



**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y  
AMBIENTAL**

*“Estudio de nanoemulsiones de aceite esencial de Litsea cubeba con  
quitosano para la desinfección de fresas”*

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la  
estudiante

María Teresa Riezco Herrera

169407

Ingeniería en Industrias Alimentarias

Directora de Tesis: Dra. María Teresa Jiménez Munguía

San Andrés Cholula, Puebla.

Otoño 2024

Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la estudiante

María Teresa Riezco Herrera ID: 169407

**Directora de Tesis**

---

**Dra. María Teresa Jiménez Munguía**

**Presidente de Tesis**

---

**Dr. Aurelio López Malo Vigil**

**Secretario de Tesis**

---

**Dr. Jocksan Ismael Morales Camacho**

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
3.1 OBJETIVOS GENERAL.....	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>IV. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
4.1 FRESA .....	12
4.2 MICROORGANISMOS DETERIORADORES Y PATÓGENOS EN FRESA .....	13
4.3 QUITOSANO .....	14
4.4 ACEITE ESENCIAL DE <i>LITSEA CUBEBA</i> .....	17
4.5 EMULSIONES .....	19
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
5.1 MATERIALES .....	22
5.2 MÉTODOS .....	22
5.2.1 <i>Caracterización de soluciones cítricas con quitosano</i> .....	22
5.2.1.1 Preparación de las soluciones cítricas con quitosano .....	22
5.2.1.2 Densidad.....	23
5.2.2 <i>Propiedades físicas y químicas de las soluciones y nanoemulsiones</i> .....	23
5.2.2.1 Viscosidad.....	23
5.2.3 <i>Caracterización de desinfectantes orgánicos comerciales</i> .....	24
5.2.3.1 Medición de pH.....	24
5.2.3.2 Determinación de acidez .....	24
5.2.4 <i>Lavado y desinfección de fresas</i> .....	25
5.2.5 <i>Recuento de microbiota de fresas</i> .....	25
5.2.6 <i>Elaboración de emulsiones con ultrasonido</i> .....	26
5.2.7 <i>Tamaño de gota del aceite disperso</i> .....	27
5.2.7.1 Índice de refracción del aceite.....	27
5.2.7.2 Medición del diámetro de gota.....	27
5.2.8 <i>Efectividad de desinfectantes contra <i>Aspergillus niger</i> en sistemas modelo</i> .....	27
5.2.8.1 Lavado de esporas de <i>Aspergillus niger</i> .....	27
5.2.8.2 Sistemas modelo.....	28
5.2.9 <i>Reto microbiano de fresas inoculadas con <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i></i> .....	29
5.2.9.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
5.2.9.2 Inoculación del microorganismo a la fresa.....	29
5.2.9.3 Evaluación de desinfectantes y nanoemulsiones .....	30
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
6.1 SOLUCIONES CÍTRICAS CON QUITOSANO .....	31
6.2 PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>LITSEA CUBEBA</i> .....	32
6.3 COMPOSICIÓN Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE NANOEMULSIONES .....	33
6.4 TAMAÑO DE GOTA DEL ACEITE DISPERSO .....	36
6.5 CARACTERIZACIÓN DE DESINFECTANTES ORGÁNICOS COMERCIALES Y NANOEMULSIÓN.....	38
6.6 RECUENTO DE MICROBIOTA DE FRESAS .....	39
6.7 RECUENTO DE BMA Y MOHOS Y LEVADURAS DE FRESAS DESINFECTADAS CON DESINFECTANTES ORGÁNICOS COMERCIALES Y NANOEMULSIONES .....	40
6.8 RETOS MICROBIANOS.....	42
6.8.1 Fúngico en sistemas modelo .....	42
6.8.2 Bacteriano en fresas .....	45

<b>VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>54</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>67</b>
9.1 ANEXO A.....	67
9.2 ANEXO B.....	67
9.3 ANEXO C.....	68
9.4 ANEXO D.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Solubilidad de quitosano en soluciones cítricas .....	31
Tabla 2. Densidad y viscosidad del aceite esencial de Litsea cubeba.....	33
Tabla 3. Composición de las nanoemulsiones con aceite esencial de Litsea cubeba .....	33
Tabla 4. Propiedades físicas de desinfectantes y nanoemulsiones.....	38
Tabla 5. Microbiota de fresas, bacterias mesofílicas aerobias (BMA), mohos y levaduras expresadas en Log UFC/g.....	40
Tabla 6. Recuento de BMA en fresas desinfectadas expresadas en Log UFC/g .....	40
Tabla 7. Recuento de mohos y levaduras en fresas desinfectadas expresadas en Log UFC/g.....	41
Tabla 8. Velocidad de crecimiento y t lag del Aspergillus niger en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™ .....	44
Tabla 9. Crecimiento del Aspergillus niger en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™ a 22 ± 3°C observado en diferentes tiempos.....	45
Tabla 10. Crecimiento del Aspergillus niger en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™ a 22 ± 3°C observado en diferentes tiempos (completa) .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de quitina y quitosano (Heras, 2020) .....	15
Figura 2. Conteo de esporas mediante cámara de Neubauer (Castillo, 2004) .....	28
Figura 3. Apariencia de las nanoemulsiones al 1% p/p de aceite esencial .....	34
Figura 4. Apariencia de las nanoemulsiones al 0.06%, 0.12% y 0.25% p/p de aceite esencial .....	35
Figura 5. Apariencia de la nanoemulsión al 0.5% p/p de aceite esencial .....	35
Figura 6. Distribución del tamaño de las gotas de esencial de Litsea cubeba en la nanoemulsión al 0.06% p/p .....	36
Figura 7. Distribución del tamaño de las gotas de aceite esencial de Litsea cubeba en la nanoemulsión al 0.12% p/p .....	37
Figura 8. Gráfico de crecimiento del <i>Aspergillus niger</i> en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™ .....	43
Figura 9. Crecimiento a las 46 h del <i>Aspergillus niger</i> , A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™ .....	44
Figura 10. Reto microbiano contra <i>Escherichia coli</i> (No ≈ 4 Log UFC/g) .....	46
Figura 11. Reto microbiano contra <i>Escherichia coli</i> (No ≈7 Log UFC/g) .....	48
Figura 12. Reto microbiano contra <i>Listeria monocytogenes</i> (No ≈ 4 Log UFC/g) .....	50
Figura 13. Crecimiento a las 66 h del <i>Aspergillus niger</i> , A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™ .....	67
Figura 14. Crecimiento a las 120 h del <i>Aspergillus niger</i> , A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™ .....	68
Figura 15. Crecimiento a las 164 h del <i>Aspergillus niger</i> , A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™ .....	68

## I. Introducción

Las frutas son de gran aporte nutricional siendo que contienen una alta gama de nutrientes y vitaminas. Las frutas son ricas en fibras, vitaminas y minerales como el potasio y el magnesio, y son una base para la salud del ser humano (Clarck, 2016). Sin embargo, aún cuando son de gran valor nutritivo para el ser humano, también lo son para los microorganismos.

En sí, la mayoría de las bacterias dañinas, y patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* requieren de actividades de agua muy altas entre 0.91 a 0.96, para desarrollarse (Badui, 2020). Esto hace que las frutas y hortalizas sean susceptibles a la contaminación de a este tipo de microorganismos que causan varias enfermedades transmitidas por alimentos, por ejemplo, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* son frecuentemente encontrados en vegetales previamente preparados para ensaladas (Shafiq, Yousuf, & Kumar, 2015). Otro patógeno que se propaga fácilmente en alimentos que se comen fríos o crudos es la *Listeria monocytogenes* que puede causar listeriosis (Centers for disease control and prevention [CDC], 2023 c). La fresa fue elegida para este trabajo de investigación por tener una alta susceptibilidad a deterioro y estar relacionada con enfermedades transmitidas por alimentos, siendo un ejemplo reciente un brote de Hepatitis A en fresas congeladas (CDC, 2023 b).

Una de las prácticas comúnmente llevadas a cabo en México es la desinfección de frutas y hortalizas en las viviendas, ya que son las que habitualmente se llegan a comer directamente y son susceptibles a contaminación por patógenos. La contaminación por patógenos en frutas se debe a varios factores durante la cosecha como el tipo de suelo donde se cultivó, el contacto que pudo tener con animales o sustancias químicas, las malas prácticas de higiene de los trabajadores, el mal empaquetado y almacenamiento, o por contacto que

tuvo la fruta con varios compradores (Shafiq, & Yousuf, & Kumar, 2015). Esto genera grandes problemas en la salud siendo las frutas y hortalizas la mayor fuente de enfermedades transmitidas por alimentos en varios países como en Estados Unidos (Food and drug administration [FDA], 2023). Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2022), en Estados Unidos, para el lavado de frutas y hortalizas, es necesario un buen lavado de manos y solamente lavar los productos en agua corriente, los limpiadores y jabones son innecesarios. Sin embargo, la situación es diferente en México, la mayor parte del agua del grifo proviene de sitios superficiales, el 39.6% de éstos son adecuados, el 20.7% incumplen con parámetros como presencia de *E. coli* y coliformes fecales, y el 39.7% están fuertemente contaminados (Comisión nacional del Agua [CONAGUA], 2023). Es por ello por lo que el agua del grifo es previamente tratada, pero puede contaminarse de nuevo al ser expuesta a químicos o residuos fecales. Las frutas pueden llegar a contaminarse con el agua, se ha observado que una de las formas en las que las frutas pueden estar contaminadas con ooquistes de *Toxoplasma gondii* (parásito) es por un lavado inadecuado o por agua contaminada (de la Torre, & Rojas-Carabali, 2022).

Existen varios desinfectantes en la industria para asegurar un alimento libre de patógenos. Entre los desinfectantes más utilizados se encuentran los hipocloritos, etanol, peróxido de hidrógenos y ácidos orgánicos (Feliziani, & Lichter, & Smilanick, & Ippolito, 2016). Los compuestos de cloro como es el hipoclorito de sodio y el de calcio logran ser muy efectivos contra patógenos, y son de los componentes más utilizados en desinfectantes comerciales (Satish, & Ilahy, & Wasim, 2018). Sin embargo, estos compuestos pueden llegar a tener un impacto ambiental alto al ser corrosivo y afectar cuerpos de agua fresca (Romanovski, & Claesson, & Hedberg, 2020). Se han buscado alternativas orgánicas como

soluciones de quitosano y aceites esenciales cítricos, ya que se ha reportado su actividad antimicrobiana en alimentos (Aranaz, et al., 2021, Lu, et al., 2018).

El objetivo de esta investigación es evaluar la efectividad de un desinfectante orgánico, elaborado con quitosano y aceite esencial de *Litsea cubeba*, un aceite esencial cítrico, en sistemas modelo y en fresas.

## II. Justificación

En México, existe una amplia variedad de frutas y verduras que aportan grandes beneficios a la salud. Sin embargo, estos alimentos, al ser consumidos la mayor parte en fresco, pueden causar enfermedades causadas por microorganismos. Se requiere de una desinfección adecuada de éstos para evitar riesgos a la salud, además de que prolonga la vida útil de estos alimentos al disminuir la cantidad de microorganismos deterioradores.

Desinfectantes como peróxido de hidrógenos e hipoclorito de sodio y calcio son frecuentemente utilizados, pero se han buscado alternativas a estos desinfectantes por ser tóxicos y corrosivos. Además, de que la resistencia de microorganismos frente a desinfectantes ha sido un tema muy relevante en los últimos años ya que el uso frecuente de éstos puede llevar a mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos en los microorganismos por transferencia de elementos genéticos móviles (Carlie, & Boucher, & Bragg, 2020).

Se ha demostrado que ciertos componentes tienen actividad antimicrobiana como los aceites esenciales y soluciones con quitosano. El quitosano logra ser efectivo y seguro contra bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio cholera*, entre otras bacterias, sin embargo, su efectividad dependerá mucho de su pureza, peso molecular, viscosidad y grado de acetilación (Aranaz, et al., 2021). Aceites esenciales como los de origen cítricos también presentan una gran capacidad inhibitoria de microorganismos, en especial bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, entre otras (Torrenegra Alarcón, & Pájaro, & León Méndez, 2017).

Por otra parte, la técnica de encapsulación por nanoemulsión se ha reportado que mejora la transferencia de los compuestos antimicrobianos y por lo tanto una disminución de la concentración requerida de dichos compuestos (Dávila, et al., 2019).

## III. Objetivos

### 3.1 Objetivos General

Evaluar la efectividad antimicrobiana de nanoemulsiones de aceite esencial de *Litsea cubeba* con quitosano en sistemas modelo y fresas.

### 3.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1. Preparar y caracterizar las nanoemulsiones de aceite esencial de *Litsea cubeba* con quitosano.

Objetivo 2. Evaluar la efectividad antimicrobiana de las nanoemulsiones de aceite esencial de *Litsea cubeba* con quitosano para inhibir la microbiota de fresas.

Objetivo 3. Evaluar la efectividad antimicrobiana de la nanoemulsiones de aceite esencial de *Litsea cubeba* con quitosano contra *Aspergillus niger* en sistemas modelo.

Objetivo 4. Analizar las cinéticas de inhibición microbiana de las nanoemulsiones de aceite esencial de *Litsea cubeba* con quitosano contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, en fresas, aplicando modelos matemáticos.

## **IV. Marco teórico**

### **4.1 Fresa**

La fresa es una planta herbácea originaria de Europa que, en condiciones de cultivo normales, no suele durar más de tres o cuatro años, ya que requiere de varias exigencias como un suelo con un pH óptimo de 5.5 a 6.5, una temperatura de 25 a 26°C durante la floración y maduración de la fruta (Bianchi, 2018), días largos con más de 12 horas de luz y zona apta de cultivo entre 1300 a 2000 msnm (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación [SAGARPA], 2017). Las fresas son consumidas en fresco, aunque también llegan a procesarse para postres, mermeladas, batidos y dulces con la fruta. México es uno de los más grandes proveedores de fresa, llegando a producir, en el año 2023, 641,552.22 toneladas (Servicio de información agroalimentaria y pesquera [SIAP], 2023).

Las fresas son consumidas frecuentemente en el mundo, sin embargo, alcanzan a tener tiempos de vida útil muy cortos por ser susceptibles a una amplia variedad de microorganismos deterioradores y patógenos. El tiempo de vida útil de la fresa es de una semana después de la cosecha lo cual es muy poco tiempo para transportarla al consumidor, esto puede ser a causa de varios aspectos como daños en su estructura, estar demasiado madura al momento de cosecharla, pérdida de humedad o por una contaminación fúngica (Ramirez, & Restrepo, & Perez, & Jimenez, 2019).

En Estados Unidos, el CDC ha detectado varios brotes de patógenos y virus en la fresa, siendo un caso reciente del virus Hepatitis A en fresas orgánicas congeladas, que provenían de Baja California México (CDC, 2023 b).

Como se mencionó anteriormente, uno de los patógenos que son comúnmente encontrados en alimentos es *Escherichia coli*, se puede presentar en fresa dependiendo de cómo este patógeno llega al alimento, esto se debe a que puede crecer en un rango alto de temperatura siendo 37°C la óptima para su crecimiento, y algunas de sus cepas pueden proliferar con un pH de 4.4 (Organización Mundial de la Salud, 2018). Uno de los medios más comunes por los que la *Escherichia coli* se puede presentar en la fruta es por el agua, en un estudio se observó que la fresa y la lechuga pueden llegar a ser contaminadas con *Escherichia coli O157:H7* debido a agua agrícola contaminada, y puede sobrevivir largos periodos de tiempo, al sumergir los productos por 1 min en agua contaminada con una población aproximada de  $10^6$  UFC/mL y almacenarlos por 8 días se observó para la fresa una población de 3 (día 0) a 1.7 Log UFC/cm<sup>2</sup> (día 7) (Bhullar, & Perry, & Monge, & Nabwiire, & Shaw, 2021).

#### **4.2 Microorganismos deterioradores y patógenos en fresa**

Anteriormente, se mencionó la susceptibilidad de la fresa a microorganismos deterioradores y patógenos que acortan la vida útil de los alimentos, así como pueden transmitir enfermedades. En las frutas, la mayoría de las bacterias no afectan a la descomposición de estos por sus bajos valores de pH, sino que logran ser atractivos para deterioradores y alteradores de alimentos como mohos y hongos como el género *Penicillium*, un tipo de fungi que provoca un deterioro en la mayoría de las frutas, y en frutos cítricos *P. digitatum* y *P. expansum* provocan esporas amarillas y verdes (Erkmen, & Faruk, 2016).

En la fresa hay gran pudrición causada principalmente por hongos como *Fusarium solani*, *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia inaequalis*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* (Morales, et

al., 2020). Es por lo que uno de los retos más importantes en su desinfección es prevenir que el moho invada toda la fresa (Singh, & Sharma, 2018). Mohos como el *Aspergillus niger*, *Rhizopus sexualis*, y *Botrytis cinerea* provocan el moho negro y gris, y la putrefacción (Alegbeleye, Adedokun, Strateva, & Stratev, 2022). El *Aspergillus niger* puede adaptarse a varias condiciones y crecer, es un hongo que crece a temperaturas de 20 a 40°C, pero puede sobrevivir a 60°C; también puede crecer en pH bajos de 2.0 y en actividades de agua de mínimo 0.77 (d'Halewyn, & Chevalier, 2024).

Aunque las bacterias no son las principales deterioradoras de las fresas, éstas pueden llegar a sobrevivir y contaminar a la fresa causando enfermedades al consumidor. Como se mencionó anteriormente, patógenos como la *Escherichia coli* pueden sobrevivir en la fresa, también se ha observado en un estudio que el patógeno *Listeria monocytogenes* sobrevive en la fresa ya sea fresca o congelada por lo menos en 4 semanas de almacenamiento (Flessa, & Lusk, & Harris, 2005). Aunque los patógenos presentados reducen su crecimiento en tiempos de almacenamiento que duran días, estos aún pueden sobrevivir en la fruta provocando un daño a la salud.

### **4.3 Quitosano**

El quitosano es un polisacárido que se obtiene de la quitina, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, siendo que es un componente estructural de los exoesqueletos de los cangrejos, camarones, entre otros artrópodos. También se puede obtener la quitina de la pared celular de los hongos (Romero-Serrano, & Pereira, 2020). Para obtener quitosano, la quitina pasa por un proceso de desacetilación que se realiza por medio de una hidrólisis termoalcalina, se realiza con la quitina en estado sólido en condiciones alcalinas, se puede

realizar la desacetilación agregando NaOH, o por hidrólisis enzimática en presencia de la enzima quitina desacetilasa. El proceso involucra eliminar los grupos acetilos de la quitina hasta alcanzar un grupo amino completo ( $\text{NH}_2$ ) (Curbelo, & Palacio, & Fanego, 2021).

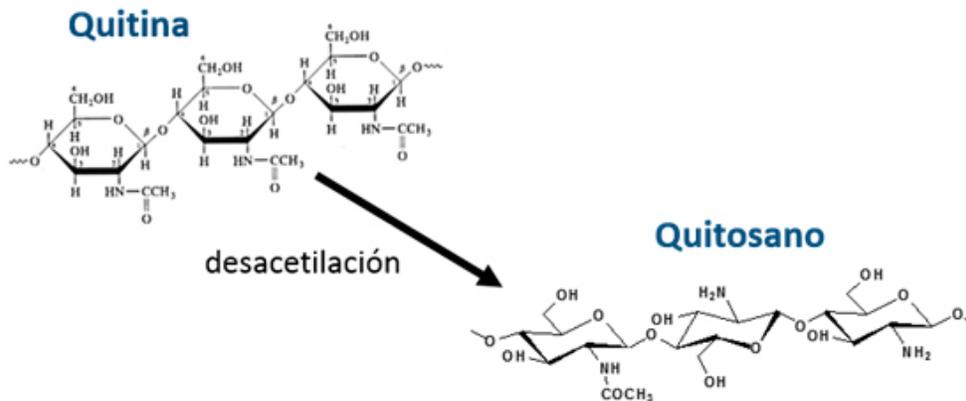


Figura 1. Estructura química de quitina y quitosano (Heras, 2020)

El quitosano es insoluble en pH neutros y alcalinos, por su forma cristalina y sus grupos amino protonables ( $\text{NH}_3^+$ ) logra ser soluble en soluciones ácidas (Romero-Serrano, & Pereira, 2020). Sin embargo, la solubilidad del quitosano dependerá mucho de su peso molecular, la temperatura, su cristalinidad y su grado de desacetilación. La viscosidad también dependerá mucho de su peso molecular, mientras más se reduzca el peso menos viscoso será la solución (Aranaz, et al., 2021). Su estructura química consiste en un grupo amino y dos grupos hidroxilos, estos grupos funcionales permiten varias modificaciones al quitosano creando nuevas funciones y polímeros, un ejemplo es el quitosano fosforado que inhibe la corrosión (Coquery, et al., 2019, como se citó en Aranaz, et al. 2021).

El quitosano cuenta con propiedades biológicas de gran importancia en la conservación de alimentos como su capacidad antimicrobiana. Este tiene varios mecanismos de acción para inhibir bacterias, uno de ellos es por las interacciones electrostáticas entre las ramas  $\text{NH}_3^+$  del quitosano y las membranas celulares de las bacterias con carga negativa, la interacción altera la permeabilidad de la célula microbiana liberando material intracelular (Tsai, & Su, 1999). Presenta actividad antimicrobiana con gram-positivas y negativas, con las gram-positivas interactúa con la pared celular conformada por peptidoglicano; mientras que, con las gram-negativas, el polímero interactúa con las proteínas y lipopolisacáridos (Guarnieri, et al., 2022).

El quitosano presenta capacidad antimicrobiana contra varios microorganismos como bacterias, fungi y levaduras, sin embargo, también presenta una actividad inhibitoria del crecimiento, al remover el quitosano algunas bacterias pueden empezar a crecer. Se ha comprobado que nanopartículas de quitosano, de forma segura y efectiva, ha logrado inhibir microorganismos dañinos para la salud como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, entre otros (Aranaz, et al., 2021).

La aplicación de quitosano para la preservación de alimentos ha sido estudiada, especialmente para la preservación de frutas y hortalizas, siendo la utilización de capas y recubrimientos la forma más común, ya que se ha demostrado que presenta mayor capacidad antioxidante y antimicrobiana, más se deben considerar las propiedades físicas y los efectos al añadir extractos o aceites a estos recubrimientos (Wang, et al., 2023).

La capacidad antimicrobiana del quitosano llega a ser demasiado débil al aplicarse en frutas y hortalizas, llegando a no ser suficiente para extender la vida de almacén, es por eso por lo que se aplica con otros componentes como los aceites esenciales. En un estudio

realizado con quitosano y aceite esencial de cedro (*P. atlántica*), se observó un mejor control contra *Botrytis cinerea* en fresas al aplicarlo en emulsión que el aceite esencial y el quitosano por separado (Wang, et al., 2023).

Hay un gran potencial en aplicar quitosano en emulsión con aceites esenciales, los aceites esenciales al estar en contacto con el quitosano mejoran la capacidad antimicrobiana y regula la concentración de compuestos activos con capacidad antimicrobiana del quitosano para que haya más durabilidad (Jiang, et al., 2023). El quitosano en emulsión (concentración entre 0.2 a 5 g/L) con aceites esenciales tiene un mayor efecto contra patógenos que al aplicarse solo, por ejemplo, en un estudio se trató lechuga con *Escherichia coli* aplicando únicamente quitosano en emulsión con agua destilada a 25°C por 15 min, se observó que su capacidad antibacteriana era demasiado baja siendo de 24% (Paomephan, et al., 2018, como se citó en Wang, et al., 2023), sin embargo, en otro estudio de pepinos inoculados con *Escherichia coli* se observó una efectividad de 33 a 77% en capacidad antibacteriana aplicando quitosano en emulsión con aceite esencial de clavo (Cui, et al., 2018, como se citó en Wang, et al., 2023).

#### **4.4 Aceite esencial de *Litsea cubeba***

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que son responsables del olor característico de varias plantas, como las rosas y hojas de canela, y frutas como los cítricos. Los aceites esenciales son insolubles en agua y, normalmente, son menos densos que esta (López Luegon, 2004), al ser hidrofóbicos logran atravesar la pared celular por medio de canales de proteínas que tienen las bacterias para dejar entrar nutrientes, y permite que los agentes antimicrobianos entren al microorganismo (Torrenegra Alarcón, & Pájaro, & León Méndez,

2017). Así que, los aceites esenciales no solo otorgan aroma, sino que también estos aceites son producidos por las plantas para su protección dada su capacidad como insecticida y su actividad antimicrobiana y antifúngica, esto se debe a los diferentes componentes antimicrobianos que tienen como aldehídos, fenoles y terpenos (Swamy, & Akhtar, & Sinniah, 2016).

La *Litsea cubeba* es una hoja botánica proveniente de árboles o arbustos perennifolios, nativa de Asia, su aceite esencial se extrae de la fruta de estos árboles o arbustos (de Groot, & Schmidt, 2021). El aceite esencial presenta un olor cítrico parecido al olor de un limón, esto se debe a varios de sus componentes como el citral, linalool, limoneno y d-limoneno (Liu, et al., 2023). Por su olor cítrico y su cantidad de limoneno es similar a un aceite esencial cítrico, que son conocidos por tener una gran capacidad antimicrobiana. Uno de los componentes más abundante en los aceites cítricos es el limoneno que tiene una gran bioactividad y capacidad antimicrobiana, pero también se presentan otros componentes con propiedades antibacterianas y antifúngicas como los quimiotipos linalool y timol (encontrados en la mandarina) (Argote-Vega, et al., 2017). El aceite esencial presenta linalool y limoneno lo cual le da esas propiedades. El citral es uno de los componentes con mayor presencia en el aceite esencial de *Litsea cubeba* y es utilizado en muchas aplicaciones, pero una de las más interesantes es como antimicrobiano. En un estudio se realizó una nano emulsión de citral en agua y se observó que tenía capacidad antimicrobiana contra patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Lu, et al., 2018). También se ha observado que el aceite esencial de *Litsea cubeba* contra *E. coli* su concentración mínima inhibitoria es de 0.125% v/v (Li, & Shi, & Liang, & Xie, & Huang, & Chen, 2014). Por la

capacidad antimicrobiana de varios componentes en el aceite esencial, se decidió utilizar este para la elaboración de las nanoemulsiones.

#### **4.5 Emulsiones**

Las emulsiones son dispersiones que se han estado utilizando mucho en la industria de alimentos por sus múltiples aplicaciones en la creación de nuevos productos. Existen dos tipos de emulsiones dependiendo de las fases como emulsiones agua en aceite donde la fase continua es el aceite y emulsiones de aceite en agua donde la fase continua es el agua.

Øye, Simon, Rustad, y Paso (2023) describen una emulsión como:

Preparación por medio de dos líquidos inmiscibles al dispersar un fluido en forma de gotas en una fase continua del segundo fluido. Estos sistemas no son termodinámicamente estables y se separan en fases rápidamente, a menos que se agreguen componentes interfaciales activos, como tensioactivos de pequeño peso molecular, polímeros anfifílicos o partículas sólidas, para capas interfaciales que proporcionen estabilidad cinética a las formulaciones. (p. 1)

Los componentes interfaciales activos o emulgentes son componentes que otorgan estabilidad a las emulsiones evitando que la fase dispersa en forma de gotas se junte, es como una barrera en la fase dispersa. Como se mencionó anteriormente, estos pueden ser polímeros anfifílicos, tensioactivos o partículas sólidas que tienen la capacidad de absorber la interfase de agua en aceite o viceversa (Costa, et al., 2019). En la industria alimentaria se utilizan varios emulgentes que han sido aprobados en varios países para ser utilizados en alimentos como los polisorbatos que “son ésteres del polioxietileno sorbitano (sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con 4, 5, o 20 moles de óxido de etileno) parcialmente esterificados con

ácidos grasos superiores” (Acofarma, s.f.). Estos polisorbatos también son conocidos como Tween, y la mayoría de estos tienen un HLB (equilibrio lipofílico-hidrofílico) entre 14 a 17 volviéndolos hidrofílicos, es decir, se utilizan en emulsiones de aceite en agua (Acofarma, s.f.). Los Tween pueden de ser de gran utilidad en las emulsiones a realizar, ya que han demostrado ser de gran utilidad al realizar emulsiones de aceites esenciales cítricos. En un estudio se realizaron nanoemulsiones con aceite esencial de naranja aplicando Tween 80, donde se evaluó la estabilidad variando las concentraciones p/p del aceite y del emulgente, siendo las más estable el sistema con 20% de aceite esencial de naranja y 10% de Tween 80 (Alvarado López, & Medina Lezama, 2019). Sin embargo, esto puede cambiar en la composición de las emulsiones que se van a realizar con nanopartículas de quitosano, ya que el quitosano no solo tiene capacidad antimicrobiana, sino que también sirve como una partícula sólida orgánica que puede estabilizar emulsiones (Øye, & Simon, & Rustad, & Paso, 2023), además de que los Tween son más efectivos al añadir otros emulsionantes (Acofarma, s.f.).

Los sistemas de emulsiones más estudiados por su estabilidad y efectividad en varias aplicaciones son las nanoemulsiones y las microemulsiones. Las nanoemulsiones se caracterizan por tener el tamaño de las gotas en un rango entre 20 a 500 nm (Bilbao-Sáinz, et al., 2010), haciendo a las emulsiones transparentes, esto las hace más estables que una emulsión normal, ya que las gotas tardan más tiempo en juntarse, actualmente son utilizadas para nanoencapsulación de aceites esenciales y recubrimientos alimentarios comestibles (Øye, & Simon, & Rustad, & Paso, 2023). La diferencia entre las nanoemulsiones y las microemulsiones son principalmente por el tamaño de la gota en la fase dispersa, siendo el tamaño desde 100 a 1000 nm en las microemulsiones (Ragish Singh, & Koya Pulikkal, 2022).

Las microemulsiones presentan la ventaja de ser termodinámicamente estables esto se debe a la cantidad de tensoactivos utilizados en los sistemas para evitar la separación de la fase dispersa y continua (Kegel, & Overbeek, & Lekkerkerker, 2018).

Los métodos de elaboración de nanoemulsiones logran ser algo complejos ya que requieren de grandes cantidades de energía para lograr ese tamaño en las gotas, la energía puede ser otorgada por aparatos mecánicos (método de alta energía) o por propiedades fisicoquímicas (método de baja energía). Uno de los métodos de alta energía más utilizados es emulsificación por ultrasonido donde se utiliza ondas ultrasónicas con frecuencia mayores a 20 kHz y los tamaños de las gotas llegan a ser menores a 100 nm (Ragish Singh, & Koya Pulikkal, 2022). Otro método que también se utiliza es homogenización de alta presión donde primero se realiza la pre-emulsificación obteniendo una emulsión gruesa que después pasa a través de las rendijas del homogeneizador de alta presión para volverla una emulsión fina (Chen, & Ao, & Ge, & Shen, 2020), pero tiene la desventaja de no ser el indicado para concentraciones de aceites esenciales mayores de 20% y con tamaños de gotas menores a 200 nm (Ragish Singh, & Koya Pulikkal, 2022). Los métodos descritos también se utilizan para la elaboración de microemulsiones con la ventaja de no requerir tanta energía a diferencia de las nanoemulsiones al requerir que el tamaño de la gota sea demasiado pequeño. En esta investigación se decidió realizar nanoemulsiones, ya que son sistemas mucho más estables, además de que se puede encapsular mejor el aceite esencial.

## V. Materiales y Métodos

### 5.1 Materiales

Para esta investigación se utilizó aceite esencial de *Litsea cubeba* (Laboratorios Hersol S.A. de C.V., México), desinfectantes comerciales marca BioCítrico™ y Great Value™, quitosano que consta de un triturado de conchas de camarones desacetilado mayor o igual al 75% (Sigma-Aldrich, Islandia), quitosano con un peso molecular promedio (Sigma-Aldrich, Iceland), ácido cítrico (Diquítra) y ácido ascórbico (Omnichem). El emulgente utilizado para la preparación de nanoemulsiones fue polisorbato 80 (Tween 80, Merck KGaA, Francia).

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Caracterización de soluciones cítricas con quitosano

##### 5.2.1.1 Preparación de las soluciones cítricas con quitosano

Se prepararon varias soluciones cítricas de ácido cítrico al 1% p/v y de ácido ascórbico al 1% p/v en matraces aforados de 100 mL. Después, se evaluó la solubilidad del quitosano con peso molecular promedio (QPMM) y del quitosano que consta de un triturado de conchas de camarones desacetilado mayor o igual al 75% (QCC) en concentraciones de 0.5% p/p y 1% p/p en las soluciones cítricas. Para ello se añadió el quitosano a la solución cítrica que se encontraba en agitación constante al ponerla en un vaso de precipitado con un agitador en una parrilla con agitación (sin calentar) mezclándolo por 30 min.

### 5.2.1.2 Densidad

La densidad se midió utilizando un picnómetro de vidrio a peso constante. Primero se pesó el picnómetro vacío y posteriormente se añade la solución. La diferencia del peso del picnómetro con la solución y del picnómetro vacío se divide entre el volumen del picnómetro, y se expresa en  $\text{g/cm}^3$  (Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica, [AOAC], 2000).

## **5.2.2 Propiedades físicas y químicas de las soluciones y nanoemulsiones**

### 5.2.2.1 Viscosidad

Esta propiedad se calculó utilizando un viscosímetro de Cannon-Fenske serie (50 no. 137A, Thomas Scientific, EE.UU.) colocado en un soporte universal. Se añade una cantidad moderada de solución al viscosímetro y, por el orificio pequeño, se succiona el líquido hasta llegar a la marca anular superior de medida. Después, se observa como el fluido desciende y se comienza a tomar el tiempo hasta que llegue a la marca anular inferior de medida. Esto se realizó por triplicado (Vallarta Solorio, 2018). Para obtener la constante del viscosímetro, se realizó el mismo procedimiento con agua destilada, considerando que la viscosidad del agua es de 1 cSt, y se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_0 = \frac{1cSt}{t H_2O}$$

Donde:

$C_0$ =Constante de viscosímetro (cSt/s)

$t H_2O$ =tiempo de agua destilada (s)

Después, se calculó la viscosidad cinemática (cSt) del aceite multiplicando la constante del viscosímetro por el tiempo de flujo.

$$\text{Viscosidad cinemática} = C_0 * t$$

Donde:

$C_0$ =Constante de viscosímetro (cSt/s)

t =tiempo de flujo (s)

Para obtener la viscosidad dinámica (mPa\*s), se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Viscosidad dinámica} = \text{Viscosidad cinemática} * \rho$$

Donde:

$\rho$ =densidad de la solución (g/cm<sup>3</sup>)

### **5.2.3 Caracterización de desinfectantes orgánicos comerciales**

#### 5.2.3.1 Medición de pH

Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro (Conductronic, México) calibrado con soluciones tampón pH 4.01 y 7.00 (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V., México).

#### 5.2.3.2 Determinación de acidez

Para la determinación de acidez se realizó una titulación con hidróxido de sodio (NaOH) a concentración 0.1 N. En un vaso de precipitado se le añadió 10 mL de muestra, 1 mL de fenolftaleína al 1% como indicador y un agitador magnético. En una bureta se colocó NaOH a 0.1 N y debajo de la bureta se colocó una parrilla con agitación. Encima de la parrilla se colocó la muestra y se llevó a agitación constante, se tituló con NaOH hasta observar un color

rosado que persistiera mínimo 15 segundos. Esto se realizó por triplicado (Secretaría de Gobernación, 1982). La ecuación para calcular la concentración de acidez fue la siguiente:

$$\% \text{ acidez} = \frac{V * N * K}{m} * 100$$

V= mililitros utilizados de NaOH

N=normalidad de NaOH=0.11 N

K= constante de ácido cítrico=64.041 g/eq

m= volumen de la muestra en mililitros

#### **5.2.4 Lavado y desinfección de fresas**

Se utilizaron varias muestras de fresas seleccionadas al azar de dos en dos. Un par de fresas no fueron lavadas ni desinfectadas (control); y a las demás se les aplicó 1 mL de los desinfectantes comerciales y de las nanoemulsiones en cada fresa y se dejaron a reposar por 15 min antes de picarlas.

#### **5.2.5 Recuento de microbiota de fresas**

Se utilizó agua peptonada, bolsas de muestreo estériles, tubos de ensayo con agua peptonada (9 mL cada uno), agar para métodos estándar (Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) y cajas Petri de 60x15 mm (Sym Laboratorios, México).

Para la preparación y dilución de las muestras de fresas, el procedimiento se basó en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Primero, se seleccionaron dos fresas al azar y se les quitó las hojas, luego se picaron con utensilios estériles y se pesaron 10 g en la bolsa de muestreo estéril. Se adicionó en la bolsa 90 mL de agua peptonada y se cerró la

bolsa para llevarla al homogeneizador (Seward, México) por 2 min. Una vez que las partículas grandes se sedimentaron, se pasó un mililitro a un tubo de ensayo ( $10^{-2}$ ) y se siguió diluyendo hasta llegar a  $10^{-5}$  (Secretaría de Gobernación, octubre 1995).

Para el recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA), se colocaron cajas Petri estériles y se marcaron para su identificación (3 para cada dilución), se añadió 1 mL a cada caja, se agregaron entre 5 a 8 mL de agar y se mezcló realizando 8 movimientos de derecha a izquierda, 8 en el sentido de las manecillas del reloj, 8 en sentido contrario y 8 de atrás a adelante. Una vez solidificadas, se llevaron a incubar en posición invertida a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas (Secretaría de Gobernación, diciembre 1995).

Para el recuento de mohos y levaduras, se siguió el mismo procedimiento de BMA, pero utilizando agar dextrosa y papa (Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) acidificado con ácido tartárico estéril al 10%, añadiendo 1.4 mL de ácido tartárico por cada 100 mL, y se llevaron a incubar a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 5 días (Secretaría de Gobernación, septiembre 1995).

### **5.2.6 Elaboración de emulsiones con ultrasonido**

Las nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) se prepararon utilizando ultrasonido (modelo CP-505, Cole Parmer, Estados Unidos). Para la elaboración de éstas se siguió el procedimiento indicado por Dávila-Rodríguez et al., (2020), realizando algunos cambios. Primero, se preparó la solución de ácido cítrico con quitosano al 1% p/p relación 1:1. La concentración utilizada de Tween 80 fue de 0.5% (p/p) y aceite esencial de *Litsea cubeba* a diferentes concentraciones variando de 0.06 al 0.5% (p/p). La amplitud de onda fue de 90  $\mu\text{m}$  por 15 min, sumergiendo la sonda 1.0 cm del nivel del volumen del líquido.

## 5.2.7 Tamaño de gota del aceite disperso

### 5.2.7.1 Índice de refracción del aceite

Para medir el índice de refracción del aceite esencial de *Litsea cubeba*, se utilizó un refractómetro digital (Reichert TS, AMETEK Reichert, EE.UU.). Las mediciones se realizaron por triplicado.

### 5.2.7.2 Medición del diámetro de gota

Se midió el diámetro de gota del aceite disperso en la emulsión utilizando el analizador de tamaño de partículas de luz dinámica (Microtac Nanotrac Wave II, Microtac Inc., EE.UU.) utilizando el software FLEX versión 11.1.0.4. Se calculó el índice de dispersión (ID) utilizando la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{D_{10} - D_{90}}{D_{50}}$$

$D_{10}$ = diámetro del 10% de las gotas en nanómetros

$D_{50}$ = diámetro del 50% de las gotas en nanómetros

$D_{90}$ = diámetro del 90% de las gotas en nanómetros

## 5.2.8 Efectividad de desinfectantes contra *Aspergillus niger* en sistemas modelo

### 5.2.8.1 Lavado de esporas de *Aspergillus niger*

Se inoculó *Aspergillus niger* en tubos de ensayo con 12 mL de Agar papa dextrosa (Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) y se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 días.

Después de su incubación, se realizó un lavado de esporas con 10 mL de agua peptonada y 0.1% de Tween 80. Se realizó un recuento de esporas utilizando una cámara de Neubauer (Marienfield, 0.100 mm/0.0025 mm<sup>2</sup>, Germany), colocando una muestra del

lavado de esporas en la cámara y observando bajo un microscopio. Se contaron las esporas manualmente en los cuadros indicados en la Figura 2.

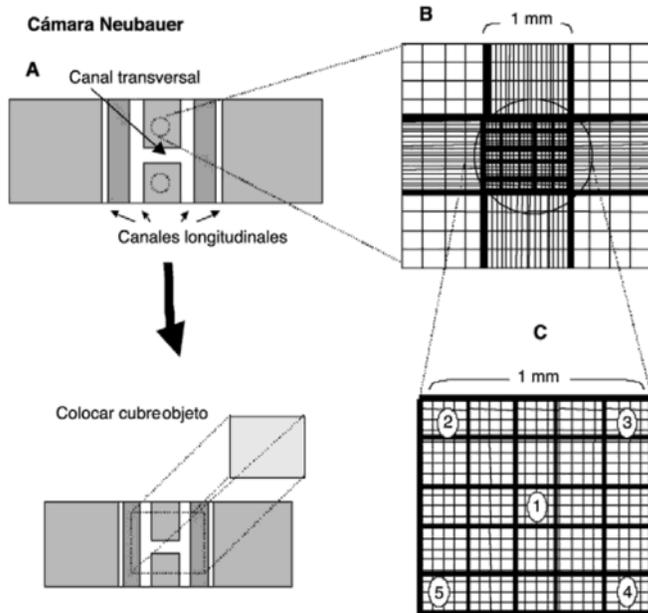


Figura 2. Conteo de esporas mediante cámara de Neubauer (Castillo, 2004)

Se calcularon el número de esporas por mililitro con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (esporas/mL)} = P * 25 \text{ cuadros} * 10,000$$

P=promedio de esporas contadas en 5 cuadros

Se realizó una dilución de  $10^{-1}$  del lavado de esporas y esta se utilizó para los sistemas modelo.

#### 5.2.8.2 Sistemas modelo

Se agregó 1 mL de los sistemas (nanoemulsiones y desinfectantes comerciales) en 9 mL de agar de rosa de bengala con cloranfenicol (Merck KGaA, Germany), se vertió el agar en la

caja Petri. Una vez solidificado el agar, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de la dilución del lavado de esporas en el centro de la caja y se esperó a que se absorbiera en el agar, esto se realizó por triplicado. Se dejaron a una temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , y se midió el crecimiento del hongo midiendo su diámetro (mm) con un vernier digital por 7 días.

## **5.2.9 Reto microbiano de fresas inoculadas con *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes***

### 5.2.9.1 Cultivo de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*

Se inoculó *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Listeria monocytogenes* (Scott A) en tubos de ensayo con 12 mL de agar de soya tripticaseína (Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) y se incubaron a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas. Después, se metieron a refrigeración para su conservación.

Se inoculó el microorganismo proveniente de las cuñas pasando una asada y se llevaron los caldos a incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas. Se realizaron diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-8}$  para realizar recuento en placa, vertiendo 1 mL de  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  en 3 cajas Petri cada una. Se añadió agar de soya tripticaseína y se incubaron a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas.

### 5.2.9.2 Inoculación del microorganismo a la fresa

Se utilizó 1 mL de caldo inoculado con *Escherichia coli* para la inoculación de las fresas, asegurándose de distribuirlo uniformemente sobre toda la superficie de la fruta. Este procedimiento se realizó añadiendo directamente el caldo a la fresa ( $1 \times 10^7$  UFC/mL), y diluyendo la carga microbiana del caldo ( $1 \times 10^4$  UFC/mL). Una vez inoculadas, las fresas se

dejaron entre 20 a 30 min cerca del mechero para permitir la evaporación del inóculo, pasado el tiempo, se le añadió 1 mL de desinfectante a cada muestra de fresa.

#### 5.2.9.3 Evaluación de desinfectantes y nanoemulsiones

Se seleccionaron 2 fresas al azar para aplicar cada prueba. Se prepararon tres controles (sin desinfectante): un control negativo, fresas frescas sin ningún lavado ni inoculación para reto microbiano; un control de fresas lavadas sin inoculación para reto microbiano; y un control positivo que fueron lavadas y después inoculadas con un microorganismo a la vez de reto microbiano.

Las muestras de fresas se dejaron a diferentes tiempos desde 0.5 a 20 min una vez cubiertas con el desinfectante, pasado el tiempo se picaron las fresas, se pesaron 5 g en la bolsa de muestreo estéril. Se adicionó en la bolsa 45 mL de agua peptonada y se cerró la bolsa para llevarla al homogeneizador (Seward, México) por 2 min. Todas las bolsas se llevaron al refrigerador para evitar crecimiento. Finalmente, se realizó un recuento de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  utilizando el método de vaciado en placa añadiendo agar de soya tripticaseína e incubando a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 h.

Los recuentos microbianos para los controles, y las fresas tratadas con desinfectantes en diferentes tiempos de contacto se realizaron por triplicado.

## VI. Resultados y Discusión

### 6.1 Soluciones cítricas con quitosano

El quitosano es soluble en soluciones con pH ácidos, en emulsiones con aceites esenciales se ha observado su capacidad antimicrobiana en concentraciones entre 0.2 a 5 g/L contra patógenos (Wang, et al., 2023). Se realizaron soluciones cítricas con quitosano a concentraciones de 0.5 y 1% p/p, utilizando ácido ascórbico y cítrico al 1% p/v.

Las muestras de quitosano utilizadas son de un triturado de conchas de camarones desacetilado mayor o igual al 75% (QCC), y con un peso molecular promedio (QPMM). Estas muestras sacadas de los mariscos en sí no son un peligro para los consumidores, de acuerdo con la FDA, el quitosano es considerado seguro para el consumo humano ya sea proveniente de hongos o de camarones (Chinova Bioworks, 2021). El quitosano es un polímero no tóxico, antimicrobiano y que no contiene alérgenos (Moreno de la Cruz, 2019). Se realizaron varias pruebas de solubilidad de diferentes tipos de quitosano en polvo (QPMM y QCC), en diferentes ácidos orgánicos, como el ácido ascórbico y el cítrico, y a diferentes concentraciones (Tabla 1) midiendo también su densidad.

Tabla 1. Solubilidad de quitosano en soluciones cítricas

Tipo de quitosano	Solución	Cantidad de quitosano (% p/p)	Disolución completa	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
QPMM	Ácido cítrico al 1% p/v	0.5	No	-
	Ácido ascórbico al 1% p/v	0.5	Sí	1.17 ± 0.01
		1	No	-
QCC	Ácido cítrico al 1% p/v	0.5	Sí	1.18 ± 0.01
		1	Sí	1.17 ± 0.01
	Ácido ascórbico al 1% p/v	0.5	No	-

En la Tabla 1 se muestran las diversas combinaciones en las soluciones, siendo la QCC al 1% p/p la que se incorporó mejor en solución de ácido cítrico al 1% p/v. Se decidió por esta solución ya que, en varios estudios revisados, se ha observado que el quitosano, a mayores concentraciones, mejor será su capacidad antimicrobiana. Se ha observado que el quitosano logra disolverse en mayores cantidades con una mezcla de ácido cítrico y ácido acético (Wu, et al. 2021), pero al ser el ácido acético no seguro para el consumo humano a altas concentraciones, se decidió realizar las soluciones con concentraciones de ácido cítrico entre 0.5 a 1% p/p porque son cantidades pequeñas con las que los polvos de quitosano son solubles y tienen capacidad antimicrobiana.

En la Tabla 1, también se observa que para el ácido cítrico con QPMM y ácido ascórbico con QCC, solo se realizó con quitosano al 0.5% p/p, esto se debe a que resultaron no ser solubles en las concentraciones, por lo que en concentraciones altas tampoco se obtendría solubilidad de los diferentes quitosanos en polvo.

## **6.2 Propiedades físicas del aceite esencial de *Litsea cubeba***

Para la elaboración de nanoemulsiones se utilizó el aceite esencial de *Litsea cubeba* al cual se le midió la densidad (g/mL) por duplicado y la viscosidad dinámica (mPa\*s) por triplicado (Tabla 2). El aceite esencial de *Litsea cubeba* a temperatura ambiente tiene una densidad de  $0.891 \pm 0.006$  g/mL. A 25°C la densidad del aceite está reportada como 0.884 g/mL (Sigma-Aldrich, s.f.), lo cual es muy cercano a la densidad obtenida. La viscosidad resultó de  $2.98 \pm 0.03$  mPa\*s, lo cual hace al aceite más viscoso que el aceite de limón italiano que tiene un

valor reportado de 1.09 mPa\*s a 20°C, y al aceite esencial de naranja de 0.99 mPa\*s a 20°C (Department Health Safety and Environment, 2020a, 2020b).

**Tabla 2. Densidad y viscosidad del aceite esencial de *Litsea cubeba***

Densidad (g/mL)	Viscosidad dinámica aceite esencial (mPa*s)
0.891 ± 0.006	2.98 ± 0.03

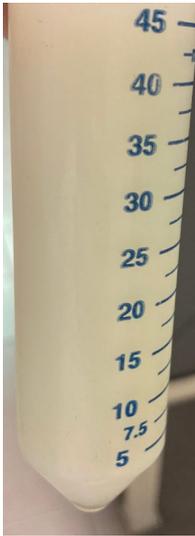
### 6.3 Composición y evaluación de sistemas de nanoemulsiones

Como se mencionó anteriormente, para la realización de los sistemas, se decidió utilizar la solución de ácido cítrico al 1% p/p con quitosano QCC al 1% p/p y el aceite esencial de *Litsea cubeba*. Se utilizó un homogeneizador ultrasónico con 75% de amplitud (90 µm) por 15 min para cada sistema. El emulgente utilizado fue Tween 80 y se probaron diferentes concentraciones de aceite esencial.

**Tabla 3. Composición de las nanoemulsiones con aceite esencial de *Litsea cubeba***

Componente	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5
Ácido cítrico	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
Quitosano	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
Aceite esencial de <i>Litsea cubeba</i>	1 g	0.5 g	0.25 g	0.12 g	0.06 g
Tween 80	0.5 g				
Agua destilada	96.5 g	97 g	97.25 g	97.38 g	97.44 g

En la Tabla 3, se observan 4 sistemas variando la concentración del aceite esencial utilizado. El sistema 1, con una concentración de 1% p/p de aceite esencial, presentó un color blanco lechoso como se muestra en la Figura 3.

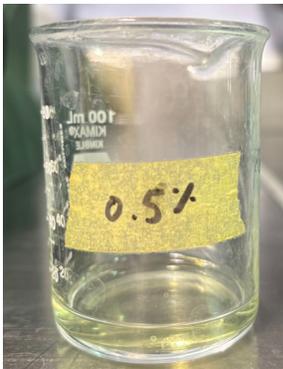


**Figura 3. Apariencia de las nanoemulsiones al 1% p/p de aceite esencial**

El sistema 1 presentó un olor similar al limón, lo cual era agradable. Sin embargo, presentaron un sabor astringente lo cual no es ideal, ya que en las instrucciones de los desinfectantes orgánicos comerciales se tienen las indicaciones de aplicar directamente el desinfectante, esperar entre 5 a 15 min y no lavar los alimentos después de la aplicación. Al no eliminar el desinfectante, éste tiene que presentar un sabor nulo o menos potente que no afecte el sabor de los alimentos, por lo que se optó por los sistemas 4 y 5 de 0.12 y 0.06% p/p de aceite esencial respectivamente, al presentar un sabor casi nulo a diferencia de los otros sistemas. Los sistemas 2, 3, 4 y 5 se diferencian mucho del color del sistema 1 siendo más transparentes como se muestra en la Figura 4 y 5.



**Figura 4. Apariencia de las nanoemulsiones al 0.06%, 0.12% y 0.25% p/p de aceite esencial**



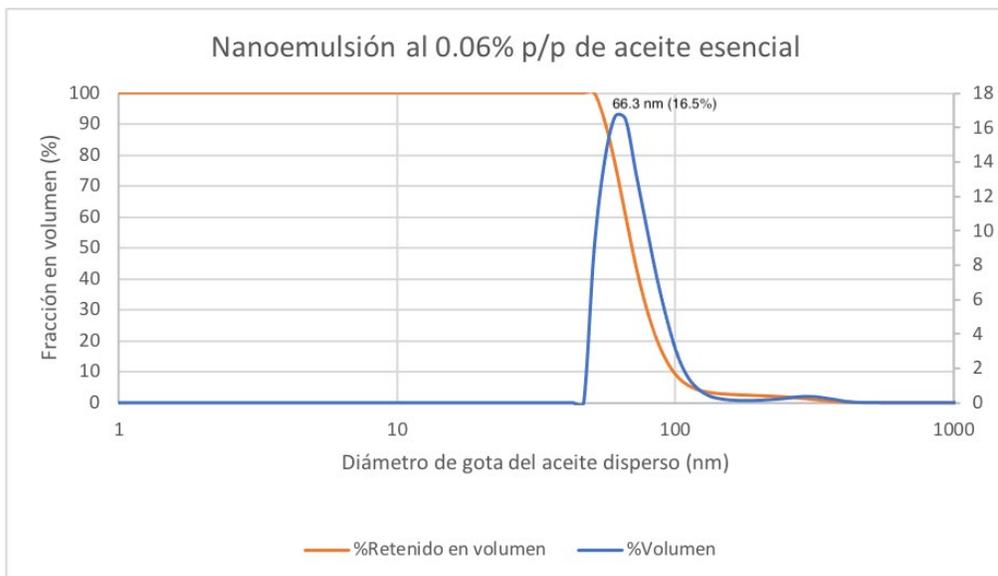
**Figura 5. Apariencia de la nanoemulsión al 0.5% p/p de aceite esencial**

Los sistemas 3, 4 y 5 siguen presentando un olor agradable parecido al limón, siendo que el sistema 4 y 5 tienen un sabor casi nulo al ser concentraciones más bajas de aceite esencial. Se seleccionaron los sistemas 4 y 5 al no presentar un sabor desagradable, además de que son los sistemas en donde las concentraciones de aceite esencial de *Litsea cubeba* son de cantidades similares a la concentración mínima inhibitoria reportada por otros autores (Li, et al., 2014) que es de 0.125% v/v.

#### 6.4 Tamaño de gota del aceite disperso

Para la determinación del tamaño de gota del aceite disperso en las emulsiones, primero se midió el índice de refracción del aceite esencial de *Litsea cubeba*, que fue de  $1.4873 \pm 0.0001$ , lo que coincide con el rango de índice de refracción reportado en la bibliografía que es entre 1.475 a 1.489 a 20°C (Anónimo, 2019).

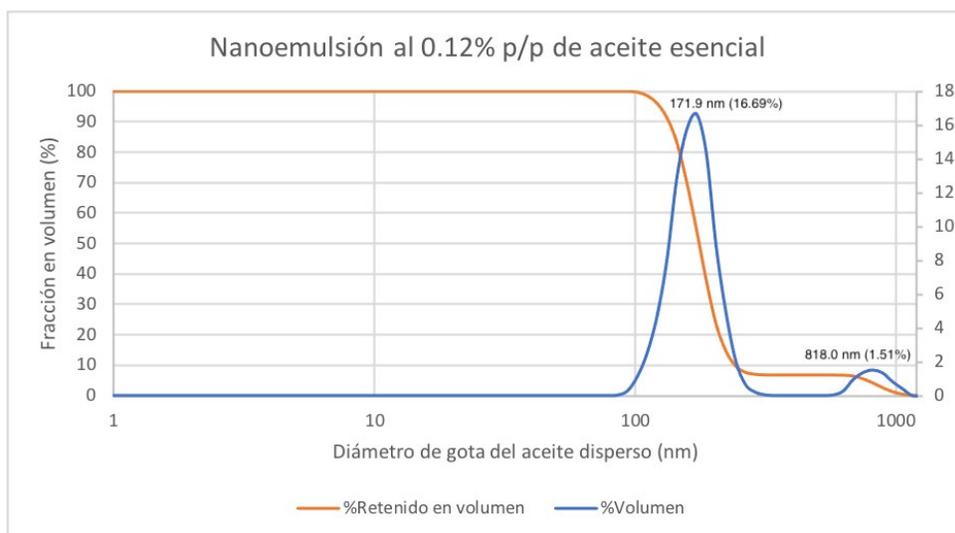
Al colocar los sistemas de nanoemulsiones en el analizador de tamaño de partículas se obtuvieron mediciones de la distribución de tamaño de las partículas de aceite esencial para las nanoemulsiones con 0.12 y 0.06% p/p de *Litsea cubeba*.



**Figura 6.** Distribución del tamaño de las gotas de esencia de *Litsea cubeba* en la nanoemulsión al 0.06% p/p

La mayoría de las gotas de aceite se encuentran en un rango de 50 a 100 nm para la nanoemulsión de 0.06% (p/p) (Figura 6). El D10 es igual a 99.1 nm; el D50 es igual a 70.1

nm y el D90 es igual a 56.1 nm. Con esta información, se calculó el índice de dispersión (ID), siendo de 0.61, lo cual significa que la distribución de tamaño de la gota dispersa es homogénea, además de ser una distribución unimodal con una moda de 66.3 nm (16.5%). Esto confirma que la emulsión al 0.06% p/p de aceite esencial es una nanoemulsión, por tener un tamaño de gota menor a 500 nm (Bilbao-Sáinz, et al., 2010).



**Figura 7. Distribución del tamaño de las gotas de aceite esencial de *Litsea cubeba* en la nanoemulsión al 0.12% p/p**

La distribución del tamaño de la gota de aceite esencial disperso en la nanoemulsión al 0.12% p/p es bimodal, con una moda 1 en 171.9 nm (16.69%) y una moda 2 en 818.0 nm (1.51 %) (Figura 7). Se calculó el ID para esta nanoemulsión siendo de 0.61, a partir del D10 de 241.6 nm; D50 de 176.2 nm y D90 de 134.4 nm. Si bien el ID de ambas nanoemulsiones es igual, la nanoemulsión más concentrada (0.12 % p/p) es menos homogénea que la menos

concentrada (0.06% p/p) por tener dos modas y además posee un diámetro mediano D50 mucho mayor, de 176.2 nm.

Ambas nanoemulsiones presentaron una estabilidad a la separación de fases muy buena, sin separación después de 2 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) y se atribuye principalmente al tamaño de la gota del aceite disperso, lo cual es característico de las nanoemulsiones en general. Las concentraciones de aceite esencial de *Litsea cubeba* usadas son dosis pequeñas a comparación de otros sistemas de nanoemulsiones reportados. En un estudio de nanoemulsiones elaboradas con 10% p/p de aceite esencial de canela D10 fue de 176 nm; D50 de 226 nm y D90 de 296 nm presentando una distribución unimodal siendo su ID de 0.53 (Dávila, et al., 2019).

### 6.5 Caracterización de desinfectantes orgánicos comerciales y nanoemulsión

Se realizó una caracterización a los dos desinfectantes comerciales para realizar una comparación con las dos nanoemulsiones preparadas. En la Tabla 4 se muestran las densidades y las viscosidades.

**Tabla 4. Propiedades físicas de desinfectantes y nanoemulsiones**

Medición	Nanoemulsión al 0.06% p/p de aceite esencial	Nanoemulsión al 0.12% p/p de aceite esencial	BioCítrico™	Great Value™
Viscosidad (mPa*s)	14.39 ± 0.09	17.72 ± 0.07	1.49 ± 0.01	1.12 ± 0.02
Densidad (g/mL)	1.03 ± 0.02	1.07 ± 0.02	1.03 ± 0.01	1.00 ± 0.01
pH	2.53 ± 0.02	2.54 ± 0.02	3.04 ± 0.03	3.90 ± 0.06
Acidez (% ácido cítrico)	1.05 ± 0.02	N.D.	0.11 ± 0.01	0.004 ± 0.00

N.D. No se determinó

En la Tabla 4, las nanoemulsiones de 0.12% y 0.06% p/p presentan densidades y viscosidades más altas que los desinfectantes comerciales, siendo la viscosidad la diferencia más notable de  $17.715 \pm 0.067$  y  $14.390 \pm 0.086$  mPa\*s respectivamente. La viscosidad de las nanoemulsiones de aceite esencial de *Litsea cubeba* es muy alta comparada con otros sistemas; se ha reportado que nanoemulsiones de aceite esencial de canela, orégano y romero tienen una viscosidad de  $4.69 \pm 0.03$ ,  $5.83 \pm 0.03$  y  $5.58 \pm 0.04$  mPa\*s respectivamente (Dávila et al., 2019). Esto se debe a que las nanoemulsiones tienen quitosano que es un polisacárido. Los polisacáridos que logran ser solubles en soluciones tienen la propiedad de formar geles o espesar la solución (Lovegrove, et al., 2015).

Los valores de pH resultan ser ácidos siendo el de Great Value™ el más alto  $3.90 \pm 0.06$ , mientras que las nanoemulsiones de 0.12 y 0.06% p/p tienen un pH de  $2.53 \pm 0.02$ . Los desinfectantes orgánicos comerciales tienen en su enlistado de ingredientes componentes como extractos de semillas cítricas, ácido cítrico, glicerina, entre otros componentes, explicando el pH bajo de éstos.

Se tomó en consideración que el ácido más prominente en los desinfectantes comerciales era el ácido cítrico teniendo una constante de  $64.041$  g/eq. La acidez de los desinfectantes comerciales es muy baja, mientras que la de las nanoemulsiones es de  $1.052 \pm 0.021$  g de acidez/100 mL.

## **6.6 Recuento de microbiota de fresas**

Se cuantificó microbiota de fresas vendidas en supermercados por caja (Tabla 5). Las fresas frescas del supermercado tienen una baja carga microbiana de bacterias mesofílicas aerobias

(BMA), así como de mohos y levaduras. Cabe mencionar que la carga microbiana de las fresas varía dependiendo del origen de estas, el trato y la manipulación por la que pasó antes de llegar al consumidor. Por ejemplo, se puede observar que el fruto presenta 3.66 Log UFC/g de mohos y levaduras, sin embargo, en otro estudio se observaron poblaciones más altas de 6.85 Log UFC/g de levaduras (Ponce, 2022).

**Tabla 5. Microbiota de fresas, bacterias mesofílicas aerobias (BMA), mohos y levaduras expresadas en Log UFC/g**

BMA	Mohos y levaduras
3.19 ± 0.12	3.66 ± 0.33

### 6.7 Recuento de BMA y mohos y levaduras de fresas desinfectadas con desinfectantes orgánicos comerciales y nanoemulsiones

Una vez realizado el recuento de microbiota, se realizó un recuento una vez desinfectadas con los desinfectantes comerciales BioCítrico™ y Great Value™, y se realizó una comparación con las nanoemulsiones; cabe mencionar que todas las muestras tuvieron el mismo tiempo de contacto que fue de 15 min (Tabla 6).

**Tabla 6. Recuento de BMA en fresas desinfectadas expresadas en Log UFC/g**

Control	BioCítrico™	Great Value™	Nanoemulsión de aceite esencial de <i>Litsea cubeba</i> al 0.12% p/p	Nanoemulsión de aceite esencial de <i>Litsea cubeba</i> al 0.06% p/p
4.61 ± 0.02 <sup>A</sup>	2.78 ± 0.01 <sup>B</sup>	3.84 ± 0.04 <sup>C</sup>	2.01 ± 0.15 <sup>D</sup>	1.73 ± 0.06 <sup>D</sup>

\*Letras diferentes son significativamente diferentes, Prueba de Tukey  $\alpha=0.05$  ( $p<0.05$ )

Como se puede observar en la Tabla 6, el control (fresas no tratadas) tuvieron una microbiota de 4.61 Log UFC/g; se puede observar que el de mayor efectividad fueron las

nanoemulsiones, ya que la de 0.12% p/p redujo aproximadamente 2.6 Log UFC/g y la de 0.06% p/p 2.87 Log UFC/g, mientras que la que presentó menos efectividad fue la de Great Value™ que no logró reducir más de un ciclo logarítmico. Para observar diferencias significativas, se realizó un análisis de medias por prueba de Tukey. Se puede observar que entre las dos nanoemulsiones no se encuentra diferencia significativa al reducir la carga microbiana de BMA en las fresas aún cuando tienen diferentes concentraciones de aceite esencial ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 7. Recuento de mohos y levaduras en fresas desinfectadas expresadas en Log UFC/g**

Control	BioCítrico™	Great Value™	Nanoemulsión de aceite esencial de <i>Litsea cubeba</i> al 0.12% p/p	Nanoemulsión de aceite esencial de <i>Litsea cubeba</i> al 0.06% p/p
6.19 ± 0.03 <sup>A</sup>	3.77 ± 0.01 <sup>B</sup>	4.65 ± 0.05 <sup>C</sup>	2.53 ± 0.07 <sup>D</sup>	2.66 ± 0.01 <sup>D</sup>

\*Letras diferentes son significativamente diferentes, Prueba de Tukey  $\alpha = 0.05$  ( $p < 0.05$ )

En la Tabla 7, se observa que los desinfectantes comerciales reducen un poco mejor los mohos y levaduras, siendo que el BioCítrico™ reduce aproximadamente 2.42 Log UFC/g y el de Great Value™ 1.55 Log UFC/g, las nanoemulsiones logran ser más efectivas siendo que la de 0.12% p/p reduce aproximadamente 3.66 Log UFC/g, y la 0.06% p/p 3.54 Log UFC/g. Para observar diferencias significativas, se realizó un análisis de media por prueba de Tukey.

Tanto en la Tabla 6 como en la Tabla 7 se puede observar que las dos nanoemulsiones pertenecen al mismo grupo en la prueba de Tukey ( $p > 0.05$ ); es decir que, aunque tengan concentraciones diferentes, no presentan una diferencia significativa en la inhibición de

microorganismos. Sin embargo, esto puede deberse a la alta variedad de BMA y mohos y levaduras en la fresa. La eficiencia de un desinfectante puede verse afectada por varios factores como el número de microorganismos y su resistencia, la concentración y potencia del desinfectante, el tiempo de contacto del desinfectante con la superficie (CDC, 2023 a). Como los dos sistemas presentan concentraciones bajas de aceite esencial, y por la gran variedad de microorganismos presentes en la fresa algunos pueden tener mayor resistencia a las nanoemulsiones afectando la reducción de ciclos logarítmicos.

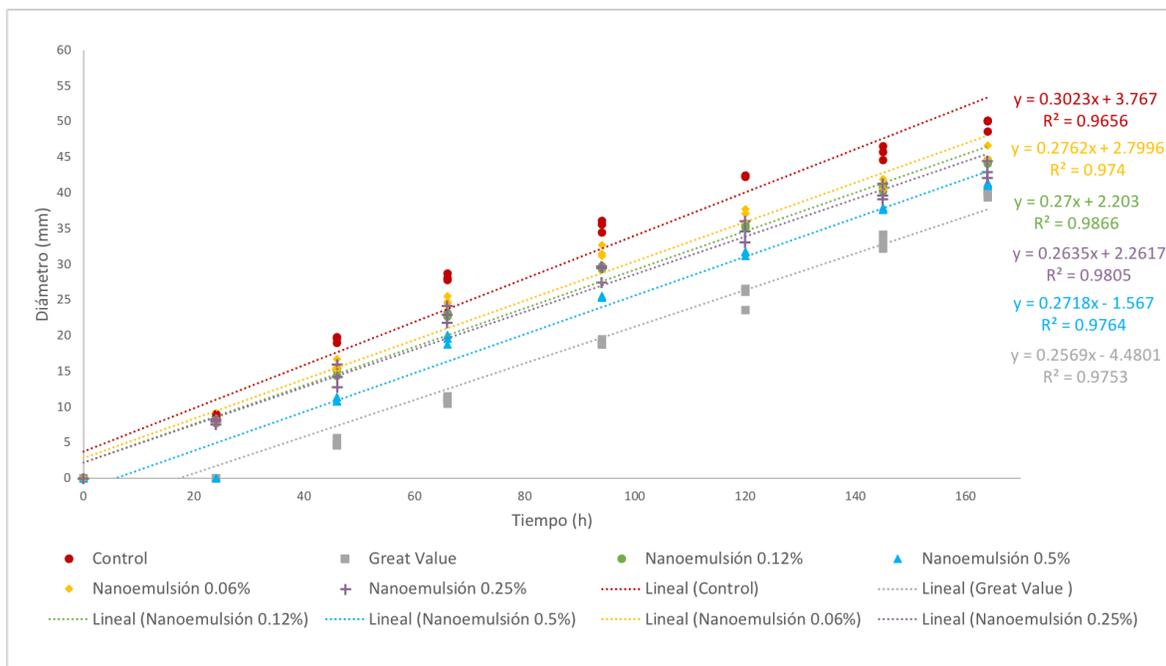
## **6.8 Retos microbianos**

### 6.8.1 Fúngico en sistemas modelo

La concentración en el lavado de esporas fue de un promedio de 88.2 esporas/cuadro, es decir,  $2.2 \times 10^7$  esporas/mL. Al diluirlo se tuvo una población de  $2.2 \times 10^6$  esporas/mL. Como se mencionó anteriormente, se utilizaron 5  $\mu$ L para cada sistema, por lo que se tuvo una población inicial en cada sistema de  $1.1 \times 10^4$  esporas/ $\mu$ L.

Para los sistemas modelo se evaluaron los desinfectantes comerciales, las nanoemulsiones de 0.5, 0.25, 0.12 y 0.06% p/p de aceite esencial. El desinfectante BioCítrico™ no se presenta en la Figura 10, esto se debe a que no creció el moho durante los 7 días en las cajas Petri.

El crecimiento del moho de cada sistema se observa en la Figura 10. En el Anexo A se muestran más tiempos de monitoreo del crecimiento del moho graficados en la Figura 10.

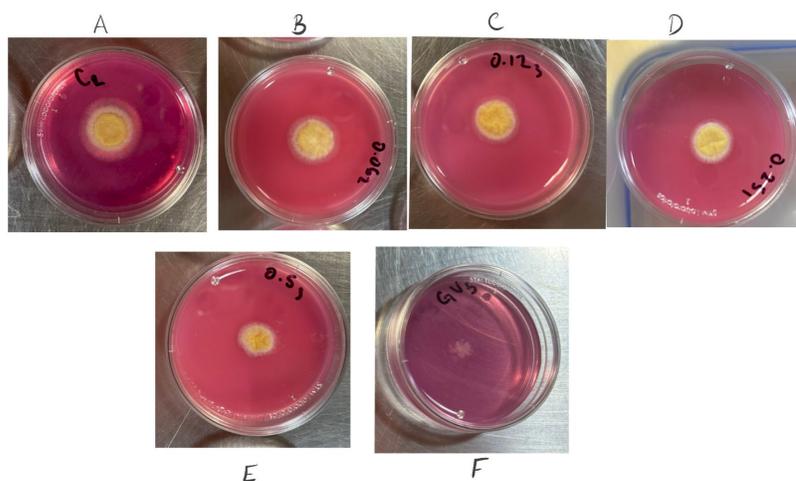


**Figura 8.** Gráfico de crecimiento del *Aspergillus niger* en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™

A partir de las cinéticas de crecimiento del *Aspergillus niger* en los sistemas modelo, se determinaron el tiempo lag y la velocidad de crecimiento (Tabla 8). El primer día en el que se observa crecimiento del moho (t lag), se observa tanto para el control, como con las nanoemulsiones del 0.06 al 0.25% p/p de aceite esencial que fue de 24 h, mientras que el desinfectante Great Value™ y la nanoemulsión al 0.5% p/p presentaron el primer crecimiento del moho a las 46 h. Las velocidades de crecimiento del moho con las nanoemulsiones son similares ( $0.26 \pm 0.01$  mm/h) diferenciándose con el control que fue más rápido ( $0.30 \pm 0.01$  mm/h). En la Figura 9 se observan el primer crecimiento del *Aspergillus niger* en los agares de rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™. En los Anexos B, C y D se muestran más fotografías durante el monitoreo del crecimiento del moho durante 66, 120 y 164 h.

**Tabla 8. Velocidad de crecimiento y t lag del *Aspergillus niger* en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™**

Sistemas	t lag	Velocidad (mm/h)	R <sup>2</sup>
Control	24 h	0.302	0.97
Great Value™	46 h	0.257	0.98
Nanoemulsión al 0.06% p/p	24 h	0.276	0.97
Nanoemulsión al 0.12% p/p	24 h	0.270	0.99
Nanoemulsión al 0.25% p/p	24 h	0.264	0.98
Nanoemulsión al 0.5% p/p	46 h	0.272	0.98



**Figura 9. Crecimiento a las 46 h del *Aspergillus niger*, A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™**

Con los datos del monitoreo del crecimiento fúngico, se realizaron pruebas de Tukey para analizar las diferencias significativas del efecto antifúngico de las nanoemulsiones para cada tiempo de almacenamiento (Tabla 9). Se puede observar que las nanoemulsiones del 0.06 al 0.25% p/p de aceite esencial no presentan diferencia significativa en su crecimiento a las 46 y 164 h. El desinfectante más efectivo resultó ser el comercial Great Value™ ya que alcanza un crecimiento de  $39.90 \pm 0.51$  mm, similar a la nanoemulsión de 0.5% p/p que tuvo un crecimiento final de  $41.27 \pm 0.22$  mm a las 164 h. En el Anexo A se muestran todos los análisis de las pruebas de Tukey para todos los tiempos monitoreados.

**Tabla 9. Crecimiento del *Aspergillus niger* en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™ a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  observado en diferentes tiempos**

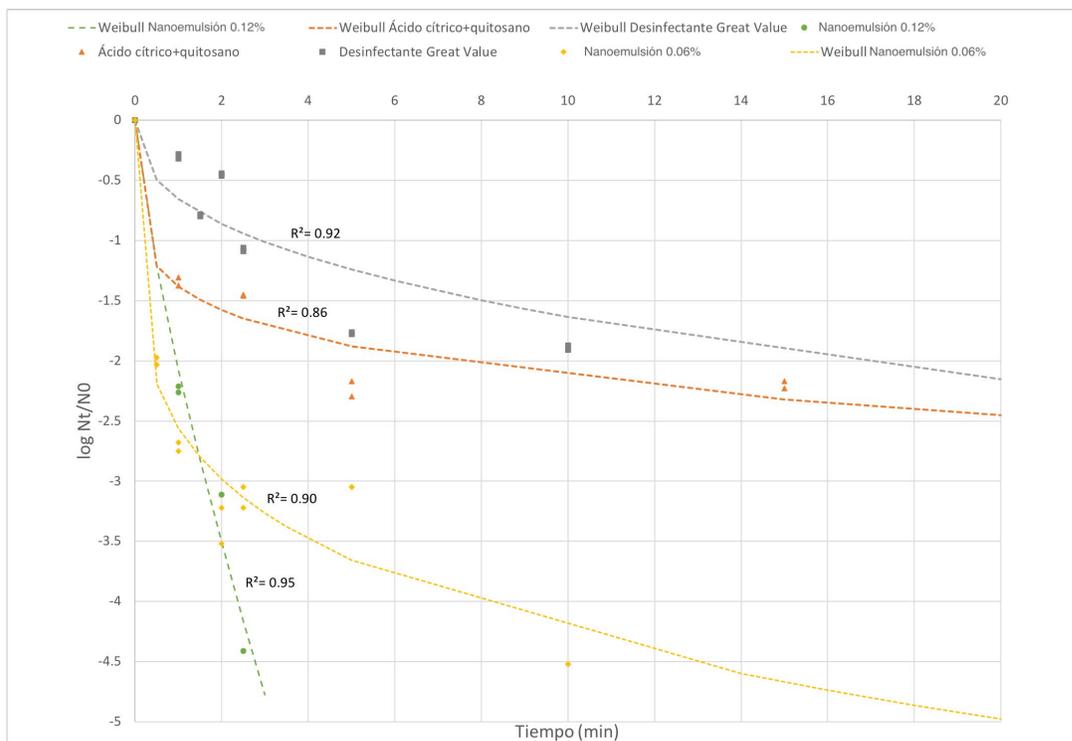
Sistemas	Diámetro (mm)			
	46 h	66 h	120 h	164 h
Control	19.46 ± 0.40 <sup>A</sup>	28.19 ± 0.49 <sup>A</sup>	42.32 ± 0.11 <sup>A</sup>	46.61 ± 0.91 <sup>A</sup>
Great Value™	5.00 ± 0.52 <sup>B</sup>	11.02 ± 0.53 <sup>B</sup>	25.45 ± 1.65 <sup>B</sup>	39.90 ± 0.51 <sup>B</sup>
Nanoemulsión al 0.06% p/p	15.81 ± 0.80 <sup>C</sup>	24.92 ± 0.57 <sup>C</sup>	37.32 ± 0.34 <sup>C</sup>	45.33 ± 1.17 <sup>C</sup>
Nanoemulsión al 0.12% p/p	14.95 ± 0.51 <sup>C</sup>	22.88 ± 0.27 <sup>D</sup>	35.42 ± 0.29 <sup>C D</sup>	44.34 ± 0.25 <sup>C</sup>
Nanoemulsión al 0.25% p/p	14.32 ± 1.63 <sup>C</sup>	22.94 ± 1.21 <sup>D</sup>	34.58 ± 1.47 <sup>D</sup>	43.13 ± 1.21 <sup>C D</sup>
Nanoemulsión al 0.5% p/p	10.98 ± 0.33 <sup>D</sup>	19.47 ± 0.68 <sup>E</sup>	31.57 ± 0.36 <sup>E</sup>	41.27 ± 0.22 <sup>B D</sup>

\*Letras diferentes en columnas significan tratamientos significativamente diferentes, Prueba de Tukey  $\alpha=0.05$  ( $p<0.05$ )

Las nanoemulsiones lograron retrasar el crecimiento del *Aspergillus niger*, sin embargo, no logran ser tan efectivos como el desinfectante comercial Great Value™ o el BioCítrico™, esto puede deberse a que la difusión de las nanoemulsiones es más efectiva en caldo como el caldo de soya tripticaseína, que en agar rosa de bengala. La difusión de líquidos puede verse afectada por la viscosidad del medio en el que se difunde (MacNeill, & Battaglia, & Carpi, 2015). También la efectividad puede deberse a la capacidad de liberación del aceite esencial de la matriz del quitosano al ser concentraciones pequeñas de aceite (Mohammadi, Hashemi & Hosseni, 2015, así como se citó en Chávez-Magdaleno, et al., 2020).

### 6.8.2 Bacteriano en fresas

Primero, se realizó un reto microbiano contra *E. coli*, con una carga inicial de 4 Log UFC/g, probando las nanoemulsiones y realizando una comparación con los desinfectantes comerciales, y una solución al 1% p/p de ácido cítrico con quitosano relación 1:1. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo matemático de Weibull para poder comparar las cinéticas de inhibición microbiana y en la Figura 10 se observan buenos ajustes con este modelo al obtener coeficientes de correlación  $R^2$  entre 0.86 – 0.95.



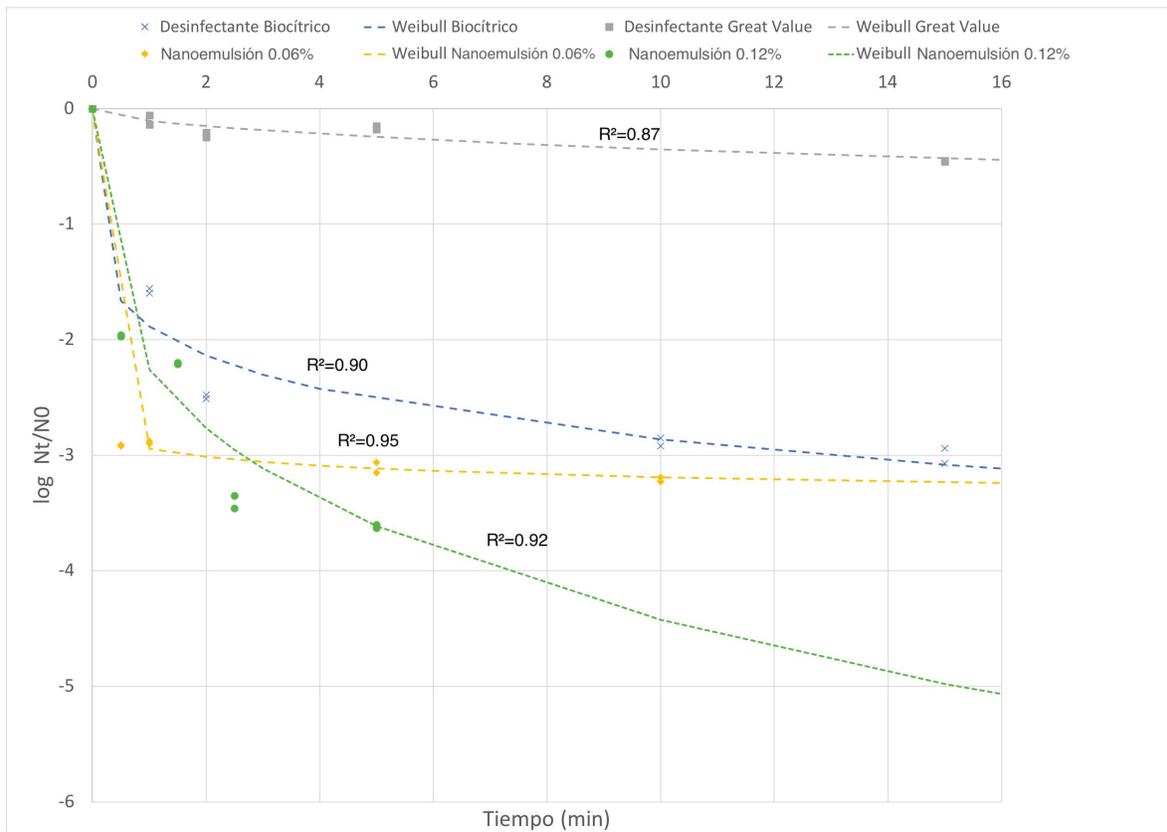
**Figura 10. Reto microbiano contra *Escherichia coli* ( $No \approx 4 \text{ Log UFC/g}$ )**

En la Figura 10, el desinfectante comercial Great Value™ solo logra reducir en 2.5 min aproximadamente 1 ciclo logarítmico, y su reducción máxima es de 1.87 ciclos logarítmicos en 20 min. El recuento microbiano con el desinfectante BioCítrico™, redujo la población total inicial de 4 ciclos a los primeros 2.5 min de tiempo de contacto. Por otra parte, se puede observar que a los 2.5 min de contacto la nanoemulsión al 0.12% p/p de aceite esencial inhibe los 4 ciclos logarítmicos, mientras que la nanoemulsión al 0.06% p/p en ese tiempo reduce aproximadamente 3 ciclos logarítmicos. Como las nanoemulsiones tienen un pH de aproximadamente  $2.53 \pm 0.02$  se puede creer que al tener el pH más bajo se podría decir que patógenos como la *Escherichia coli* no llegaría a sobrevivir, ya que su amplio rango de crecimiento es de un pH entre 4.4 a 10.0 (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018).

Sin embargo, se ha reportado que pueden sobrevivir a pH de 2.0 por varias horas siendo éste el pH aproximado encontrado en el estómago (Foster, 2004). Es por ello que se realizó una comparación con una solución de ácido cítrico con quitosano contra *E. coli* y se pudo observar que, aunque tiene un pH ácido, la solución no logra inhibir del todo al patógeno siendo su reducción máxima de aproximadamente 2.17 ciclos logarítmicos en 15 min.

Al tener el aceite esencial de *Litsea cubeba* en emulsión con quitosano con una concentración de 0.12% p/p (1.35  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), o de 0.06% p/p (0.67  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) mejora la capacidad de ambos compuestos en inhibir el patógeno respecto a otros aceites esenciales cítricos que se han aplicado solos sin quitosano contra *E. coli* como los aceites esenciales de mandarina y limón con concentraciones mínimas inhibitorias de 13.2 y 14.6  $\mu\text{L}/\text{mL}$  respectivamente (Argote-Vega, et al., 2017), estas concentraciones son muy altas al compararlas con las concentraciones encontradas en los sistemas realizados.

Al observar la efectividad de inhibición contra *E. coli* con una carga inicial de 4 Log UFC/g, se evaluó a una carga más alta de aproximadamente 7 Log UFC/g, con los datos experimentales se ajustados a un modelo matemático de Weibull para poder comparar las cinéticas de inhibición microbiana y en la Figura 11 se observan buenos ajustes con este modelo al obtener coeficientes de correlación  $R^2$  entre 0.87 – 0.95.

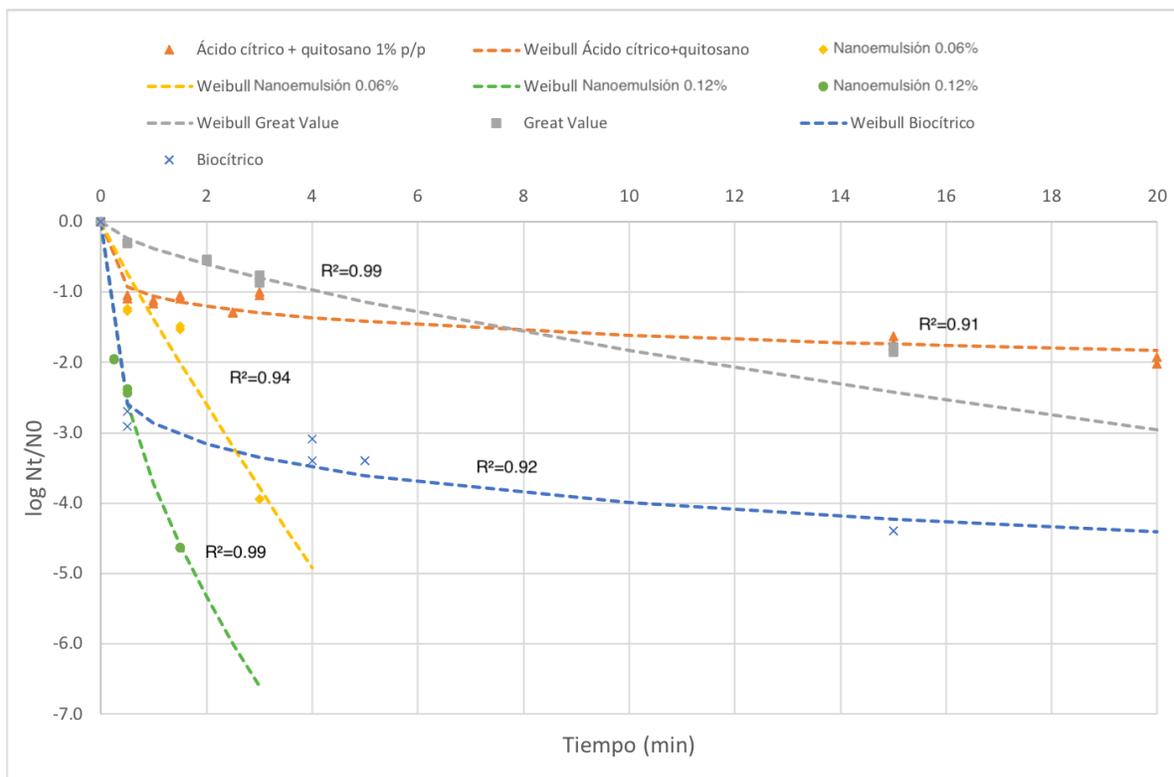


**Figura 11. Reto microbiano contra *Escherichia coli* ( $N_0 \approx 7$  Log UFC/g)**

En la Figura 11, se observa que a los 5 min de contacto el sistema con mayor efectividad fue la nanoemulsión al 0.12% p/p al inhibir aproximadamente 3.62 ciclos logarítmicos, mientras que la nanoemulsión al 0.06% p/p en ese tiempo reduce 3.11 ciclos logarítmicos. El desinfectante menos efectivo contra *E. coli* fue el desinfectante comercial Great Value™, ya que a los 5 min de contacto solo reduce aproximadamente 0.17 ciclos logarítmicos, siendo que su reducción máxima fue de 0.46 ciclos en 15 min de contacto. Finalmente, el desinfectante comercial BioCítrico™ tiene una reducción máxima de 3 ciclos logarítmicos en 15 min de contacto lo que lo hace efectivo, pero con la diferencia de que las nanoemulsiones logran inhibir mayor carga de *E. coli* a menor tiempo.

Como se mencionó anteriormente, la efectividad de las nanoemulsiones incrementa al tener quitosano y aceite esencial de *Litsea cubeba* en un mismo sistema, esto también ocurre con otros aceites mezclados con otros componentes o aplicando un tratamiento extra. En un estudio de Luna Guevara, et al. (2015), se evaluó la eficacia de aplicar diferentes tratamientos sobre *Escherichia coli* enterotoxigénica inoculada en tomates, llegando a la conclusión de que se logra una reducción máxima de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos aplicando aceite esencial de orégano a 5 ppm mezclado con aceite de tomillo a 5 ppm y, luego, aplicar ultrasonido por 10 min, siendo más efectivo que aplicar el aceite de orégano de manera individual al solo reducir 2.65 ciclos logarítmicos en 10 min.

Después, se realizó un reto microbiano contra *Listeria monocytogenes* probando los sistemas de nanoemulsiones y realizando una comparación con los desinfectantes comerciales, y la solución al 1% p/p de ácido cítrico con quitosano relación 1:1.



**Figura 12. Reto microbiano contra *Listeria monocytogenes* ( $N_0 \approx 4$  Log UFC/g)**

En la Figura 12, se puede observar que los desinfectantes comerciales no logran inhibir del todo al microorganismo. A los 0.5 min de contacto el desinfectante comercial Great Value™ reduce aproximadamente 0.31 ciclos logarítmicos, y su máxima reducción es de 1.82 ciclos logarítmicos en 15 min. El desinfectante BioCítrico™ reduce 2.81 ciclos logarítmicos a 0.5 min, e inhibe por completo al patógeno en 15 min de contacto. Como se mencionó anteriormente, se comparó con una solución al 1% p/p de ácido cítrico con quitosano relación 1:1 por el bajo pH en los sistemas, y se puede observar que a los 0.5 min reduce 1.07 ciclos logarítmico y su reducción máxima es de aproximadamente 1.97 ciclos logarítmicos en 20 min.

Las nanoemulsiones con aceite esencial al 0.12 y 0.06% p/p resultan ser muy efectivas contra *Listeria monocytogenes* así como el desinfectante comercial BioCítrico™, con la nanoemulsión de 0.12% p/p reduciendo 2.40 ciclos logarítmicos a 0.5 min e inhibiendo por completo al patógeno a los 1.5 min de contacto. La nanoemulsión de 0.06% p/p reduce 1.26 ciclos logarítmicos a 0.5 min, inhibiendo la carga inicial del patógeno por completo a 3 min de contacto.

Las nanoemulsiones logran ser más efectivas al inhibir el patógeno en menor tiempo de contacto. La *E. coli* presentó más resistencia que la *Listeria monocytogenes*, esto puede ser por su estructura, la *E. coli* es gram-negativa mientras que la *Listeria monocytogenes* es gram-positiva; se conoce que los aceites esenciales tendrán mayor o menor efectividad contra patógenos dependiendo de varios factores siendo uno de estos la célula de la bacteria. La mayoría de los aceites esenciales tienen mayor efectividad contra bacterias gram-positivas que negativas (Nazzaro, et al., 2013). Los aceites esenciales tienen el mecanismo de acción de entrar en la membrana y dañar la estructura de la bacteria, las bacterias gram-positivas tienen extremos lipofílicos en su membrana celular lo que hace que presenten gran afinidad por los compuestos hidrofóbicos de los aceites esenciales haciendo que estos entren fácilmente en la membrana; mientras que las gram-negativas presentan cierta resistencia al presentar proteínas de membrana extrínseca o por lipolisacáridos de la pared celular, limitando la entrada de los compuestos hidrofóbicos (Sin, et al., 2021).

## VII. Conclusiones y Recomendaciones

En conclusión, se obtuvieron dos sistemas de emulsiones estables, con concentraciones de 0.06 y 0.12% p/p de aceite esencial de *Litsea cubeba*, siendo estas nanoemulsiones con un diámetro de gota menor a 500 nm. La nanoemulsión de 0.06% p/p de aceite esencial presentó un diámetro mediano de la gota de aceite de 70.1 nm, con una distribución unimodal; mientras que la de 0.12% p/p tiene un diámetro mediano mucho mayor, de 176.2 nm, y presentó una distribución bimodal.

Las nanoemulsiones logran ser más efectivas que los desinfectantes comerciales BioCítrico™ y Great Value™ contra patógenos y contra microbiota de las fresas. Las nanoemulsiones reducen de 2.6 a 2.87 ciclos logarítmicos de BMA y, 3.54 a 3.66 ciclos logarítmicos de mohos y levaduras, nativos de las fresas.

Aún teniendo un pH similar al de las nanoemulsiones preparadas, la solución de ácido cítrico con quitosano al 1% p/p, relación 1:1, no logró inhibir por completo los patógenos, comprobando que la adición del aceite esencial de *Litsea cubeba* al 0.12% p/p y/o al 0.06% p/p ejerce actividad antimicrobiana.

Las nanoemulsiones logran retrasar el crecimiento del moho *Aspergillus niger* comparado con el control, siendo la nanoemulsión a una concentración de 0.5% p/p de aceite esencial la más efectiva.

Al aplicarse las nanoemulsiones de 0.06 y 0.12% p/p de aceite esencial, inhibe 3 y 4 ciclos logarítmicos, respectivamente, de *E. coli* ( $N_0 \approx 4 \text{ Log UFC/g}$ ) en 2.5 min; y, de *Listeria monocytogenes* ( $N_0 \approx 4 \text{ Log UFC/g}$ ) inhibiendo por completo al patógeno a los 3 y 1.5 min de contacto respectivamente.

Con base a los resultados obtenidos, se puede decir que las nanoemulsiones son más efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano que el fúngico, aunque en este estudio puede deberse a que los experimentos para evaluar el reto fúngico fueron en un medio de agar modelo, diferente al bacteriano que fue directamente sobre la superficie de las fresas.

Las recomendaciones que se sugieren es preparar las nanoemulsiones el mismo día en el que se medirá el diámetro de la gota del aceite disperso, aunque sean estables los sistemas, es mejor medirlas el mismo día para evitar que se unan algunas gotas de aceite. También, para la medición del diámetro, se prepararon nanoemulsiones sin quitosano y ácido cítrico, ya que el quitosano impide la lectura del aceite esencial de *Litsea cubeba* en el analizador de tamaño de partículas de luz dinámica al ser concentraciones muy pequeñas de aceite.

En los recuentos de microbiota de fresa se recomienda que en próximos estudios también se realice un recuento de coliformes en fresa. En los retos microbianos, se debe tener en consideración que las muestras de fresas deben de ser similares en tamaño, además de que al aplicarse el patógeno en la superficie de la fresa se debe de esperar a que se seque por completo la fruta, ya que puede llegar a dar errores en el recuento.

En los sistemas modelos con el moho *Aspergillus niger* se sugiere realizar el experimento en refrigeración en vez de a temperatura ambiente, ya que la fresa es una fruta que comúnmente se mantiene en refrigeración para prolongar tiempo de vida útil.

## VIII. Bibliografía

- Acofarma. (s.f.). Fichas de información técnica, Tween. Recuperado de <https://www.sefh.es/fichadjuntos/TWEEN80.pdf>
- Alegbeleye, O., & Adedokun, O., & Strateva, M., & Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research*, 2, 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100122>
- Alvarado López, G., & Medina Lezama, E. (2019). Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80. *Revista de la sociedad química del Perú*, 85 (2), [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2019000200007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2019000200007)
- Anónimo. (2019). Ficha Técnica *Litsea cubeba*: Plant be. Consultado el 26 de octubre del 2024, de <https://aceitesesencialesnaturales.eu/wp-content/uploads/2019/04/plant-be-litsea-cubeba-ficha-tecnica-2019.pdf>
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis AOAC International* (17<sup>th</sup> ed., Vol. 2). Gaithersburg, Maryland: AOAC INTERNATIONAL.
- Aranaz, I., & Alcántara, A.R., & Civera, M.C., & Arias, C., & Elorza, B., & Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13 (19), <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Argote-Vega, F.E., & Suarez-Montenegro, Z.J., & Tobar-Delgado, M.E., & Perez-Alvarez, J.A., & Hurtado-Benavides, A.M., & Delgado-Ospina, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15 (2),

<http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692->

[35612017000400052&script=sci\\_arttext#B7](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612017000400052&script=sci_arttext#B7)

Badui, S. (2020). *Química de los Alimentos* (6<sup>th</sup> ed.). México: Pearson Latinoamérica.

Bianchi, P.G. (2018). *Guía completa del cultivo de las fresas*. USA: De Vecchi, Editorial S.A. Recuperado de

[https://www.google.com.mx/books/edition/Gu%C3%ADa\\_completa\\_del\\_cultivo\\_de\\_las\\_fresas/AA9dDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0](https://www.google.com.mx/books/edition/Gu%C3%ADa_completa_del_cultivo_de_las_fresas/AA9dDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0)

Bilbao-Sáinz, C., & Avena-Bustillos, R.J., & Wood, D., & Williams, T., & McHugh, T. (2010). Nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method applied to edible films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 (22), 11932-11938.

Bhullar, M., & Perry, B., & Monge, A., & Nabwiire, L., & Shaw, A. (2021). *Escherichia coli* Survival on Strawberries and Unpacked Romaine Lettuce Washed Using Contaminated Water. *Foods*, 10, <https://doi.org/10.3390/foods10061390>

Carlie, S.M., & Boucher, C.E., & Bragg, R.R. (2020). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *PubMed*, 48, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31830738/>

Carlina, S., & Aritizábal, G., & Inés, C. (2021). *Manual práctico de microbiología básica*. Popayán, Colombia: Universidad del Cauca. Recuperado de:

[https://www.google.com/books/edition/Manual\\_pr%C3%A1ctico\\_de\\_microbiolog%C3%ADa\\_b%C3%A1sica/ZkxhEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1](https://www.google.com/books/edition/Manual_pr%C3%A1ctico_de_microbiolog%C3%ADa_b%C3%A1sica/ZkxhEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1)

Castillo, G. (2004). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Recuperado de

[https://www.google.com.mx/books/edition/Ensayos\\_Toxicol%C3%B3gicos\\_y\\_M%C3%A9todos\\_de\\_Eva/GD7-N3154OIC?hl=es-](https://www.google.com.mx/books/edition/Ensayos_Toxicol%C3%B3gicos_y_M%C3%A9todos_de_Eva/GD7-N3154OIC?hl=es-)

[419&gbpv=1&dq=camara+de+neubauer+metodologia&pg=PA90&printsec=frontcover](#)

CDC. (2020). Outbreak of *E. coli* infections linked to Romain lettuce: CDC. Consultado el 22 de julio de 2023, de <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o157h7-11-19/index.html>

CDC (2022). La seguridad de las frutas y verduras: CDC. Recuperado el 27 de enero del 2023, <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/steps-healthy-fruits-veggies.html>

CDC. (2023 a). Factors Affecting the Efficacy of Disinfection and Sterilization: CDC. Consultado el 6 de octubre de 2024, de <https://www.cdc.gov/infection-control/hcp/disinfection-sterilization/efficacy-factors.html>

CDC. (2023 b). Multistate outbreak of Hepatitis A virus infections linked to frozen organic strawberries: CDC. Consultado el 22 de julio de 2023, de <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2023/hav-contaminated-food/index.htm>

CDC. (2023 c). Prevenga la infección por *Listeria*: CDC. Consultado el 11 de mayo de 2024, de <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/prevention.html>

CEDRSSA. (2020). *Análisis de la producción y consumo de hortalizas*. Recuperado de [http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/88Ana%CC%81lisis\\_produccio%CC%81n\\_consumo\\_hortalizas.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/88Ana%CC%81lisis_produccio%CC%81n_consumo_hortalizas.pdf)

Chávez-Magdaleno, M.E., & Gutiérrez-Martínez, P., & Montaña-Leyva, B., & González-Estrada, R.R. (2020). Evaluación *in vitro* del quitosano y aceites esenciales para el control de dos especies patógenas de *Colletotrichum* aisladas de aguacate (*Persea americana* Mill). *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22,

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2019000100112#B13](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2019000100112#B13)

Chen, L., & Ao, F., & Ge, X., & Shen, W. (2020). Food-Grade Pickering Emulsions: Preparation, Stabilization and Applications. *Molecules*, 25 (14), <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/14/3202>

Chinova Bioworks. (2021). GRAS Notice (GRN) No. 997. Recuperado el 4 de septiembre de 2023, <https://www.fda.gov/media/154923/download>

Clarck, N. (2016). *La guía de nutrición deportiva de Nancy Clarck*. España: Paidotribo. Recuperado de, [https://www.google.com.mx/books/edition/La\\_gu%C3%ADa\\_de\\_nutrici%C3%B3n\\_deportiva\\_de\\_Nanc/aVORDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0](https://www.google.com.mx/books/edition/La_gu%C3%ADa_de_nutrici%C3%B3n_deportiva_de_Nanc/aVORDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0)

CONAGUA. (2023). Calidad del Agua en México: Gobierno de México. Recuperado el 29 de mayo del 2023, de <http://www.gob.mx/conagua/articulos/calidad-del-agua>

Cortés-Higareda, M., & Bautista-Baños, S., & Ventura-Aguilar, R.I., & Landa-Salgado, P., & Hernández-López, M. (2021). Bacterias patógenas de los alimentos agrícolas frescos y mínimamente procesados. Estado actual en el control del género *salmonella*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22 (1), [https://www.redalyc.org/journal/813/81367929003/html/#redalyc\\_81367929003\\_ref29](https://www.redalyc.org/journal/813/81367929003/html/#redalyc_81367929003_ref29)

Costa, C., & Medronho, B., & Filipe, A., & Mira, I., & Lindman, B., & Edlund, H., & Norgren, M. (2019). Emulsion Formation and Stabilization by Biomolecules: The Leading Role of Cellulose. *Polymers*, 11 (10), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6835308/>

- Curbelo, C., & Palacio, Y., & Fanego, S. (2021). Desacetilación de quitina obtenida por vía química de exoesqueletos de camarón *litopenaeus vannamei*. *Centro Azúcar*, 48 (3), 53-61, [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2223-48612021000300053&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2223-48612021000300053&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Dávila-Rodríguez, M., & López-Malo, A., & Palou, E., & Ramírez-Corona, N., & Jiménez-Munguía, M.T. (2019). Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano essential oils on fresh celery. *LWT-Food Science and Technology*, 112, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.014>
- Dávila-Rodríguez, M., & López-Malo, A., & Palou, E., & Ramírez-Corona, N., & Jiménez-Munguía, M.T. (2020). Essential oils microemulsions prepared with high-frequency ultrasound: physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Food Science and Technology*, 57 (11), 4133-4142, <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04449-8>
- de Groot, A.C., & Schmidt, E. (2021). *Essential Oils Contact allergy and chemical composition*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group. Retrieved from [https://www.google.com.mx/books/edition/Essential\\_Oils/\\_3AnEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1](https://www.google.com.mx/books/edition/Essential_Oils/_3AnEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1)
- de la Torre, A., & Rojas-Carabali, W.A. (2022). *Toxoplasmosis ocular: ¡No coma cuento, ni carne cruda!* Colombia: Universidad del Rosario.
- Department Health Safety and Environment. (2020a). Ficha de datos de seguridad de Aceite de limón italiano: Carl Roth. Consultado el 3 de noviembre del 2024, de <https://www.carlroth.com/medias/SDB-3797-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyOTM2MTB8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oYmMvaGQ3Lzg>

[5ODM1MDg4NzczNDIucGRmfDY4ZDY3MmVjYjljZTEwNmNIYTViMzNkN2FIYmI1ZjZmYjMwNzQxMjQyZDQ0NzZjZTdiMzRjNDBjOGF1Zjk5MmU](https://www.carlroth.com/medias/SDB-6611-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMDc0NzI8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGhjOS9oMTUvOTE0NjM2OTcwMzk2Ni9TREJfNjYxMV9FU19FUy5wZGZ8NTRkMDQ0OWIyMzhkZmFhM2JjOTk4MDM1ODI5ZDMxZWl4N2QwNWJiMmZhMzg1ZmY3YmE3YTY0MDE0M2EwOGNIYw)

Department Health Safety and Environment. (2020b). Ficha de datos de seguridad de Aceite esencial de naranja, dulce, natural: Carl Roth. Consultado el 3 de noviembre del 2024, de [https://www.carlroth.com/medias/SDB-6611-ES-](https://www.carlroth.com/medias/SDB-6611-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMDc0NzI8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGhjOS9oMTUvOTE0NjM2OTcwMzk2Ni9TREJfNjYxMV9FU19FUy5wZGZ8NTRkMDQ0OWIyMzhkZmFhM2JjOTk4MDM1ODI5ZDMxZWl4N2QwNWJiMmZhMzg1ZmY3YmE3YTY0MDE0M2EwOGNIYw)

[ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMDc0NzI8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGhjOS9oMTUvOTE0NjM2OTcwMzk2Ni9TREJfNjYxMV9FU19FUy5wZGZ8NTRkMDQ0OWIyMzhkZmFhM2JjOTk4MDM1ODI5ZDMxZWl4N2QwNWJiMmZhMzg1ZmY3YmE3YTY0MDE0M2EwOGNIYw](https://www.carlroth.com/medias/SDB-6611-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMDc0NzI8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGhjOS9oMTUvOTE0NjM2OTcwMzk2Ni9TREJfNjYxMV9FU19FUy5wZGZ8NTRkMDQ0OWIyMzhkZmFhM2JjOTk4MDM1ODI5ZDMxZWl4N2QwNWJiMmZhMzg1ZmY3YmE3YTY0MDE0M2EwOGNIYw)

d'Halewyn, M.A., & Chevalier, P. (2024). *Aspergillus niger*: Institut national de santé publique du Québec. Consultado el 21 de noviembre de 2024, de [https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/aspergillus-niger#:~:text=Growth%20requirements,\)%%20%7B989;%20715%7D](https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/aspergillus-niger#:~:text=Growth%20requirements,)%%20%7B989;%20715%7D).

Erkmen, O., & Faruk, T. (2016). *Food Microbiology Vol. 1*. Oxford, UK: Wiley.

FDA. (2023). Frutas y verduras frescas: Cómo seleccionarlas y servir las de forma segura: FDA. Recuperado el 22 de septiembre del 2023, de <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/frutas-y-verduras-frescas-como-seleccionarlas-y-servirlas-de-forma-segura>

Feliziani, E., & Lichter, A., & Smilanick, J.L., & Ippolito, A. (2016). Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biology & Technology*, 122, 53-69, <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.016>

- Flessa, S., & Lusk, D.M., & Harris, L.J. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (3), 255-262, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160505000103>
- Foster, J.W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 898-907, <https://www.nature.com/articles/nrmicro1021>
- Guarnieri, A., & Triunfo, M., & Scieuzo, C., & Ianniciello, D., & Tafi, E., & Hahn, T., & Zibek, S., & Salvia, R., & De Bonis, A., & Falabella, P. (2022). Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Scientific reports*, 12 (8084), <https://www.nature.com/articles/s41598-022-12150-3#:~:text=Chitosan%20can%20inhibit%20the%20proliferation,the%20microbial%20membrane%20integrity52>.
- Heras, J.M. (2020, 8 octubre). Quitosano de origen fúngico, una herramienta natural de lucha contra *Brettanomyces* [Entrada de blog]. Recuperado de [https://www.acenologia.com/brett\\_quitosano\\_origen\\_fungico\\_cienc174\\_0220/](https://www.acenologia.com/brett_quitosano_origen_fungico_cienc174_0220/)
- Jiang, A., & Patel, R., & Padhan, B., & Palimkar, S., & Galgali, P., & Adhikari, A., & Varga, I., & Patel, M. (2023). Chitosan Based Biodegradable Composite for Antibacterial Food Packaging Application. *Polymers*, 15 (10), <https://doi.org/10.3390/polym15102235>
- Kegel, W.K., & Overbeek, J.T.G., & Lekkerkerker, H.N.W. (2018). Thermodynamics of Microemulsions I. In P. Kumar & K.L. Mittal (Eds.), *Handbook of microemulsion science and technology* (pp. 19-35). Marcel Dekker, Inc.

- Li W.R., & Shi Q.S., & Liang Q., & Xie X.B., & Huang X.M., & Chen Y.B. (2014). Antibacterial Activity and Kinetics of *Litsea cubeba* Oil on *Escherichia coli*. PLoS ONE 9(11): e110983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110983>
- Liu, S., & Zhao, C., & Cao, Y., & Li, Y., & Zhang, Z., & Nie, D., & Tang, W., & Li, Y. (2023). Comparison and chemical compositions and antioxidant activity of essential oils from *Litsea cubeba*, Cinnamon, Anise and Eucalyptus. *Molecules*, 28, 5051, <https://doi.org/molecules28135051>
- López Luegon, M.T. (2004). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23 (7), 88-91, <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- Lovegrove, A., & Edwards, C.H., & De Noni, I., & Patel, H., & El, S.N., & Grassby, T., & Zielke, C., & Ulmius, M., & Nilsson, L., & Butterworth, P.J., & Ellis, P.R., & Shewry, P.R. (2015). Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 57 (2), 237-253, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5152545/#:~:text=It%20should%20also%20be%20noted.,%2C%202012%2C%202013>).
- Lu, W.C., & Huang, D.W., & Wang, C.C.R., & Yeh, C.H., & Tsai, J.C., & Huang, Y.T., & Li, P.H. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26 (1), 82-89, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>
- Luna Guevara, M.L., & Luna Guevara, J.J., & Ruiz Espinosa, H., & Leyva Abascal, L., & Díaz González, C.B. (2015). Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre *Escherichia coli* inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante. *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (3), 251-255,

<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-eficiencia-desinfeccion-con-aceites-esenciales-S0325754115000553>

MacNeill, H., & Battaglia, G., & Carpi, A. (2015). Difusión: Visionlearning. Consultado el 21 de noviembre de 2024, de

[https://www.visionlearning.com/es/library/qu%C3%ADmica/1/difusi%C3%B3n/216#toc2\\_2](https://www.visionlearning.com/es/library/qu%C3%ADmica/1/difusi%C3%B3n/216#toc2_2)

Mishra, V., & Shyam, G., & Dubey, N. (2018). Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables. In M.W. Siddiqui (Ed.), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 253-272). Elsevier.

Moreno de la Cruz, J. (2019). *Estudio de viabilidad de una planta de producción de quitosano* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad Politécnica de Madrid.

[https://oa.upm.es/55989/1/TFM\\_Jaime\\_Moreno\\_de\\_la\\_Cruz.pdf](https://oa.upm.es/55989/1/TFM_Jaime_Moreno_de_la_Cruz.pdf)

Müller, G. (1981). *Microbiología de los Alimentos*. España: ACRIBIA ZARAGOZA.

Nazzaro, F., & Fratianni, F., & De Martino, L., & Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6 (12), 1451-1474, <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3873673/#:~:text=Different%20amounts%20of%20specific%20compounds,3%2C56%2C58%5D>.

Organización Mundial de la Salud. (2018). E. coli: Organización Mundial de la Salud.

Recuperado el 10 de enero del 2024, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli#:~:text=coli%20productora%20de%20toxina%20Shiga%20puede%20crecer%20a%20temperaturas%20que,%20m%C3%ADnima%20de%200%2C95>.

- Ponce Navarro, A. (2022). *Inactivación de Listeria monocytogenes y Salmonella enterica en fresas mediante la aplicación de calentamiento óhmico* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/8829/1/RI007670.pdf>
- Ragish Singh, I., & Koya Pulikkal, A. (2022). Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. *OpenNano*, 8, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352952022000287>
- Ramirez, R., & Restrepo, L., & Perez, C., & Jimenez, A. (2019). Strawberry Pre- and Post-Harvest management techniques for higher fruit quality. T., Asao, & Md. Asaduzzaman (Eds.), *Physical, Chemical and Processing Postharvest Technologies in Strawberry* (pp. 43-50). IntechOpen. Recuperado de <https://www.google.com.mx/books/edition/Strawberry/hBT8DwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&kptab=overview>
- Romanovski, V., & Claesson, P.M., & Hedberg, Y.S. (2020). Comparison of different surface disinfection treatments of drinking water facilities from a corrosion and environmental perspective. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27 (11), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7136315/>
- Romero-Serrano, A., & Pereira, J. (2020). Estado del arte: Quitosano, un biomaterial versátil. Estado del Arte desde su obtención a sus múltiples aplicaciones. *Revista INGENIERÍA UC*, 27 (2), 118-135, <https://www.redalyc.org/journal/707/70764230002/html/>
- Saavedra, G., & Corradini, F., & Antúnez, A., & Felmer, S., & Estay, P., & Sepúlveda, P. (2017). *Manual de producción de lechuga*. Santiago, Chile: Instituto de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Recuperado de:

[https://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/20.500.13082/29500/INIA\\_Libro\\_0051.pdf?sequence=1](https://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/20.500.13082/29500/INIA_Libro_0051.pdf?sequence=1)

SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Fresa Mexicana*.

Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>

Satish, V., & Ilahy, R., & Wasim, M. (2018). Commercial Disinfectants in Skirmishing Postharvest Diseases. In M.W. Siddiqui (Ed.), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 273-288). Elsevier.

Secretaría de Gobernación (1995, septiembre 13). *NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. Diario Oficial de la Federación.

[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0)

Secretaría de Gobernación (1995, octubre 16). *NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Diario Oficial de la Federación.

[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995#gsc.tab=0)

Secretaría de Gobernación (1995, diciembre 12). *NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Diario Oficial de la Federación.

[https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0)

Secretaría de Gobernación (1982, septiembre 2). *Norma Oficial Mexicana NOM-F-420-S-1982, productos alimenticios para uso humano - Determinación de acidez en leche*

*fluida, así como el Aviso de la Declaratoria de Vigencia.* Diario Oficial de la Federación.

[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4761014&fecha=02/09/1982#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4761014&fecha=02/09/1982#gsc.tab=0)

Shafiq, O., & Yousuf, B., & Kumar, A. (2015). Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1-11,

<http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1121606>

SIAP. (2023). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola: Gobierno de México.

Recuperado el 14 de diciembre del 2024, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Sigma-Aldrich. (s.f). *Litsea cubeba* oil: Merck. Recuperado el 27 de mayo del 2024, de

<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/w384606>

Sin, C., & Britos, M., & Chamorro, E., & Cáceres, M., & Fernández, D., & Ortega, S. (2021).

Aceites esenciales con actividad antibacteriana: posible aplicación y administración en odontología. *Odontología Vital*, 2 (35), 32-43,

<https://www.scielo.sa.cr/pdf/odov/n35/1659-0775-odov-35-32.pdf>

Singh, D., & Sharma, R.R. (2018). Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and their Management. In M.W. Siddiqui (Ed.), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 1-35). Elsevier.

Swamy, M.K., & Akhtar, M.S., & Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review.

*Evid Based Complement Alternat Med*, 2016,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206475/#:~:text=The%20presence%20of%20different%20types,orientation%20of%20its%20functional%20groups.>

- Torrenegra Alarcón, M.E., & Pájaro, N.P., & León Méndez, G. (2017). Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46 (2), [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74182017000200160#t1](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182017000200160#t1)
- Tsai, G.J., & Su, W.H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62(3), 239–243. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.3.239>
- Øye, G., & Simon, S., & Rustad, T., & Paso, K. (2023). Trends in food emulsion technology: Pickering, nano-, and double emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 50, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101003>
- Vallarta Solorio, P.G. (2018). *Estabilidad de las propiedades antioxidantes de aceites esenciales microencapsulados mediante secado por atomización* [Tesis de Programa de Honores]. Universidad de las Américas Puebla.
- Wang, S., & Herrera-Balandrano, D.D., & Jiang, Y., & Shi, X., & Chen, X., & Liu, F., & Laborda, P. (2023). Application of chitosan nanoparticles in quality and preservation of postharvest fruits and vegetables: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 22 (3), 1722-1762, <https://doi-org.udlap.idm.oclc.org/10.1111/1541-4337.13128>

## IX. Anexos

### 9.1 Anexo A

Tabla 10. Crecimiento del *Aspergillus niger* en agar rosa de bengala formulado con las nanoemulsiones y el desinfectante Great Value™ a  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  observado en diferentes tiempos (completa)

Sistemas	Diámetro (mm)						
	24 h	46 h	66 h	94 h	145 h	120 h	164 h
Control	8.74 ± 0.23 <sup>A</sup>	19.46 ± 0.40 <sup>A</sup>	28.19 ± 0.49 <sup>A</sup>	35.39 ± 0.81 <sup>A</sup>	45.63 ± 0.98 <sup>A</sup>	42.32 ± 0.11 <sup>A</sup>	46.61 ± 0.91 <sup>A</sup>
Great Value™	0.00 ± 0.00 <sup>B</sup>	5.00 ± 0.52 <sup>B</sup>	11.02 ± 0.53 <sup>B</sup>	19.02 ± 0.43 <sup>B</sup>	33.10 ± 1.01 <sup>B</sup>	25.45 ± 1.65 <sup>B</sup>	39.90 ± 0.51 <sup>B</sup>
Nanoemulsión al 0.06% p/p	8.00 ± 0.32 <sup>C</sup>	15.81 ± 0.80 <sup>C</sup>	24.92 ± 0.57 <sup>C</sup>	31.78 ± 0.80 <sup>C</sup>	41.25 ± 0.71 <sup>C</sup>	37.32 ± 0.34 <sup>C</sup>	45.33 ± 1.17 <sup>C</sup>
Nanoemulsión al 0.12% p/p	7.88 ± 0.15 <sup>C</sup>	14.95 ± 0.51 <sup>C</sup>	22.88 ± 0.27 <sup>D</sup>	29.50 ± 0.19 <sup>D</sup>	40.59 ± 0.37 <sup>C</sup>	35.42 ± 0.29 <sup>C D</sup>	44.34 ± 0.25 <sup>C</sup>
Nanoemulsión al 0.25% p/p	7.92 ± 0.39 <sup>C</sup>	14.32 ± 1.63 <sup>C</sup>	22.94 ± 1.21 <sup>D</sup>	28.86 ± 1.25 <sup>D</sup>	40.00 ± 1.13 <sup>C</sup>	34.58 ± 1.47 <sup>D</sup>	43.13 ± 1.21 <sup>C D</sup>
Nanoemulsión al 0.5% p/p	0.00 ± 0.00 <sup>B</sup>	10.98 ± 0.33 <sup>D</sup>	19.47 ± 0.68 <sup>E</sup>	25.48 ± 0.11 <sup>E</sup>	37.78 ± 0.17 <sup>D</sup>	31.57 ± 0.36 <sup>E</sup>	41.27 ± 0.22 <sup>B D</sup>

\*Letras diferentes en columnas significan tratamientos significativamente diferentes, Prueba de Tukey  $\alpha=0.05$  ( $p<0.05$ )

### 9.2 Anexo B

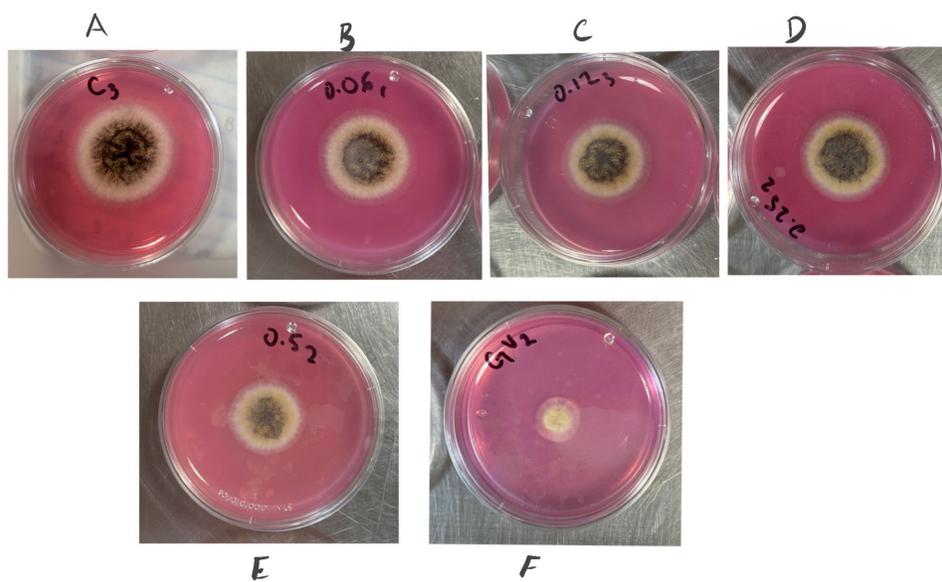


Figura 13. Crecimiento a las 66 h del *Aspergillus niger*, A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06% p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25% p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/p, F= Desinfectante Great Value™

### 9.3 Anexo C

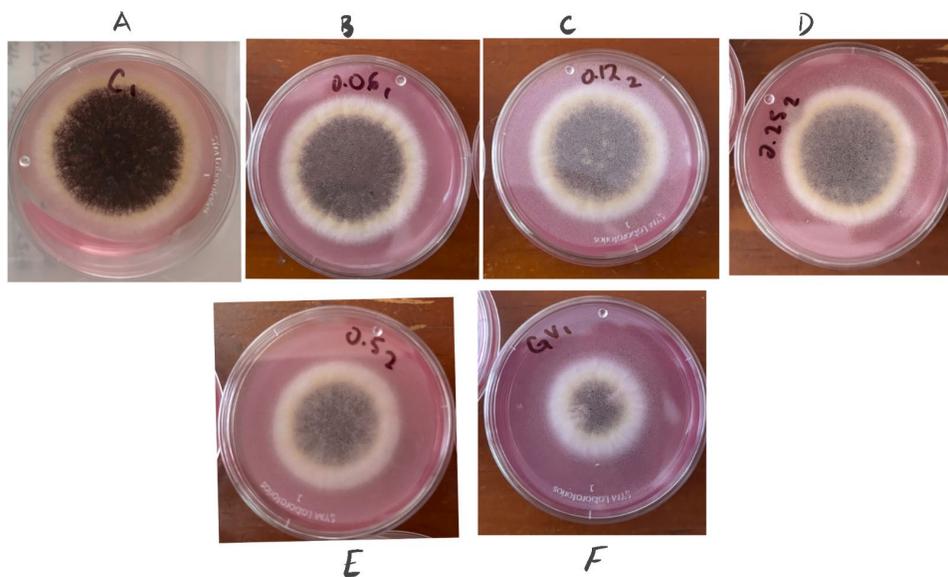


Figura 14. Crecimiento a las 120 h del *Aspergillus niger*, A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™

### 9.4 Anexo D

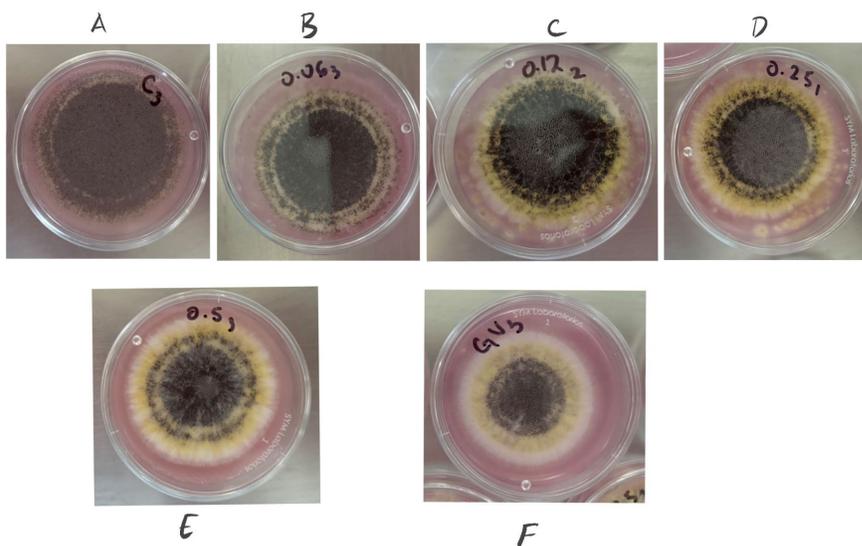


Figura 15. Crecimiento a las 164 h del *Aspergillus niger*, A: Control, B: Nanoemulsión al 0.06%p/p, C: Nanoemulsión al 0.12% p/p, D: Nanoemulsión al 0.25%p/p, E: Nanoemulsión al 0.5% p/, F= Desinfectante Great Value™