en estado líquido o ser secadas para producir polvos (Bakry *et al.*, 2015). Básicamente, una emulsión consiste en al menos dos líquidos inmiscibles, usualmente agua y aceite, con uno de los líquidos dispersos como pequeñas gotas en el otro. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamada emulsión aceite en agua (O/W), mientras que un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa, es llamada emulsión agua en aceite (W/O). También pueden desarrollarse sistemas (W/O/W) y (O/W/O). Para obtener una emulsión estable, se añaden comúnmente agentes emulgentes y agentes estabilizantes (carbohidratos y proteínas). Los

diámetros de las gotas de las emulsiones se pueden encontrar en el rango de 0.1 a 100 μm (Fang y Bhandari, 2010). La emulsión puede ser preparada homogenizando el agua, el agente estabilizante, el agente emulgente y el AE juntos utilizando un dispositivo mecánico conocido como homogeneizador (molino coloidal, homogeneizador de membrana, sonicador, homogeneizador de altas presiones, entre otros) (McClements *et al.*, 2009).

La estabilidad de los encapsulados está determinada por factores como el tamaño de partícula, el cremado y la viscosidad. El objetivo de la encapsulación por emulsión es producir el tamaño de partícula lo más pequeño posible, con el fin de obtener emulsiones más estables y disminuir la coalescencia (Kaushik y Roos, 2007). En la encapsulación por emulsión un menor tamaño de partícula, hace que el sistema sea más resistente al cremado y a la sedimentación (Nam *et al.*, 2010). Los equipos utilizados en la formación de emulsiones, con los que se puede lograr un menor tamaño de partícula (escalas nano) son los homogeneizadores a altas presiones, microfluidizadores y equipos de ultrasonido (Kourniatis, Spinelli, Mansur y González, 2010). Las nanoemulsiones tienen algunas ventajas comparadas con emulsiones convencionales, ya que debido a su menor tamaño de partícula son más estables y tienen una apariencia translúcida (Tadros y Kessell, 2004). Por otro lado, el cremado es el movimiento hacia la parte superior de las gotas de la fase dispersa, debido a su menor densidad, con respecto a la densidad de la fase continua. El incremento en el porcentaje de polisacáridos utilizados como estabilizantes en la emulsión en combinación con un bajo contenido de AE, puede hacer que el cremado aumente, debido a las moléculas de polisacárido no disueltas en la fase acuosa de las emulsiones. Para evitar el cremado en emulsiones, la viscosidad de la fase continua se puede incrementar añadiendo inductores de viscosidad apropiados como son algunas gomas (Sheu y Rosenberg, 1998). En cuanto a la viscosidad, se ha observado que el contenido total de sólidos es una variable que puede tener influencia en la viscosidad de la emulsión, ya que, al aumentar el porcentaje del contenido de sólidos, puede aumentar la viscosidad de la emulsión. Una alta viscosidad en la emulsión puede aumentar la retención de los compuestos volátiles, limitando la difusión del AE a través del material de la pared. Una alta concentración de AE puede disminuir la viscosidad de la emulsión, lo cual se puede deber a la disminución del material de la pared (Sheu y Rosenberg, 1998).

5.1.3.2 Atomización

Es una operación básica que consiste en la transformación de una suspensión o disolución en un material seco particulado, mediante la atomización del primero en un medio caliente y seco (Tonon, Grosso y Hubinger, 2011). Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto. El secado por atomización es la técnica más común y barata para producir materiales microencapsulados, ya que el equipo está disponible a nivel industrial y los costos de producción son más bajos que los de otros métodos (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La encapsulación por atomización es una técnica de bajo costo, comúnmente usada a escala industrial, la cual tiene la ventaja de producir microcápsulas de manera sencilla, en operación continua y barata, comparada con otras técnicas de microencapsulación. La encapsulación por atomización, es la técnica más utilizada para la encapsulación de AEs. La técnica de encapsulación por atomización, se utiliza para el secado de las emulsiones preparadas a partir de los AEs a temperaturas relativamente altas, lo cual permite la evaporación rápida de agua y la formación de la pared de la micro cápsula a una alta velocidad, con lo cual el AE queda atrapado de manera instantánea. Mediante la aplicación de esta técnica se evita la degradación química y biológica y se reducen los costos de almacenamiento y transporte. La encapsulación por atomización consta de cuatro etapas: i) Preparación de la emulsión, ii) homogenización de la emulsión, iii) atomización de la emulsión y iv) deshidratación de las partículas atomizadas. La viscosidad de las emulsiones debe ser baja y el tamaño de partícula pequeño. Se deben seleccionar cuidadosamente los parámetros de operación del equipo de secado por atomización, de los cuales los más importantes son la temperatura de secado y el flujo de alimentación. La temperatura de secado puede modificar la viscosidad de la emulsión y si es muy elevada puede hacer que se pierdan compuestos volátiles y originar procesos de inestabilidad oxidativa. La eficiencia de la microencapsulación se puede incrementar, al aumentar la concentración de sólidos (materiales de pared) en la emulsión. Los materiales de la pared, pueden ser seleccionados de una gran cantidad de polímeros naturales (celulosa y almidón) y sintéticos (nylon, polietileno y poliéster). Los criterios para la selección se basan en su solubilidad, peso molecular, cristalinidad, difusibilidad entre otras, el costo también debe ser considerado (Young, Sarda y Rosenberg, 1993).

En cuanto a la estabilidad de los encapsulados por atomización, se ha observado que antes de la etapa de secado, la emulsión formada debe ser estable en un cierto lapso de tiempo, las partículas del AE deben ser pequeñas y deben tener una baja viscosidad para prevenir la inclusión de aire en la partícula. La viscosidad de la emulsión y su distribución de tamaño de partícula tienen efectos físicos significativos en el proceso de secado (Drusch, 2006). Las propiedades físicas del polvo obtenido se ven influenciadas por la naturaleza de la emulsión (contenido de sólidos, viscosidad y temperatura), tipo de atomizador, velocidad de operación, presión y temperaturas de entrada y de salida, entre otros. Las cápsulas obtenidas mediante el proceso de secado por atomización deben ser uniformes, de forma y tamaño definidos y se pueden clasificar de acuerdo a su tamaño de partícula, siendo macrocápsulas cuando son mayores 5000 μm , microcápsulas cuando se encuentran entre 0.1 y 5000 μm y nanocápsulas cuando son menores de 0.1 μm (Murugesan y Orsat, 2012). El proceso de secado disminuye el contenido de agua del producto original, por lo tanto, disminuye la humedad y la actividad de agua, con lo que se asegura una estabilidad microbiológica de los productos, se reduce el riesgo de degradaciones químicas o biológicas, lo cual conlleva a prolongar su vida de anaquel (Gharsalloui *et al.*, 2007).

5.1.3.3 Otras técnicas

Liofilización: Este proceso se realiza mediante la congelación del material, para después reducir la presión circundante, permitiendo que el agua congelada en el material se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido (Oetjen y Haseley 2004). Esta técnica es simple y fácil de operar. Los encapsulados obtenidos mediante esta técnica son muy resistentes a la oxidación. Las mayores desventajas incluyen uso de gran cantidad de energía, un tiempo largo de procesamiento y altos costos de producción comparados con otras técnicas de secado (Sinha, Sharma y Sharma, 2008).

Co-Extrusión: La obtención de las microcápsulas implica tres pasos básicos: preparación de las emulsiones a procesar, la extrusión de las emulsiones de forma simultánea y por último la solidificación de las gotas. La principal ventaja de esta técnica es la estabilidad contra la oxidación, la baja cantidad de AE en la superficie y una prolongada vida de anaquel, comparada con el secado por atomización. Sin embargo, esta técnica es más costosa que la

técnica de secado por atomización y el tamaño de partícula es de 150 a 2000 μm , lo cual limita su uso en varias aplicaciones (Desai y Jin Park, 2005).

Coacervación: Es un método en el cual pequeñas partículas o gotas están rodeadas por un material encapsulante, o se encuentran en una matriz homogénea o heterogénea, formando pequeñas cápsulas. Dichas cápsulas pueden envolver una sustancia sólida, líquida o gaseosa otorgándole propiedades de liberación controlada a las condiciones deseadas (Bakry *et al.*, 2015). Esta técnica produce microcápsulas estables con una superficie delgada y alto contenido de AE. Asimismo, poseen excelentes características de liberación controlada y mayor resistencia al calor. Además, este método es considerado como simple, de bajo costo, sin uso de disolventes, y reproducible para la obtención de AEs microencapsulados; por lo que podría ser usado a nivel industrial (Bakry *et al.*, 2015).

5.1.4 Encapsulación y uso como antimicrobianos en sistemas modelo

Se han llevado a cabo algunas investigaciones relacionadas con el efecto antimicrobiano de los AEs encapsulados en sistemas modelo, las cuales están permitiendo adquirir una mayor comprensión sobre su acción en contra de los microorganismos de interés en alimentos, bajo condiciones de estudio controladas. Entre ellas se encuentra el estudio realizado por Hernández-Hernández *et al.* (2014), en el que se observó que en un sistema modelo de agar nutritivo, después de tres meses de almacenamiento en refrigeración, el efecto antibacteriano de los AEs de orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) y de orégano europeo (*Origanum vulgare* L.) no encapsulados, contra *Micrococcus luteus*, se redujo en 59.3% y 33.3%, respectivamente; mientras que con los mismos AEs pero microencapsulados, el efecto antibacteriano no experimentó cambios significativos. Otro ejemplo es el estudio de Dima *et al.* (2014), en el cual se investigó el efecto antimicrobiano del AE de cilantro encapsulado en β -ciclodextrina, por el método de co-precipitación, utilizando un sistema modelo de agar de extracto de malta, para inhibir el crecimiento de *B. subtilis* MIUG B106B, *Bacillus cereus* MIUG B107B, *Rhodorula glutinis* MIUG D7, *Candida utilis* MIUG D8, *Sc. cerevisiae* MIUG D9, *Aspergillus niger* MIUG M5, *Penicillium glaucum* MIUG M9 y *Geotrichum candidum* MIUG M13. Los resultados mostraron que las cápsulas de AE de cilantro resultaron más efectivas para inhibir a *A. niger* MIUG M5 y a *P. glaucum* MIUG M9 y menos efectivas para inhibir el crecimiento de *Sc. cerevisiae* MIUG D9, en comparación

con los otros microorganismos probados. Por otro lado, Ayala-Zavala *et al.* (2008), estudiaron el efecto antimicrobiano del AE de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y de AE de ajo (*Allium sativum*), encapsulados en β -ciclodextrina, por el método de precipitación, para inhibir el crecimiento de *Alternaria alternata*, utilizando un sistema modelo de agar papa dextrosa, incubado durante 48 h a 25°C. Los resultados mostraron que los dos tipos de AE de canela, encapsulado y no encapsulado, inhibieron el crecimiento de *A. alternata* de manera más afectiva que el AE de ajo (encapsulado y no encapsulado). Lo anterior sugiere que los microorganismos pueden resultar más sensibles a un tipo de AE que a otro, lo cual está relacionado con el efecto de sus componentes y con la naturaleza de los microorganismos. Por otra parte, 0.004 g/mL del AE de canela y 0.005 g/mL de AE de ajo, microencapsulados de manera independiente, fueron las concentraciones que mostraron el menor crecimiento del hongo. Sin embargo, cuando dichos AEs no encapsulados, se aplicaron a una concentración de 0.005 g/mL, mostraron el mismo efecto antimicrobiano.

5.1.5 Encapsulación y uso como antimicrobianos en alimentos

El efecto antimicrobiano de los AEs encapsulados, en alimentos, también ha sido estudiado por algunos investigadores. En este sentido puede mencionarse el estudio realizado por Teodoro *et al.*, (2014), en el que se encapsuló AE de romero mediante la técnica de secado por atomización, utilizando como materiales encapsulantes maltodextrina y almidón modificado. El AE de romero encapsulado se añadió en una concentración de 1.5%, a una masa fresca para pan, previamente inoculada con *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* Para el análisis se utilizó un control que fue la masa fresca de pan sin AE; así como una muestra con 1.5% de AE sin encapsular. Después de 8 días de almacenamiento a 25°C, se encontró que los tratamientos en los que se añadió AE, obtuvieron un bajo conteo fúngico; en comparación con el control, la carga microbiana se redujo entre 0.7 y 1.5 ciclos logarítmicos (UFC/mL). Además, se observó un menor conteo fúngico para el tratamiento con AE microencapsulado, en relación con el tratamiento con AE sin encapsular. Otro ejemplo es el estudio de Fernández-Serrano (2015), en el cual se evaluó el efecto antifúngico del AE de canela encapsulado por emulsión a altas presiones, utilizando como agente estabilizante goma xantana. El AE encapsulado en concentraciones de 0.08 mg/g y 0.1 mg/g, se agregó a mermelada de fresa, previamente inoculada con *Aspergillus flavus* (CECT 2685), *A. niger*

(CECT 20156), *Penicillium expansum* (CECT 20140), *Zygosaccharomyces rouxii* o *Z. bailii*. Los resultados mostraron que después de 28 días a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, las muestras de mermelada a las cuales se les incorporó la emulsión, presentaron un menor desarrollo fúngico comparadas con el control (mermelada de fresa sin AE), siendo las emulsiones más efectivas sobre *P. expansum* y *A. flavus*. Sin embargo, en el caso de *A. niger*, el desarrollo fúngico de las muestras control y el de las preparadas con la emulsión, presentaron una evolución similar. Por otra parte, las levaduras resultaron más sensibles al AE de canela encapsulado. Para *Z. rouxii*, se observó la completa inhibición del crecimiento, durante todo el período de almacenamiento, con la emulsión que contenía 0.1 mg/g de AE. En el caso de *Z. bailii*, la inhibición completa se presentó con la muestra preparada con la emulsión que contenía 0.08 mg/g de AE.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Los AEs de orégano, tomillo y hojas de clavo, se adquirieron con los Laboratorios Hersol (México). Para la preparación de las nanoemulsiones, se utilizó goma arábiga (Freskal, Quetzal Negro, México) e inulina de agave (Fructagave PR95, Agaviótica, N.L, México) como agentes encapsulantes y polisorbato 80 (Tween 80, Sigma-Aldrich, EE.UU.) como agente emulgente. Para las pruebas de actividad antimicrobiana se utilizaron algunos reactivos como agar de soya tripticaseína (BD BIOXON, México), caldo de soya tripticaseína (BD BIOXON, México) y resazurina (Sigma Aldrich, Germany). Las cepas bacterianas utilizadas fueron *E. coli* ATCC 29922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. aureus* ATCC 25923, los cuales se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, México. Los jugos de jitomate y jugo verde JUMEX®, fueron adquiridos en un supermercado de la ciudad de Puebla, México. Para la determinación de las propiedades antioxidantes de las nanoemulsiones secadas por atomización se utilizaron algunos reactivos como n-hexano (J. T. Baker, USA), metanol (J.T. Baker, USA), HCl (Hycel, México) y DPPH (Sigma-Aldrich, USA).

6.2 Métodos

6.2.1 Caracterización de aceites esenciales

6.2.1.1 Caracterización química

Los AEs fueron analizados usando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850N (Palo Alto, CA, USA), equipado con un detector de espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C (Palo Alto, CA, USA). El flujo de gas acarreador (helio) fue de 1.1 mL/min. La separación se llevó a cabo utilizando una columna de sílica fundida HP 5 (Agilent, Palo Alto, CA, USA; 30 m de longitud, 250 μ m y 0.25 μ m de espesor de película). La temperatura del inyector se fijó a 300°C y fue operado en modo split de 10:1. En el horno de columnas se fijó una temperatura de 60°C durante 2 min y luego se hizo una rampa de

temperaturas para subir a 250°C a una velocidad de 10 °C/min. Los constituyentes de los AEs fueron identificados comparando los espectros de masa obtenidos con la base de datos del National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Database.

6.2.1.2 Propiedades físicas

Los AEs fueron caracterizados con base a sus parámetros de color (L,a,b) en escala Hunter usando un colorímetro (CR400, Konica Minolta, Japón), el índice de refracción se determinó utilizando un refractómetro digital (PAL-BX/RI, ATAGO, Japón) de acuerdo con la A.O.A.C. 920.141. La viscosidad de los AEs, fue calculada utilizando un viscosímetro Cannon-Fenske (350, Thomas Scientific, USA) y la densidad fue calculada usando un picnómetro de vidrio de acuerdo a la A.O.A.C. 920.134. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

6.2.2 Preparación y caracterización de nanoemulsiones

Las nanoemulsiones al 5% (p/p) de los AEs (fase dispersa) fueron preparadas utilizando 10% (p/p) de inulina como agente encapsulante. En el caso de las nanoemulsiones que fueron secadas por atomización, se completaron los sólidos a un total de 20% con goma arábiga como agente encapsulante. Se utilizó 3% (p/p) de polisorbato 80 (Tween 80) como agente emulgente en la fase continua. Las nanoemulsiones fueron homogenizadas utilizando un homogeneizador ultrasónico (Ultrasonic Processor CP 505, Cole Parmer, USA) a 84 µm de amplitud, durante 15 min. (Ruíz-González *et al.*, 2019).

6.2.2.1 Propiedades físicas

Las nanoemulsiones de los AEs fueron caracterizadas con base a sus parámetros de color (L, a, b) en escala Hunter usando un colorímetro (CR400, Konica Minolta, Japón) y pH usando un potenciómetro (PC45, Conductronic, México) de acuerdo con la A.O.A.C. 981.12. Ambos equipos fueron previamente calibrados. La viscosidad fue calculada usando un viscosímetro Cannon-Fenske (350, Thomas Scientific, USA) (Tadros, 2018) y la densidad usando un picnómetro de vidrio de acuerdo a la A.O.A.C. 920.134. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

6.2.2.2 Eficiencia de encapsulación

La EE de las nanoemulsiones de los AEs fue calculada utilizando un espectrofotómetro de UV/VIS (Cary 100, Varian, USA) de acuerdo con la literatura con algunas modificaciones (Xiao, Li, Zhu, Zhou y Niu, 2016). El pico máximo fue calculado en los espectrogramas de los AEs disueltos en n-hexano, en un rango de longitudes de onda de 190-500 nm. Los picos máximos encontrados para AEO, AET y AEHC fueron a 271, 274 y 281 nm, respectivamente. La EE fue calculada mediante una curva de calibración elaborada con cinco soluciones estándar de cada uno de los AEs, diluidas en n-hexano y preparadas en diferentes concentraciones (0.5-5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Para calcular la EE, se llevó a cabo la extracción del aceite esencial libre (AELN) de las nanoemulsiones, disolviendo 700 μL de las nanoemulsiones en 9.3 mL de n-hexano en constante agitación (60 rpm) durante 15 s. Este análisis se llevó a cabo por triplicado. Después, la absorbancia se estableció en una longitud de onda específica de acuerdo con el AE. La EE fue calculada como porcentaje usando la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{AEN - AELN}{AEN} \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Donde, AEN era el contenido de AE de la nanoemulsión que se fijó en 5% ($\text{mL}_{\text{AE}}/\text{mL}_{\text{nanoemulsión}}$) y AELN era el contenido de AE libre de la nanoemulsión ($\text{mL}_{\text{AE}}/\text{mL}_{\text{nanoemulsión}}$).

6.2.2.3 Estabilidad

La estabilidad de las nanoemulsiones de los AEs se llevó a cabo mediante inspección visual, en busca de los primeros signos de cremado. Para esta prueba, 25 mL de cada nanoemulsión fueron transferidos dentro de un tubo graduado (por triplicado) y fueron almacenadas en un lugar oscuro a $23 \pm 1.0^\circ\text{C}$ durante 28 días. Luego, las nanoemulsiones fueron revisadas en busca de signos de cremado (separación de fases) después de 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento de acuerdo con Hebishy, Buffa, Guamis y Trujillo (2013), con algunas modificaciones.

La distribución granulométrica de las gotas de los AEs dispersas en las nanoemulsiones, se llevó a cabo por triplicado usando un analizador de partícula de dispersión dinámica de luz (Nanotrak Wave II, Microtrac, USA).

6.2.3 *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y nanoemulsiones en sistemas modelo*

6.2.3.1 Cultivo microbiano

Las cepas fueron cultivadas en agar de soya tripticaseína (AST) e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Luego fueron almacenadas a 4°C por un máximo de tres semanas. Al final del periodo de almacenamiento, las cepas bacterianas fueron reactivadas y cultivadas nuevamente. Para la preparación de las suspensiones bacterianas (10^8 UFC/mL), las suspensiones fueron preparadas introduciendo dos asadas de los cultivos microbianos en tubos de 10 mL con caldo soya tripticaseína (CST) y luego incubándolos a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

6.2.3.2 Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los AEs y nanoemulsiones de los AEs fue evaluada usando el método de la microdilución con algunas modificaciones (Haba *et al.*, 2014). Se prepararon diluciones seriadas con CST de los AEs y las nanoemulsiones y fueron transferidas dentro de los pozos de las microplacas. Se preparó una solución estándar de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cada uno de los AEs y se añadieron de 1 a 40 μL dentro de los micropozos para lograr concentraciones de 0.1 a 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los AEs. Por otro lado, las nanoemulsiones fueron preparadas al 5% (p/p) de AEs, se añadieron 0.5 a 10 μL de las nanoemulsiones dentro de los micropozos para lograr concentraciones de 0.1 a 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los AEs. En seguida, se añadió a cada micropozo 2.5 μL de la suspensión bacteriana (10^8 UFC/mL), para lograr una concentración final aproximada de 10^6 UFC/mL, de los microorganismos a estudiar. Las microplacas fueron incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. Después del periodo de incubación, se agregaron 10 μL de resazurina (preparada a una concentración de 0.015%) a cada micropozo para poder observar el crecimiento microbiano. Después de la incubación a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 h, el valor de la CMI fue calculado como la concentración de AEs o nanoemulsiones que

no cambiaron el color del azul de la resazurina al color rosa de la resofurina. El crecimiento activo se detectó mediante la reducción de la resazurina azul a la resofurina rosa.

6.2.3.3 Concentración mínima bactericida

La concentración mínima bactericida (CMB) de los AEs y las nanoemulsiones fue calculada usando el método de la microdilución con algunas modificaciones (Haba *et al.*, 2014). Se tomaron 5 µL de los micropozos que dieron negativo a crecimiento bacteriano y se sembraron mediante la técnica de extensión en placa en AST. El valor de la CMB correspondía con la mínima concentración de AEs o nanoemulsiones que dieran negativo a crecimiento después de una incubación a 37±1°C durante 24 h. Estos cálculos se llevaron a cabo por triplicado.

6.2.4 *Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de nanoemulsiones en sistemas modelo*

Se determinó el efecto de las mezclas binarias de las nanoemulsiones de AEO y AET, usando el método de la microdilución con algunas modificaciones (Haba *et al.*, 2014). Se prepararon diluciones con CST de las nanoemulsiones y fueron transferidas dentro de los pozos de las microplacas. Las nanoemulsiones fueron preparadas al 5% (p/p) de los AEs y se añadieron a los micropozos en la cantidad necesaria para obtener las proporciones de la CMI de los AEs de acuerdo a un diseño de tablero de ajedrez (Tabla V). En seguida, se añadió a cada micropozo 2.5 µL de la suspensión bacteriana (10⁸ UFC/mL), para lograr una concentración final aproximada de 10⁶ UFC/mL de *E. coli* y *S. aureus*. Las microplacas fueron incubadas y se les aplicó la resazurina como se explicó en la sección anterior.

Las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFIs) fueron calculadas con la MIC de cada AE con las siguientes ecuaciones:

$$CFI A = \frac{CMI \text{ de A en presencia de B}}{CMI \text{ de A individual}} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$CFI B = \frac{CMI \text{ de B en presencia de A}}{CMI \text{ de B individual}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde A y B representan los AEs evaluados.

Una vez que se obtienen las CFIs, se debe obtener el Índice CFI de los AEs evaluados mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Índice CFI} = \text{CFI A} + \text{CFI B} \quad (\text{Ec. 4})$$

Como el Índice CFI es calculado con base a la MIC de cada AE en la mezcla, el valor resultante indica el efecto de la mezcla. Un Índice CFI <1.0, 1.0 o > 1.0 es definido como un efecto sinérgico, aditivo o antagonístico de las mezclas de los AE evaluados, respectivamente (García-García, López-Malo y Palou, 2011).

6.2.5 *Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones y de una mezcla binaria de las mismas en alimentos*

6.2.5.1 Caracterización fisicoquímica de jugos

Los jugos de jitomate y jugo verde fueron caracterizados mediante °Bx usando un refractómetro digital (PAL-BX / RI, ATAGO, Japón) de acuerdo a la A.O.A.C. 932.14, pH utilizando un potenciómetro (PC45, Conductronic, México) con base a la A.O.A.C. 981.12, a_w mediante un higrómetro de punto de rocío (Decagon, AquaLab, EE.UU.) de acuerdo a la A.O.A.C. 978.18 y viscosidad usando un viscosímetro (RVDV-II+P, Brookfield, EE.UU.) de acuerdo con lo reportado por otros autores (Bozdogan, 2015). Todos los equipos fueron previamente calibrados. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

6.2.5.2 Concentración mínima inhibitoria

Se prepararon diluciones de las nanoemulsiones de AEO y AET en jugo de jitomate o jugo verde, en tubos de 20 mL, añadiendo la cantidad de las nanoemulsiones necesaria para obtener concentraciones de 0.1-1 $\mu\text{L/mL}$ de AEO y AET. Por otro lado, se añadió a cada uno de los tubos, la cantidad necesaria de la suspensión bacteriana, para obtener una concentración aproximada de 10^6 CFU/mL, de *S. aureus*. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 h, para después evaluar el crecimiento microbiano, mediante la técnica de vertido en placa en AST. El valor de la CMI corresponde

a la menor concentración de las nanoemulsiones que resultó negativo a crecimiento después de la incubación de las placas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Este análisis se llevó a cabo por duplicado.

6.2.5.3 Curvas de inhibición microbiana

Se prepararon diluciones de las nanoemulsiones de AEO y AET de manera individual o en mezcla, en jugo de jitomate o jugo verde, en un vaso de precipitados de 50 mL, añadiendo la cantidad de las nanoemulsiones necesaria para obtener el valor de la CMI de AEO y AET de manera individual o bien de su fracción para la mezcla. Se añadió al vaso de precipitados la cantidad necesaria de la suspensión bacteriana, para lograr una concentración de 10^6 CFU/mL de *S. aureus*. El vaso de precipitados, se mantuvo en agitación a 180 rpm durante 2 h aproximadamente y se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes periodos de tiempo, para evaluar la carga microbiana. El recuento microbiano se llevó a cabo utilizando el método de vertido en placa en AST. Las placas se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Este análisis se llevó a cabo por duplicado.

6.2.5.4 Modelo de Weibull

Para describir el efecto de las nanoemulsiones de AEO y AET en la cinética de inhibición de *S. aureus* inoculada en jugo verde y jugo de jitomate, se utilizó el modelo de Weibull:

$$\log N/N_0 = -b/t^n \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde, N_0 es el número inicial de células viables (UFC/mL), N es el número de células sobrevivientes (UFC/mL) después de ser expuestas al tratamiento a un tiempo t (min), b y n son factores de la curva de Weibull (Peleg y Cole ,1998). Para determinar los factores b y n , se utilizó el software estadístico Minitab 18 (Minitab Inc; State College, PA, EE.UU.).

El ajuste del modelo se evaluó utilizando el coeficiente de regresión (R^2) y el error cuadrático medio (ECM).

$$\text{ECM} = \frac{\sum(\text{predicho}-\text{observado})}{m-p} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde, m es el número de observaciones y p es el número de parámetros a ser estimados.

La distribución de frecuencia de las resistencias se calculó utilizando la distribución de Weibull con parámetros de b y n :

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

donde $d\Phi / dt_c$ es la densidad de población superviviente de microorganismos respecto al tiempo, medida de la resistencia o sensibilidad del organismo a ciertas condiciones de los tratamientos. 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 (v_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.

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

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

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

$$v_1 = \frac{[\Gamma(1+2/n)/b^{3/2}]}{[\Gamma(1+2/n)/b^{2/n}]^{3/2}} \quad (\text{Ec.11})$$

6.2.6 Atomización de nanoemulsiones y caracterización de polvos

Las nanoemulsiones de AEO y AET fueron atomizadas a dos diferentes temperaturas de entrada (160°C y 180°C) y dos diferentes flujos de alimentación (5 g/min y 10 g/min) usando un secador por atomización (B-290, Büchi, Suiza), de acuerdo con Tomazelli-Júnior *et al.* (2017).

6.2.6.1 Propiedades fisicoquímicas

El rendimiento (R) de los polvos de AEO y AET se determinó midiendo la cantidad de sólidos recuperados después del proceso de secado por atomización. El R fue calculado como porcentaje mediante la siguiente ecuación:

$$R = \frac{SR}{SN} * 100 \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde, R es el rendimiento de los polvos (%), SR fue la cantidad de sólidos recuperados (g) y SN es la cantidad inicial de sólidos contenida en la nanoemulsión (g).

Los polvos de AEO y AET también fueron caracterizados mediante el contenido de humedad por el método de estufa, de acuerdo con la A.O.A.C. 926.12. La actividad de agua a_w fue medida con un higrómetro de punto de rocío (AquaLab, Desazon, USA), el cual fue previamente calibrado.

La densidad del bulto de los polvos de AEO y AET fue determinada al introducir un peso conocido de polvo dentro de una probeta graduada y después midiendo su volumen. La densidad compactada fue determinada en una forma similar, aplicando fuerza mecánica para compactar las partículas de polvo. Ambas densidades fueron calculadas mediante la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde, ρ es la densidad (g/mL), m es la masa (g) y v es el volumen (mL).

El índice de Carr fue obtenido mediante la siguiente ecuación (Carr 1965):

$$IC = \frac{\rho_c - \rho_b}{\rho_c} \quad (\text{Ec. 14})$$

Where, IC es el índice de Carr, ρ_c es la densidad compactada (g/cm^3) y ρ_b es la densidad bulk (g/cm^3).

El cociente de Hausner se determinó con la siguiente ecuación (Hausner,1967):

$$CH = \frac{\rho_c}{\rho_b} \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde, CH es el cociente de Hausner, ρ_c es la densidad compactada (g/cm^3) y ρ_b es la densidad bulk (g/cm^3).

Por otro lado, el tamaño de partícula de los polvos de AEO y AET fue determinado usando un analizador de partículas de difracción láser (Bluewave, Microtrac Inc., USA). El instrumento fue previamente calibrado.

6.2.6.2 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) se refiere a la cantidad existente de compuesto activo encapsulado dentro de las partículas de polvo. La determinación de EE fue llevada a cabo de acuerdo al método descrito por Jafari, Assadpoor, He y Bhandari, (2008). El contenido de aceite total y aceite no encapsulado en las cápsulas de AEO y AET fue determinado por extracción con solventes orgánicos seguida de métodos gravimétricos. La EE fue calculada como porcentaje de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EE = \left(\frac{\text{Aceite total} - \text{Aceite no encapsulado}}{\text{Aceite total}} \right) * 100 \quad \text{Ec. 16}$$

6.2.7 *Propiedades antioxidantes y estabilidad durante el almacenamiento de polvos*

6.2.7.1 Porcentaje de inhibición del DPPH

El porcentaje de inhibición del DPPH y los extractos de AEO y AET fueron obtenidos de acuerdo a la literatura (Sreeramulu y Raghunath, 2011; Yu *et al.*, 2002; Sing, Chidambara-Murthy y Jayaprakash, 2002; Matthaus, 2002). Para obtener los extractos, se mezclaron 0.5 g de polvo con 20 mL de metanol (70%) acidificado con 0.1% de HCl, la mezcla se agitó a 120 rpm durante 2 h a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue separado y filtrado a través de papel Whatman No.1. Se pusieron 100 μL de cada extracto en tubos de vidrio y se añadió 2.9 mL de DPPH (0.1 mM), los tubos fueron agitados vigorosamente usando un vortex y se

midió la absorbancia inicial (initial ABS) a 517 nm, usando un espectrofotómetro de UV/VIS (Carry 100, VARIAN, USA). Los tubos se dejaron en reposo en un lugar oscuro durante 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia final (final ABS) a 517 nm.

El porcentaje de inhibición del DPPH fue obtenido mediante la siguiente ecuación:

$$\%Inhibition = \frac{initial\ ABS - final\ ABS}{initial\ ABS} \times 100 \quad (Ec. 17)$$

6.2.7.2 Índice de peróxidos

El índice de peróxido de los polvos de AEO y AET fue determinado de acuerdo con la literatura (A.O.A.C. 965.33). El principio del método se basa en disolver la muestra en una mezcla de ácido acético y cloroformo (3:2), agregar yoduro de potasio y valorar el yodo liberado en una solución estándar de tiosulfato de sodio 0.01 N, usando almidón de papa al 2% (p/p) como solución indicadora. El resultado se expresa en meq/kg.

6.2.7.3 Estabilidad

Para evaluar la estabilidad de las propiedades antioxidantes del AEO y AET microencapsulados, los polvos fueron almacenados en un horno (E-33, RIOSSA, México) a 45°C por 7 y 14 días, respectivamente. Al final del periodo de almacenamiento, se midió la capacidad antioxidante y el índice de peróxidos.

6.2.8 *Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados estadísticamente usando Minitab Software v.17 (LEAD Technologies, State College, PA, USA) mediante ANOVA y pruebas de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de aceites esenciales

7.1.1 Caracterización química

La diferencia en cuanto a la caracterización química de los AEs se puede deber a su composición, la cual depende de varios factores geográficos y ambientales (Boskovic *et al.*, 2015). Los componentes principales identificados en los AEs se muestran en la Tabla I. El AEO contiene más de 30 componentes, incluyendo carvacrol que es usualmente uno de sus principales componentes. En este estudio se detectó al carvacrol como componente mayoritario (60.76%) del AEO. El carvacrol es un compuesto fenólico responsable de la actividad antimicrobiana del AEO (Olmedo *et al.*, 2014). De manera similar, la actividad antimicrobiana del AET es mayormente atribuida al timol y al carvacrol (Navarrete *et al.*, 2010). En el presente estudio el mayor componente del AET fue el timol (30.76%). El aceite esencial de clavo presenta actividad antimicrobiana principalmente debida a su contenido de eugenol (Bhuiyan, Begum, Nandi y Akter, 2010). En este estudio, uno de los mayores componentes encontrados en el AEHC fue eugenol (25.72%).

Tabla I. Caracterización química de los aceites esenciales

Aceite esencial	Principales componentes	Area %
AEO	carvacrol	60.76
	syn carvacrol	15.21
	syn m-cimeno	6.92
	syn δ -terpineno	5.64
	cariofileno	3.53
	syn linalol	2.52
AET	timol	30.76
	m-cimeno	21.77
	1r- α -pineno	9.35
	syn-linalol	6.16
	syn δ -terpineno	6.14
	δ -terpineno	4.64
	óxido de cariofileno	2.22
	cariofileno	2.09
AEHC	α -cariofileno	32.16
	eugenol	25.72
	syn δ -cadieno	12.43
	4-((1E)-3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol	8.82
	α -farneseno	4.11
	óxido de cariofileno	3.37
	diepicedreno-1-óxido	3.28

AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo y AEHC: aceite esencial de hojas de clavo

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado

7.1.2 Propiedades físicas

Cada uno de los AEs tiene diferentes propiedades, las cuales están relacionadas con las distintas variedades de las plantas de donde son extraídos, entre otros factores. Es posible encontrar variaciones en las propiedades de los AEs provenientes de géneros de plantas similares (Boskovic *et al.*, 2015). Por lo tanto, las propiedades físicas de los AEs se evaluaron antes del proceso de nanoencapsulación, ya que algunas propiedades como la densidad y la viscosidad de la fase dispersa tienen un gran impacto en la formulación de emulsiones estables. Las propiedades físicas de los AEs se presentan en la Tabla II. El color es una propiedad física de los AEs, la cual es muy variable dependiendo del tipo de aceite. En este estudio, los parámetros de color del AEO, AET y AEHC fueron evaluados mediante la escala de Hunter (Tabla II). Para todos los AEs se observó una alta luminosidad y una tendencia hacia el color amarillo y verde. Por otro lado, otros autores (Alabado-Plaus, Saez-Flores y Grabiél-Ataucusi, 2001; Haddouchi, Chaouche, Lazouni y Benmansour, 2011) reportaron un valor de índice de refracción de 1.4774 para el AEO, el cual es muy cercano al reportado en este estudio (Tabla II). El índice de refracción del AET (1.499) fue similar al valor reportado en otros estudios (Alabado-Plaus *et al.*, 2001; Haddouchi *et al.*, 2011). Otros autores (Nowak, Ogonowski, Jaworska y Grzesik, 2012) reportaron un rango de valor del índice de refracción del AEHC de 1.5330 a 1.5350, el cual es similar al obtenido en este estudio. La viscosidad es una propiedad física característica de los AEs y varía dependiendo del tipo de aceite. En general, los valores obtenidos para el AEO, AET y AEHC en este estudio (Tabla II), fueron similares a los valores obtenidos por otros autores (Siddiqui y Ahmad, 2013) los cuales reportaron un valor de 0.066 ± 0.006 P para aceite de flor de clavo y 0.041 ± 0.001 P para aceite de canela. En el presente estudio, el valor de densidad del AEO (Tabla II) fue similar al valor reportado en la literatura (0.92 g/cm^3) (Busatta, Mossi, Rodrigues, Cansian y De Oliveira, 2007). En otro estudio (Shabnum y Wagay, 2011), se reportó un valor de densidad de (0.925 g/cm^3) para el AET, el cual es similar al obtenido en este estudio. El AEHC presentó los más altos valores de densidad, lo cual está de acuerdo con lo reportado por otros autores (Nowak *et al.*, 2012), quienes obtuvieron valores en el rango de $1.046\text{-}1.053 \text{ g/cm}^3$.

Tabla II. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Propiedad	AEO	AET	AEHC
Color			
L	80.490±0.310 ^b	81.440 ±0.100 ^a	81.600±0.200 ^a
a	-2.230±0.030 ^b	-1.060±0.020 ^c	-3.920±0.030 ^a
b	8.370±0.050 ^b	3.920±0.030 ^c	16.430±0.030 ^a
Índice de refracción	1.510±0.001 ^b	1.502±0.006 ^b	1.535±0.004 ^a
Viscosidad (P)	0.095±0.004 ^a	0.048±0.003 ^c	0.079±0.004 ^b
Densidad (kg/L)	0.947±0.041 ^a	0.920±0.071 ^a	1.042±0.020 ^a

AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo y AEHC: aceite esencial de hojas de clavo

Letras diferentes en la misma fila significan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado

7.2 Caracterización de nanoemulsiones (10% de sólidos)

Las emulsiones poseen diferentes propiedades, de acuerdo a los materiales utilizados en su preparación (Campelo *et al.*, 2017). Por lo tanto, es necesario caracterizar las propiedades físicas de las nanoemulsiones para correlacionarlas con su estabilidad y probar su uso como antimicrobianos en sistemas modelo. Las propiedades físicas y la estabilidad de las nanoemulsiones de los AEs se muestran en la Tabla III.

7.2.1 Propiedades físicas

En este estudio, se evaluaron los parámetros de color para las nanoemulsiones de AEO, AEC y AEHC, mediante la escala Hunter. Se encontraron altos valores de luminosidad y tendencia a los colores amarillos y verdes (Tabla III). La evaluación de los parámetros de color en las nanoemulsiones fue muy importante ya que se buscaba que el color de las mismas no interfiriera en los análisis microbiológicos al llevar a cabo el análisis de la CMI. El pH es un parámetro muy importante en las nanoemulsiones, ya que un cambio en este valor puede sugerir un cambio en los componentes de la emulsión, lo cual puede afectar su estabilidad (Campelo *et al.*, 2017). De acuerdo a otros estudios, las emulsiones de alimentos generalmente se encuentran en el rango de pH de 2.5 a 7.5, similar a los valores de pH determinados para las nanoemulsiones de AEO, AET y AEHC utilizados en este estudio

(4.64-5.04) (McClements, 2005). El pH de la nanoemulsión de AEO fue el más alto, lo que podría afectar su estabilidad, ya que fue la nanoemulsión menos estable (Tabla IV). De acuerdo a la estabilidad de las emulsiones, se ha observado que cuando la fase continua es más viscosa, el proceso de cremado es más lento (Salager, 2000). En este estudio, la viscosidad de las nanoemulsiones fue aproximadamente de 0.018 P. Generalmente, la viscosidad de las emulsiones está vinculada a la viscosidad de la fase continua (McClements, 2005). No se encontró diferencia significativa ($P>0.05$) entre la viscosidad del AEO, AET y AEHC en este estudio (Tabla III) posiblemente debido al bajo contenido de AE presente en la nanoemulsión (5%). La densidad es un parámetro muy importante para la estabilidad de las emulsiones (McClements, 1999). Si la fase continua y dispersa tienen densidades muy diferentes, se puede producir el proceso indeseable de cremado (Salager, 2000). En el presente estudio, los valores de densidad para las nanoemulsiones de AEO, AET y AEGC fueron similares (Tabla III) con un valor promedio de 1.033 g/cm^3 . No se encontró diferencia significativa ($P>0.05$) en los valores de densidad de las nanoemulsiones AEO, AET y AEHC, posiblemente debido a su bajo contenido de AE (5%).

7.2.2 *Eficiencia de encapsulación*

El cálculo de este parámetro es muy importante ya que evalúa la retención de aceite en la cápsula (Jafari *et al.*, 2008.). En este estudio, la EE fue calculada en un rango de 76.2 a 96.7% (Tabla III). La nanoemulsión de AEHC presentó los más altos valores de EE. Un pequeño tamaño de partícula en combinación con una alta EE podría explicar una mayor estabilidad de las nanoemulsiones de AET y AEHC, en comparación con la nanoemulsión de AEO.

7.2.3 *Estabilidad*

En este estudio, las nanoemulsiones más estables fueron las de AEO y AEHC, ya que no se observaron cambios visibles durante el periodo de observación de 28 días (Tabla IV). La nanoemulsión de AEO mostró los primeros signos de cremado con la presencia de gotas de AE en la superficie de la nanoemulsión desde el día 7. Al final del periodo de observación, la nanoemulsión presentaba entre 14 y 16 gotas de AE disperso en la superficie, sin presentar una separación total de fases. El tamaño de partícula es un parámetro crítico en la determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones (McClements y Rao, 2011). Un muy

pequeño tamaño de partícula de 116.4 a 232.5 nm (D_{50}) fue determinado para las nanoemulsiones en el presente estudio (Figura 1); siendo el menor tamaño correspondiente a la nanoemulsión de AEHC. La mejor descripción de una emulsión es a través de su distribución de tamaño de partícula, lo cual provee estadísticamente una idea de la fragmentación de la fase dispersa (Salager, 2000). Al disminuir el promedio del tamaño de las gotas se puede prevenir o minimizar el cremado (Barbosa-Canovas, 2009). En este estudio, la mayor estabilidad de la nanoemulsión de AEHC, se puede deber a que tiene el menor valor de tamaño de partícula (Figura 1, Tabla III y IV).

Tabla III. Propiedades físicas y estabilidad de las nanoemulsiones de los aceites esenciales

Propiedad	AEO	AET	AEHC
Color			
L	80.530±0.390 ^b	81.750 ±0.280 ^a	81.820±0.300 ^a
a	-0.750±0.010 ^b	-0.710±0.010 ^c	-0.780±0.010 ^a
b	1.130±0.010 ^a	0.550±0.010 ^c	1.010±0.010 ^b
pH	5.040±0.010 ^a	4.730±0.040 ^b	4.640±0.010 ^c
Viscosidad (P)	0.018±0.002 ^a	0.018±0.002 ^a	0.018±0.003 ^a
Densidad (kg/L)	1.034±0.021 ^a	1.032±0.010 ^a	1.034±0.032 ^a
D_{10} (μm)	174.600±0.058 ^a	97.700±0.045 ^b	90.800±0.057 ^c
D_{50} (μm)	232.500±0.058 ^a	130.800±0.045 ^b	116.400±0.057 ^c
D_{90} (μm)	343.000±0.058 ^a	237.800±0.045 ^c	301.000±0.057 ^b
EE (%)	76.243±0.001 ^c	92.182±0.001 ^b	96.709±0.001 ^a

AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo y AEHC: aceite esencial de hojas de clavo

EE: Eficiencia de encapsulación

Letras diferentes en la misma fila significan diferencias significativas ($p < 0.05$)

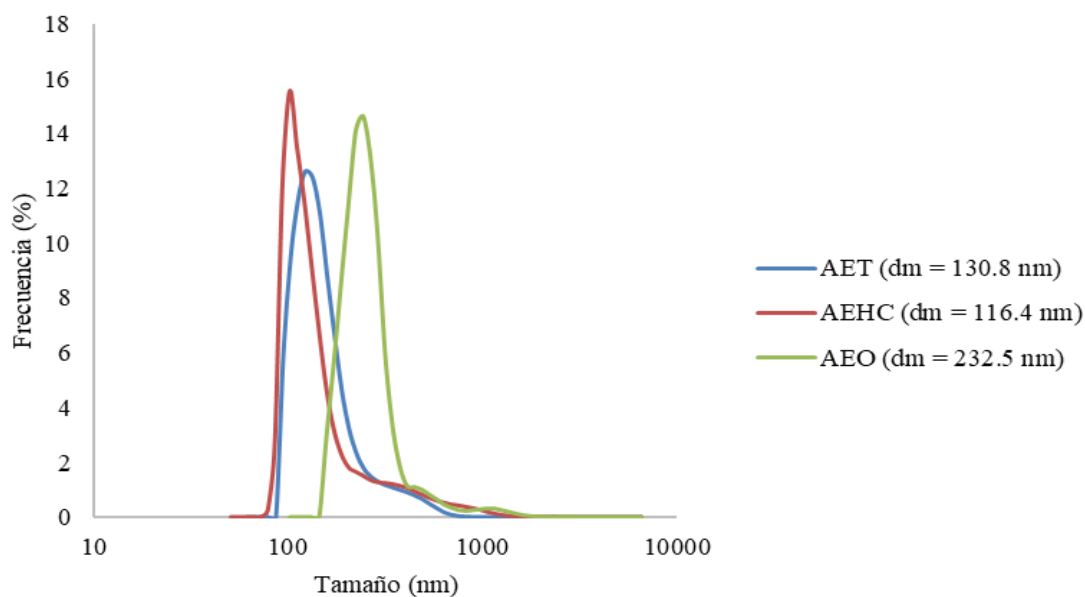
Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado

Tabla IV. Estabilidad de las nanoemulsiones de los aceites esenciales durante su almacenamiento a 23°C

Nanoemulsiones	Periodo de observación (días)			
	7	14	21	28
AEO	Se observaron de 4-7 gotas de aceite en la superficie, sin una separación de fase total	Se observaron de 8-10 gotas de aceite en la superficie, sin una separación de fase total	Se observaron de 12-14 gotas de aceite dispersas en la superficie, sin una separación de fase total	Se observaron de 14-16 gotas de aceite dispersas en la superficie, sin una separación de fase total
AET	nc	nc	nc	nc
AEHC	nc	nc	nc	nc

AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo, AEHC: aceite esencial de hojas de clavo y nc: no cambios visibles

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado



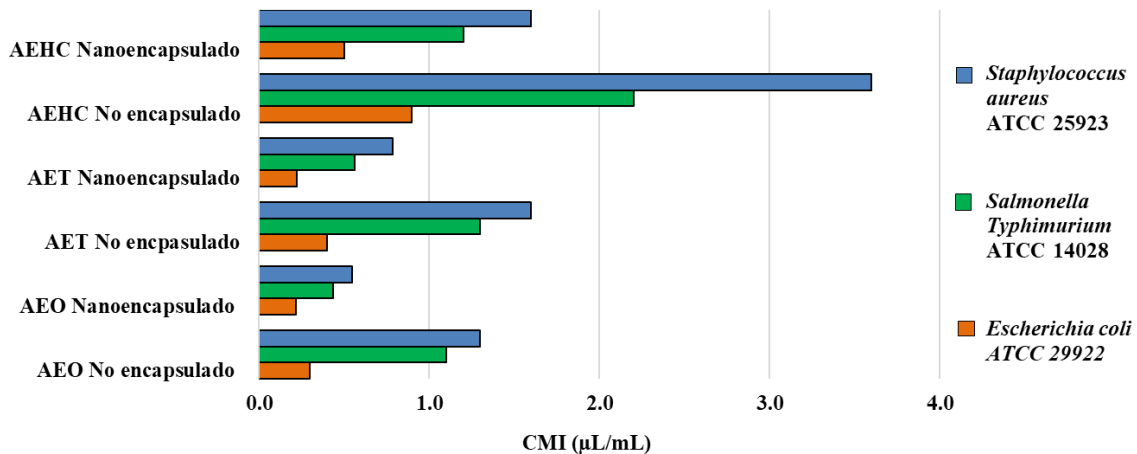
AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo, AEHC: aceite esencial de hojas de clavo y dm: diámetro medio

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado

Figura 1. Tamaño de gota de las nanoemulsiones

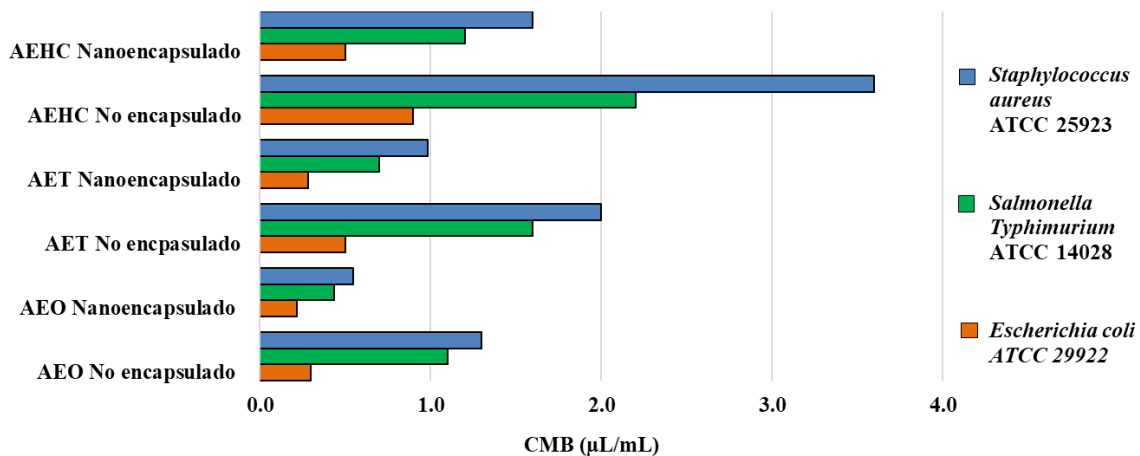
7.3 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y nanoemulsiones (10% de sólidos) en sistemas modelo

La actividad antimicrobiana de los AEs depende principalmente de tres factores que son sus componentes químicos, el tipo de microorganismo contra el que actúan y sus características hidrofílicas/hidrofóbicas (López-Malo *et al.*, 2006; Fisher y Phillips, 2008). Mediante la caracterización química de los AEs se observaron los compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana para AEO (60.76% de carvacrol), para AET (30.76% de timol) y para AEHC (25.72% de eugenol). Resultados de otros estudios (Delaquis, 2002) han mostrado que los compuestos fenólicos son los compuestos químicos responsables de las propiedades antimicrobianas de los AEs. Los compuestos químicos de los AEs actúan alterando la estructura de la membrana citoplasmática de los microorganismos, inhibiendo el transporte de electrones o actuando como potenciales agentes desnaturalizantes de proteínas, solventes y deshidratadores (Hernández-Hernández *et al.*, 2014). En la evaluación de la actividad antimicrobiana de los tres AEs, la mayor actividad antimicrobiana se observó para el AEO no encapsulado y encapsulado, ya que se observaron los valores más bajos de CMI y CMB contra las cepas bacterianas estudiadas (*E. coli*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*), en comparación con el AET y AEHC no encapsulados y nanoencapsulados (Figuras 2 y 3). Estos resultados pueden deberse al alto contenido de carvacrol (60.76%) en el AEO evaluado. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con otros estudios (Fisher y Phillips, 2008), los cuales reportan que el AEO es uno de los AEs más efectivos para el control antimicrobiano; sus compuestos fenólicos tienen la habilidad de alterar la membrana celular externa, lo que provoca la fuga de protones e iones de potasio, provocando el colapso de la membrana y la inhibición de la síntesis de ATP. En contraste, se observó que el AEHC (no encapsulado y nanoencapsulado) fue el AE menos efectivo, ya que se observaron los más altos valores de la CMI y CMB, contra los microorganismos probados. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en otros estudios (Rodríguez-García *et al.*, 2015), en los que se muestra la actividad antimicrobiana de los AEs en el siguiente orden orégano> flor de clavo> cilantro> canela> tomillo> menta> romero> mostaza> cilantro> salvia. Con respecto al tipo de



AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo y AEHC: aceite esencial de hojas de clavo
 Los análisis se llevaron a cabo por triplicado

Figura 2. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (no encapsulados y nanoencapsulados) contra las bacterias estudiadas mediante la concentración mínima inhibitoria



AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo y AEHC: aceite esencial de hojas de clavo
 Los análisis se llevaron a cabo por triplicado

Figura 3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (no encapsulados y nanoencapsulados) contra las bacterias estudiadas mediante la concentración mínima bactericida

microorganismo contra el que actúan, los AE no encapsulados y encapsulados tuvieron una mayor actividad contra *E. coli*, al mostrar valores de CMI y CMB más bajos. Con base en

los datos de la literatura, la CMI del AEO (*Origanum vulgare*) contra *S. Typhimurium* se observó en el rango de 0.12-3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Boskovic *et al.*, 2015) y la CMI de AEO (*Origanum compactum*) contra *E. coli* y *S. aureus* se observó en 0.625 y 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente (Ouedrhiri *et al.*, 2016). Además, la CMI de AET (*Thymus vulgaris*) contra *S. Typhimurium* se observó en el rango de 0,45-7,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Boskovic *et al.*, 2015) y la CMI de AET (*T. serpyllum*) contra *S. aureus* se observó en 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Ouedrhiri *et al.*, 2016). Los resultados del presente estudio fueron similares a los resultados reportados por otros autores; sin embargo, la composición de los AEs depende de varios factores incluyendo las temporadas de cosecha y los factores geográficos. Lo cual puede explicar las diferencias en los resultados de los diferentes estudios (Boskovic *et al.*, 2015). Algunos estudios han documentado que los componentes de los AEs tienen un mayor efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-negativas (Moraes-Lovison *et al.*, 2016). En el presente estudio, se encontró una gran resistencia de *S. aureus* contra los AEs no encapsulados y nanoencapsulados, en comparación con *E. coli* y *S. Typhimurium* (Figuras 2 y 3). En este estudio, se detectó una mayor resistencia a los AEs para *S. Typhimurium*, en comparación con la detectada para en *E. coli*. En este estudio se observó una disminución de la CMI del 27 al 60% para los AEs nanoencapsulados, en comparación con los AEs no encapsulados. Mediante la caracterización de los AE nanoencapsulados, se detectaron tamaños de partícula muy pequeños de 116.4-232.5 nm (D_{50}) (Tabla III), lo que facilitó su fácil difusión en los medios, como lo muestran otros estudios (Weiss *et al.*, 2009).

7.4 Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de nanoemulsiones (10% de sólidos) en sistemas modelo

La obtención de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET probadas individualmente, contra *S. aureus* y *E. coli*, en sistemas modelo de CST, se llevó a cabo anteriormente (Ruíz-González *et al.*, 2019) (Figura 2), los valores obtenidos fueron de 0.218 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la nanoemulsión de AEO y 0.224 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la nanoemulsión de AET, contra *E. coli* y de 0.546 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la nanoemulsión de AEO y 0.786 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la nanoemulsión de AET, contra *S. aureus*.

Una vez conociendo la CMI de las nanoemulsiones probadas individualmente contra los microorganismos de interés, se evaluó el efecto de las mezclas de las nanoemulsiones de acuerdo a un diseño de tablero de ajedrez, en el cual las concentraciones de las nanoemulsiones fueron calculadas con base a la CMI individual en diferentes proporciones. La Tabla V, muestra los porcentajes de la CMI de las nanoemulsiones evaluados, los valores del índice de las concentraciones fraccionales inhibitorias (índice CFI) correspondientes para las mezclas de las nanoemulsiones y el efecto de la mezcla de las nanoemulsiones sobre la respuesta bacteriana “crece o no crece”.

Los resultados de los valores de los índices CFI, mostraron efecto aditivo contra *S. aureus* y *E. coli*, al mezclar diferentes proporciones de las nanoemulsiones de AEO y AET (índice CFI=1.00), inhibiendo el crecimiento de estos microorganismos. El efecto aditivo obtenido para la mezcla de las nanoemulsiones de AEO y AET se puede deber a que la composición química de los AEs es similar (Tabla I), lo que concuerda con algunos autores quienes han reportado que generalmente los compuestos con estructuras similares exhiben un efecto aditivo en lugar de sinérgico (Bassolé y Juliani, 2012). Otros autores han mencionado que la interacción aditiva de algunos AEs se ha relacionado con sus principales compuestos fenólicos (carvacrol y timol) (Bajpai, Baek y Baek, 2012).

Aunque no se encontraron estudios sobre mezclas de nanoemulsiones, algunos autores han reportado efecto aditivo contra *S. aureus* y *E. coli* al mezclar timol y carvacrol (Lambert, Skandamis, Coote y Nychas, 2001). Sin embargo, se ha observado efecto sinérgico contra *E. coli*, para otras mezclas de componentes como timol y eugenol o carvacrol y eugenol (Pei, Zhou, Ji y Xu, 2009). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, ya que el timol y el carvacrol son los principales componentes del AEO y AET (Tabla I).

Generalmente se requieren concentraciones altas de AEs al aplicarse individualmente, por lo que es importante desarrollar mezclas de los AEs que mantengan la seguridad del producto y la vida útil, minimizando los cambios sensoriales asociados con la adición de altas concentraciones de los AEs (Gutierrez, Barry-Ryan y Bourke. 2008). El uso de nanoemulsiones de los AEs, en lugar de utilizar los AEs puros, puede reducir la CMI contra

los microorganismos de interés (Ruíz-González *et al.*, 2019) y si además se encuentran mezclas sinérgicas de las nanoemulsiones de los AEs, se puede reducir aún más la dosis de AE presente en el producto final, lo que sería favorable en cuanto a sus características sensoriales.

Tabla V. Efecto de las mezclas de las nanoemulsiones de aceite esencial de orégano y aceite esencial de tomillo sobre las bacterias estudiadas de acuerdo a las proporciones de la concentración mínima inhibitoria y el índice de las concentraciones fraccionales inhibitorias correspondientes

% de la CMI		<i>S. aureus</i>	índice CFI	<i>E. coli</i>	índice CFI
NAEO	NAET				
0	0	C		C	
	25	C		C	
	50	C		C	
	75	C		C	
	100	NC		NC	
25	0	C		C	
	25	C		C	
	50	C		C	
	75	NC	1.00	NC	1.00
	100	NC		NC	
50	0	C		C	
	25	C		C	
	50	NC	1.00	NC	1.00
	75	NC		NC	
	100	NC		NC	
75	0	C		C	
	25	NC	1.00	NC	1.00
	50	NC		NC	
	75	NC		NC	
	100	NC		NC	
100	0	NC		NC	
	25	NC		NC	
	50	NC		NC	
	75	NC		NC	
	100	NC		NC	

CMI: concentración mínima inhibitoria, NAEO: nanoemulsión de aceite esencial de orégano, NAET: nanoemulsión de aceite esencial de tomillo, Índice CFI: índice de concentración fraccional inhibitoria, C: crece, NC: no crece

Aunque se obtuvieron mezclas de las nanoemulsiones de AEO y AET con carácter aditivo, se pueden utilizar para el control del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. El uso de las mezclas aditivas de las nanoemulsiones de AEO y AET, podría tener un efecto positivo en cuanto a la reducción de costos, ya que la cantidad requerida de cada AE presente en la nanoemulsión es menor que si se añadiera la nanoemulsión con el aceite esencial de manera individual.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, las nanoemulsiones de AEO y AET, así como una mezcla binaria de las mismas (50-50% de la CMI) fueron aplicadas en jugo de jitomate y jugo verde, para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, el cual resultó ser el microorganismo más resistente en sistemas modelo.

7.5 Actividad antimicrobiana de nanoemulsiones (10 % de sólidos) y de una mezcla binaria en jugo verde y jugo de jitomate

Los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) en frutas enlatadas, jugos de frutas y productos similares, se usan comúnmente como un término conveniente para expresar el porcentaje en peso de todos los sólidos solubles en solución. Se han reportado valores de $^{\circ}\text{Bx}$ para distintos tipos de jugos de frutas y verduras comerciales (3.1 a 22 $^{\circ}\text{Bx}$) (USDA, 2013). Estos valores concuerdan con los valores reportados en este estudio para jugo de jitomate (5.47 ± 0.06 $^{\circ}\text{Bx}$) y para jugo verde (11.43 ± 0.06 $^{\circ}\text{Bx}$). Por otro lado, el valor de pH en jugos de frutas y verduras es un parámetro muy importante ya que está relacionado con su estabilidad microbiológica, dado que dichos alimentos pueden ser vehículos de microorganismos patógenos y causantes de deterioro. En general las frutas y jugos de frutas tienen un pH bajo (2.0-4.5), dado su alto contenido de ácidos orgánicos (Dewanti-Hariyadi, 2013). En este estudio, se obtuvieron valores similares para jugo de jitomate (3.51 ± 0.01) y jugo verde (3.71 ± 0.01). Otro parámetro importante de la caracterización de jugos es la a_w , la cual hace referencia a la cantidad de agua libre que está disponible en los alimentos para el crecimiento microbiano. Se han reportado algunos valores de a_w para jugos de frutas (0.984) (Mathlouthi, 2001), que son cercanos a los obtenidos en este estudio para jugo de jitomate (0.992 ± 0.003) y jugo verde (0.988 ± 0.001). La viscosidad de un fluido es una medida de su resistencia a las deformaciones graduales. En algunos alimentos como los jugos, este atributo es importante ya que define la aceptación por parte del consumidor. Algunos autores han reportado valores de viscosidad para jugos de fruta en

el rango de 51-350 mPa (Kim, Yoo y Yoo, 2014), lo cual concuerda con los datos reportados en este estudio para jugo de jitomate (200.00 ± 0.01 mPa) y jugo verde (80 ± 0.00 mPa). Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los jugos se muestran en la Tabla VI.

Por otro lado, se calcularon las CMI de las nanoemulsiones y se evaluó el comportamiento de una mezcla binaria (50-50% de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET). En este estudio, se observó que las CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET contra *S. aureus*, al ser aplicadas en jugo verde y jugo de jitomate, tuvieron un valor de $0.450 \mu\text{L}/\text{mL}$ y $825 \mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente. Algunos autores han mencionado que la actividad antimicrobiana de los AE en alimentos puede ser diferente a la obtenida en sistemas modelo, debido a la interacción de los componentes de los alimentos (Burt, 2004). Como se puede observar en la Tabla V, los valores obtenidos son parecidos a los que se obtuvieron en sistemas modelo ($0.546 \mu\text{L}/\text{mL}$ para la nanoemulsión de AEO y $0.786 \mu\text{L}/\text{mL}$ para la nanoemulsión de AET) (Ruíz-González *et al.*, 2019). Con la finalidad de descartar el efecto de la matriz, relacionada principalmente al pH ácido de los jugos, se analizó un control. Algunos autores han reportado que los jugos de fruta tienen un pH en el rango ácido, lo que funciona como una barrera para el crecimiento microbiano. Sin embargo, los patógenos de los alimentos algunas veces pueden sobrevivir a estos ambientes (Aneja, Dhiman, Aggarwal, Kumar y Kaur, 2014).

Tabla VI. Caracterización fisicoquímica de jugo verde y jugo de jitomate

Propiedad	Jugo de jiomate	Jugo verde
$^{\circ}\text{Bx}$	$5.467 \pm 0.058^{\text{a}}$	$11.433 \pm 0.058^{\text{b}}$
pH	$3.517 \pm 0.012^{\text{a}}$	$3.707 \pm 0.006^{\text{b}}$
a_{w}	$0.992 \pm 0.003^{\text{a}}$	$0.988 \pm 0.001^{\text{b}}$
Viscosidad (mPa)	$200.000 \pm 0.000^{\text{a}}$	$80.000 \pm 0.000^{\text{b}}$

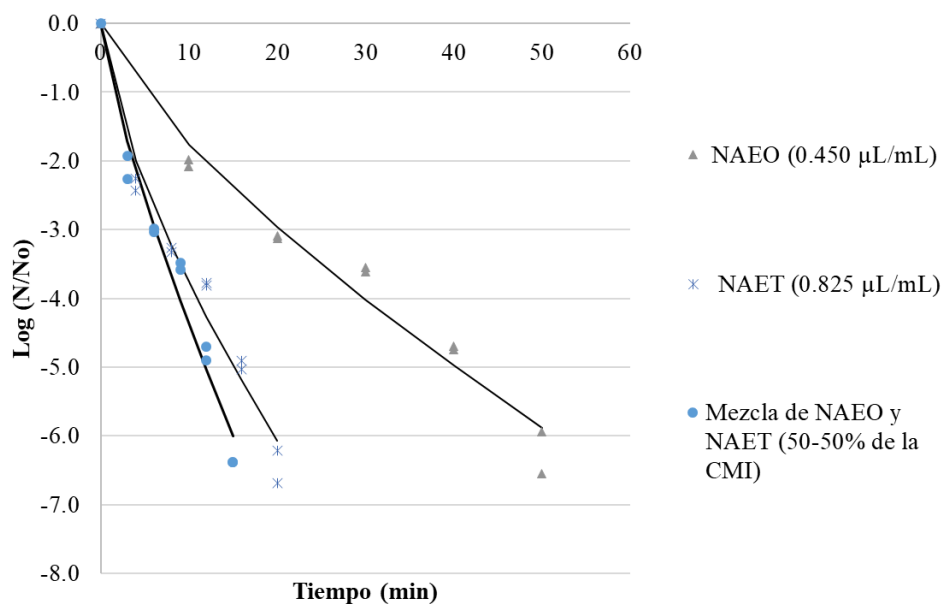
Las mediciones se hicieron por triplicado.

Diferentes letras en la misma fila significan diferencias significativas ($p < 0.05$).

El control microbiano mostró que el crecimiento de *S. aureus* no se inhibió con el pH ácido de los jugos, ya que a las 24 h se obtuvo un recuento microbiano de 10^6 UFC/mL, correspondiente a la concentración del inóculo inicial. Por otra parte, se evaluó la mezcla binaria (50-50% de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET) observándose que también tiene un comportamiento aditivo contra *S. aureus*, al ser aplicada en jugo verde y jugo de jitomate inhibiendo a *S. aureus*. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos en sistemas modelo (Tabla V).

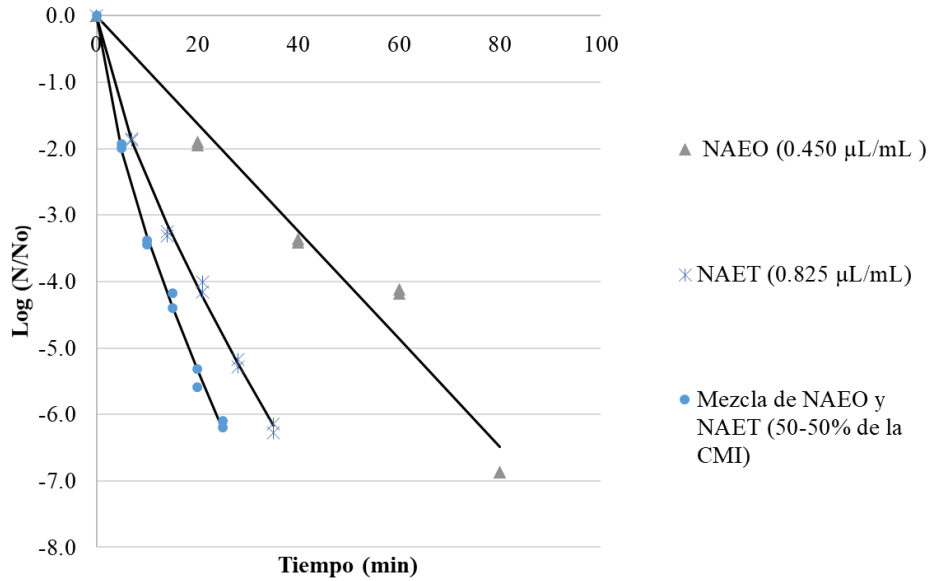
Tomando como base los resultados anteriores, se hicieron las curvas de inhibición contra *S. aureus*, las cuales posteriormente fueron ajustadas mediante el modelo de Weibull. El modelo de Weibull se adapta adecuadamente a las curvas de supervivencia de *S. aureus* inoculadas en jugo verde y jugo de jitomate, a los cuales se les agregó las nanoemulsiones de AEO y AET y una mezcla binaria de las mismas (50-50% de la CMI). Las curvas experimentales se correlacionaron adecuadamente con los datos pronosticados, con R^2 significativo (Tabla VII). De los parámetros del modelo de Weibull, el parámetro “n” o el parámetro de forma indica una concavidad hacia arriba (ascendente), siendo <1 para las curvas de inhibición que se analizaron (Tabla VII y Figuras 4 y 5). Una concavidad ascendente indica que las células que sobreviven podrían adaptarse a los factores de estrés aplicados (Coronel, Jiménez, López-Malo y Palou, 2011). La mayoría de la población microbiana se redujo a los pocos minutos de la aplicación de las nanoemulsiones y los valores de las medias de la distribución de frecuencia de resistencia variaron entre 1.75 y 12.09 min (Tabla VII), lo que indica el efecto de las nanoemulsiones evaluadas sobre la población de microorganismos. En general se obtuvieron valores de varianza bajos, especialmente para el tratamiento formulado con $0.825 \mu\text{L/mL}$ de la nanoemulsión de AET y para el tratamiento formulado con la mezcla binaria (50-50% de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET) en ambos tipos de jugos, indicando que son tratamientos efectivos contra *S. aureus*. Los perfiles de distribución de frecuencia para los tratamientos formulados con la mezcla binaria (50-50% de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET), mostraron distribuciones estrechas y valores de media y varianza bajos (Tabla VII y Figura 6), lo que sugirió que la población de *S. aureus* muestra una sensibilidad uniforme a la aplicación de la mezcla binaria de nanoemulsiones. Con respecto a la diferencia sobre la inhibición microbiana (representados con los parámetros del modelo de Weibull) al aplicar las nanoemulsiones en jugo verde con respecto al de jugo de

jitomate, algunos autores han reportado que la inhibición microbiana producida puede variar debido a las propiedades fisicoquímicas de los alimentos (De Medeiros-Barbosa *et al.*, 2016). Se puede observar en la caracterización de los jugos que sus propiedades fisicoquímicas son diferentes (Tabla VI). Particularmente, la viscosidad del jugo de jitomate (200.00 ± 0.00 mPa) es mayor que la viscosidad del jugo verde (80.00 ± 0.00 mPa), lo cual puede tener un impacto sobre la difusión de la nanoemulsión, resultados similares fueron reportados por otros autores al comparar la variabilidad de las propiedades físicas entre diferentes matrices y su impacto sobre la actividad antimicrobiana de diferentes desinfectantes (Mothershaw y Jaffer, 2004).



NAEO: nanoemulsión de aceite esencial de orégano, NAET: nanoemulsión de aceite esencial de tomillo,
 CMI: concentración mínima inhibitoria
 Los análisis se hicieron por duplicado

Figura 4. Curvas de inhibición de *Staphylococcus aureus* en jugo verde (puntos). Las curvas de predicción se ajustaron con el modelo de Weibull (líneas)



NAEO: nanoemulsión de aceite esencial de orégano, NAET: nanoemulsión de aceite esencial de tomillo, CMI: concentración mínima inhibitoria
 Los análisis se hicieron por duplicado

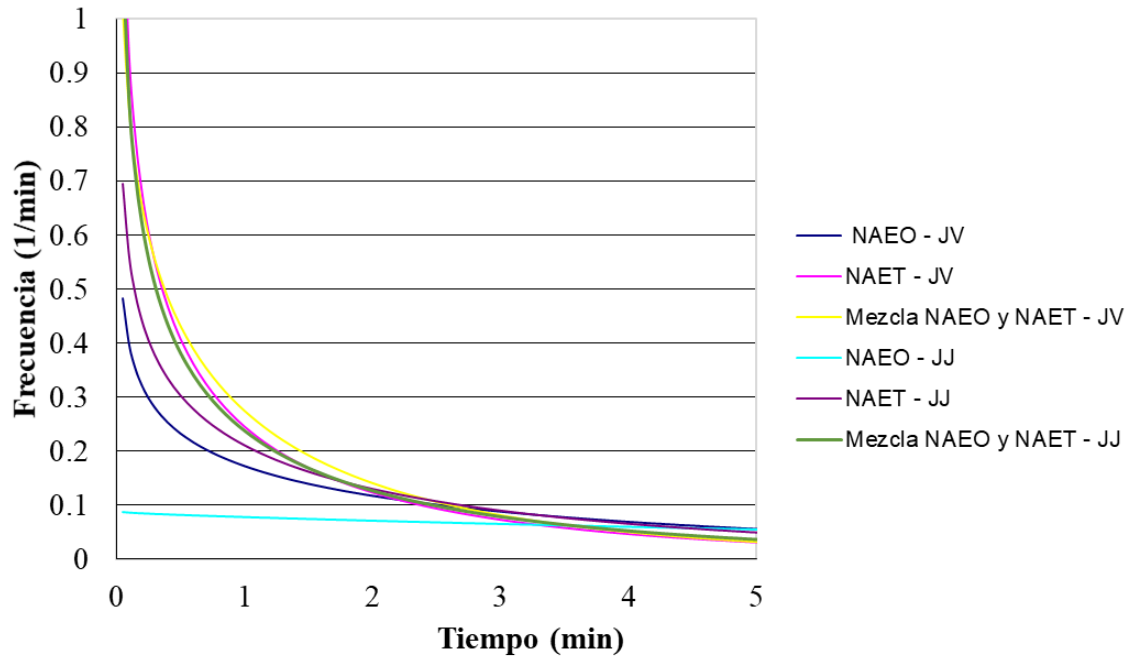
Figura 5. Curvas de inhibición de *Staphylococcus aureus* en jugo de jitomate (puntos). Las curvas de predicción se ajustaron con el modelo de Weibull (líneas)

Tabla VII. Parámetros del modelo de Weibull correspondientes a la inhibición de *Staphylococcus aureus* en jugo verde y jugo de jitomate

Tratamiento	<i>b</i>	<i>n</i>	R ²	Media (min)	Moda (min)	Varianza (min ²)	Coefficiente de sesgo (-)
NAEO - JV	0.314	0.749	0.985	5.59	--	57.38	3.14
NAET - JV	0.770	0.689	0.975	1.88	--	7.83	3.63
Mezcla de NAEO y NAET - JV	0.723	0.781	0.989	1.75	--	5.1	2.94
NAEO - JJ	0.081	0.999	0.999	12.09	--	149.28	2.15
NAET - JJ	0.450	0.736	0.983	3.58	--	24.41	3.23
Mezcla de NAEO y NAET - JJ	0.676	0.689	0.975	2.27	--	11.4	3.62

NAEO: nanoemulsión de aceite esencial de orégano, NAET: nanoemulsión de aceite esencial de tomillo, JV: jugo verde y JJ: jugo de jitomate

Los análisis se hicieron por duplicado



NAEO: nanoemulsión de aceite esencial de orégano, NAET: nanoemulsión de aceite esencial de tomillo, JV: jugo verde y JJ: jugo de jitomate
 Los análisis se hicieron por duplicado

Figura 6. Distribución de frecuencias de las resistencias de *Staphylococcus aureus* en jugo verde y jugo de jitomate.

7.6 Caracterización de nanoemulsiones (20% de sólidos) para su secado por atomización

7.6.1 Propiedades físicas

Se obtuvieron los valores de los parámetros de color en escala Hunter para las nanoemulsiones de AEO y AET. Se observaron altos valores de luminosidad y tendencia a los colores amarillo y verde (Tabla VIII). Por otro lado, la densidad es un parámetro muy importante para la estabilidad de las emulsiones (McClements, 1999). Si la fase continua y dispersa tienen densidades muy diferentes, existe una gran presión en las gotas de la fase dispersa, lo que da lugar a un proceso de separación de fases llamado cremado (Salager,

2000). Para las nanoemulsiones de AEO y AET, se obtuvieron valores de densidad de aproximadamente 1.08 Kg/L y no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de densidad de dichas nanoemulsiones. En este estudio, se obtuvo una alta viscosidad para las nanoemulsiones de AEO (15.12 ± 0.02 cP). Con respecto a la estabilidad de las emulsiones, se ha observado que una fase continua más viscosa permite que el proceso de cremado sea más lento (Salager, 2000). Generalmente, la viscosidad de las emulsiones está determinada entre otros factores, por la viscosidad de la fase continua (McClements, 2005). Sin embargo, en este estudio, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de viscosidad de las nanoemulsiones de AEO y AET. El tamaño de gota tiene una gran importancia al determinar la estabilidad de las emulsiones a largo plazo (McClements y Rao, 2011). Se observó un tamaño de gota pequeño en las nanoemulsiones evaluadas, en el rango de 259.40 a 667.00 nm (D50); el tamaño de partícula más pequeño fue obtenido por la nanoemulsión de AET, lo cual puede representar una mayor estabilidad en comparación con la nanoemulsión de AEO. La mejor descripción de una emulsión es a través de su distribución de tamaño de partícula (Salager, 2000). La reducción del tamaño promedio del tamaño de gota puede prevenir o minimizar el proceso de cremado (Barbosa-Cánovas, 2009).

7.7 Caracterización de polvos

7.7.1 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas y la eficiencia de encapsulación de los polvos de AEO y AET, se muestran en la Tabla IX. El rendimiento es un parámetro muy importante que debe ser monitoreado para determinar la eficiencia del proceso de secado por atomización y está en función de las condiciones de secado, condiciones ambientales, así como la cantidad y tipo de agentes encapsulantes y el material del núcleo utilizado (Cai y Corke, 2000). Para los polvos de AEO el mayor rendimiento ($83.62 \pm 0.00\%$) fue obtenido a 160°C y 10 g/min, mientras que para los polvos de AET el mayor rendimiento ($84.92 \pm 0.00\%$) fue obtenido a 180°C y 10 g/min. En este estudio, se observó para todos los sistemas, que altos rendimientos fueron obtenidos a altos flujos (10 g/min), lo cual se puede deber a una menor permanencia de la nanoemulsión en la cámara de secado. Otros autores han obtenido resultados similares de rendimiento (86.73%) cuando secaron aceites de sésamo utilizando el secado por atomización (Onsaard, Putthanimon, Singthong y Thammarutwasik, 2018).

Tabla VIII. Propiedades físicas y estabilidad de las nanoemulsiones de los aceites esenciales previo al secado por atomización

Propiedad	AEO	AET
Viscosidad (cP)	15.12±0.02 ^a	13.97±0.02 ^b
Densidad (Kg/L)	1.08±0.00 ^a	1.07±0.00 ^a
Color		
L	68.72±0.32 ^a	93.42±0.23 ^b
a	-1.73±0.02 ^a	-0.63±0.00 ^b
b	5.98±0.03 ^a	4.20±0.02 ^b
Tamaño de gota (nm)		
D ₁₀	490.00±1.48 ^a	169.10±1.20 ^b
D ₅₀	667.00±1.48 ^a	259.40±1.20 ^b
D ₉₀	4560.00±1.48 ^a	3930.00±1.20 ^b

AEO: aceite esencial de orégano y AET: aceite esencial de tomillo

Diferentes letras en diferentes columnas, significan diferencia significativa (p<0.05)

Las mediciones fueron hechas por triplicado

Por otro lado, es necesario conocer la cantidad de humedad y actividad de agua para los diferentes sistemas secados por atomización, ya que pueden inducir el proceso de oxidación de los lípidos y con ello la pérdida de las propiedades fisicoquímicas de los polvos (Basu, Shivhare y Mujumdar, 2006). En este estudio, todos los sistemas mostraron valores de humedad en el rango de 1.40 a 2.79%, lo cual no excede el límite especificado por la industria de alimentos (3-4%) (Campos *et al.*, 2014). Algunos autores han obtenido valores de contenido de humedad de 2.33 - 4.84% al encapsular aceite de pescado y 1.11-1.65% cuando encapsularon aceite de linaza mediante el secado por atomización (Aghbashlo, Mobli, Rafiee y Madadlou, 2012). En este estudio, se observó para todos los sistemas, que altos valores de humedad fueron obtenidos a altos flujos (10 g/min), lo que puede deberse a una menor tasa de evaporación de agua en la superficie de la gota durante el proceso de secado. Por otro lado, todos los sistemas mostraron valores de actividad de agua menores a 0.3. Algunos autores reportaron que, en alimentos secos, con bajos niveles de humedad (aproximadamente 0.3), la oxidación de lípidos se puede retardar reduciendo la catálisis de metales, apagando los radicales libres, promoviendo el pardeamiento no enzimático e impidiendo el acceso al oxígeno (Nawar, 1997).

La densidad de bulto está influenciada por la interacción entre la concentración del material encapsulante, la temperatura de entrada, el flujo de alimentación y la temperatura del aire (Fernandes, Borges y Botrel, 2013). La densidad de bulto ($0.28-0.36 \text{ g/cm}^3$) obtenida para todos los sistemas de AEO y AET concuerda con los valores reportados en la literatura ($0.25-0.36 \text{ g/cm}^3$) (Fernandes *et al.*, 2013). El incremento en la temperatura de secado del aire puede causar una disminución en la densidad de bulto, ya que hay una mayor tendencia a la formación de partículas huecas (Walton, 2000), lo cual se observa en los resultados obtenidos para el AEO y AET microencapsulados, al ser secados a 180°C . Por otro lado, la densidad compactada es un factor muy importante que se relaciona con el empaque, transporte y comercialización de polvos (Finney, Buffo y Reineccius, 2006). Los valores obtenidos de densidad de bulto ($0.42-0.54 \text{ g/cm}^3$) para todos los sistemas de AEO y AET son cercanos a los reportados en la literatura (0.41 g/cm^3) (De Barros, Vilela, Alvarenga y Rodríguez, 2014). Una vez que la densidad de bulto y la densidad compactada fueron obtenidas, se evaluaron otros parámetros para predecir el comportamiento de los polvos. El índice de Carr obtenido para los polvos de AEO secados a $180^\circ\text{C} - 5 \text{ g/min}$, $180^\circ\text{C} - 10 \text{ g/min}$ y $160^\circ\text{C} - 10 \text{ g/min}$, estuvieron en el rango de 20 – 35%, por lo tanto, su capacidad de flujo se considera justa, mientras que para otros sistemas de AEO y AET la capacidad de flujo fue considerada mala o muy mala (Carr, 1965). Por otro lado, el cociente de Hausner (1.49-1.83) obtenido por todos los sistemas de AEO y AET fue mayor a 1.4, por lo tanto, las muestras son consideradas como polvos altamente cohesivos (Hausner, 1967), siendo los más cohesivos los polvos de AET. Las propiedades de flujo de los polvos se pueden relacionar con su tamaño de partícula. Algunos autores han observado que al disminuir el tamaño de partícula de los polvos su cohesividad se incrementa (Jinapong, Suphantharika y Jamnong, 2008), lo cual sucedió con los polvos de AET al tener un menor tamaño ($4.1\mu\text{m}$).

De acuerdo con la literatura, el tamaño de partícula de las microcápsulas producidas depende de la naturaleza del compuesto activo, de las propiedades del material de encapsulación y de las condiciones de operación del secador por atomización (Jafari *et al.*, 2008). Los valores de tamaño de partícula obtenidos por todos los sistemas tienen un valor cercano a lo reportado por la literatura ($5-15 \mu\text{m}$) para varios sistemas secados por atomización (Kurozawa, Morassi, Vanzo, Park y Hubinger, 2009). El polvo de AEO con el menor tamaño de partícula ($4.84\pm 0.03 \mu\text{m}$) fue obtenido a 180°C y 5 g/min . Por otro lado, se observó un pequeño tamaño

de partícula para los polvos de AET (4.1 μm), lo cual se puede deber a la naturaleza del compuesto activo, ya que el menor tamaño de partícula también fue observado en las nanoemulsiones de AET antes del proceso de secado. Algunos autores han reportado que pequeños tamaños de partícula, representan una mayor área superficial, por lo que la tendencia a ganar humedad es baja, lo cual representa una mayor estabilidad para los polvos (Kurozawa *et al.*, 2009), por lo tanto, los polvos de AET tenderán a sea más estables, ya que tienen un menor tamaño de partícula.

7.7.2 Eficiencia de encapsulación

Uno de los parámetros de calidad más importantes en la encapsulación de AEs es la EE, definida como el porcentaje de aceite que se encapsula (De Barros *et al.*, 2014). De acuerdo con otros autores, la EE se ve afectada por las condiciones de secado, la emulsión y las características del compuesto bioactivo y las propiedades del material de la pared (Jafari *et al.*, 2008). Algunos autores reportaron valores de EE en el rango de 62-96% (Carneiro, Tonon, Grosso y Hubinger, 2013), los cuales son similares a los valores obtenidos en este estudio para todos los sistemas (86.27-91.83%). Por otro lado, los altos valores de EE para los sistemas de AEO fueron obtenidos a las condiciones de secado de 180°C y 5 g/min (89.96 \pm 0.32% y 91.83 \pm 0.00%, para AEO y AET respectivamente). Algunos autores han reportado que, a mayores temperaturas de secado, hay una mayor tasa de evaporación del agua en la superficie de la gota lo cual permite la rápida formación de una membrana semipermeable, resultando en la protección de la liberación de los compuestos bioactivos durante el proceso de secado y como consecuencia una EE mayor (Jafari *et al.*, 2008).

Tabla IX. Propiedades fisicoquímicas y eficiencia de encapsulación de los polvo

AEO				
Propiedad	160 °C - 5 g/min	160 °C - 10 g/min	180 °C - 5 g/min	180 °C - 10 g/min
Rendimiento (%)	79.91±0.00 ^b	83.62±0.00 ^d	79.14±0.00 ^a	81.55±0.00 ^c
Humedad b.s. (%)	2.35±0.05 ^a	2.79±0.06 ^b	2.30±0.12 ^a	2.77±0.09 ^b
a _w	0.18±0.00 ^b	0.22±0.00 ^d	0.26±0.00 ^a	0.20±0.00 ^c
Densidad de bulto (g/cm ³)	0.31±0.00 ^b	0.36±0.01 ^c	0.28±0.00 ^a	0.31±0.01 ^b
Densidad compactada (g/cm ³)	0.49±0.01 ^b	0.54±0.01 ^d	0.42±0.01 ^a	0.47±0.01 ^c
Indice de Carr (%)	37.00±0.01 ^b	33.00±0.01 ^a	33.00±0.01 ^a	33.00±0.01 ^a
Cociente de Hausner	1.58±0.01 ^b	1.49±0.01 ^a	1.50±0.01 ^a	1.50±0.01 ^a
Eficiencia de encapsulación (%)	88.12±0.06 ^b	87.15±0.57 ^b	89.96±0.32 ^a	87.66±0.43 ^b
Tamaño de partícula (µm)				
D ₁₀	2.73±0.03 ^a	2.73±0.03 ^a	2.70±0.03 ^a	2.74±0.03 ^a
D ₅₀	5.10±0.03 ^b	5.03±0.03 ^c	4.84±0.03 ^a	5.12±0.03 ^b
D ₉₀	9.79±0.03 ^b	9.59±0.03 ^c	9.23±0.03 ^a	9.79±0.03 ^b
AET				
Propiedad	160 °C - 5 g/min	160 °C - 10 g/min	180 °C - 5 g/min	180 °C - 10 g/min
Rendimiento (%)	83.60±0.00 ^b	83.98±0.00 ^d	81.82±0.00 ^a	84.92±0.00 ^c
Humedad b.s. (%)	1.42±0.01 ^a	1.75±0.06 ^b	1.40±0.02 ^a	1.70±0.06 ^b
a _w	0.15±0.00 ^a	0.18±0.01 ^c	0.15±0.00 ^a	0.21±0.01 ^b
Densidad de bulto (g/cm ³)	0.28±0.00 ^a	0.30±0.00 ^b	0.28±0.00 ^a	0.28±0.00 ^a
Densidad compactada (g/cm ³)	0.52±0.01 ^a	0.50±0.02 ^a	0.51±0.01 ^a	0.50±0.01 ^a
Indice de Carr (%)	45.00±0.01 ^a	44.00±0.01 ^a	45.00±0.01 ^a	39.00±0.01 ^b
Cociente de Hausner	1.82±0.01 ^{ab}	1.80±0.01 ^b	1.83±0.01 ^a	1.65±0.01 ^c
Eficiencia de encapsulación (%)	87.27±0.13 ^b	86.27±0.03 ^c	91.83±0.00 ^a	87.09±0.12 ^b
Tamaño de partícula (µm)				
D ₁₀	2.61±0.02 ^a	2.60±0.02 ^a	2.62±0.02 ^a	2.61±0.02 ^a
D ₅₀	4.13±0.01 ^a	4.15±0.02 ^a	4.18±0.02 ^a	4.17±0.02 ^a
D ₉₀	7.61±0.02 ^b	7.72±0.02 ^a	7.71±0.02 ^a	7.86±0.02 ^c

AEO: aceite esencial de orégano, AET: aceite esencial de tomillo

Diferentes letras en diferentes columnas, significan diferencia significativa (p<0.05)

Las mediciones fueron hechas por triplicado

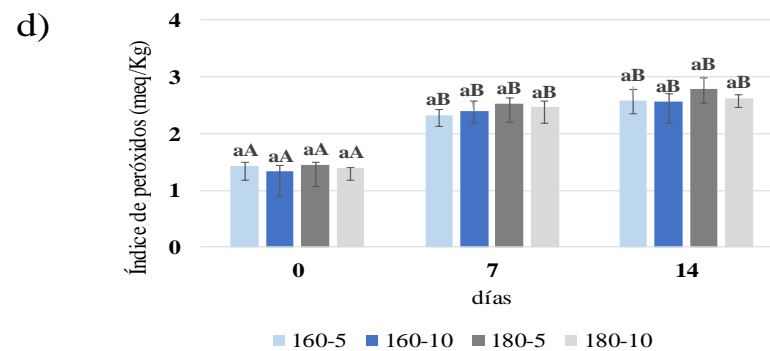
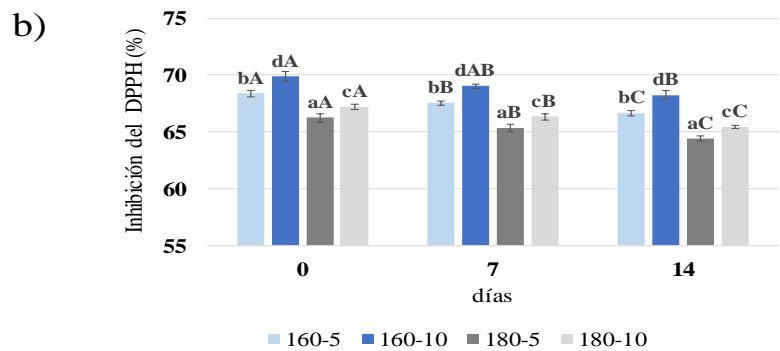
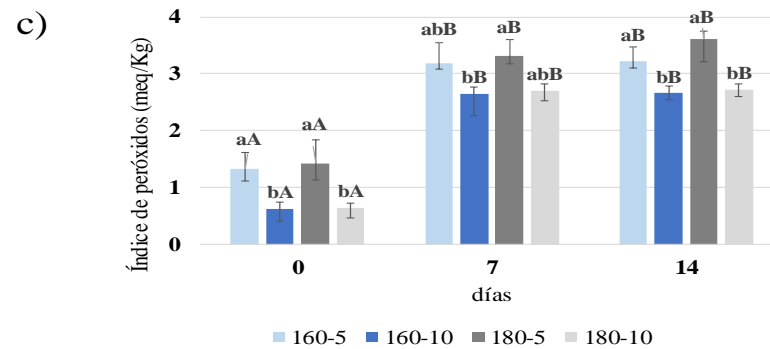
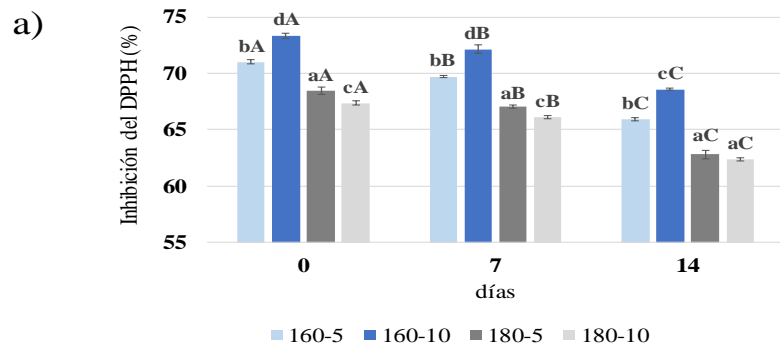
7.8 Propiedades antioxidantes y estabilidad durante el almacenamiento de polvos

Las propiedades antioxidantes y la estabilidad de los polvos de AEO y del AET se muestran en la Figura 7. Algunas especies de radicales con diferente reactividad se forman durante la oxidación de los lípidos. El DPPH es un radical relativamente estable que ha sido usado en la determinación de la actividad antioxidante de varios compuestos, así como de diferentes extractos de plantas (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995). El método fue usado para evaluar la capacidad antioxidante del AEO y AET microencapsulados. Algunos autores reportaron valores de porcentaje de inhibición del radical DPPH en el rango de 39-90% para varios polvos de AEs (Wei y Shibamoto, 2007), los cuales son similares a los valores obtenidos en este estudio para todos los sistemas de AET y AEO (66.22-73.34%). Se reportaron resultados similares en la literatura para polvos de AEO (Kuliscic, Radonic, Katalinic y Milos, 2004). Por otro lado, los polvos de AEO tienen una alta capacidad antioxidante, obteniendo altos valores de porcentaje de inhibición del radical DPPH, para todas las condiciones de secado. Algunos estudios sobre la actividad antioxidante de los AEs de varias plantas aromáticas han reportado que el AEO rico en timol y carvacrol tiene un considerable efecto antioxidante en el proceso de oxidación de los alimentos (Tsimidou y Boskou, 1994). En este estudio, se observó que las mejores condiciones de secado para los polvos de AEO y AET fueron a 160°C y 10 g/min, al obtener los más altos valores del porcentaje de inhibición del radical DPPH (73.34±0.22% y 69.87±0.44% para AEO y AET respectivamente). Estas condiciones de secado fueron suficientes para la formación de una membrana semipermeable, resultando en la protección de las propiedades antioxidantes de los AEs, durante el proceso de secado (Jafari *et al.*, 2008).

Por otro lado, el valor del índice de peróxidos es un indicador muy utilizado para conocer el grado de oxidación de lípidos, grasas y aceites. La oxidación de los lípidos en alimentos es indeseable debido a los sabores desagradables, formación de toxinas y pérdida de vitaminas liposolubles (Dermis, Can y Dogru, 2012). En las muestras se observó un bajo nivel de oxidación, en un rango de 0.63 to 1.44 meq/kg; estos valores están de acuerdo con lo reportado en el Codex Alimentarius (2015) (hasta 10 meq/kg). Por otro lado, se han reportado

valores similares de índice de peróxido para otros AEs secados por atomización (Frascareli, Silva, Tonon y Hubinger, 2012). En este estudio, se observó que los tratamientos que se llevaron a cabo a 160°C y 10 g/min, así como a 180°C y 10 g/min, mostraron los más bajos valores de índice de peróxidos para los polvos de AEO (0.63 ± 0.12 y 0.65 ± 0.08 meq/Kg respectivamente), lo cual se puede deber a la alta capacidad antioxidante de los compuestos del AEO (Tsimidou y Boskou, 1994).

La estabilidad oxidativa del AEO y AET microencapsulados a diferentes condiciones de secado fue evaluada a $45\pm 1^\circ\text{C}$ por 7 y 14 días de almacenamiento. Todos los sistemas de AEO y AET mostraron una mínima disminución del porcentaje de inhibición del radical DPPH al día 7 de almacenamiento, sin embargo, el índice de peróxidos incrementó en general para todos los sistemas. Valores similares de índice de peróxido fueron obtenidos por otros autores al secar aceite de café mediante secado por atomización (Frascareli *et al.*, 2012). En el día 14 de almacenamiento todos los sistemas de AET continuaron mostrando una disminución mínima del porcentaje de inhibición del radical DPPH, en comparación con todos los sistemas de AEO, lo cual se puede deber a que los polvos de AEO se obtuvieron con valores de humedad mayor que los de AET (Tabla IX). El índice de peróxidos permaneció estable del día 7 al día 14 de almacenamiento en todos los sistemas de AEO y AET, los valores obtenidos están de acuerdo con los reportados en la literatura (Codex Alimentarius, 2015). En este estudio, se observó que a las condiciones de secado de 160°C y 10 g/min se obtuvieron los más grandes valores del porcentaje de inhibición del radical DPPH para los polvos de AEO y AET desde el inicio del almacenamiento y hasta 7 días y 14 días después del almacenamiento, respectivamente.



a) Inhibición del DPPH de AEO, b) Inhibición del DPPH de AET, c) Índice de peróxido de AEO, d) Índice de peróxido de AET
 AEO: aceite esencial de oégano and AET: aceite esencial de tomillo
 Diferentes letras minúsculas en las barras, significan una diferencia significatva ($p < 0.05$), entre tratamientos
 Diferentes letras mayúsculas en las barras, significan una diferencia significatva ($p < 0.05$), entre días de almacenamiento
 Las mediciones fueron hechas por triplicado

Figura 7. Estabilidad de las propiedades antioxidantes de los polvos de durante su almacenamiento a $45 \pm 1^\circ\text{C}$

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

Para las pruebas de actividad antimicrobiana en sistemas modelo, el proceso de nanoencapsulación usando emulsificación fue efectivo al preservar los principales componentes del AEO, AET y AEHC. Estos resultados se relacionan con los tamaños de gota pequeños y a la alta eficiencia de encapsulación de los AEs nanoencapsulados preparados mediante ultrasonificación. La actividad antimicrobiana de los AEs depende del tipo de aceite, de su solubilidad y del tipo de cepa bacteriana estudiada. Tanto el AEO no encapsulado, como el nanoencapsulado mostraron una gran actividad antimicrobiana contra las bacterias estudiadas en sistemas modelo, ya que la completa inhibición se llevó a cabo a concentraciones de 0.218-0.300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *E. coli*, 0.437-1.100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *S. Typhimurium* y 0.546- 1.300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *S. aureus*. En general, los AEs nanoencapsulados fueron más efectivos en la inhibición de las cepas bacterianas estudiadas en comparación con los AEs no encapsulados. Las nanoemulsiones producidas en este estudio mostraron una importante actividad antimicrobiana contra las cepas probadas en sistemas modelo. Por otro lado, se observó un comportamiento aditivo para las pruebas de actividad antimicrobiana en sistemas modelo, de las mezclas binarias de las nanoemulsiones de AEO y AET, contra *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, es positivo ya que se pueden disminuir costos, así como mejorar las características sensoriales del producto, al utilizar una cantidad menor de cada AE. En cuanto a las pruebas de actividad antimicrobiana en alimentos, se observó una reducción de la población microbiana de *S. aureus* a los pocos minutos de la aplicación de las nanoemulsiones. Los parámetros del modelo de Weibull indicaron una mayor sensibilidad de *S. aureus* al aplicar la mezcla binaria (50-50% de la CMI de las nanoemulsiones de AEO y AET), respecto a su aplicación de manera individual. Se observó el efecto que tienen las propiedades físicas de los sistemas alimentarios (jugo verde respecto a jugo de jitomate) sobre la actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones. Es importante mencionar que se necesitan más estudios para investigar las interacciones de los AEs aplicados en sistemas de alimentos reales, así como el establecimiento de modelos para la optimización de los efectos antimicrobianos de los AEs. También es necesario establecer cantidades máximas de uso de los AEs para garantizar la seguridad de los alimentos sin efectos desfavorables en las

características sensoriales. Por otro lado, en cuanto a la estabilización de las nanoemulsiones mediante el secado por atomización, fue importante evaluar las propiedades físicas de las nanoemulsiones, para poder establecer las condiciones de secado utilizadas. Se observó para los polvos de los Aes, que los más altos rendimientos fueron obtenidos al más alto flujo de alimentación (10 g/min). En general se obtuvieron altos valores de EE para los polvos en todas las condiciones de secado evaluadas. Los tamaños de partícula, la humedad y la a_w , se observaron dentro de los límites establecidos para polvos en alimentos. De acuerdo a las propiedades de flujo, se obtuvieron polvos cohesivos, lo cual debe ser considerado para futuras aplicaciones. El proceso de microencapsulación usando secado por atomización fue efectivo para proteger las propiedades antioxidantes del AEO y el AET. Las condiciones de secado a 160°C y 10 g/min, preservaron las propiedades antioxidantes del AEO y AET microencapsulados durante el almacenamiento acelerado a 45±1°C. Se observó una disminución mínima del porcentaje de inhibición del DPPH y un aumento mínimo del índice de peróxido durante el almacenamiento acelerado de los AEs microencapsulados. Sería importante para estudios futuros aplicar los polvos obtenidos en este estudio en alimentos, como agentes antioxidantes y antimicrobianos, así como llevar a cabo más estudios para establecer modelos para la optimización de los efectos antioxidantes de los AEs.

8.2 Recomendaciones

- Se recomienda llevar a cabo un análisis sensorial del jugo verde y del jugo de jitomate, para conocer cómo se ven afectadas sus características sensoriales al añadir las nanoemulsiones en las concentraciones requeridas para lograr el efecto antimicrobiano.
- Se recomienda evaluar otros microorganismos patógenos y/o deteriorativos de interés en alimentos.
- Se recomienda aplicar las nanoemulsiones en distintos alimentos de origen vegetal y animal, para conocer el efecto de las propiedades físicas de los sistemas alimentarios, en el potencial de los agentes antimicrobianos.
- Probar otras formas de incorporación de las nanoemulsiones en los alimentos, como esparcido en la superficie del alimento, introducidas como parte de la formulación del

alimento o en líquidos para marinar, entre otros; para conocer el potencial de los agentes antimicrobianos incluidos en las nanoemulsiones.

- Se recomienda aplicar las nanoemulsiones en combinación con otros antimicrobianos naturales o artificiales, para disminuir los posibles efectos negativos de los aceites esenciales en la calidad sensorial de los productos.
- Sería interesante aplicar los polvos y las mezclas de los mismos, como antimicrobianos en sistemas modelo y en alimentos, para comparar su actividad antimicrobiana con la de las nanoemulsiones.

REFERENCIAS

1. Adamiec, J. (2009). Moisture sorption characteristics of peppermint oil microencapsulated by spray drying. *Drying Technology*, 27: 1363-1369.
2. Aghbashlo, M., Mobli, H., Rafiee, S. and Madadlou, A. (2012). Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and exergy efficiencies of fish oil microencapsulation. *Powder Technology*, 225: 107-117. doi: 10.1016/j.powtec.2012.03.040.
3. Ait-Ouazzou, A., Loran, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagan, R. and Conchello, P. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14): 2643-2651. doi:10.1002/jsfa.4505.
4. Alabado-Plaus, E., Saez-Flores, G. and Grabiell-Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12(1):16-19. doi: 10.20453/rmh.v12i1.660.
5. Almeida, A.P., Rodríguez-Rojo, S., Serra, A.T., Vila-Real, H., Simplicio, A.L., Delgadilho, I., Beirao da Costa, S., Beirao da Costa, L., Nogueira, I.D. and Duarte, C.M.M. (2013). Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20:140–145.
6. Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V. and Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science*. 14: 1–7. doi:10.1155/2014/408085.
7. A.O.A.C. Official Method 926.12 - Moisture and volatile matter in oils and fats – vacuum oven method. In: William Horwitz. *Official Methods of Analysis A.O.A.C international*, 17th Edition. Gaithersburg, Md., Association of Official Analytical Chemists, 2000: 1-25.
8. A.O.A.C. Official Method 965.33 - Peroxide value of oil and fats. In: William Horwitz. *Official Methods of Analysis A.O.A.C international*, 19th Edition. Gaithersburg, Md., Association of Official Analytical Chemists, 2012: 1-11.
9. A.O.A.C. Official Method 981.12 - pH of acidified foods. In: William Horwitz. *Official Methods of Analysis A.O.A.C international*, 17th Edition. Gaithersburg, Md., Association of Official Analytical Chemists, 2000: 1-14.
10. A.O.A.C. Official Method 920.141 - Refractive index of lemon and orange oils. In: William Horwitz. *Official Methods of Analysis A.O.A.C international*, 17th Edition. Gaithersburg, Md., Association of Official Analytical Chemists, 2000: 1-25.

11. A.O.A.C. Official Method 932.14 - Solids in sirups. In: William Horwitz. Official Methods of Analysis A.O.A.C international, 16th Edition. U.S., Association of Official Analytical Chemists, 1995.
12. A.O.A.C. Official Method 920.134 - Specific gravity of lemon, orange and lime extracts - pycnometer method. In: William Horwitz. Official Methods of Analysis A.O.A.C international, 17th Edition. Gaithersburg, Md, Association of Official Analytical Chemists, 2000: 1-25.
13. A.O.A.C. Official Method 978.18 - Water activity of canned vegetables. In: William Horwitz. Official Methods of Analysis A.O.A.C international, 16th Edition. U.S., Association of Official Analytical Chemists, 1995.
14. Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E.N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R. and 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.
15. Ayala-Zavala, J.F., Soto-Valdez, H., González-León, A., Álvarez-Parrilla, E., Martín-Belloso, O. and González-Aguilar, G.A. (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 60: 359-368.
16. Bajpai, V.K., Baek, K.H. and Baek, S.C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. Food Research International, 45: 722–734.
17. Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A. and Liang, L. (2015). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(1):143- 182. doi:10.1111/1541-4337.12179.
18. Barbosa-Canovas GV. Food Engineering, Vol. II. EOLSS, USA, 2009:1-334.
19. Bassolé, I.H.N. and Juliani. H.R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Molecules, 17: 3989-4006. doi:10.3390/molecules17043989.
20. Basu, S., Shivhare, U.S. and Mujumdar, A.S. (2006). Models for sorption isotherms for foods: a review. Drying Technology, 4 (8): 917-930. doi: 10.1080/07373930600775979.
21. Beirao da Costa, S., Duarte, C. and Bourbon, A.I. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated oregano essential oil. Journal of Food Engineering, (110)2: 190–199.

22. Bhargava, K. Conti, D.S., Da Roch, S.R.P. and Zhang, Y.F. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*, 47:69-73.
23. Bhuiyan, M.N.I., Begum, J., Nandi, N.C. and Akter, F. (2010). Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). *African Journal of Plant Science*, 4(11): 451-454.
24. Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M. and Baltic, M.Z. (2015). Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Science*, 5:18-21. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.005.
25. Bozdogan, A. (2015). Viscosity behavior of bitter orange (*Citrus aurantium*) juice as affected by temperature and concentration. *Ciencia y Tecnología Alimentaria - Journal of Food*, 13(4): 535-540. doi:10.1080/19476337.2015.1012120.
26. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 28(1): 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
27. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.002.
28. Busatta, C., Mossi, A.J., Rodrigues, M.R.A., Cansian, R.L. and De Oliveira, J.V. (2007). Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4):610-616. doi: 10.1590/s1517-83822007000400006.
29. Cai, Y. and Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65(7): 1248-1252. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x.
30. Campelo, P.H., Junqueira, L.A., Resende, J.V., Zacarias, R.D., Fernandes, R.V. de B., Botrel, D.A. and Borges, S.B. (2017). Stability of lime essential oil emulsion prepared using biopolymers and ultrasound treatment. *International Journal of Food Properties*, 20(1):5564-5579. doi: 10.1080/10942912.2017.1303707.
31. Campos, A.A., Gomes, J.M., Silva, E.K., Machado, V., Yoshida, M.I. and Vilela, S. (2014). Physical and thermal properties of oregano (*Origanum Vulgare* L.) essential oil microparticles. *Journal of Food Process Engineering*, 38(1): 1-10. doi: 10.1111/jfpe.12120.
32. Carneiro, H.C.F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F. and Hubinger, M.D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using

- different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4): 443-451. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033.
33. Carr, R.L. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering Journal*, 72: 163-168.
34. Cetin-Babaoglu, H., Bayrak, A., Ozdemir, N. and Ozgun, N. (2017). Encapsulation of clove essential oil in hydroxypropyl beta-cyclodextrin for characterization, controlled release, and antioxidant activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5):1-8. doi: 10.1111/jfpp.13202.
35. Chatterjee, D. and Bhattacharjee, P. (2013). Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 117:545–50.
36. Codex Alimentarius. CODEX STAN 19-2015 - Norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. *Normas Internacionales de los Alimentos*. 2015: 2-5.
37. Coronel, C. P., Jiménez, M. T., López-Malo, A., and 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.
38. Dermis, S., Can, S. and Dogru, B. (2012). Determination of peroxide values of some fixed oils by using the mFOX method. *Spectroscopy Letters*, 45(5): 359-363. doi: 10.1080/00387010.2012.666702.
39. Desai, K.G.H. and JinPark, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23:1361–94.
40. De Barros, R.V., Vilela, S., Alvarenga, D. and Rodríguez, C. (2014). Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers. *International Journal of Food Science Technology*, 49 (6): 1522–1529. doi: 10.1111/ijfs.12449.
41. De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Taglialatela-Scafati, O. and Senatore, F. (2013). Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare L. subsp. vulgare L.* under different growth conditions. *Molecules*, 18: 14948–14960.
42. De Medeiros-Barbosa, I., Da Costa-Medeiros, J.A., De Oliveira, K.Á.R., Gomes-Neto, N.J., Tavares, J.F., Magnani, M. and 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.

43. Dewanti-Hariyadi, R. (2013). Microbiological quality and safety of fruit juices. *Foodreview international*, 1(1): 53:57.
44. 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.
45. Dima, C., Cotarlet, M., Tiberius, B., Bahrim, G., Alexe, P. and Dima, S. (2014). Encapsulation of coriander essential oil in β -cyclodextrin: antioxidant and antimicrobial properties evaluation. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(2): 9128-9140.
46. Drusch, S. (2006). Sugar beet pectin: a novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 21(7):1223-1228.
47. Fang, Z. and Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends of Food Science and Technology*, 21:510–23.
48. Fernandes, R.V.B., Borges, S.V. and Botrel, D.A. (2013). Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. *Science Technology*, 33: 171–178. doi: 10.1590/S0101-20612013000500025.
49. Fernández-Serrano, P. (2015). Emulsiones como sistemas de liberación de antimicrobianos naturales en alimentos. Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia.
50. Finney, J., Buffo, R. and Reineccius, G.A. (2006). Effects of type of atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. *Journal of Food Science*, 67 (3): 1108–1114. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09461.x.
51. Fisher, K. and Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science and Technology*, 19(3): 156-164. doi: 10.1016/j.tifs.2007.11.006.
52. Frascareli, E., Silva, V., Tonon, R. and Hubinger, M. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Journal of Food and Bioproducts Processing*, 12: 413-424. doi: 10.1016/j.fbp.2011.12.002.
53. Ganjali-Dashti1, N., Mirlohi, M., Ganjali-Dashti, M., Jafari, M. and Bahreini-Esfahani, N. (2015). Antioxidant effect of thyme essential oil on oxidative stability of chicken nuggets. *International Journal of Food Engineering*, 1(2): 115-120. doi: 10.18178/ijfe.1.2.115-120.
54. García-García, R., A. López-Malo and E. Palou. (2011). Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 76:95–100.

55. Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Azizi, M.H. (2016). Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18: 1781-1792.
56. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley A., and Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40: 1107-1121.
57. Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, and P. Bourke. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124:91–97.
58. Haba, E., Bouhdid, S., Torrego-Solana, N., Marqus, A.M., Espuny, M.J., Garcia-Celma, M.J. and Manresa, A. (2014). Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmaceutics*, 476(1-2):134-141. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.039.
59. Haddouchi, F., Chaouche, T., Lazouni, H.A. and Benmansour, A. (2011). Physicochemical study essential oils of *Thymus fontanesii* according to its conservation. *Der Pharma Chemica*, 3(2):404-410.
60. Hausner, H.H. (1967). Friction conditions in a mass of metal powder. *International Journal of Powder Metallurgy*, 3: 7-13.
61. Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B. and Trujillo, J.A. (2013). Stability of submicron oil-in-water emulsions produced by ultra-high pressure homogenization and sodium caseinate as emulsifier. *Chemical Engineering Transactions*, 32: 1813-1818. doi: 10.3303/CET1332303.
62. Hernández-Hernández, E., Regalado-Gonzalez, C., Vazquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I. and García-Almendarez, B.E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *Scientific World Journal*. 14:1-12. doi: 10.1155/2014/641814.
63. Jafari, S., Assadpoor, E., He, Y. and Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26(7): 816-835. doi: 10.1080/07373930802135972.
64. Jinapong, N., Suphantharika, M. and Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 8:194-205. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032.

65. Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36:9–19.
66. Kaushik, V. and Roos, Y.H. (2007). Limonene encapsulation in freeze-drying of gum arabic-sucrose-gelatin systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 40: 1381-1391.
67. Kim, S.G., Yoo, W. and Yoo, B. (2014). Relationship between apparent viscosity and line-spread test measurement of thickened fruit juices prepared with a xanthan gum-based thickener. *Preventive Nutrition and Food Science*. 19(3): 242–245. doi:10.3746/pnf.2014.19.3.242.
68. Kourniatis, L.R., Spinelli, L.S., Mansur, C.R.E. and González, G. (2010). Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. *Química Nova*, 33(2):295-300.
69. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4): 633-640. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.024.
70. Kurozawa, L., Morassi, A., Vanzo, A., Park, K. and Hubinger, M. (2009). Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. *Drying Technology*, 27(11): 1248-1257. doi: 10.1080/07373930903267187.
71. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P. and Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453–462.
72. León-Méndez, G., Osorio, M. and Gil, J. (2015). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *plectranthus amboinicus* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4): 708-718.
73. López-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R. and Alzamora, S.M. (2006). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Advances in Food Mycology*. 6; 261-286. doi: 10.1007/0-387-28391-9_18.
74. Lupo-Pasin, B., González-Azón, C. and Maestro-Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1): 130-151.
75. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. and Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44:3057–3064.

76. Magi, G., Marini, E. and Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant group A Streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 6:1-7.
77. Matan, N., Rimkeereea, H., Mawsonb, A.J., Chompreedaa, P., Haruthaithanasana, V. and Parkerb, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2):180– 185.
78. Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*. 12: 409-417.
79. Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oil seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3444-3452. doi: 10.1021/jf011440s.
80. McClements, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, Florida, 1999:1-374.
81. McClements, D.J. *Food Emulsion: Principle, Practices, and Techniques*, 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005: 1-609.
82. McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y. y Weiss J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 49:577–606.
83. McClements, D.J., and Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4):285-330. doi: 10.1080/10408398.2011.559558.
84. Misharina TA. (2003). Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(3):311-316. doi: 10.1023/a:1023592030874.
85. Moraes-Lovison, M., Marostegan, L.F.P., Peres, M.S. and Menezes, I.F. (2016). Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pate. *Journal of Food Science and Technology*, 77: 233-240. doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.061.
86. Mothershaw, A.S. and Jaffer, T. (2004). Antimicrobial activity of foods with different physio-chemical characteristics. *International Journal of Food Properties*. 7(3):629–638. doi:10.1081/jfp-200033062.
87. Murugesan, R. and Orsat, V. (2012). Spray drying for the production of nutraceutical ingredients: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 3-14.
88. Nam, Y.S., Kim, J.W., Shim, J., Han, S.H. and Kim, H.K. (2010). Nanosized emulsions stabilized by semisolid polymer interphase. *Langmuir*, 26(16): 13038-13043.

89. National Institute of Standards and Technology (NIST). Automated mass spectral library with search program (NIST 11, software, version 2.0g).
90. Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R. and Romero, J. (2010). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41:667-678 doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02590.x.
91. Nawar, W. W. (1997). *Biochemical processes Food Storage Stability*. USA: CRC Press.
92. Nguefack, J., Tamgue, O., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Zollo, P.H.A. and Nkengfack, A.E. (2012). Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control*. 23:377-383.
93. Nowak, K., Ogonowski, J., Jaworska, M. and Grzesik, K. (2012). Clove oil properties and applications. *Scitech Journal*, 66(2):145-152.
94. Oetjen, G.W. and Haseley, P. (2004). *Freeze-drying*. 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
95. Olmedo, R., Nepote, V. and Grosso, N.R. (2014). Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food Chemistry*, 156:212-219. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.087.
96. Onsaard, E., Putthanimon, J., Singthong, J. and Thammarutwasik, P. (2018). Oxidation stability of sesame oil encapsulated by spray drying. *International Food Research Journal*, 25(2):784-792.
97. Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P. and Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *Journal of Food Science*, 74: 379–383.
98. Peleg, M. and Cole, M. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*. 38(5): 353-380. doi:10.1080/10408699891274246.
99. Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F.O. Taleb, M. and Greche, H. (2016). Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products*, 89:1-9. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.04.049.
100. Rodríguez-García, I., Silva-Espinoza, B.A., Ortega-Ramírez, L.A., Leyva, J.M., Siddiqui, M.W., Cruz-Valenzuela, M.R., González Aguilar, G.A. and Ayala-Zavala, J.F. (2015). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(10):1717-1727. doi: 10.1080/10408398.2013.800832.
101. Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N. and Jiménez Munguía, M.T., (2019). Antimicrobial activity and physicochemical characterization of oregano, thyme and clove leaf essential oils, nonencapsulated and nanoencapsulated, using emulsification. *Applied Food Biotechnology*, 6(4): 237-246. doi:10.22037/afb.v6i4.25541.
 102. Sakkas, H. and Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3): 429-438. doi: 10.4014/jmb.1608.08024.
 103. Salager, J.L. (2000). Emulsion Properties and Related know-how to attain them. In: Nielloud F, Marti-Mestres G. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*. New York, Marcel Dekker Inc., 2000: 72-125.
 104. Sánchez, E., García, S., and Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applications of Environmental Microbiology*, 76: 6888–6894.
 105. Shabnum, S and Wagay, M.G. (2011). Essential oil composition of *Thymus Vulgaris L.* and their uses. *Journal of Research and Development*, 11: 1-12.
 106. Sheu, T.Y. and Rosenberg, M. (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, 63(3), 491-494.
 107. Siddiqui, N. and Ahmad, A. (2013). A study on viscosity, surface tension and volume flow rate of some edible and medicinal oils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2013; 2(6):1318-1326.
 108. Sing, R.P., Chidambara-Murthy, K.N. and Jayaprakash, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 81-86. doi: 10.1021/jf010865b.
 109. Sinha, A.K., Sharma, U.K. and Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59:299–326.
 110. Sipailiene, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. and Sarkinas, A., (2006). Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18:698–703.
 111. Song, N.B., Lee, J.H., Al Mijan, M. and Song, K.B. (2014). Development of a chicken feather protein film containing clove oil and its application in smoked salmon packaging. *Food Science and Technology*, 57:453–60.

112. Sreeramulu, D. and Raghunath, M. (2011). Antioxidant and phenolic content of nuts, oil seeds, milk and milk products commonly consumed in India. *Journal of Food Science and Nutrition*, 2: 422-427. doi: 10.4236/fns.2011.25059.
113. Tadros, T. *Handbook of colloid and interface science*. De Gruyter, Berlin, 2018.
114. Tadros, T. and Kessell, L. (2004). Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications. *Cosmetic Toilet*, 119: 41-46.
115. Teodoro, R.A.R., De Barros, R.V., Botrel, D.A., Borges, S.V. and De Souza, A.U. (2014). Characterization of microencapsulated rosemary essential oil and its antimicrobial effect on fresh dough. *Food Bioprocess Technology*, 7: 2560–2569.
116. Tomazelli-Júniora, O., Kuhn, F., Padilhac, P.J.M., Vicentec, L.R.M., Costac, S.W., Boligond, A.A., Scapinellob, J., Nesic, C.N., Dal Magrob, J. and Lamo-Castellví, S. (2017). Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78(2): 311-317. doi:10.1590/1519-6984.08716.
117. Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food. *Journal of Food Science*, 79(7): 1231-1249.
118. Tonon, R.V., Grosso, C.R.F. and Hubinger, M.D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*. 44:282–9.
119. Tsimidou, M. and Boskou, D. (1994) Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi*. Amsterdam: Elsevier. *Developments in Food Science*, 34: 273-284.
120. USDA (2013). *Fruit and Vegetable Program. Technical Procedures Manual*. 1-174.
121. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J. (2007). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27:91-101. doi: 10.1111/j.1745-4565.2007.00063.x.
122. Walton, D.E. (2000). The morphology of spray-dried particles a qualitative view. *Drying Technology*, 18(9): 1943-1986. doi: 1080/07373930008917822.
123. Wang, Y., Lu, Z., Wu, H. and Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 136:71-74.
124. Wei, A. and Shibamoto, T. (2007). Antioxidant activities of volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5):1737-1742. doi: 10.1021/jf062959x.

125. Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M. and McClements, J. Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. In: Barbosa-Canovas G, Mortimer A, Lineback D, Spiess W, Buckle K, Colonna P. *Global Issues in Food Science and Technology*. New York, NY, USA, Academic Press, 2009:425-479. doi: 10.1016/b978-0-12-374124-0.00024-7.
126. Wichchukit, S., and 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.
127. Winniczuk, P. and Parish, M. (1997). Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against microorganisms related to citrus juice. *Food Microbiology*. 14(4): 373–381. doi:10.1006/fmic.1997.0103.
128. Xiao, Z., Li, W., Zhu, G., Zhou, R. and Niu, Y. (2016). Study of production and the stability of styrallyl acetate nanocapsules using complex coacervation. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(4):283-289. doi: 10.1002/ffj.3306.
129. Young, S.L., Sarda, X. and Rosenberg, M. (1993). Microencapsulating properties of whey proteins, microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science*, 76 (28): 68– 77.
130. Yu, L.L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6): 1619-1624. doi: 10.1021/jf010964p.
131. Zuidam, J.N. and Heinrich. E. (2010). Encapsulation of aroma. *Encapsulation technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 127-160.
132. Zuidam, N.J. and Nedovic, V. (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer, New York.

PUBLICACIONES Y PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Difusión de resultados

- **Artículo de revisión.** Ruíz-González, N. y Jiménez-Munguía, M.T. (2018). Efectividad antimicrobiana de aceites esenciales y sus componentes encapsulados. *Revista Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 11(1): 5-12.
- **Artículo científico.** Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez, N. and Jiménez-Munguía, M.T. (2019). Antimicrobial activity and physicochemical characterization of oregano, thyme and clove leave essential oils, nonencapsulated and nanoencapsulated, using emulsification. *Applied Food Biotechnology*, 6(4): 237-246. doi:10.22037/afb. v6i4.25541.
- **Artículo científico.** Ruíz-González, N., Vallarta-Solorio, P.G., López-Malo, A., Palou, E., Hernández-Nava, R. and Jiménez-Munguía, M.T. (2020). Stability of the antioxidant properties of essential oils microencapsulated by spray drying. *Food Processing and Preservation*. Enviado.
- **Nota de investigación.** Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez, N. y Jiménez-Munguía, M.T. (2020). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano nanoencapsulado contra *Staphylococcus aureus* en jugo de jitomate y jugo verde. *Revista Entorno*. Enviado.
- **Artículo de revisión.** Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez, N. and Jiménez-Munguía, M.T. (2020). Antimicrobial activity of essential oils and their components encapsulated and applied in model systems and food. En revisión.

Participación en congresos

Cartel. Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E. and Jiménez-Munguía, M.T. Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and clove leaves non-encapsulated and encapsulated by emulsification. Presentado en el SEKI-Food 2018, llevado a cabo del 3 al 5 de julio de 2018 en Stuttgart, Alemania.

Cartel. Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez, N. y Jiménez-Munguía, M.T. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano no-encapsulado y nanoencapsulado por emulsificación en sistemas modelo y alimentos. Presentado en el Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria AMEPAL, llevado a cabo del 11 al 13 de septiembre de 2019, en Monterrey, Nuevo León, México.

Cartel. Ruíz-González, N., López-Malo, A., Palou, E. and Jiménez-Munguía, M.T. Antimicrobial activity of nanoencapsulated oregano essential oil against *Staphylococcus aureus* in tomato juice and green juice. Para presentar en el SEKI-Food 2021, a llevarse a cabo del 23 al 25 de junio del 2021 en Nicosia, Cyprus.

Efectividad antimicrobiana de aceites esenciales y sus componentes encapsulados

N. Ruiz-González y M. T. Jiménez-Munguía

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla

Ex hacienda Sta. Catarina Mártir, C.P. 72810, San Andrés Cholula, Puebla, México.

RESUMEN

El uso de los aceites esenciales como aditivos naturales para extender la vida útil de los productos alimenticios ha recibido una creciente atención. Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales son debidas a sus componentes, los cuales poseen actividad contra microorganismos patógenos y deteriorativos comunes en alimentos. Los aceites esenciales y sus componentes son inestables ante diferentes condiciones ambientales, por lo que la encapsulación representa una alternativa para protegerlos. Uno de los procesos importantes en el diseño de un sistema de encapsulación para agentes antimicrobianos es la prueba de su efectividad antimicrobiana en sistemas modelo y alimentos, sin embargo, estos estudios aún son escasos. El propósito de esta revisión es dar a conocer información actualizada sobre los mecanismos de acción antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes, así como sobre su efectividad al ser encapsulados y probados en sistemas modelo y en alimentos.

Palabras clave: efectividad antimicrobiana, aceites esenciales, encapsulación, sistemas modelo, alimentos.

ABSTRACT

The use of essential oils and their components has received increasing attention as natural additives to extend the shelf life of foodstuffs. The antimicrobial properties of the essential oils are due to its components, which have activity against common pathogenic and deteriorative microorganisms in food. Essential oils and their components are unstable under different environmental conditions, so encapsulation is an alternative to protect them. One of the important processes in the design of an encapsulation system for antimicrobial agents is the proof of its antimicrobial effectiveness in model and food systems, however these studies are still scarce. The purpose of this review is to provide updated information on the mechanisms of antimicrobial action of essential oils and their components, as well as their effectiveness as they are encapsulated and tested in model and food systems.

Keywords: antimicrobial effectiveness, essential oils, encapsulation, model systems, food.

* Programa de Doctorado
en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126
Dirección electrónica:
nancy.rutiz@udlap.mx
maria.barcenas@udlap.mx

Antimicrobial Activity and Physicochemical Characterization of Oregano, Thyme and Clove Leave Essential Oils, Nonencapsulated and Nanoencapsulated, Using Emulsification

Nancy Ruiz-Gonzalez, Aurelio Lopez-Malo, Enrique Palou, Nelly Ramirez-Corona, Maria Teresa Jimenez-Munguia*

Universidad de las Americas Puebla, Chemical, Food and Environmental Engineering Department, Ex hacienda Sta. Catarina Martir, S/N, San Andres Cholula, Puebla, Mexico. CP. 72810.

Abstract

Background and objective: Functional properties of essential oils are attributed to their components, many of which exhibit antimicrobial activity against pathogenic and spoilage microorganisms in a wide variety of foods. However, essential oils are unstable compounds; therefore, they can be encapsulated for a better protection and increase of functionality. In this work, antimicrobial activities of oregano, thyme and clove leave essential oils (non-encapsulated and nanoencapsulated) were assessed against *Escherichia coli* ATCC 29922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 using emulsification.

Material and methods: The essential oils were characterized based on their physicochemical properties. Nanoemulsions were prepared, using 5% (w w⁻¹) of essential oils, and then characterized based on their physical properties, stability and encapsulation efficiency. The microdilution antimicrobial assay was carried out to assess minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the essential oils and their nanoemulsions. Data from physical properties of the essential oils and physical properties, stability and encapsulation efficiency of the nanoemulsions were statistically analyzed.

Results and conclusion: Antimicrobial activity of the essential oils showed decreases in minimum inhibitory concentration by 27-60% for the nanoencapsulated oils, compared to nonencapsulated oils. Nanoencapsulated and nonencapsulated oregano essential oils exhibited the lowest minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration values. Based on the results, nanoencapsulated essential oils may further be used in various foods to avoid microbial contaminations.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

How to cite this article

Ruiz-Gonzalez N, Lopez-Malo A, Palou E, Ramirez C, Jimenez-Munguia MT. Antimicrobial Activity and Physicochemical Characterization of Oregano, Thyme and Clove Leave Essential Oils, Nonencapsulated and Nanoencapsulated, Using Emulsification. *Appl Food Biotechnol* 2019; 6(4): 237-246. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i4.25541>

Article Information

Article history:

Received 27 May 2019
Revised 30 Jul 2019
Accepted 24 Aug 2019

Keywords:

- Antimicrobials
- Essential oils
- Nanoemulsions
- Nanoencapsulation
- Pathogens

*Corresponding author:

Maria Teresa Jimenez-Munguia,
Universidad de las Americas Puebla, Chemical, Food and Environmental Engineering Department, Ex hacienda Sta. Catarina Martir, S/N, San Andres Cholula, Puebla, Mexico.

Tel: +52-222 229 4353

E-mail:

maria.t.jimenez@uadlap.mx

#131: Antimicrobial activity of oregano, thyme and clove leaves essential oils, non-encapsulated and encapsulated by emulsification

Nancy RUIZ-GONZÁLEZ, Aurelio LÓPEZ-MALO, Enrique PALOU, María Teresa JIMÉNEZ-MUNGUÍA*

UNIVERSIDAD DE LAS AMERICAS PUEBLA, San Andrés Cholula, Puebla, Mexico

*Corresponding Author (mariat.jimenez@udlap.mx)

The antimicrobial properties of essential oils are due to their components, which have activity against pathogenic and deteriorative microorganisms common in food. Essential oils are unstable under different environmental conditions, and encapsulation techniques present an alternative to protect them. In this work we compared the antimicrobial activity of oregano (OEO), thyme (TEO) and clove leaves (CLEO) essential oils, without encapsulating and encapsulated by emulsification, against *Escherichia coli* ATCC 29922, *Salmonella* Tiphymurium ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The emulsions of the essential oils were prepared using 5 % (w/w) of essential oil, 10 % (w/w) of agave inulin as a stabilizing agent and 3 % (w/w) of Tween 80 as an emulsifying agent. The essential oils and emulsions were characterized by physicochemical tests and its minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the micro dilution technique. The results of the characterization of the essential oils showed major volatile components with antimicrobial activity, for OEO 60.76 % of carvacrol, for TEO 30.76 % of thymol and CLEO 33.50 % of eugenol. Besides, in the characterization tests of the emulsions a very small particle size was detected, in the range of 0.137 to 0.035 μm , being the smaller size for the emulsion of CLEO, and the creaming tests showed that the emulsions are stable systems for 21 days at 21 ± 2 ° C. The tests of antimicrobial activity showed a reduction of the MIC of 27 to 60 % for the encapsulated oils with respect to the non-encapsulated oils, which may be due to the increase of their solubility and to a smaller particle size which promotes its diffusion in de medium. The encapsulated and non-encapsulated OEO recorded the lowest CMI values, which may be due to its high content of carvacrol. This study contributes to the knowledge of the behavior of the emulsions against bacteria in model systems, which may be further applied in different types of food.

Keywords

essential oils, encapsulation, antimicrobial activity

Acknowledgements

Author Ruiz-González acknowledges UDLAP for the scholarship and financial support for her PhD studies.



AMEPAL A.C.®

La Asociación Mexicana para la Protección de los Alimentos A.C. (AMEPAL) otorga a:

N. Ruiz-González, A. López-Malo Vigil, E. Palou-García, N. Ramírez-Corona y M.T. Jiménez-Munguía

el presente

RECONOCIMIENTO

por su participación con el trabajo titulado:

Actividad antimicrobiana de aceite esencial de orégano no encapsulado y nanoencapsulado por emulsificación en un sistema modelo y en alimentos

en el:

**CONGRESO INTERNACIONAL
DE INOCUIDAD ALIMENTARIA 2019**
"Retos de la Industria Alimentaria Alrededor de la Inocuidad"

Bevado a cabo del 11 al 13 de septiembre de 2019,
en la Biblioteca Universitaria "Raúl Rangel Frías" en Monterrey, N.L.

M.C. Nydia Orué Arreola
Presidenta de la AMEPAL A.C.

Dra. Maria Teresa Jiménez Munguía
Secretaria de la AMEPAL A.C.

