



UNIVERSIDAD VERACRUZANA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ALIMENTARIAS



**Caracterización de Nanoemulsiones O/W de Aceites Esenciales de  
Pimienta Negra (*Piper nigrum*) y Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y  
su Funcionalidad como Antimicrobiano**

**TESIS**

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias

Presenta:

I. en A. Jazmín Aurora Domínguez Olivo

Directores de Tesis

Dr. César Ignacio Beristain Guevara

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Xalapa, Veracruz

Septiembre, 2016



Universidad Veracruzana



MAESTRIA EN  
CIENCIAS  
ALIMENTARIAS

La presente tesis titulada

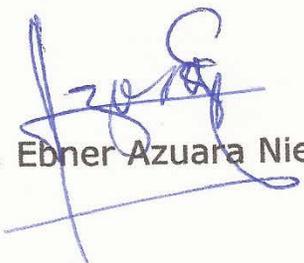
**“Caracterización de nanoemulsiones O/W de aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*) y canela (*Cinnamomun zeylanicum*) y su funcionalidad como antimicrobiano”,**  
Realizada por la

**I.A. JAZMÍN AURORA DOMÍNGUEZ OLIVO**

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestro en Ciencias Alimentarias**

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 01 de septiembre de 2016.

  
Dr. Ebner Azuara Nieto

  
Dr. Oscar García Barradas

  
Dra. María Remedios Mendoza López

## DEDICATORIAS

Para mis padres, que me han brindado todo su amor y apoyo incondicional, contribuyendo a lograr alcanzar mis metas y objetivos, por saber encaminarme a través de sus enseñanzas y por motivarme constantemente.

A mis hermanos, que siempre han cuidado de mí y me han brindado momentos de felicidad, así como ser ejemplo de la perseverancia, realización profesional y humildad.

A mi familia, por ser la base de mi formación, por inculcar en mí valores y la fe en Dios, que me ha servido para enfrentar las distintas adversidades, por escuchar mis logros y también mis preocupaciones.

A mis directores de tesis, Dr. César Ignacio Beristain Guevara y Dra. Maribel Jiménez Fernández, que gracias a su conocimiento, dedicación, apoyo y paciencia hemos culminado este proyecto.

A Rafael, que ha sido parte fundamental en esta etapa de mi vida, a través de su compañía y de la serenidad que tanto lo caracteriza, brindándome su apoyo en momentos difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la culminación de este proyecto, por bendecirme con las personas que me apoyaron en el transcurso de esta etapa y darme fuerzas ante toda dificultad.

Así mismo, agradezco a mi madre por su amor, dedicación y preocupación, por sus consejos y consentimientos, por ayudarme cada día. A mi padre, agradezco por tenerlo en mi vida, por brindarme su apoyo y su amor. Agradeciendo a la vida porque me ha dado unos padres tan maravillosos, que supieron encaminarme por un buen camino, y esta etapa que termina es en gran parte gracias a ustedes.

A mi hermano Juan Manuel, le agradezco además de su ayuda, por ser mi ejemplo a seguir, porque me ha motivado a superarme y a buscar nuevos retos. A mi hermano Pablo César, por su confianza en mí, por su nobleza y alegría, pero sobre todo por enseñarme a superar adversidades.

A mis asesores de tesis, Dr. César Ignacio Beristain Guevara y Dra. Maribel Jiménez Fernández, les agradezco por su orientación y por sus correcciones a lo largo del camino.

A mis sinodales, Dr. Ebner Azuara Nieto, Dr. Óscar García Barradas y Dra. María Remedios Mendoza López, por el tiempo dedicado en la revisión de mi tesis y sus aportaciones.

A la Dra. Luz Alicia, le agradezco su amabilidad y por su apoyo en la elaboración de este proyecto. Y a la Mtra. Oriana por iniciarme en el mundo de la investigación y por su buena disposición al solicitar su ayuda.

A Rafael, le agradezco por estar siempre a mi lado, por sus palabras de aliento y su ayuda constante a lo largo de este camino, sobre todo en aquellos días de extenso trabajo, y por ser parte importante en esta etapa de mi vida. Gracias por apoyarme cuando más lo necesité.

A mis compañeros, gracias por brindarme su amistad y por todas las vivencias que durante dos años hicieron que la maestría fuera una de las mejores etapas. Agradezco especialmente a Lies y Jaqui, por su amabilidad al enseñarme técnicas de Microbiología, y por nunca negarse en el préstamo de su material. Y a Erick por compartir su conocimiento conmigo para resolver las dudas surgidas en el laboratorio.

A Kari, Flor, Moni y Andrés, gracias por ser parte de mi vida, por todas aquellas experiencias, por los días de estudio, por las celebraciones, por las risas, pero sobre todo por la gran amistad que forjamos. Kari, gracias por compartir la experiencia de las emulsiones, incluso durante vacaciones, y por esas risas que alegraban el laboratorio, siempre llevaré en mí tus ocurrencias. Flor, te agradezco por tus consejos en Microbiología, y por ser la principal en organizar las reuniones en las que tanto reímos. Moni, que bueno que nos reencontramos en el camino para poder conocerte mejor, gracias por ser una persona noble y brindarme una amistad sincera. Andrés, gracias por tu amistad y confianza, y por los momentos divertidos, llevaré siempre en mí esas frases que tanto te caracterizan.

A Dafne, me alegra haber tenido la oportunidad de convivir más contigo, sin duda eres de las mejores personas que he conocido, y a quien agradezco su amistad y las experiencias compartidas, así como tu ayuda en el laboratorio.

A Jesús y Anita, nos encontramos nuevamente en este camino lo que me permitió conocerlos más, gracias por su amistad y por compartir momentos de alegría. Jesús, especialmente te agradezco por ayudarme durante las últimas semanas en el laboratorio y por brindarme tu compañía en esas tardes de trabajo.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	2
2.1 Aceites Esenciales .....	2
2.1.1 <i>Composición química de los aceites esenciales</i> .....	2
2.1.2 <i>Degradación de aceites esenciales</i> .....	3
2.1.2.1 <i>Oxígeno</i> .....	3
2.1.2.2 <i>Calor</i> .....	3
2.1.2.3 <i>Luz</i> .....	4
2.1.3 <i>Prevención de la degradación</i> .....	4
2.1.4 <i>Mecanismo de acción antimicrobiana de los aceites esenciales</i> .....	4
2.2 Pimienta negra .....	6
2.2.1 <i>Taxonomía</i> .....	6
2.2.2 <i>Origen y distribución</i> .....	6
2.2.3 <i>Descripción</i> .....	6
2.2.4 <i>Composición química</i> .....	7
2.2.5 <i>Composición y toxicidad del aceite esencial</i> .....	8
2.2.6 <i>Usos</i> .....	8
2.3 Canela.....	9
2.3.1 <i>Taxonomía</i> .....	9
2.3.2 <i>Origen y distribución</i> .....	10
2.3.3 <i>Descripción</i> .....	10
2.3.4 <i>Composición química</i> .....	10
2.3.5 <i>Composición y toxicología del aceite esencial</i> .....	11
2.3.6 <i>Usos</i> .....	12
2.4 <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14

2.6	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
2.7	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhi</i> .....	15
2.8	Nanotecnología .....	16
2.9	Emulsiones.....	16
2.10	Propiedades de la emulsión.....	18
	2.10.1 <i>Fracción de volumen de la Fase-Dispersa</i> .....	18
	2.10.2 <i>Distribución del tamaño de gota (DSD)</i> .....	19
2.11	Propiedades Interfaciales.....	19
2.12	Carga de la partícula.....	20
2.13	Interacciones gotas-gotas .....	20
2.14	Ingredientes de la emulsión .....	20
	2.14.1 <i>Soluciones acuosas</i> .....	21
	2.14.2 <i>Surfactantes</i> .....	21
	2.14.2.1 <i>Número de HLB</i> .....	22
	2.14.3 <i>Modificadores de textura</i> .....	22
	2.14.3.1 <i>Alginato</i> .....	23
2.15	Formación de una emulsión.....	24
2.16	Principios físicos en la formación de la emulsión.....	24
	2.16.1 <i>Disrupción de gota</i> .....	24
	2.16.1.1 <i>Fuerzas interfaciales</i> .....	25
	2.16.1.2 <i>Importancia del emulsificante</i> .....	25
	2.16.2 <i>Coalescencia de las gotas</i> .....	26
2.17	Estabilidad de la emulsión .....	27
	2.17.1 <i>Separación gravitacional: “creaming” y sedimentación</i> .....	27
	2.17.2 <i>Agregación de gotas: floculación y coalescencia</i> .....	28
	2.17.3 <i>Maduración de Ostwald</i> .....	29
	2.17.4 <i>Fase de inversión</i> .....	30
2.18	Nanoemulsiones .....	31
	2.18.1 <i>Métodos de producción</i> .....	31

2.18.1.1	<i>Homogeneización de alta presión</i> .....	31
2.18.1.2	<i>Microfluidización</i> .....	32
2.18.1.3	<i>Ultrasonido</i> .....	32
<b>3.</b>	<b>SITUACIÓN ACTUAL</b> .....	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
5.1	Objetivo general .....	36
5.2	Objetivos específicos .....	36
<b>6.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>36</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
7.2	Metodología .....	38
7.2.1	<i>Elaboración de la emulsión y almacenamiento</i> .....	38
7.2.2	<i>Elaboración de los sistemas de nanoemulsión</i> .....	39
7.2.2.1	<i>Elaboración de nanoemulsión por el método de homogeneización de alta presión</i> .....	39
7.2.2.2	<i>Elaboración de nanoemulsión por el método de ultrasonido</i> .....	39
7.2.2.2.1	<i>Proceso continuo en la aplicación de ultrasonido</i> .....	39
7.2.2.2.2	<i>Proceso con pulsos en la aplicación de ultrasonido</i> .....	39
7.2.3	Propiedades de la emulsión .....	40
7.2.3.1	<i>Tamaño de partícula</i> .....	40
7.2.3.2	<i>Cinética de maduración de Ostwald</i> .....	40
7.2.3.3	<i>Potencial <math>\zeta</math></i> .....	40
7.2.3.4	<i>Índice de blancura</i> .....	40
7.2.3.5	<i>pH</i> .....	41
7.2.4	Actividad antioxidante de las emulsiones .....	41
7.2.4.1	<i>Captura del radical DPPH•</i> .....	41
7.2.4.2	<i>Potencial óxido-reducción</i> .....	41
7.2.5	Actividad antimicrobiana de las emulsiones .....	42
7.2.5.1	<i>Difusión en pozos</i> .....	42
7.2.5.2	<i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i> .....	42
7.2.5.3	<i>Tiempo de reducción logarítmica</i> .....	43
7.2.6	Método estadístico.....	43

<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
8.1 Elaboración de emulsiones .....	44
8.2 Propiedades de nanoemulsiones producidas por el método de homogeneización de alta presión .....	48
8.3 Propiedades de las nanoemulsiones producidas por el método de ultrasonido	54
8.3.1 <i>Proceso continuo</i> .....	54
8.3.2 <i>Proceso con pulsos</i> .....	57
8.4 Selección de los parámetros finales de preparación de las nanoemulsiones ...	59
8.5 Caracterización de las emulsiones y nanoemulsiones .....	60
8.5.1 <i>Potencial <math>\zeta</math> y pH</i> .....	60
8.5.2 <i>Índice de blancura</i> .....	62
8.5.3 <i>Actividad antioxidante</i> .....	63
8.6 Propiedades de las emulsiones durante el almacenamiento en condiciones controladas .....	65
8.6.1 <i>Tamaño de partícula</i> .....	65
8.6.1.1 <i>Maduración de Ostwald</i> .....	67
8.6.2 <i>Potencial <math>\zeta</math> y pH</i> .....	69
8.6.3 <i>Actividad antioxidante</i> .....	71
8.6.4 <i>Actividad antimicrobiana</i> .....	75
8.6.4.1 <i>Difusión en pozo</i> .....	75
8.6.4.2 <i>Concentración mínima inhibitoria</i> .....	77
8.6.4.3 <i>Tiempo de reducción logarítmica</i> .....	79
8.6.5 <i>Análisis de correlación entre las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones y la actividad antimicrobiana</i> .....	80
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	83
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	84
APÉNDICE A .....	93
APÉNDICE B .....	95
APÉNDICE C .....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de alginato .....	23
<b>Figura 2.</b> Tamaño de las gotas durante la homogeneización. ....	26
<b>Figura 3.</b> Estructura de las nanoemulsiones antimicrobianas.....	33
<b>Figura 4.</b> Esquema General de trabajo.....	37
<b>Figura 5.</b> Comportamiento del tamaño de partícula de emulsiones convencionales. ....	45
<b>Figura 6.</b> Comportamiento en índice de polidispersión de emulsiones convencionales. .....	47
<b>Figura 7.</b> Comportamiento del tamaño de partícula de emulsiones procesadas con homogeneizador de alta presión (5 ciclos, 150 MPa) .....	49
<b>Figura 8.</b> Comportamiento del índice de polidispersión de emulsiones procesadas con homogeneizador de alta presión (5 ciclos, 150 MPa) .....	50
<b>Figura 9.</b> Procesamiento en homogeneizador de alta presión 150 MPa, 5 ciclos. ....	52
<b>Figura 10.</b> Distribución del tamaño de partícula por intensidad de nanoemulsiones elaboradas por homogeneizador de alta presión (4 ciclos 150 MPa).....	53
<b>Figura 11.</b> Comportamiento del tamaño de partícula de emulsiones procesadas con ultrasonido (5 min, 30% de amplitud) .....	55
<b>Figura 12.</b> Comportamiento del índice de polidispersión de emulsiones procesadas con ultrasonido (5 min, 30% de amplitud) .....	56
<b>Figura 13.</b> Procesamiento en Ultrasonido por pulsos, 30% amplitud.. ....	58
<b>Figura 14.</b> Distribución del tamaño de partícula por intensidad en nanoemulsiones producidas por ultrasonido. ....	59
<b>Figura 15.</b> Cinética del tamaño de partícula durante el almacenamiento de emulsiones convencionales (T=4 °C).....	66
<b>Figura 16.</b> El radio medio de partícula al cubo en función del tiempo de almacenamiento de las nanoemulsiones de aceite esencial de canela.....	68
<b>Figura 17.</b> Comportamiento de Potencial $\zeta$ y pH de los sistemas de aceite de canela durante almacenamiento a 4 °C.....	71
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de inhibición del radical DPPH• durante su almacenamiento a 4 °C.. ....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Potencial $\zeta$ y pH de emulsiones y nanoemulsiones por homogeneizador de alta presión y ultrasonido. ....	61
<b>Tabla 2.</b> Índice de blancura de emulsiones y nanoemulsiones por homogeneizador de alta presión y ultrasonido. ....	63
<b>Tabla 3.</b> Propiedades antioxidantes de emulsiones y nanoemulsiones .....	64
<b>Tabla 4.</b> Velocidad de disminución del tamaño de partícula (primera fase) y velocidad de incremento del tamaño de partícula (segunda fase) en emulsiones convencionales.....	67
<b>Tabla 5.</b> Coeficiente de correlación de la actividad de captura del radical DPPH• y el tiempo de almacenamiento .....	74
<b>Tabla 6.</b> Velocidad de degradación de actividad de captura de DPPH• de emulsión y nanoemulsiones durante el almacenamiento .....	75
<b>Tabla 7.</b> Halos de inhibición por difusión en pozos (mm).....	76
<b>Tabla 8.</b> Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) de los sistemas de emulsión y nanoemulsión por ultrasonido y alta presión .....	79
<b>Tabla 9.</b> Tiempo requerido para la reducción de un ciclo logarítmico (min).....	80
<b>Tabla 10.</b> Coeficiente de correlación entre las propiedades Fisicoquímicas de las emulsiones y la actividad antimicrobiana. ....	82

## **ABREVIACIONES:**

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

D: coeficiente de difusión de moléculas en la fase dispersa

$D_{(3,0)}$ : diámetro volumétrico

$D_{(3,2)}$ : diámetro Sauter

$D(z)$ : diámetro medio hidrodinámico z o “z-average”

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

d: diámetro de la gota

$\rho$ : densidad

$\rho_1$ : densidad de la fase continua

$\rho_2$ : densidad de la fase dispersa

$\Phi_m$ : fracción de masa de la fase dispersa

$\Phi$ : fase dispersa

G: velocidad de cizalla

g: aceleración debida a la gravedad

k: constante cinética

kT: energía térmica

min: minutos

mV: mili-volts

$\eta_1$ : viscosidad de corte de la fase continua

$\eta_2$ : viscosidad de corte de la fase dispersa

nm: nanómetros

N: movimiento Browniano

$n_0$ : número inicial de partículas

OR: maduración de Ostwald

O/W: emulsión aceite en agua

$\Delta P$ : presión de Laplace

PDI: índice de polidispersión

R: constante de gases

$R^2$ : Coeficiente de determinación

r: radio medio de la gota

$r^3$ : radio medio de la gota al cubo

$S(\infty)$ : solubilidad de solutos de la fase continua

$S(R)$ : solubilidad del soluto

$\gamma$ : Tensión interfacial

V: velocidad de cremado

$V_D$  : volumen de gotas de emulsión

$V_E$  : volumen total de emulsión

$V_m$ : volumen molar del soluto

WI: índice de blancura

W/O: emulsión agua en aceite

## RESUMEN

Los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) han mostrado efecto antimicrobiano en organismos patógenos relacionados con enfermedades y deterioro de alimentos. Dichas propiedades antimicrobianas se deben a la interacción de los componentes del aceite con la membrana citoplasmática de los organismos patógenos. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de los aceites limita su empleo como conservadores naturales dentro de una matriz alimentaria. Para solucionar dichas limitaciones, el presente trabajo propone el desarrollo de una nanoemulsión para aprovechar y resguardar las propiedades antimicrobianas de los aceites mencionados previamente. Por consiguiente, el objetivo principal del presente trabajo fue caracterizar nanoemulsiones aceite/agua (O/W por sus siglas en inglés) de los aceites de pimienta negra, canela y la mezcla de ambos. La fase acuosa de las nanoemulsiones consistieron en una solución de alginato, la fase oleosa estuvo compuesta de los aceites esenciales y como agente surfactante se empleó una combinación de Tween 80 y Span 20. Dos métodos mecánicos para la elaboración de nanoemulsiones fueron usados y comparados: homogeneización de alta presión (4 ciclos, 150 MPa), y ultrasonido (30% de amplitud). Las siguientes mediciones fueron realizadas para la caracterización de emulsiones y nanoemulsiones: tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial zeta, pH, color y actividad antioxidante. En ambos métodos de elaboración se obtuvieron sistemas ópticamente transparentes con el tamaño de partícula  $D_z < 100$  nm y potencial  $\zeta < -30$  mV. Durante su almacenamiento, las nanoemulsiones de pimienta y canela-pimienta mostraron una mayor estabilidad física en comparación con la de las emulsiones convencionales; las nanoemulsiones de canela y canela-pimienta presentaron las mejores propiedades antimicrobianas contra las cepas seleccionadas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*). Finalmente, la nanoemulsión de la mezcla de los aceites esenciales elaborada mediante ultrasonido obtuvo los mejores resultados por su propiedad antimicrobiana y su estabilidad física.

Palabras clave: *Cinnamomum zeylanicum*, *Piper nigrum*, aceites esenciales, nanoemulsión, antimicrobiano.

## SUMMARY

Black pepper (*Piper nigrum*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils have shown an antimicrobial effect on pathogens related with diseases and spoilage of food. Such antimicrobial properties are due to the interaction between the oil components and the cytoplasmic membrane of the pathogens. Nevertheless, the hydrophobic nature of the essential oils limits their application as natural preservatives in a food matrix. In order to solve such limitations, the present work proposed the development of a nanoemulsion in order to use and preserve the abovementioned antimicrobial properties of the essential oils. The objective of this research was to characterize oil-in-water (O/W) nanoemulsions of black pepper, cinnamon and their blend. The aqueous phase of the nanoemulsions consisted in an alginate solution; the oleic phase was composed of the essential oils and Tween 80 and Span 20 were used as surfactant agents. Two mechanical methods for nanoemulsion elaboration were compared: high pressure homogenization (4 cycles at 150 MPa), and ultrasound (30% amplitude). The following measurements were performed in order to characterize the emulsions and nanoemulsions: particle size, polydispersion index (PDI),  $\zeta$ -potential, pH, color and antioxidant activity. In both methods of elaboration, optically transparent systems with particle size  $D_z < 100$  nm and  $\zeta$ -potential  $< 30$  mV were obtained. During storage, pepper and cinnamon-pepper nanoemulsions exhibited a higher physical stability in comparison to conventional emulsions. In terms of antimicrobial properties, the cinnamon and cinnamon-pepper showed the highest efficacy against selected strains (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*). Finally, nanoemulsions of the mixture of essential oils by ultrasound method showed the best antimicrobial performance and the highest physical stability.

Keywords: *Cinnamomum zeylanicum*, *Piper nigrum*, essential oils, nanoemulsion, antimicrobial.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales de las plantas son mezclas de compuestos orgánicos volátiles originados de una fuente botánica particular, y son los responsables de su sabor y fragancia. Dichos compuestos han mostrado propiedades antimicrobianas, las cuales han sido estudiadas en diversos microorganismos patógenos presentes en alimentos, que causan su deterioro y son también responsables de ciertas enfermedades por el consumo de productos contaminados. Microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, son algunos ejemplos en los cuales se ha demostrado el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales. El aceite esencial de pimienta negra (*Piper nigrum*), ha mostrado retardar el crecimiento de microorganismos como *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus albus*, *Clostridium diphtheriae*, *Shigella dysenteriae*, *Streptomyces faecalis*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*; así como aflatoxinas producidas por *Aspergillus parasitics*. Mientras que el aceite esencial de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) manifiesta una alta actividad contra *Listeria monocytogenes*, y *Escherichia coli*. El mecanismo de acción de la inhibición de una bacteria, se lleva a cabo en la membrana celular, al irrumpir en ésta los componentes de los aceites esenciales ocasionan una alteración en su composición, principalmente en el perfil de ácidos grasos, causando la fuga de los compuestos celulares.

Así mismo, la creciente demanda de los consumidores de utilizar agentes antimicrobianos procedentes de fuentes naturales, hace viable la incorporación de aceites esenciales en alimentos, a través de una metodología que les permita ser añadidos fácilmente, sin restricción de su hidrofobicidad. Por consiguiente, se desarrolló una metodología para elaborar nanocápsulas, que facilitará la entrada en la membrana celular de la bacteria, utilizando su naturaleza hidrofóbica, para crear nanopartículas dispersas en un medio acuoso: las nanoemulsiones. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la funcionalidad de las nanoemulsiones O/W de aceites esenciales de canela, pimienta y su mezcla, obtenidas a través de homogeneización de alta presión y ultrasonido.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Aceites Esenciales

Las plantas son capaces de sintetizar dos tipos de aceites: los aceites no volátiles o fijos y los aceites volátiles o esenciales. Los primeros consisten de ésteres de glicerol y de ácidos grasos (triglicéridos), mientras que los aceites esenciales son mezclas de compuestos orgánicos volátiles originados de una fuente botánica particular, y contribuyen al sabor y fragancia de la planta. La palabra “esencial” es usada para referirse a su naturaleza intrínseca o a la esencia de la planta, y “aceite” para indicar un líquido que es insoluble o inmiscible en agua. Estos aceites son obtenidos de diferentes partes de las plantas: flores (rosas), hojas (menta), frutos (limón), semillas (hinojo), hierbas (zacate limón), raíces (vetiver), rizomas (jengibre), maderas (cedro), corteza (canela), resina (incienso), bulbos (ajo) y capullos de flores secas (clavo). La mayoría son incoloros o amarillos pálidos. Pueden ser obtenidos por fermentación, disolución en grasa (enfleurage) o por extracción, pero el método de destilación por arrastre de vapor es el más usado para la producción comercial de los aceites esenciales (Tisserand y Young, 2013). Además, exhiben propiedades antimicrobianas, atributos que junto con la creciente demanda del uso de aditivos naturales en alimentos, ha llevado a un interés en el uso de los aceites esenciales como antimicrobiano (Salvia *et al.*, 2014; Calo *et al.*, 2015).

#### 2.1.1 *Composición química de los aceites esenciales*

Químicamente los aceites esenciales son una mezcla de compuestos orgánicos, que incluyen alcoholes, ácidos, ésteres, epóxidos, aldehídos y cetonas (Calo *et al.*, 2015), así mismo sus componentes pueden ser clasificados en dos grupos de origen bioquímico distinto: terpenos y fenilpropanoides. Los terpenos son sintetizados a partir de pirofosfato de isopentilo (IPP), derivado de la ruta biosintética del ácido mevalónico. Los monoterpenos comprenden la más simple y común clase de terpenos encontrados en aceites esenciales. Dos ejemplos de monoterpenos son (+)-limoneno y  $\alpha$ -pineno. Los sesquiterpenos son menos abundantes en los aceites esenciales que los monoterpenos, puesto que tienen un tamaño molecular más grande haciéndolos menos volátiles. Los

diterpenos, siendo más grandes, son relativamente poco comunes en los aceites esenciales, fitol es un ejemplo. Por su parte, los fenilpropanoides en aceites esenciales, son sintetizados por la vía del ácido shikímico y se caracterizan por tener una cadena de tres átomos de carbono añadido a un anillo de benceno. Los principales en aceites esenciales incluyen anetol, eugenol y safrol, que poseen una doble ligadura carbono-carbono en su cadena lateral (Tisserand y Young, 2013).

### *2.1.2 Degradación de aceites esenciales*

La degradación química de los aceites esenciales, tiende a ocurrir mayormente en un almacenamiento prolongado bajo condiciones no controladas y/o su exposición al aire. Cuando se mantienen en condiciones totalmente frescas y oscuras, en contenedores sellados, la degradación llega a presentarse en meses o años, pero en condiciones desfavorables puede progresar en cuestión de días o semanas. Los tres principales factores responsables de la degradación del aceite esencial son: oxígeno, calor y luz (Tisserand y Young, 2013).

#### *2.1.2.1 Oxígeno*

El oxígeno atmosférico puede cambiar la composición química de un aceite esencial por la reacción con algunos de sus constituyentes y puede resultar más fácil en aceites esenciales ricos en monoterpenos, que son susceptibles porque sus cadenas con dobles enlaces carbono-carbono son reactivas con el oxígeno, tal es el caso de los aceites cítricos, que tienen alta concentración de (+)-limoneno. Los niveles altos de oxidación en los aceites esenciales, pueden contribuir a la pérdida de su actividad antimicrobiana. (Tisserand y Young, 2013).

#### *2.1.2.2 Calor*

El calor promueve cualquier proceso químico endotérmico porque ayuda a los reactivos a superar la energía de activación necesaria para llevar a cabo la reacción. Los efectos degradantes del calor no han sido ampliamente investigados, pero los estudios publicados muestran una gran variación entre los diferentes tipos de aceite esencial. Sin embargo, se ha encontrado que los aceites con bajas concentraciones de monoterpenos

y alto contenido en fenilpropanoides como el eugenol, no muestran una degradación significativa al ser mantenidos a 28 °C en un tiempo de 45 a 90 días, por el contrario aceites con elevada concentración de monoterpenos sí muestran degradación, aunque a 0 °C ésta se reduce (Gopalakrishnan, 1994; Tisserand y Young, 2013).

#### *2.1.2.3 Luz*

La luz, especialmente ultra violeta, está implicada en la reacción y formación de radicales libres. En una investigación realizada por Ziegler y colaboradores, encontraron que una emulsión ácida de aceite de naranja dulce tuvo cambios significativos en la composición cuando se expuso a la luz ultra violeta a 20 °C por 50 min que incluyeron decrecimiento en carvona, isopulegol, carveol, óxido de linalool y óxido de limoneno, la degradación iniciada por luz ultravioleta muestra la oxidación fotosensible y los mecanismos de ciclación intramolecular en los aceites esenciales (Ziegler *et al.*, 1991). De acuerdo con este factor, Misharina y Polshkov (2005), demostraron que el aceite de hinojo dulce se oxida más rápidamente en la luz que en condiciones de oscuridad.

#### *2.1.3 Prevención de la degradación*

La oxidación puede ser prevenida con adecuado almacenamiento y por la adición de antioxidantes a los aceites esenciales susceptibles. Por dichas razones, es importante almacenar los aceites en contenedores oscuros, sin exposición directa a los rayos del sol y a fuentes de calor, su almacenamiento debe ser a temperaturas de refrigeración preferentemente (Tisserand y Young, 2013).

#### *2.1.4 Mecanismo de acción antimicrobiana de los aceites esenciales*

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales puede ser atribuida por su habilidad de penetrar en la membrana bacteriana, especialmente por su naturaleza hidrofóbica, la cual afecta el porcentaje de los ácidos grasos insaturados en la membrana, alterando su estructura (Almadiy *et al.*, 2016; Burt, 2004; Calo *et al.*, 2015). Los diferentes componentes de aceites esenciales se caracterizan por un mecanismo particular de acción, que depende de la naturaleza de la molécula bioactiva específica (Di Pasqua *et*

*al.*, 2007). Los mayores componentes activos de los aceites esenciales pueden ser clasificados en fenoles, aldehídos y terpenos (Ceylan y Fung, 2004).

El mecanismo de acción de los compuestos fenólicos se relaciona con la interacción del grupo hidroxilo de sus moléculas con la membrana celular, provocando fugas de los componentes celulares, alteración de los perfiles de ácidos grasos y fosfolípidos, deterioro del metabolismo de la energía celular (ATP) y síntesis de material genético (Burt, 2004; Ceylan y Fung, 2004; Di Pasqua *et al.*, 2007; Calo *et al.*, 2015; Almadiy *et al.*, 2016). Por su parte, los aldehídos como el cinamaldehído se basan en la disipación de la fuerza protón-motriz, diferente a la de los fenoles, en este caso la acción antimicrobiana está relacionada con la fuga de los pequeños iones en lugar de grandes moléculas como ATP, debido a la ruptura parcial de la membrana celular que no se desintegra por el acceso de las moléculas del cinamaldehído en el periplasma y a las partes más profundas de la células (Burt, 2004; Donsi *et al.*, 2012). Mientras que los terpenos, de acuerdo a Burt (2004), actúan sobre la membrana de la bacteria, su acumulación en ella causa la pérdida de su integridad, la inhibición de enzimas respiratorias y la disipación de la fuerza protón-motriz.

Una importante característica de los aceites esenciales y sus componentes es la hidrofobicidad, permitiendo a los aceites esenciales su interacción con la membrana celular de la bacteria, causando la separación de los lípidos y la mitocondria, aumentando la permeabilidad de moléculas hidrofílicas, logrando inhibir su crecimiento. Generalmente la acción antimicrobiana de los aceites, es más efectiva en bacterias Gram positivas, por la interacción directa de la membrana celular con sus componentes hidrofóbicos; las Gram negativas son más resistentes porque presentan una membrana externa hidrofílica, característica otorgada por proteínas denominadas porines, que forman canales o poros ayudando a prevenir la penetración de los compuestos hidrofóbicos y restringiendo la entrada de compuestos por su tamaño (Burt, 2004; Calo *et al.*, 2015; Salvia *et al.*, 2015).

## 2.2 Pimienta negra

### 2.2.1 Taxonomía

Proviene del género *Piper*, que pertenece a la clase de las *Dicotiledóneas*, del orden de los *Piperales* y de la familia de las *Piperáceas*, que contiene alrededor de doce géneros y mil cuatrocientas especies de hierbas, arbustos, guías y árboles nativos de las áreas tropicales y subtropicales del mundo, ricas en aceites en las hojas y semillas (León, 2000; Ahmad *et al.*, 2012).

Clasificación botánica:

- División: Magnoliophyta
- Clase: Dicotiledónea
- Orden: Piperales
- Familia: Piperaceae
- Género: *Piper*
- Especie: *nigrum* L.

(Parthasarathy *et al.*, 2007)

### 2.2.2 Origen y distribución

La pimienta negra es originaria del sur de la India y popularmente conocida como “Rey de las especias”. Más de cincuenta cultivos de *P. nigrum* han sido reportados de regiones tropicales y subtropicales de India (Ahmad *et al.*, 2012). Su área principal de producción está en los trópicos asiáticos; en América se cultiva en la región amazónica de Brasil y Perú (León, 2000, Parthasarathy *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Descripción

*Piper nigrum* L, es una planta lisa trepadora perenne que se adhiere por medio de sus raíces y puede crecer de 6 a 10 metros. Se desarrolla en zonas de clima cálido y de alta humedad, en temperaturas comprendidas entre 20 y 36 °C, siendo óptimo 26 °C (León, 2000).

- Raíces: El sistema radicular está generalmente compuesto por un número de raíces que varía de 3 a 6, que a su vez están compuestas de subraíces, con una profundidad aproximada de 30 a 60 cm.
- Tallo: conformado por los estolones, encontrados al ras de la planta, los tallos ortótropos, que constituyen el almacén de la planta, y las ramas plagiótropas.
- Hojas: Son característicamente alternas, pecioladas y sencillas. Las hojas en el tallo están dispuestas en forma alterna; el peciolo tiene de 2 a 5 cm de largo y está cubierto por dos estípulas laterales. La lámina es resistente, ovalada, de 8 a 20 cm de largo por 4 a 12 cm de ancho, base redonda y de ápice agudo, verde oscuro brillante arriba y más clara en el lado, generalmente de 5 a 7 nervaduras.
- Inflorescencias: son colgantes o con espigas patentemente curvadas, de tallo corto y de 2-15 cm de largo. La inflorescencia contiene de 70 a 100 flores bisexuales o unisexuales; las flores son sésiles y están hundidas en un raquis grueso y anguloso.
- Fruto: los frutos no se desarrollan al mismo tiempo y es posible encontrarlos maduros y rojos. La “pimienta negra” comercial son los frutos enteros y secos de *P. nigrum*, que muestran una superficie suave y reticulada. Los tejidos del pericarpio forman una cobertura relativamente delgada, comparada con el tamaño de la semilla; los frutos se componen de epicarpo, mesocarpo y endocarpo. Las capas más internas del mesocarpo, contienen células de diversos tamaños con aceites esenciales, que dan el olor característico de la pimienta (León, 2000; Parthasarathy *et al.*, 2007).

#### 2.2.4 Composición química

Las cualidades sensoriales de la pimienta negra son otorgadas a dos componentes:

- Piperina, el alcaloide predominante en la pimienta, al cual se le atribuye su característica pungente. Aunque, se han identificado cinco alcaloides presentes en menor cantidad y que son asociados con dicha característica: piperatina, piperanina, piperilina A, piperoleina B y pipericina (Parthasarathy *et al.*, 2007; Ravindran y Kallapurackal, 2012).

- Aceite volátil, que es responsable del aroma y sabor; es una mezcla de compuestos químicos volátiles, más de ochenta componentes han sido reportados en el aceite esencial (Ravindran y Kallapurackal, 2012).

### 2.2.5 Composición y toxicidad del aceite esencial

El aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos, que pueden ser recuperados a través de la destilación por arrastre de vapor, medio principal por el cual se lleva a cabo la producción de aceite esencial de pimienta negra a nivel industrial (Ravindran y Kallapurackal, 2012).

Constituyentes principales:

- $\beta$ -Cariofileno 9.4-30.9%
- (+)-limoneno 16.4-24.4%
- $\alpha$ -Pinoeno 1.1-16.2%
- $\delta$ -3-Careno 0.0-15.5%
- $\beta$ -Pinoeno 4.9-14.3%
- Sabineno 0.1-13.8%
- $\beta$ -Bisaboleno 0.1-5.2%
- $\alpha$ -Copaeno 0.1-3.9%
- (E)- $\beta$ -Farneseno 0.0-3.3%
- $\alpha$ -Cubebeno 0.2-1.6%

(Tisserand y Young, 2013)

El aceite esencial de pimienta negra ha sido clasificado como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro, por sus siglas en inglés), y con una Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) oral en ratas > 5 g/Kg y DL<sub>50</sub> cutánea en conejos > 5 g/Kg (Tisserand y Young, 2013).

### 2.2.6 Usos

La pimienta negra es una especie que se cultiva por sus frutos que normalmente se secan y se utilizan como especias y condimentos. También es utilizada en medicina empírica como diurético y antiséptico, para dolor estomacal y tratamiento de la tos, artritis

reumatoide, neuropatía periférica y la lepra debido a la presencia de compuestos volátiles, taninos y fenoles (Ahmad *et al.*, 2012). El uso del aceite esencial para inhibir el crecimiento bacteriano ha sido reportado para microorganismos como: *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus albus*, *Clostridium diphtheriae*, *Shigella dysenteriae*, *Streptomyces faecalis*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* Además de suspender el crecimiento y producción de aflatoxinas producidas por *Aspergillus parasitica* en una concentración de 0.2-1% (Ravindran y Kallapurackal, 2012).

## 2.3 Canela

### 2.3.1 Taxonomía

El término canela tiene su origen en el vocablo griego y significa “madera dulce”, y se refiere a la corteza del árbol tropical del mismo nombre (Hamidpour *et al.*, 2014). Pertenece al género *Cinnamomum* de la familia *Lauraceae* y tiene cerca de 250 especies y muchas de las cuales son aromáticas, saborizantes y especias (Thomas y Kutuvilla, 2012, Hamidpour *et al.*, 2014). Hay dos variedades principales de canela: Ceylon o canela auténtica (*Cinnamomum zeylanicum*), la cual crece en Sri Lanka y el Sur de India, y Cassia (*Cinnamomum aromaticum* Ness), la cual crece en China, Indonesia y Vietnam (Hamidpour *et al.*, 2015).

Clasificación botánica:

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Magnoliidae
- Orden: Laurales
- Familia: Lauraceae
- Género: *Cinnamomum*
- Especie: *zeylanicum*

(Hamidpour *et al.*, 2015)

### 2.3.2 Origen y distribución

La canela es originaria de Ceilán (Sri Lanka) y del Sur de India; ha sido difundida en los Trópicos, principalmente en el océano Índico. Los principales productores son Sri Lanka, China, India y Vietnam. Sri Lanka produce 90% de la canela a nivel mundial, los mayores importadores son México, Alemania, Estados Unidos, Inglaterra, Arabia Saudita, Taiwán, Singapur, Hong Kong y Francia (Thomas y Kutuvilla, 2012).

### 2.3.3 Descripción

- **Árbol:** es de hoja perenne y puede alcanzar hasta 7 m de altura en su estado natural, bajo cultivo crece como arbusto de aproximadamente 3 m, ya que los tallos se cortan continuamente para la extracción de la corteza, ésta es gruesa y rugosa, posee el olor y sabor característico de la canela (Thomas y Kutuvilla, 2012).
- **Hojas:** sencillas, opuestas, oblongas u ovaladas y acuminadas en su extremidad. El limbo mide de a 10 a 18 cm de largo por 4 o 5 cm de ancho. Tienen nervadura triple: una central y dos laterales que van desde la base al vértice del limbo. Las hojas son de color rojizo cuando son jóvenes y de color verde oscuro al madurar.
- **Inflorescencias:** se presentan en racimos de flores regulares, pequeñas, blancas o amarillas y nacen en el axilar terminal.
- **Fruto:** se presenta en forma de baya, de color púrpura o negro cuando madura, contiene una semilla y mide de 10 a 13 mm (Barceloux, 2009).

### 2.3.4 Composición química

La canela está compuesta de mucílago, taninos, azúcar, resina y aceite esencial, el cual es el constituyente más importante. La mayor proporción del aceite esencial que se extrae de su corteza es cinnamaldehído o aldehído cinnámico y es el responsable del sabor y aroma de la canela. El extracto crudo de canela contiene altos niveles de compuestos no volátiles (principalmente taninos condensados), los cuales consisten de 23.2% de proantocianidinas y 3.6% de catequinas además de cinnamaldehído (64.1%) (Hamidpour *et al.*, 2015).

### 2.3.5 Composición y toxicología del aceite esencial

El aceite esencial de *Cinnamon cassia* contiene 80 a 90% de cinnamaldehído con trazas de eugenol, el cual es diferente de la corteza de *C. zeylanicum*, la cual contiene 60 a 80% de cinnamaldehído y aproximadamente 2% o más de eugenol, sin embargo, los aceites esenciales de sus hojas son ricas en eugenol (70-75%) (Hamidpour *et al.*, 2015).

Principales constituyentes de aceite extraído de la corteza seca de árboles jóvenes:

- (E)-Cinnamaldehído 60-80%
- Eugenol 2.0-13.3%
- (E)-Acetato de cinamilo 0.3-10.6%
- linalol 0.2-7.0%
- $\beta$ -Cariofileno 1.3-5.8%
- $\rho$ -Cimeno 1.7-2.5%
- 1,8-Cineol 0.4-2.3%
- Benzaldehído 0.0-2.2%
- $\beta$ -Felandreno 0-1.5%
- $\alpha$ -Terpineol 0.4-1.4%
- Alcanfor 0-1.4%
- Terpen-4-ol 0.4-1.1%
- Benzoato de bencilo 0.0-1.0%
- $\alpha$ -Cariofileno 0.0-1.0%
- Safrol 0.0-0.04%

(Tisserand y Young, 2013)

El aceite esencial de corteza de canela es un producto GRAS, tiene una ingesta diaria aceptable (ADI, por sus siglas en inglés) de 1.25 mg/Kg para cinnamaldehído, el cual equivale a una dosis adulta de 115 mg de aceite (Tisserand y Young, 2013).

### 2.3.6 Usos

La canela ha sido utilizada en la preparación de alimentos y en la medicina tradicional de Egipto y China. Además se ha encontrado que esta especie tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antipiréticas y antiinflamatorias. La corteza de la canela se utiliza como especia y se ingiere por medio de infusiones, también se utiliza como remedio para el tratamiento de resfriados comunes, enfermedades cardiovasculares y desordenes gastrointestinales crónicos y ginecológicos. Además ralentiza el deterioro de los alimentos por propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Hamidpour *et al.*, 2015). Su aceite esencial ha sido probado en diferentes cepas de microorganismos, encontrando una alta actividad contra *Listeria monocytogenes*, y *Escherichia coli* (Mazzarrino *et al.*, 2014; Calo *et al.*, 2015).

### 2.4 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos más intensamente estudiados, fue descubierto en 1885 por el Dr. Theodor Escherich en heces infantiles y fue nombrado *Bacterium coli commune* por encontrarse en el colon. En el siglo XIX, fue clasificado en un nuevo género, *Escherichia*, nombre dado por su descubridor. Las cepas de *E. coli* provienen de la familia *Enterobacteriaceae*, son clasificadas como coliformes, término utilizado para describir bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa en 48 horas; es anaerobia facultativa, no formadora de esporas, con forma de bastoncillos, oxidasa negativa y crece en fuentes de carbono, incluyendo glucosa y acetato; fermenta la hexosa a una mezcla de ácidos (lactato, acetato, formato), y el dióxido de carbono. Forma parte de la microflora intestinal de mamíferos, incluyendo al ser humano, y por lo cual es utilizado como indicador de contaminación fecal. En humanos, forma una capa de mucosidad en el colón y es el más abundante microorganismo anaerobio facultativo en la microflora intestinal. Muchas de las cepas de esta bacteria existen en relación simbiótica y algunas de ellas son benéficas para su hospedador balanceando su flora intestinal y la absorción de los nutrientes. Sin embargo, existen cepas patógenas que causan una amplia gama de enfermedades en humanos y animales, que va desde diarrea hasta infecciones en el torrente sanguíneo, como resultado de la heterogeneidad de las

especies, puesto que muchos de sus genes son polimórficos con múltiples alelos encontrados entre los diferentes aislamientos. Las cepas que causan infecciones gastrointestinales son llamadas *E. coli* patógenas o *E. coli* diarreogénicas. Una de las cepas más importantes es la del serotipo O157: H7, que incluye cepas altamente virulentas, siendo el foco de atención en la última década, ya que se asocia con una serie de brotes de origen alimentario y por su capacidad de sobrevivir a condiciones ácidas que anteriormente se creían letales para *E. coli* (Batt y Tortorello, 2014; Yang y Wang, 2014).

La distinción serológica entre las cepas de *E. coli* es una importante herramienta en el seguimiento de los aislamientos en alimentos relacionados con brotes de enfermedades. El serotipo, O157:H7, es una de las variedades más conocidas de las bacterias transmitidas por los alimentos. Los serotipos se componen de tres fundamentales antígenos, O, K y H. El antígeno O se basa en un resto de polisacárido que se asocia con la membrana externa; el antígeno K es también un polisacárido que forma parte de la cápsula de la célula y es termolábil, este grupo es el menos complejo, sólo tres antígenos se han reportado: A, B y L; el antígeno H se asocia con flagelos, encontrándose solo en las cepas móviles de *E. coli*, aunque la mayoría no son móviles; sin embargo se han descubierto más de 50 antígenos H. Los malestares que resultan del consumo de alimentos contaminados con cepas patógenas de este microorganismo pueden variar, en las formas enteropatógenas generalmente toman de 5 a 48 h después del consumo y está en función del tipo y número de cepas consumidas por la víctima, generalmente los síntomas incluyen un dolor severo abdominal. Cuando se involucran cepas enteroinvasivas y hemorrágicas, los síntomas son más severos, estos se presentan aproximadamente de 10-24 horas después de consumir el alimento contaminado, el dolor es acompañado de diarrea con sangre, además de náuseas, vómito, fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y dolor muscular, si progresa puede convertirse en el síndrome urémico hemolítico. Los alimentos relacionados con brotes del serotipo de *E. coli* O157:H7 incluyen carne picada, queso, repollo, salami y sidra de manzana. (Batt y Tortorello, 2014).

## 2.5 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* proviene de la familia *Staphylococcaceae*, el *Staphylococcus aureus*, es un organismo Gram positivo, se presenta en acúmulos parecidos a los racimos de uvas, en parejas o en forma de cadenas cortas. Está presente en la mayoría de los mamíferos marinos y terrestres, en los seres humanos se encuentra principalmente en el tracto respiratorio superior, especialmente en la garganta y las fosas nasales, así como en el cuero cabelludo y las manos. También se aísla de animales asociados a una enfermedad, particularmente mastitis. El aislamiento de éste microorganismo se ha evaluado en animales domésticos, la probabilidad de encontrarse en aves de corral es de 50%, en cerdos 42% y en bovinos 23%. El rango de temperatura en la que crece es de 7-48 °C, la óptima fluctúa entre 35-40 °C. Los miembros del *S. aureus* producen un número de componentes extracelulares, incluyendo toxinas que dañan la piel como la toxina epidermolítica; superantígenos (SAGs), como la toxina responsable del síndrome de shock tóxico (TSST) y la enterotoxina estafilocócica (SEs); y las exoenzimas como coagulasa y nucleasa termoestable (TNasa), que son ampliamente utilizadas como marcadores de identificación de *S. aureus* (Martín *et al.*, 2014).

## 2.6 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es una de las seis especies en el género *Listeria*. Las otras especies son *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Todas las especies son ampliamente distribuidas en el ambiente, se pueden encontrar en el suelo, la vegetación en descomposición, aguas residuales, tierra húmeda, la paja y en las heces; pero solamente *L. monocytogenes* es considerada como patógena tanto para humanos como para animales. Crece en un amplio rango de temperatura de 3 a 45 °C, pero la temperatura de crecimiento óptimo es entre 30 y 37 °C, aunque puede crecer a 4 °C por pocos días. Es un bacilo corto (0.5-2 µm), Gram positivo, anaerobio facultativo, hemolítico, catalasa positiva (excepto para algunas cepas) y oxidasa negativa, crece en un pH de 5 a 9.6. Generalmente, los miembros del género *Listeria* son motiles de 20 a

28 °C. Las cepas de *Listeria* están divididas en serotipos de antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Trece serotipos son conocidos para *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Allerberger, 2003). Puede causar ciertas enfermedades que incluyen septicemia, meningitis, encefalitis e infecciones intrauterinas; este microorganismo está asociado con alimentos, incluyendo leche cruda, queso fresco, helados, vegetales crudos, frutas, carne cruda o insuficientemente cocida y pescado; la dosis infectiva no es conocida y difiere entre las diferentes cepas, pero se asume ser aproximadamente a 1000 células (Batt y Tortorello, 2014).

### 2.7 *Salmonella enterica* serovar *typhi*

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, consiste en bacterias en forma de bastoncillos, Gram negativas, no formadoras de esporas, predominantemente móviles, que van desde 0.7 hasta 1.5 µm de diámetro, y de 2 a 5 µm de longitud, la mayoría son incapaces de fermentar la lactosa; son anaerobias facultativas que emplean sustratos orgánicos y reacciones de óxido-reducción para obtener energía, el óptimo pH para su crecimiento se encuentra en el rango de 6.5-7.5 y su óptima temperatura de crecimiento es 37 °C, aunque puede crecer en un rango de 2-54 °C (Batt y Tortorello, 2014). Este género contiene dos especies: *enterica* y *bongori*; *S. enterica* está dividida a su vez en seis subespecies (*enterica*, *salamaes*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) conteniendo cerca de 2500 serovares (Batt y Tortorello, 2014; Lee *et al.*, 2015; Mastroeni y Maskell, 2006). La mayoría de las enfermedades causadas por el género *Salmonella* se deben a las subespecies *Salmonella enterica*. La tifoidea es contraída por la ingestión de alimentos y agua contaminadas por *S. enterica* serovar *Typhi*, esta bacteria puede sobrevivir por períodos prolongados en agua, hielo y polvo, que actúan como fuentes de infección. Los factores de riesgo para contraer la enfermedad incluye el consumo de alimentos preparados sin higiene, tal como helados o bebidas refrescantes que incluyan hielo y ensaladas (Mastroeni y Maskell, 2006). Aunque la dosis infecciosa “típica” se considera que está en el rango de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> UFC, la evidencia epidemiológica de una serie de brotes ha demostrado que la dosis infecciosa

puede ser sustancialmente menor, tan poco como unas pocas células (Batt y Tortorello, 2014).

## 2.8 Nanotecnología

La nanotecnología se enfoca en la fabricación, caracterización y manipulación de las estructuras biológicas y no biológicas menores a 100 nm, éstas han demostrado tener propiedades únicas y funcionales, por lo que el interés y las actividades en esta área de investigación han incrementado en los últimos años. El control de las moléculas en nanoescala de los alimentos podría permitir la modificación de las características de macroescala de los alimentos tales como procesamientos, textura, atributos sensoriales y vida media (Fathi *et al.*, 2012; Sozer y Kokini, 2012; Weis *et al.*, 2006).

La nanoencapsulación se define como una tecnología para proteger sustancias y/o compuestos bioactivos en una nanoescala. Esta tecnología es eficiente para el desarrollo de productos funcionales y podría ayudar a resolver dificultades como: pérdidas de funcionalidad durante el proceso o en el almacenamiento, generación de malos olores y sabores, deterioro de textura y la pérdida de actividad enzimática. Una técnica para llevar a cabo la nanoencapsulación es la formación de nanopartículas hidrofóbicas dispersas en un medio acuoso, es decir una emulsión con tamaños de partícula menores a 100 nm (Quintanilla *et al.*, 2010).

## 2.9 Emulsiones

Una emulsión consiste de dos líquidos inmiscibles (usualmente aceite y agua), uno de ellos disperso como pequeñas gotas en el otro. Pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo a la distribución de su fase oleosa y acuosa. Un sistema, el cual consiste de gotas de aceite dispersas en la fase acuosa es denominado emulsión aceite en agua o O/W (ejemplo: mayonesa, leche, crema, sopas y salsas). El sistema en el cual las gotas de agua se encuentran dispersas en la fase oleosa se les designa como

emulsión agua en aceite o W/O (ejemplo: margarina, mantequilla y los alimentos para untar) (McClements, 1999; Quintanilla *et al.*, 2010).

Es posible formar una emulsión por homogeneización del aceite y agua pura, pero las dos fases se separan rápidamente en un sistema que consiste de una capa de aceite (menor densidad) sobre una capa de agua (mayor densidad). Esto es porque las gotas tienden a emerger con las más próximas cuando colisionan entre ellas, conduciendo a la separación de fases. La fuerza conductora para este proceso es el hecho de que el contacto entre moléculas de aceite y agua es energéticamente desfavorable, por lo que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. Sin embargo, se puede hacer que las emulsiones sean cinéticamente estables por un tiempo razonable por medio de la adición de un emulsificador y/o agentes espesantes *a priori* a la homogeneización (McClements, 1999).

La viscosidad de la gota de la fase dispersa, la polidispersidad, carga eléctrica, distribución del tamaño de partícula, actividad de superficie y la reología de la fase continua son los principales factores que determinan la estabilidad de la emulsión (Chanamai y McClements, 2000; Sozer y Kokini, 2012). El término “estabilidad de emulsión” es usado para describir la capacidad de una emulsión para resistir cambios en sus propiedades con el tiempo. Hay una variedad de mecanismos fisicoquímicos los cuales pueden ser responsables de las alteraciones en las propiedades de una emulsión, tales como: “creaming”, sedimentación, floculación y coalescencia. “Creaming” y sedimentación son formas de separación gravitacional, el primero describe el movimiento ascendente de las gotas debido a que tienen una densidad menor que el líquido circundante, mientras que la sedimentación describe el movimiento hacia abajo de las gotas debido a una densidad mayor que el líquido circundante. Por otra parte la floculación y coalescencia son tipos de agregación de las gotas, la primera ocurre cuando dos o más gotas se juntan para formar agregados conservando su integridad individual, mientras que la coalescencia es el proceso donde dos o más gotas emergen juntas para formar una sola gota. Se puede considerar que las emulsiones consisten en tres regiones: el interior de las gotas, la fase continua y la interfase. La distribución de las moléculas es

de acuerdo a la concentración y polaridad, así las moléculas no polares se localizan en la fase oleosa y las polares en la acuosa, mientras que las anfífilas en la interfase. En la mayoría de las emulsiones su fase oleosa incluyen aceite vegetal, aceite esencial, vitaminas, antioxidantes y agentes bioactivos y en su fase acuosa incluye agua, gomas, emulsionantes, edulcorantes, sales, preservativos y proteínas hidrosolubles. (McClements, 1999; Sozer y Kokini, 2012).

## 2.10 Propiedades de la emulsión

### 2.10.1 Fracción de volumen de la Fase-Dispersa

La concentración de las gotas en una emulsión es usualmente descrita en los términos de fracción del volumen de la fase dispersa ( $\Phi$ ), la cual es igual al volumen de las gotas de emulsión ( $V_D$ ) dividida por el volumen total de la emulsión ( $V_E$ ):

$$\Phi = V_D / V_E \quad (\text{Ecuación- 1})$$

Esta propiedad es importante porque influye en la apariencia, textura, sabor, estabilidad y costo de los productos alimenticios a base de emulsión. En algunas situaciones, es más conveniente expresar la composición de una emulsión en términos de la fracción de masa de la fase dispersa ( $\Phi_m$ ), la cual está relacionada con la fracción del volumen por la siguiente ecuación:

$$\Phi_m = \frac{\Phi \rho_2}{\rho_2 \Phi + (1 - \Phi) \rho_1} \quad (\text{Ecuación- 2})$$

Donde  $\rho_1$  y  $\rho_2$  son densidades de la fase continua y dispersa, respectivamente. Cuando las densidades de las dos fases son iguales, la fracción de masa es equivalente a la fracción de volumen. La fracción de volumen de la fase dispersa de una emulsión es conocida porque la concentración de los ingredientes utilizados para su preparación está controlada (McClements, 2009).

### 2.10.2 *Distribución del tamaño de gota (DSD)*

Sí todas las gotas en una emulsión son del mismo tamaño, se le denomina como monodispersa, pero sí hay un rango de tamaños presentes, la emulsión es referida como polidispersa. El tamaño de las gotas en una emulsión monodispersa puede ser completamente caracterizado por un solo número, ya sea el diámetro de la gota ( $d$ ) o el radio ( $r$ ). Las emulsiones polidispersas pueden ser clasificadas de acuerdo a la forma general del tamaño de partícula como “monomodal” (un solo pico), “bimodal” (doble pico) o “multimodal” (múltiples picos). Las emulsiones alimentarias siempre contienen una distribución de tamaño de gotas, y especificar su tamaño es más complicado que el de un sistema monodisperso. Sin embargo, en muchas situaciones, el conocimiento del tamaño medio de las gotas y la amplitud de la distribución son suficiente. El promedio del tamaño de partícula puede ser calculado de diversas formas, con la media de los diámetros: número-longitud ( $d_{1,0}$ ), número-volumen ( $d_{3,0}$ ), volumen-superficie ( $d_{3,2}$ ), peso-volumen ( $d_{4,3}$ ), etcétera (McClements, 2009).

### 2.11 Propiedades Interfaciales

La interfaz de las gotas consiste en una región estrecha (por lo general de 1-50 nm de espesor), que rodea a cada una de ellas y contiene una mezcla de moléculas de aceite, agua, emulsionante, biopolímeros y minerales. La composición, estructura, espesor y reología de la capa interfacial es determinante en las propiedades de las emulsiones y solamente representa una fracción significativa del total de volumen de una emulsión cuando el tamaño de gota es menor de 1  $\mu\text{m}$ . La composición y estructura de la región interfacial se determinan por el tipo y concentración de especies de superficie activa presente, así como por los acontecimientos que se producen tanto durante como después de la formación de la emulsión. El espesor y la reología de la región interfacial influyen en la estabilidad de las emulsiones a la separación gravitacional, coalescencia, y la floculación y determinan la velocidad a la cual las moléculas salen o entran de las gotas (McClements, 2009).

## 2.12 Carga de la partícula

Las características de las gotas en una emulsión tienen un papel importante en la determinación de sus propiedades y vida media, dado que determina la naturaleza de su interacción con otras especies o su comportamiento en la presencia de un campo eléctrico. Cuando la carga es suficientemente grande, las gotas no tienden a aglutinarse debido a la repulsión entre ellas, el origen de esta carga es normalmente por la adsorción de moléculas de emulsionantes que son ionizados o ionizables, como los surfactantes iónicos, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos, los cuales tienen grupos hidrófilos que pueden ser neutros, cargados positivamente o negativamente. La magnitud y el signo de la carga eléctrica dependen del tipo y concentración de las moléculas de superficie activa presentes en la interfase, así como el pH y la composición iónica de la fase acuosa. Los cambios eléctricos en una gota de emulsión pueden ser manipulados por la selección de emulsificantes con características de carga mínima (signo, magnitud, punto isoeléctrico) y controlando las propiedades de la fase acuosa (pH y fuerza iónica). La carga de la gota también determina cómo interactúan las gotas con otras especies con carga dentro de la emulsión, como biopolímeros, minerales y antioxidantes (McClements, 2009).

## 2.13 Interacciones gotas-gotas

La interacción entre dos gotas son usualmente descritas por un potencial de interacción,  $w(h)$ , el cual es la energía libre necesaria para traer dos gotas de una distancia infinita a una separación de superficie a superficie ( $h$ ). La interacción potencial total se compone de la contribución de diferentes tipos de interacciones, incluyendo van der Waals, electrostática, interacciones hidrofóbicas y de hidratación (McClements, 2009).

## 2.14 Ingredientes de la emulsión

Las emulsiones se componen de materiales complejos los cuales contienen una variedad de diferentes constituyentes químicos que interactúan unos con otros, ya sea

física o químicamente. Al ser sustancias termodinámicamente inestables, se necesitan agregar sustancias que estabilicen las dos fases que componen a una emulsión, estas pueden ser divididas en: surfactantes y modificadores de textura, o biopolímeros (McClements, 2009).

#### *2.14.1 Soluciones acuosas*

La fase acuosa de muchas emulsiones contienen una variedad de constituyentes solubles en agua, incluyendo minerales, ácidos, bases, sabores, preservativos, vitaminas, azúcares, surfactantes, proteínas y polisacáridos. La interacción entre estos constituyentes y las moléculas de agua determinan la solubilidad, volatilidad, conformación y reacción química de muchos ingredientes de los alimentos. Cuando una molécula de soluto es introducida en el agua, la organización estructural normal y las interacciones de las moléculas del agua son alteradas, las cuales resultan en cambios de sus propiedades como densidad, compresibilidad, punto de fusión y punto de ebullición. Muchos de los solutos presentes en las emulsiones alimentarias, son iónicos o capaces de ser ionizados, incluyendo sales, ácidos, bases, proteínas y polisacáridos. El grado de ionización de mucho de estos solutos es dirigido por el pH de la solución acuosa (McClements, 2009).

#### *2.14.2 Surfactantes*

Los surfactantes son moléculas de superficie activa que rápidamente se adsorben en las superficies de las gotas formadas durante la homogeneización primaria, creando un revestimiento que ayuda a prevenir que las gotas se junten y se agreguen. La mayoría de los surfactantes en alimentos, son moléculas anfifílicas, tales como los emulsificadores con base lipídica (surfactantes de moléculas pequeñas o fosfolípidos) y biopolímeros (proteínas y polisacáridos) (McClements, 2009). Las moléculas de los surfactantes son adsorbidas por la interfase agua-aceite puesto que adoptan una orientación en la cual la parte hidrofílica se localiza en el agua, mientras que la parte hidrofóbica es localizada en el aceite, minimizando el área de contacto entre estas dos regiones y reduciendo la tensión interfacial; dicha reducción tiene importancia durante la homogeneización debido

a la facilidad de disrupción de las gotas de emulsión, puesto que la energía requerida para romper una gota es menor (McClements, 1999).

#### *2.14.2.1 Número de HLB*

El concepto de balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés), es un método semiempírico el cual es ampliamente utilizado para la clasificación de surfactantes (McClements, 1999). Este número es la relación entre los grupos hidrofílicos y lipofílicos en cada surfactante y por lo tanto se le asigna un número de HLB de acuerdo a su estructura química, que en su mayoría ha sido registrado en la literatura. Así un surfactante con un bajo número de HLB (3 a 6) es predominantemente hidrofóbico, utilizado preferentemente en emulsiones agua en aceite; un surfactante con alto número de HLB (8 a 18) es hidrofílico, empleado en emulsiones aceite en agua; el número de HLB intermedio (6 a 8) no tiene preferencias particulares entre agua y aceite. Los valores de HLB de muchos surfactantes han sido tabulados en la literatura. Es posible ajustar el número HLB eficaz mediante el uso de una combinación de dos o más tensioactivos con diferentes números de HLB (McClements, 1999).

#### *2.14.3 Modificadores de textura*

Los modificadores de textura son ingredientes que son añadidos normalmente en la fase continua de una emulsión para incrementar su viscosidad o para formar un gel. En el primer caso se les denomina “agentes espesantes” y en el segundo “agentes gelificantes” (McClements, 2009). Los biopolímeros estabilizan las gotas de una emulsión protegiéndolas de la agregación por diferentes mecanismos, todos proporcionan fuerzas estéricas repulsivas que son suficientemente fuertes para mantener las gotas lejos para no unirse. Las propiedades de las soluciones de biopolímeros son particularmente sensibles al pH y a la fuerza iónica. Si los valores de pH se encuentran cerca del punto isoeléctrico de las proteínas, o a altas fuerzas iónicas, la repulsión electrostática entre las partículas puede no ser suficientemente grande para evitar que se agreguen (McClements, 2009).

### 2.14.3.1 Alginato

Alginato, uno de los biopolímeros más ampliamente utilizados, es un polisacárido que se extrae de las algas cafés de las *Feoficeae*, donde es el componente estructural de las paredes celulares como sales de sodio, calcio o potasio. Las especies de algas pardas mayormente utilizadas para la producción de alginato son *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Saccharina japonica* y *Ascophyllum nodosum*. A nivel molecular el alginato se describe como un polisacárido lineal que consiste de dos residuos de ácido urónico:  $\beta(1,4)$ -D-manosilurónico (M) y ácido  $\alpha(1,4)$ -L-gulosilurónico (G), que se presentan en forma de bloques de manuronato, bloques de guluronato y bloques heteropoliméricos de ambos monómeros. Como se aprecia en la Figura 1 los bloques de guluronato forman una cavidad con dimensión ideal para el acomodo de un ión como el del calcio. Así surge el “modelo de caja de huevo” descrito por Grant, explicando el mecanismo de gelación del alginato y pectina: las zonas de unión intermoleculares se forman por unión directa de cationes divalentes a los grupos carboxilatos en las cadenas de guluronato. Generalmente, las soluciones de alginato tienden a ser altamente viscosas, esta propiedad como en la mayoría de los polisacáridos, depende en gran medida del peso molecular, con incremento proporcional al aumento del peso molecular. En alginatos, otros factores como la relación G:M, pH, fuerza iónica y, en particular, la presencia de cationes divalentes pueden causar variaciones en la viscosidad (Norton *et al.*, 2011).

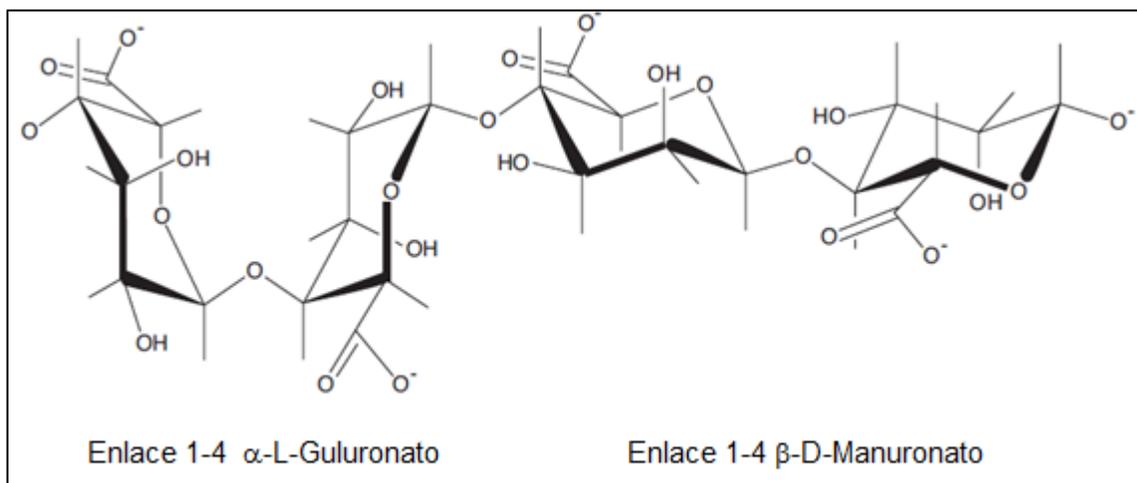


Figura 1. Estructura química de alginato (Norton *et al.*, 2011)

## 2.15 Formación de una emulsión

La concentración de las gotas en una emulsión es usualmente descrita en los términos de fracción del volumen de la fase dispersa ( $\Phi$ ). El proceso de la conversión de dos fases líquidas inmiscibles en una emulsión, o la reducción del tamaño de las gotas en una emulsión preexistente, se le conoce como homogeneización. En la industria de los alimentos, este proceso se lleva a cabo generalmente, con dispositivos denominados homogeneizadores, los cuales mantienen a los líquidos en una agitación mecánica intensa. Es conveniente dividir la homogeneización en dos categorías: primaria, donde se crea una emulsión directamente de los dos líquidos que contiene gotas de tamaño relativamente grandes, regularmente a través de un mezclador de alta velocidad, y la secundaria, donde se reduce el tamaño de gotas, y se lleva a cabo con otro tipo de homogeneizador por ejemplo ultrasonido, homogeneizador de alta presión y microfluidizador. Para la formación de una emulsión cinéticamente estable por un período de tiempo razonable, se debe evitar que las gotas formadas se fusionen. Esto se logra al tener una concentración suficiente de emulsionante o surfactante durante el proceso de homogeneización, donde se absorbe en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que impide que las gotas estén suficientemente cerca para unirse (McClements, 1999).

## 2.16 Principios físicos en la formación de la emulsión

El tamaño de las gotas producidas por la homogeneización depende del balance entre dos procesos físicos opuestos: disrupción de la gota y la coalescencia de la gota (McClements, 1999).

### 2.16.1 *Disrupción de gota*

La disrupción de la gota está relacionada con el equilibrio existente entre las fuerzas interfaciales y las fuerzas mecánicas generadas en el proceso de homogeneización (McClements, 1999).

### 2.16.1.1 Fuerzas interfaciales

La gota en una emulsión tiende a ser esférica para minimizar la energía desfavorable en el área de contacto entre la fase oleosa y la fase acuosa. Dividir en una serie de gotas más pequeñas, aumenta el área de contacto y por lo tanto requiere un aporte de energía. La fuerza interfacial responsable de mantener una gota en forma esférica es caracterizada por la “Presión de Laplace” ( $\Delta P_L$ ), y que actúa a través de la interfase aceite-agua hacia el centro de la gota de modo que haya una presión mayor dentro de la gota que fuera de ella:

$$\Delta P_L = \frac{4\gamma}{d} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde,  $\gamma$  es la tensión interfacial entre aceite y agua, y  $d$  es el diámetro de la gota. Para deformar y romper una gota durante la homogeneización, es necesario aplicar un fuerza externa significativamente mayor que la fuerza interfacial (McClements, 1999).

### 2.16.1.2 Importancia del emulsificante

La facilidad con la cual una gota puede ser dividida durante la homogeneización incrementa conforme la tensión interfacial disminuye. Por lo que es posible producir gotas con tamaños pequeños por homogeneización en la presencia de un emulsificante el cual reduce la tensión interfacial. Los siguientes factores también determinan la efectividad de los emulsificantes en la reducción del tamaño de gota: primero, la velocidad con la cual un emulsificador se adsorbe en la superficie de las gotas inmediatamente después de su formación por la homogeneización, donde las gotas que tienen una baja concentración del emulsificante adsorbido en su superficie serán más difícil de romperlas por la tensión interfacial relativamente alta. Con el tiempo, mayor cantidad de emulsificante se acumula en la superficie, la cual decrece la tensión interfacial y facilita la disrupción de las gotas. Por lo tanto: a mayor adsorbancia en la superficie de las gotas durante la homogeneización, menor tamaño de gotas se producen. Segundo, la habilidad de los emulsificadores para mejorar la reología interfacial de las gotas de la emulsión que impide

la ruptura de las gotas, lo que conduce a tamaños más grandes de los esperados a partir del equilibrio de tensión interfacial (McClements, 1999).

### 2.16.2 Coalescencia de las gotas

Las emulsiones son sistemas altamente dinámicos en los cuales las gotas continúan moviéndose y colisionan frecuentemente unas con otras, particularmente rápido durante la homogeneización debido a la intensidad de la agitación mecánica, que de no haber una concentración suficiente de surfactante para cubrir completamente la superficie recién formada, tienden a incorporarse una con otra inmediatamente después de su ruptura. Por lo que, para prevenir la coalescencia es necesario formar una membrana de emulsificador suficientemente concentrada alrededor de las gotas antes de que tengan tiempo de colisionar con otras gotas. Como se muestra en la Figura 2, el tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización depende del tiempo llevado para que el emulsificador sea adsorbido en la superficie de las gotas ( $\tau_{\text{adsorción}}$ ) en relación con el tiempo entre la colisión de gotas ( $\tau_{\text{colisión}}$ ), (McClements, 1999).

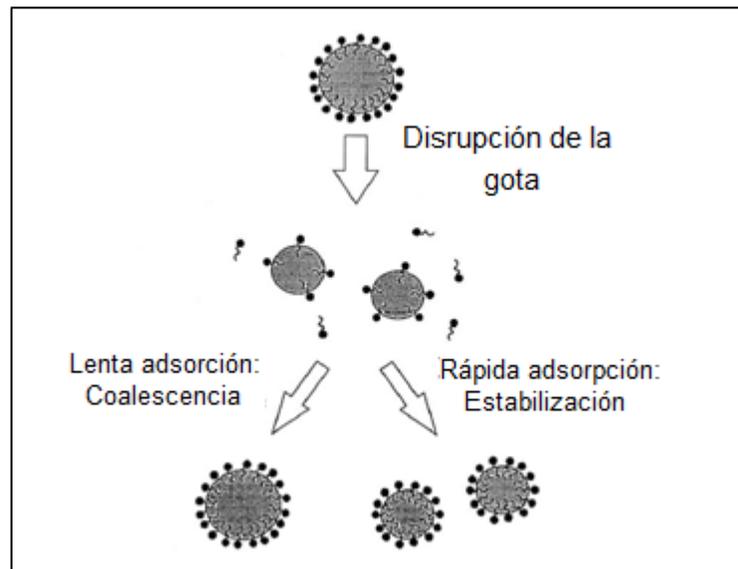


Figura 2. Tamaño de las gotas durante la homogeneización (McClements, 1999).

## 2.17 Estabilidad de la emulsión

Como se menciona con anterioridad, las emulsiones son termodinámicamente inestables que tienden a separarse sus fases acuosa y oleosa. El término de “estabilidad de emulsión” se refiere a la habilidad de una emulsión para resistir los cambios de sus propiedades, entre mayor sea la estabilidad menores serán los cambios en sus propiedades. Los cambios en las propiedades pueden ser los resultados de los procesos físicos que causan cambios en la distribución espacial de sus componentes (“creaming”, sedimentación, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald y fase de inversión) o de los procesos químicos que causan alteración en el tipo de moléculas presentes (oxidación, hidrólisis, polimerización) (McClements, 2009).

### 2.17.1 Separación gravitacional: “creaming” y sedimentación

Las gotas en una emulsión usualmente tienen una densidad diferente que los líquidos que la rodean, y por ello una fuerza gravitacional actúa sobre ellas. Si las gotas tienen menor densidad, tienden a moverse hacia arriba, fenómeno conocido como “creaming”. Contrariamente, si las gotas tienen una densidad mayor, tienden a moverse hacia abajo lo cual se conoce como “sedimentación”. Para una primera aproximación, la velocidad de “creaming” de una sola gota esférica aislada en un líquido viscoso puede ser descrita por la ecuación de Stokes:

$$v = - \frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $v$  es la velocidad de “creaming”,  $g$  es la aceleración debida a la gravedad,  $\rho$  es la densidad,  $\eta$  es la viscosidad de corte y los subíndices 1 y 2 se refieren a la fase continua y a la dispersa, respectivamente. El signo de  $v$  determina hacia donde se mueve la gota, arriba (+) y abajo (-). La ecuación de Stokes indica que el “creaming” puede ser retardado minimizando la diferencia de densidades entre las dos fases, reduciendo el tamaño de partícula o incrementando la viscosidad de la fase continua (McClements, 2009).

### 2.17.2 Agregación de gotas: floculación y coalescencia

Las gotas en emulsiones están en continuo movimiento debido a su energía térmica, a la fuerza gravitacional o a las fuerzas mecánicas a las que son sometidas; y al moverse colisionan con las gotas próximas, como se explica anteriormente. Después de una colisión, las gotas pueden separarse o pueden permanecer agregadas, dependiendo de la magnitud de las fuerzas de atracción o repulsión entre ellas. Las gotas tienden a agregarse cuando la fuerza neta es extremadamente atractiva, y permanecen como entidades individuales cuando la fuerza neta es fuertemente repulsiva. Dos tipos de agregación de gotas son comúnmente observadas en la emulsión: la floculación y la coalescencia. En la floculación, dos o más gotas llegan a formarse en agregados en los cuales las gotas de emulsión conservan su integridad individual. Mientras que en la coalescencia, dos o más gotas se unen en una sola gota. La velocidad en la cual la agregación de gotas procede dentro de una emulsión depende de dos factores: la frecuencia y la eficiencia de las colisiones. La frecuencia de la colisión es el número de los encuentros entre las gotas por unidad de tiempo por unidad de volumen. Para emulsiones diluidas que contienen partículas esféricas idénticas, la frecuencia de colisión  $N$  se ha calculado para sistemas en reposo y en agitación (McClements, 2009):

$$\text{Movimiento Browniano: } N = \frac{4kTn_0^2}{3n} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\text{Corte simple: } N = \frac{16}{3}Gr^3n_0^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $n_0$  es el número inicial de partículas por unidad de tiempo,  $r$  es el radio de la gota,  $G$  es la velocidad de cizalla, y  $kT$  es la energía térmica. La eficiencia de la colisión,  $E$ , es la fracción de encuentros entre las gotas que conducen a la agregación, su rango de valores es de 0 (sin agregación) a 1 (demasiada agregación) y depende de la interacción potencial de la gota y la naturaleza de la interfase alrededor de las gotas. Cuando la fuerza de atracción entre las gotas es relativamente fuerte, dos gotas tienden a juntarse tan pronto como se encuentran, conduciendo a la formación de flóculos que

tienen estructuras muy abiertas y se caracterizan por una dimensión fractal baja. Al no ser tan fuertes estas fuerzas de atracción, permite que después de una colisión las gotas se junten, formando unos flóculos densos con una dimensión fractal superior. La estructura de los flóculos formados en una emulsión influye en sus propiedades físico-químicas. La coalescencia se produce rápidamente entre gotas que no están protegidas por moléculas de emulsionantes. Cuando son estabilizadas por una capa de emulsificante, la tendencia a la coalescencia se rige por la interacción de las gotas y la estabilidad de la capa interfacial a la ruptura. Sí hay una fuerza repulsiva fuerte entre las gotas y las separaciones, o si la capa interfacial es altamente resistente a la ruptura, entonces las gotas no tenderán a unirse (McClements, 2009).

### 2.17.3 Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald (OR) es el crecimiento de gotas grandes de aceite a expensas de las gotas más pequeñas debido a la difusión de las moléculas de aceite a través de la intervención de la fase acuosa (McClements, 2009). La fuerza motriz para el OR es el hecho de que la solubilidad del aceite en la proximidad inmediata de una gota de aceite aumenta a medida que el diámetro de la gota disminuye. La tasa de maduración Ostwald por lo general aumenta con el aumento de la solubilidad de la fase oleosa en la fase acuosa (McClements, 1999; Chang *et al.*, 2015):

$$S(r) = S(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{RT_r}\right) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$S(r) = S(R) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{RT_r}\right) \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde  $V_m$  es el volumen molar del soluto,  $\gamma$  es la tensión interfacial,  $R$  es la constante de gases,  $S(\infty)$  es la solubilidad de los solutos en la fase continua para una gota con una curvatura infinita (interfase planar), y  $S(R)$  es la solubilidad del soluto cuando esté contenido en una gota esférica de radio  $r$ . En una emulsión polidispersa hay una mayor solubilidad de las moléculas que conforman la fase dispersa entre menor sea el radio de la gota, lo que ocasiona un gradiente de concentración, que involucra el movimiento de

las moléculas de gotas más chicas a las gotas grandes. La velocidad de OR puede ser obtenida por la teoría de LSW (Lifshitz-Slezov-Wagner) que se describe en la Ecuación 9:

$$W = \frac{d\langle r \rangle^3}{dt} = \frac{8\gamma V_m S(\infty) D}{9RT} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde D es el coeficiente de difusión de las moléculas de la fase dispersa a través de la fase continua. De acuerdo con esta teoría hay una relación lineal entre el cubo del radio medio de la gota y el tiempo (McClements, 2009; Li y Chiang, 2012).

La maduración de Ostwald es despreciable en muchos alimentos debido a que los triglicéridos tienen solubilidades muy bajas de agua, y por lo tanto la tasa de transporte de masa es insignificante. Sin embargo, en emulsiones que contienen más lípidos solubles en agua, tales como los aceites esenciales, la maduración de Ostwald es importante (McClements, 2009).

#### *2.17.4 Fase de inversión*

La fase de inversión involucra la conversión de una emulsión aceite en agua a una emulsión agua en aceite o viceversa. Este proceso es resultado de alguna alteración en la composición del sistema o condiciones ambientales, como la fracción de volumen de la fase dispersa, tipo y concentración del emulsificador, fuerza iónica, pH o la aplicación de fuerzas mecánicas. La fase de inversión se produce por medio de una serie de mecanismos fisicoquímicos complejos involucrando la fragmentación de la gota y los procesos de agregación. En el punto donde se produce la inversión de fase, el sistema puede contener regiones de emulsión de aceite en agua, de agua en aceite, emulsiones múltiples, y las fases bicontinuas, antes de invertir a su estado final (McClements, 2009).

## 2.18 Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones, también conocidas como miniemulsiones, son gotas nanoescalares de dispersiones de multifases coloidales formadas por la dispersión de un líquido en otro inmiscible por acción física de la ruptura inducida. Diversos tamaños de partícula han sido manejados en la literatura para denominar a estos sistemas como nanoemulsiones, sin embargo la más apropiada basada en la definición de nanotecnología, así como la obtención de propiedades distintas a la emulsión ordinaria, es un tamaño de diámetro menor de 100 nm (Fathi *et al.*, 2012).

### 2.18.1 Métodos de producción

Los métodos utilizados para producir nanoemulsiones pueden ser divididos en técnicas mecánicas y no mecánicas. Los métodos mecánicos (de alta energía) incluyen: homogeneizadores de alta presión, microfluidización y ultrasonido. Mientras que los métodos no mecánicos incluyen técnicas como difusión de disolventes y evaporación-emulsificación (Fathi *et al.*, 2012).

#### 2.18.1.1 Homogeneización de alta presión

Una emulsión primaria es producida por lo general usando un mezclador de alta velocidad (homogeneización primaria) y se alimenta directamente a la entrada de la válvula del homogeneizador de alta presión (McClements, 1999). Para formar una emulsión estable y fina por este método, es pasada a través de pequeños orificios por medio de la aplicación de presión (Fathi *et al.*, 2012). A medida que la emulsión pasa a través de dichos orificios experimenta una combinación de intenso cizallamiento y cavitación, así las condiciones de flujo turbulento causan la ruptura de las gotas grandes en pequeñas. La presión y el número de ciclos empleados tienen un efecto importante en el tamaño de partícula de la nanoemulsión formada (McClements, 1999; Quintanilla *et al.*, 2010).

### 2.18.1.2 *Microfluidización*

En esta técnica, las corrientes de fluidos se ven obligados a pasar a través de un sistema de microcanales dispuesto de tal manera que la fuerza de arrastre ejercida por los fluidos cuando se mueven en el sistema y el contacto entre sí haga que las gotas se rompan en gotas más pequeñas. Los microcanales se pueden encontrar en diferentes tamaños con diversas geometrías. Al igual que el homogenizador de alta presión, las partículas son fraccionadas por un esfuerzo de cizalla y cavitación (Fathi *et al.*, 2012; Quintanilla *et al.*, 2010).

### 2.18.1.3 *Ultrasonido*

El mecanismo de generación de una nanoemulsión usando ultrasonido es atribuido a la cavitación de las burbujas. Las ondas de los ultrasonidos resultan en la formación secuencial, crecimiento y colapso de burbujas microscópicas de vapor en el líquido. Subsecuentemente, el colapso de estas cavidades proporciona la energía suficiente para incrementar la superficie del área de las gotas. La eficiencia de la nanoemulsión por sonicación, depende tanto de las propiedades de la emulsión y la potencia del dispositivo (Fathi *et al.*, 2012).

## 2.19 Nanoemulsiones como transporte de agentes antimicrobianos

Las nanoemulsiones pueden ser designadas con una variedad de técnicas para servir como transportadores de agentes antimicrobianos para mejorar la seguridad y calidad de los alimentos. Una de las técnicas involucra un agente antimicrobiano lipofílico y su liberación por medio de un transporte de masa desde el interior de las gotas de la nanoemulsión a través de la fase acuosa del sistema de alimentación de la membrana de los patógenos; por su reducido tamaño de partícula, se espera que tengan mejor actividad ya que la fuerza motriz para el proceso de transporte de masas es menor con respecto a una emulsión con mayor tamaño de gota. Otra técnica, consta de un lípido inerte estabilizado con un agente de superficie activa antimicrobiana como lisozima, nisina y arginato laúrico, permitiendo la interacción de gotas con microorganismos, en este caso las nanoemulsiones podrían presentar mayor probabilidad que una emulsión,

de colisionar con el microorganismo. Así mismo, las nanoemulsiones antimicrobianas podrían ser elaboradas por la combinación de dos enfoques descritos anteriormente, es decir usando un antimicrobiano que es parte de la fase dispersa y un segundo antimicrobiano que sea la superficie activa y parte de la capa emulsionante. En la Figura 3 se muestra las estructuras de las nanoemulsiones antimicrobianas; de izquierda a derecha, las nanoemulsiones con lípido y surfactante antimicrobianos; las nanoemulsiones con surfactante antimicrobiano y lípido inactivo; las nanoemulsiones con acumulación preferencial de lípido antimicrobiano y superficie activa, y las nanoemulsiones con superficie inerte y lípido antimicrobiano homogéneamente disperso a través de la gota (Barbosa *et al.*, 2009).

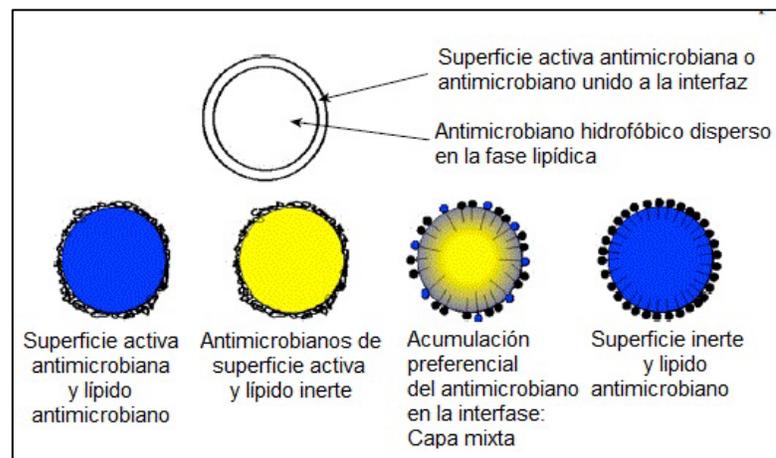


Figura 3. Estructura de las nanoemulsiones antimicrobianas (Barbosa *et al.*, 2009).

### 3. SITUACIÓN ACTUAL

Los alimentos insalubres que contienen microorganismos nocivos causan más de 200 enfermedades, se estima que cada año enferman en el mundo 600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados, y 420 mil mueren por dicha causa. Entre los principales patógenos que se reportan anualmente como causantes de dichas enfermedades se encuentra *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* (OMS, 2015). Para reducir el riesgo de brotes de enfermedades por alimentos, por años se han empleado conservadores químicos, surgiendo controversia en su uso puesto que han causado problemas en la salud (Fleming y Smith, 2003). Ante tal situación, se requiere encontrar una nueva opción para reducir o eliminar los microorganismos presentes durante la vida útil de los alimentos; aunado a la creciente demanda de los consumidores por productos naturales, lo cual ha conducido a la investigación de nuevos agentes antimicrobianos que procedan de fuentes naturales como son las plantas (Goñi *et al.*, 2009).

Se ha considerado que los aceites esenciales extraídos de plantas, podrían fungir como aditivos naturales para la preservación de los alimentos, puesto que estudios dirigidos a la reducción, retraso e inhibición del crecimiento de la población de microorganismos han concluido que la interacción de los compuestos químicos que los conforman cumple satisfactoriamente con mencionado propósito, debido a su reacción con los componentes de la membrana celular de la bacteria (Burt, 2004; Liang *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2013; Salvia *et al.*, 2014; Calo *et al.*, 2015; Mazzarino *et al.*, 2015).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales muestran una actividad antimicrobiana que son la base de su aplicación en la elaboración y preservación de los alimentos. La actividad antimicrobiana de los diferentes aceites esenciales y de los componentes de los mismos, ha sido probada en distintas especies de microorganismos. Sin embargo, la incorporación directa de los aceites esenciales en los alimentos se encuentra con limitaciones tecnológicas, relacionadas con la naturaleza hidrofóbica, reactiva y volátil de las moléculas bioactivas que constituyen los aceites esenciales (Donsi *et al.*, 2011). Para mantener su actividad biológica y minimizar el impacto en las propiedades organolépticas de los alimentos donde se incorporen, los constituyentes de los aceites esenciales, como otros componentes bioactivos, necesitan estar protegidos de la interacción con otros ingredientes del alimento y del estrés ambiental experimentado durante la elaboración del alimento (McClements, 1999). Por lo anterior y con el fin de ser activos en el área de los alimentos, los aceites esenciales o sus constituyentes pueden ser encapsulados en sistemas de liberación adecuados, para actuar en fases acuosas o interfases líquido-sólido, donde los microorganismos tienen mayor probabilidad de crecer y proliferar (Barbosa *et al.*, 2009). El empleo de la nanocápsulas líquidas para brindar dicha protección a los compuestos de los aceites esenciales, es una opción viable además de mejorar su habilidad para penetrar en la membrana por su tamaño de partícula; haciendo uso de la insolubilidad en agua de los aceites esenciales se puede elaborar nanoemulsiones O/W, para proteger sus propiedades antimicrobianas (Quintanilla *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012; Fathi *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2013; Salvia *et al.*, 2015; Almadiy *et al.*, 2016). La caracterización y evaluación del aceite esencial de canela y pimienta negra como fase dispersa en una fase continua acuosa permitirá desarrollar las condiciones adecuadas para su producción y almacenamiento.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Desarrollar y caracterizar las nanoemulsiones O/W elaboradas de los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su mezcla, y evaluar su capacidad antimicrobiana.

### 5.2 Objetivos específicos

- Elaborar las emulsiones y nanoemulsiones de los aceites esenciales de pimienta negra, canela y su mezcla mediante ultrasonido y homogeneización de alta presión y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas.
- Evaluar la estabilidad fisicoquímica de las emulsiones convencionales y nanoemulsiones durante el almacenamiento en condiciones controladas.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas de la emulsión y nanoemulsión sobre las cepas seleccionadas.

## 6. HIPÓTESIS

La mezcla de los aceites esenciales como fase dispersa en una nanoemulsión O/W, presenta mayor efecto antimicrobiano respecto al empleo de un solo aceite esencial, contra las cepas de microorganismos seleccionadas.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología se desarrolló en tres etapas, las cuales se muestran en la Figura 4.

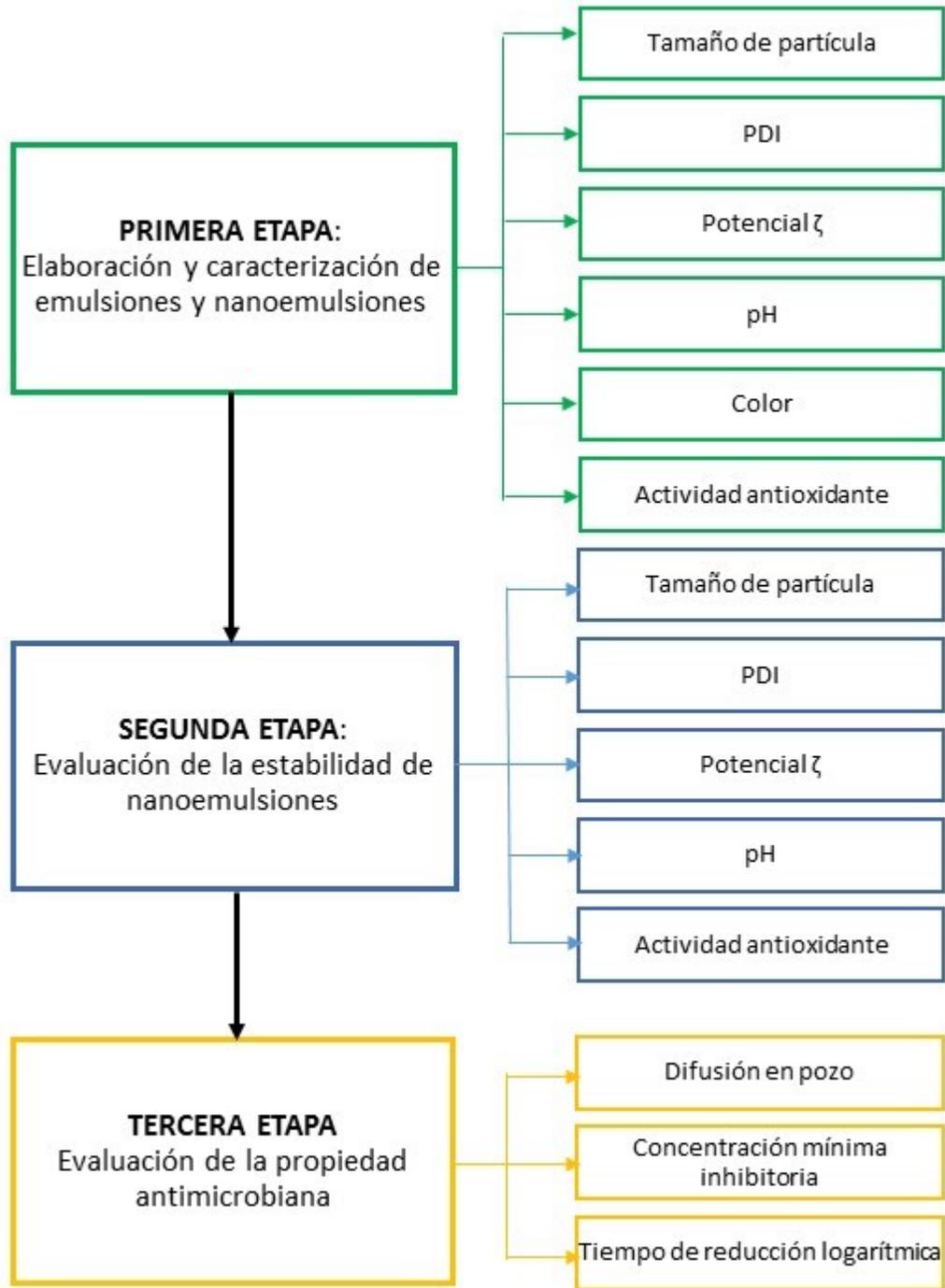


Figura 4. Esquema General de trabajo

## 7.1 Materia prima

El aceite esencial de pimienta negra (*Piper nigrum L.*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) fue donado por la empresa “Aromáticos Victoria S.A de C.V”. El alginato de sodio se adquirió en la droguería “Cosmopolitan S.A de C.V”. Los surfactantes utilizados: monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 20), monohexadecanoato de sorbitano (Tween 40), monooleato de sorbitan polioxietilénico (Tween 80) y monolaurato de sorbitán (Span 20), fueron marca Sigma Aldrich. Las cepas seleccionadas fueron *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 43895) y *Salmonella enterica serovar thyphimurum* (ATCC 14028).

## 7.2 Metodología

### 7.2.1 Elaboración de la emulsión y almacenamiento

La elaboración de la emulsión se llevó a cabo de acuerdo a la técnica modificada de Salvia *et al.* (2014). La fase acuosa consistió en una solución de alginato de sodio en agua destilada (1% p/v); mientras que para la fase oleosa (1% v/v) se realizaron tres formulaciones: la primera consistió únicamente en aceite esencial de pimienta, la segunda en aceite esencial de canela y la tercera se elaboró con una relación 1:1 (v/v) de ambos aceites. Para la selección del número de HLB del surfactante a emplear en cada sistema de emulsión se procedió a un ajuste: 12.0, 14.0 y 16.0, con la mezcla de dos surfactantes, obteniendo las fracciones de masa de ambos a través de la ecuación descrita por Souza *et al.* (2011):

$$M_a = (HLB_d - HLB_b)/(HLB_a - HLB_b) \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde  $M_a$  es la fracción de masa del surfactante  $a$ ,  $HLB_d$  es el número de HLB deseado, y  $HLB_a$  y  $HLB_b$  son los números de HLB de los surfactantes  $a$  y  $b$ , respectivamente. Para los ajustes se emplearon: Span 20 (HLB 8.6), Tween 80 (HLB 15), Tween 40 (HLB 15.6) y Tween 20 (HLB 16.7).

Una vez ajustado el número de HLB se realizó un ensayo que consistió en la fase dispersa fija (1% v/v), variando la cantidad de surfactante para obtener la relación aceite:surfactante de: 1:1, 1:3 y 1:5 (v/v); únicamente en las emulsiones elaboradas por un solo aceite esencial (canela o pimienta negra). Las fases se mezclaron por medio de un homogeneizador de alta velocidad (EUROSTAR P CV 6000) a 3400 rpm durante 2 min, manteniendo la temperatura durante el procesamiento a 25 °C. El almacenamiento se llevó a cabo durante dos meses a 4 °C, determinando su tamaño de partícula, PDI, potencial  $\zeta$ , pH y porcentaje de captura del radical DPPH.

### *7.2.2 Elaboración de los sistemas de nanoemulsión*

#### *7.2.2.1 Elaboración de nanoemulsión por el método de homogeneización de alta presión*

Un equipo de homogeneización de alta presión (Nano-Debee®, Easton, EUA) fue empleado para la homogeneización secundaria de la emulsión convencional. La emulsión fue pasada cinco ciclos a través del sistema trabajando a 150 MPa. Determinando su tamaño de partícula e índice de polidispersión por cada ciclo a 25 °C.

#### *7.2.2.2 Elaboración de nanoemulsión por el método de ultrasonido*

##### *7.2.2.2.1 Proceso continuo en la aplicación de ultrasonido*

La emulsión primaria fue sujeta a un procesador ultrasónico de 20 kHz con un poder máximo de 750 W (Cole-Parmer instruments, modelo CPX750, EUA), operando a una amplitud de 30% durante 5 min de tiempo corrido. Determinando su tamaño de partícula e índice de polidispersión, tomando una muestra de 100  $\mu$ L del sistema sujeta a ultrasonido cada minuto.

##### *7.2.2.2.2 Proceso con pulsos en la aplicación de ultrasonido*

La emulsión primaria fue sujeta a un procesador ultrasónico de 20 KHz con un poder máximo de 750 W (Cole-Parmer instruments, modelo CPX750, EUA), operando a una amplitud de 30%. Se empleó un sistema de pulsos que consistió en 2 min continuos de ultrasonido y 30 s de reposo, aplicando 6 pulsos a cada sistema de emulsión, para un total de sonicación de 12 min.

### 7.2.3 Propiedades de la emulsión

#### 7.2.3.1 *Tamaño de partícula*

El tamaño de partícula fue medido por escala de luz dinámica (DLS) con un difractómetro láser (Zetasizer NanoZS Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) trabajando en 633 nm en 25 °C. Para su medición se preparó un mililitro de dilución 1:10 (v/v) de la emulsión o nanoemulsión en agua destilada.

#### 7.2.3.2 *Cinética de maduración de Ostwald*

La velocidad de maduración de Ostwald ( $w$ ), se obtuvo de la teoría LSW descrita en la Ecuación 9; donde se implica una relación lineal entre el cubo del radio medio de partícula ( $r^3$ ) y el tiempo de almacenamiento. Se empleó el diámetro volumétrico ( $D_{3,0}$ ) a partir del día siete de almacenamiento, a partir de él se obtuvo el  $r^3$  para obtener la pendiente que describió su comportamiento lineal en función del tiempo de los sistemas de nanoemulsiones y reportando la velocidad de maduración como  $m^3 \cdot s^{-1}$ .

#### 7.2.3.3 *Potencial $\zeta$*

El potencial  $\zeta$  de las gotas de aceite fue medido con un difractómetro láser (Zetasizer NanoZS Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) para determinar la carga de superficie en la interfase de las gotas dispersas en la solución del biopolímero. Dos mililitros de una dilución 1:10 (v/v) de la emulsión o nanoemulsión en agua destilada fue utilizada para evaluar este parámetro.

#### 7.2.3.4 *Índice de blancura*

El color de las emulsiones fue medido con un colorímetro (Color-Flex Hunter Lab. modelo CX115 45/0, EUA), calibrando con un disco negro y blanco. Se determinaron los valores CIE  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Fuerza de color, D65 y 10° de ángulo de observador) y el índice de blancura (WI) fue calculado con la Ecuación 11 (Silva *et al.*, 2013):

$$WI = 100 - ((100 - L)^2 + (a^2 + b^2))^{0.5} \quad \text{Ecuación 11}$$

### 7.2.3.5 pH

El pH fue obtenido por medio de un potenciómetro (Oakton, Modelo: JZ-35613-2, Singapur) para la emulsión convencional y para las nanoemulsiones seleccionadas por ambos métodos mecánicos, antes y durante su almacenamiento.

### 7.2.4 Actividad antioxidante de las emulsiones

#### 7.2.4.1 Captura del radical DPPH•

El porcentaje de captura del radical DPPH• se determinó por el método modificado de Brand-Williams *et al.* (1995) en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO, EUA). Se empleó una solución etanólica  $6.1 \times 10^{-5}$  M del radical DPPH, utilizando como control 20  $\mu$ L de etanol en 180  $\mu$ L de dicha solución, el blanco consistió en 200  $\mu$ L de etanol. Para la determinación de actividad antioxidante, 100  $\mu$ L de emulsión se diluyeron en 1000  $\mu$ L de etanol, dejándolo reposar durante 10 min. Posteriormente, 20  $\mu$ L de esta dilución fueron colocados en la microplaca, y se le agregó 180  $\mu$ L de la solución etanólica del DPPH. Después de 30 min de incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad, se leyeron las muestras a una absorbancia de 517 nm. Las muestras se realizaron por triplicado y se reportó de acuerdo al porcentaje de captura empleando la Ecuación 12:

$$\% \text{ de captura DPPH}\bullet = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

#### 7.2.4.2 Potencial óxido-reducción

Las mediciones se realizaron de acuerdo al método descrito por Manzocco *et al.* (1998) con algunas modificaciones. Se empleó un electrodo de platino, calibrando con una solución estándar de potencial óxido-reducción de 315 mV a 25 °C. El electrodo se insertó en un recipiente de 30 mL que contenía un volumen de 10 ml de muestra. Antes del análisis, el oxígeno se eliminó del sistema por inyección de nitrógeno gaseoso por un período de 2 min. El valor de potencial se estableció cuando por lo menos en 5 min se mantuvo estable.

### 7.2.5 Actividad antimicrobiana de las emulsiones

La actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones fueron evaluadas por la inhibición *in vitro* de las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; y de las bacteria Gram negativa: *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. Para su reactivación se cultivaron en caldo Mueller-Hinton 24 horas, a una temperatura de 37 °C, posteriormente se realizó un sembrado por estría en agar Mueller-Hinton.

#### 7.2.5.1 Difusión en pozos

Para determinar las nanoemulsiones con mayor poder antimicrobiano, se realizó la técnica de difusión en pozos. Se realizaron 5 pozos con ayuda de una varilla estéril en cajas Petri que contenían agar Mueller-Hinton solidificado y esterilizado. Las cepas cultivadas en caldo Mueller Hinton se ajustaron a una concentración de  $10^8$  UFC/ml (0.5 de la escala de McFarland), sembrando 200  $\mu$ L en la superficie del agar. En cada pozo se pipeteó un volumen diferente de emulsión o nanoemulsión, en un rango de 80-160  $\mu$ L. Se empleó como control negativo solución de alginato al 1% (correspondiente a la fase acuosa de la emulsión). La inhibición fue determinada por la medición del diámetro de la zona libre de crecimiento alrededor del pozo y reportada como diámetro de la zona de inhibición en milímetros.

#### 7.2.5.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en las seis cepas fue evaluada de acuerdo con la técnica modificada de Donsi *et al.*, 2011, por la concentración de la nanoemulsión en el medio de cultivo en un rango de 20-1000  $\mu$ L/mL. Las muestras fueron inoculadas con 1% de suspensión microbiana ( $3 \times 10^8$  UFC/ml, correspondiente a la concentración 0.5 de la escala de McFarland) e incubadas por 24 h a 37 °C. El valor de CMI fue determinado como la más baja concentración de la nanoemulsión que inhibe el crecimiento de los microorganismos evaluando la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro en 600 nm antes y después de su incubación.

### 7.2.5.3 Tiempo de reducción logarítmica

El método empleado fue una modificación del descrito por Silva *et al.*, 2013. Se inoculó con 1% de cultivo bacteriano ajustado a la escala 0.5 de McFarland en 1 mL de buffer PBS pH 7 y 100 µL de emulsión o nanoemulsión. Para determinar la inactivación cinética, una alícuota fue tomada después de 5, 15 y 30 min de tiempo en contacto, inmediatamente se realizaron diluciones seriales para ser sembradas sobre placas con agar McConkey y Mueller-Hinton para *Listeria monocytogenes*. En el control, se reemplazó la nanoemulsión por agua destilada estéril. El conteo de colonias se llevó a cabo después de la incubación de las cajas a 37 °C por 24 h, el modelo de Weibull fue utilizado para la obtención del tiempo para la inactivación del primer ciclo logarítmico, el cual se describe en la Ecuación 12:

$$\ln(S) = -\left(\frac{t}{\beta}\right)^{\alpha} \quad \text{Ecuación 12}$$

Don S corresponde a la fracción de supervivencia de las bacterias ( $N/N_0$ ), t es el tiempo en contacto (min),  $\beta$  representa el tiempo (min) necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico de la población microbiana y  $\alpha$  describe la forma de la curva de inactivación.

### 7.2.6 Método estadístico

Se realizó ANOVA de dos vías para el análisis estadístico de los datos, y prueba de Tukey para la diferencia de medias con valor de significancia  $P < 0.05$ ; y un análisis de correlación en las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas. El software empleado para dicho análisis fue Statistica 7®; se graficó por medio de KaleidaGraph® Versión 4.0 y Desing-Expert 7 ® para los gráficos de superficie de respuesta.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Elaboración de emulsiones

Los gráficos de superficie (Figura 5) muestran el efecto obtenido por la interacción de la concentración y número de HLB en el tamaño de partícula expresado como diámetro medio de partícula ( $D_z$ ) en nanómetros (nm) de las emulsiones convencionales. El tamaño de partícula se relacionó con el valor de HLB, distinguiéndose una elevación en el diámetro conforme ascendió el número de HLB, reportando en HLB 12 el  $D_z$  menor para canela: 96.34 nm y pimienta negra: 166.45 nm y el mayor en HLB 16 (canela: 586.95 nm y pimienta negra: 1923.5 nm). Por su parte, la relación aceite:surfactante (v/v) no afectó el tamaño de partícula para los sistemas elaborados con aceite esencial de pimienta, pero fue significativa para las emulsiones de aceite esencial de canela, donde se percató que en una concentración mayor del surfactante (excepto HLB 16) se obtenían menores tamaños de gotas; este comportamiento ha sido descrito por diversos investigadores obteniendo tamaños de partícula menores cuando la cantidad de surfactante es superior a la del aceite (McClements, 2009; Lee y McClements, 2010; Gosh *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012); expresado de otra manera, a partir de la proporción aceite:surfactante 1:3 (v/v) el diámetro medio de la fase dispersa disminuyó para los sistemas elaborados con número de HLB 12 y 14, quienes mostraron una adsorción más eficiente en las gotas recién formadas. Comparando con lo reportado por Salvia *et al.* (2013), las emulsiones convencionales elaboradas de aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, con fase acuosa de solución de alginato al 1% y estabilizadas con Tween 80 (HLB 15), registraron un  $D_z$  de 1410 nm, valor que se encontró por arriba de lo registrado por las emulsiones de aceite esencial de canela y pimienta, excepto con el empleo de HLB 16 para este último.

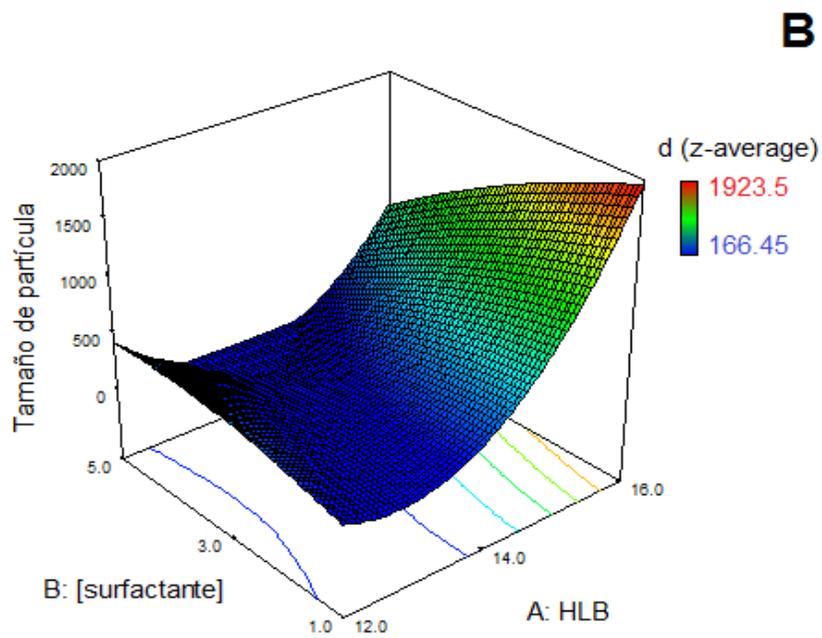
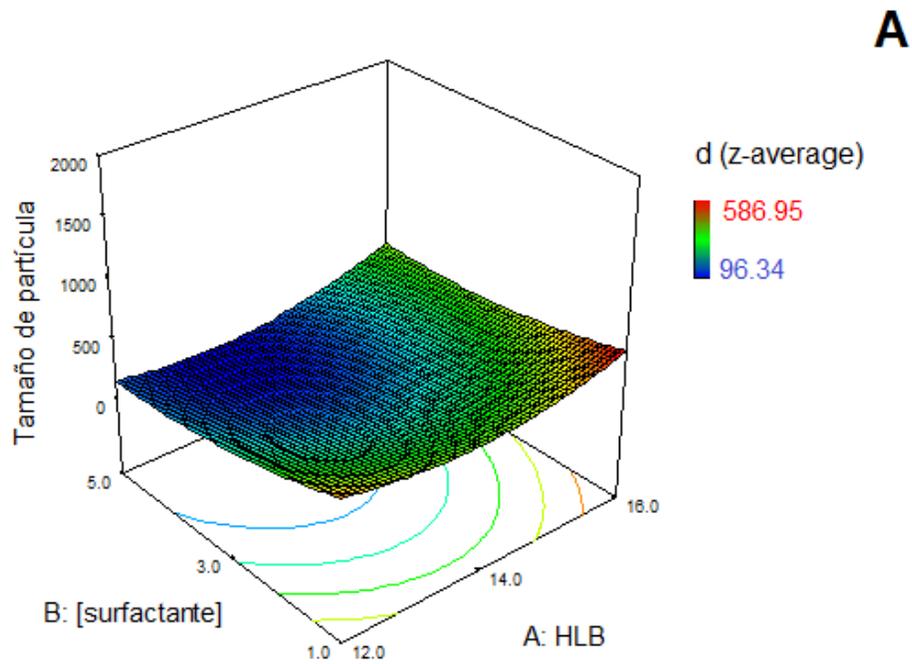


Figura 5. Comportamiento del tamaño de partícula de emulsiones convencionales con HLB 12, 14 y 16 a diferentes concentraciones (1:1, 1:3, 1:5 v/v). (A) Aceite esencial de canela ( $R^2=0.99$ ). (B) Aceite esencial de pimienta negra ( $R^2=0.95$ ).

Un valor de índice de polidispersión (PDI) mayor a 0.5 se refiere a una amplia distribución en el tamaño de partícula de la emulsión (Wu *et al.*, 2011, Salvia *et al.*, 2013); de acuerdo con lo anterior y lo observado en la Figura 6, las mejores condiciones de distribución de tamaño tanto para canela como pimienta, se obtuvieron en las emulsiones con HLB 12 (PDI=0.4). McClements (2009), menciona que los sistemas de emulsiones convencionales obtienen diversos tamaños de gota, por lo cual su índice de polidispersión llega a ser elevado, requiriendo una segunda homogeneización para disminuir la variación en el tamaño.

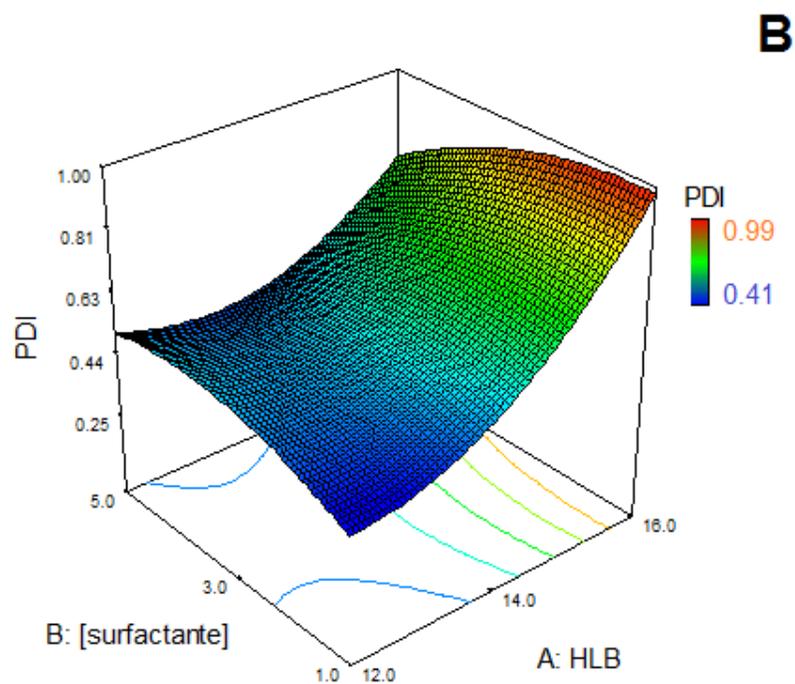
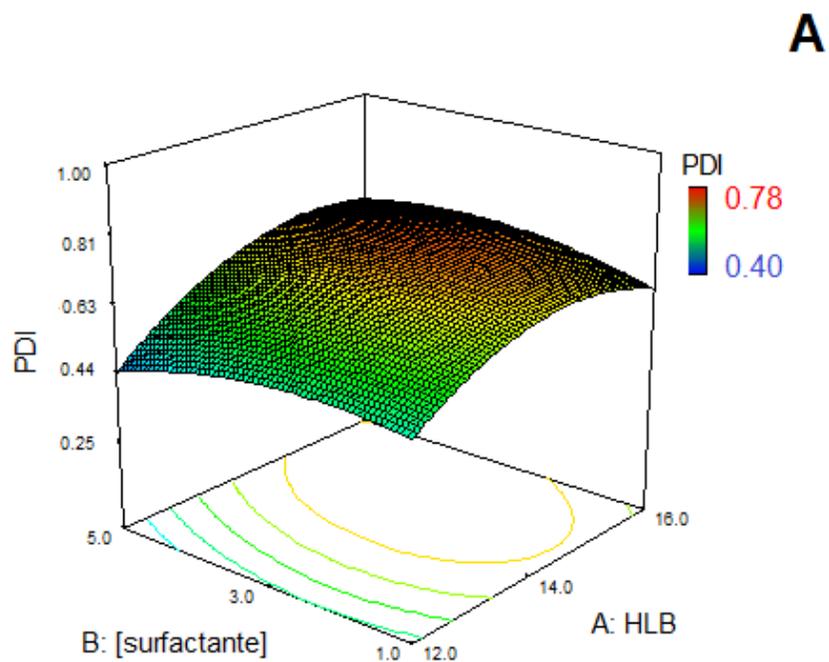


Figura 6. Comportamiento en índice de polidispersión de emulsiones convencionales con HLB 12, 14 y 16 a diferentes concentraciones (1:1, 1:3, 1:5 v/v). (A) aceite esencial de canela ( $R^2=0.62$ ). (B) Aceite esencial de pimienta negra ( $R^2=0.99$ ).

## 8.2 Propiedades de nanoemulsiones producidas por el método de homogeneización de alta presión

El comportamiento en el diámetro medio de partícula ( $D_z$ ) e índice de polidispersión, obtenidos posterior al procesamiento por cinco ciclos en alta presión de acuerdo a la interacción del número de HLB y a la concentración de surfactante se muestra en la Figura 7 y Figura 8, respectivamente. Los menores tamaños de partícula y PDI del aceite esencial de canela como fase dispersa, se registraron en las nanoemulsiones con HLB 14 (Figura 7A), y fue dependiente de la concentración de surfactante, puesto que el menor tamaño ( $D_z < 50$  nm) se obtuvo en una relación aceite:surfactante de 1:5 (v/v). Este comportamiento fue observado por Jo y colaboradores (2014), en sus nanoemulsiones de cinamaldehído (compuesto principal del aceite de canela), encontrando los menores tamaños en una relación 1:3 (v/v) (cinamaldehído: surfactante), indicando que cantidades menores de surfactante formaban partículas con mayor diámetro, sin embargo, cantidades excedentes de surfactante resultaban en la creación de sus micelas. Por su parte, las nanoemulsiones de aceite esencial de pimienta obtuvieron mejores condiciones de procesamiento en HLB 12 (Figura 7B), registrando un tamaño menor a 100 nm y un PDI menor a 0.4; pese a que se obtuvieron tamaños menores de 100 nm en HLB 14 su PDI fue elevado ( $PDI > 0.7$ ), lo que podría influir a su inestabilidad durante el almacenamiento (McClements, 1999). El tamaño final de la gota en las nanoemulsiones es una interacción compleja entre las condiciones de procesamiento y la adsorción del surfactante (Wooster *et. al.*, 2008), y a su vez del efecto de la concentración y tipo de surfactante en el tamaño de partícula, aunado a la composición química del aceite. Asociado al tipo y concentración del surfactante se encuentran las propiedades fisicoquímicas de los aceites, afectando directamente en el tamaño de partícula, reafirmando esto con el estudio realizado por Salvia *et al.*, 2015, con el empleo de diferentes aceites esenciales para la elaboración de nanoemulsiones a través de alta presión, donde concluyen que las diferencias en el tamaño de gota pueden atribuirse a la estructura molecular, la concentración de compuestos volátiles, viscosidad, tensión interfacial o a la afinidad del surfactante de cada aceite.

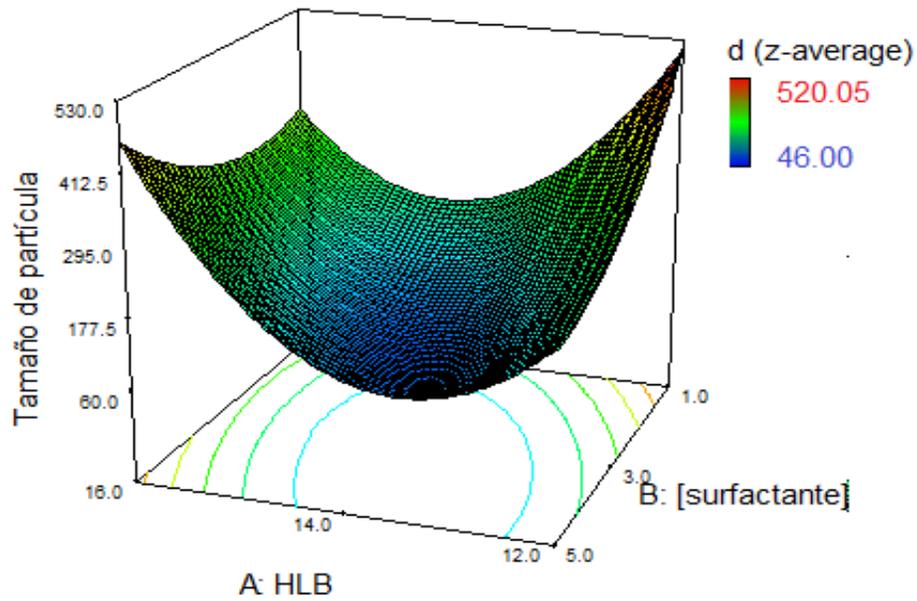
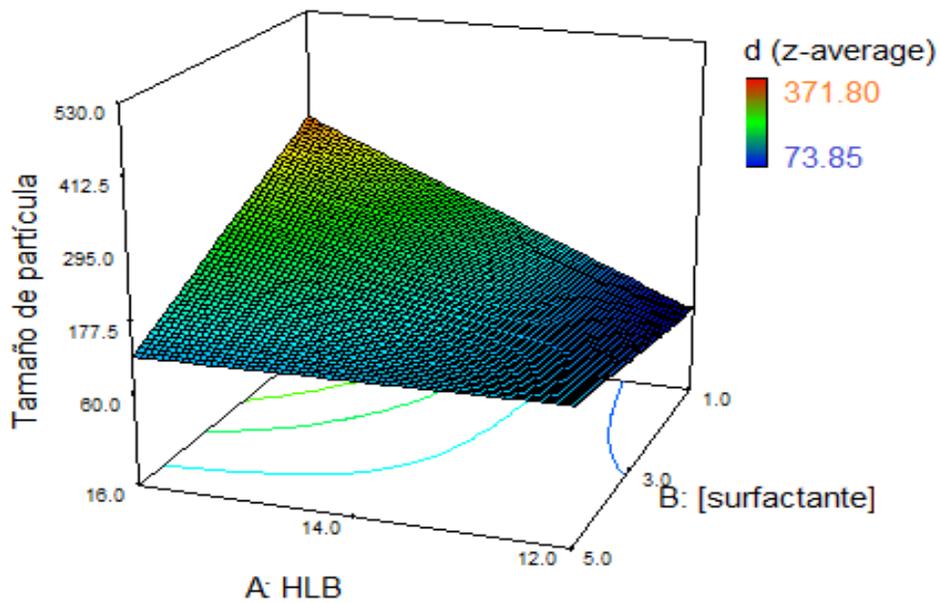
**A****B**

Figura 7. Comportamiento del tamaño de partícula de emulsiones procesadas con homogeneizador de alta presión (5 ciclos, 150 MPa) con HLB 12, 14 y 16 a diferentes concentraciones (1:1, 1:3, 1:5 v/v). (A) Aceite esencial de canela ( $R^2=0.91$ ). (B) Aceite esencial de pimienta negra ( $R^2=0.80$ ).

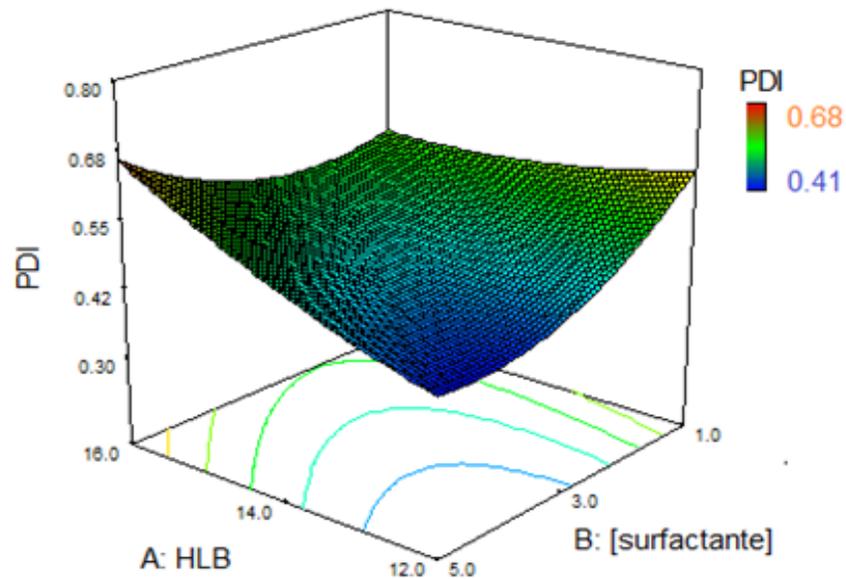
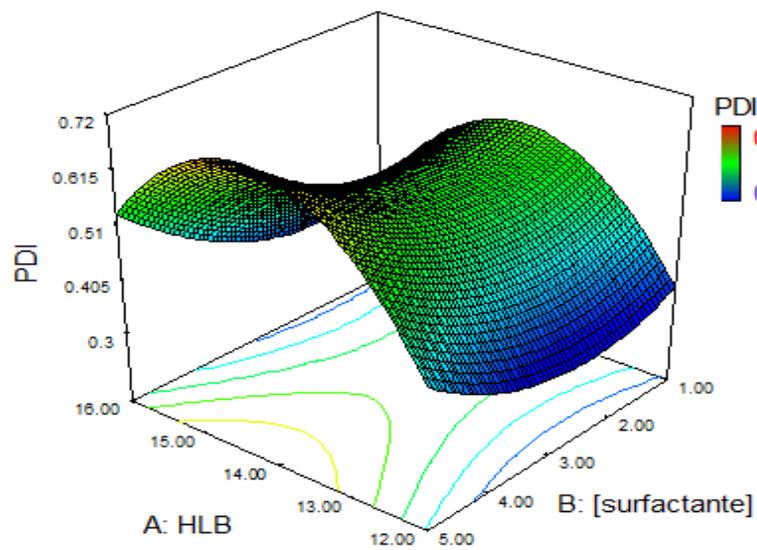
**A****B**

Figura 8. Comportamiento del índice de polidispersión de emulsiones procesadas con homogeneizador de alta presión (5 ciclos, 150 MPa) con HLB 12, 14 y 16 a diferentes concentraciones (1:1, 1:3, 1:5 v/v). (A) Aceite esencial de canela ( $R^2 = 0.85$ ). (B) Aceite esencial de pimienta negra ( $R^2 = 0.96$ ).

Con base en los resultados anteriores, en ambos aceites el surfactante con número de HLB 14 presentó una adsorción en su partícula eficiente para reducir el tamaño de partícula a un  $D_z < 100$  nm, por lo cual se determinó emplear este surfactante para la elaboración de la nanoemulsión de la mezcla de los aceites esenciales canela: pimienta (1:1 v/v) en una relación aceite:surfactante de 1:3 (v/v). La Figura 9 muestra el comportamiento en el de tamaño de partícula y su PDI, conforme a los ciclos operados en el homogeneizador de alta presión. El comportamiento del diámetro promedio tuvo una disminución significativa durante el primer ciclo, continuando con el procesamiento una disminución menor se registra hasta la máxima reducción; para el aceite de canela, a partir del segundo ciclo no se observó una disminución, manteniendo un diámetro promedio menor a 50 nm, con  $PDI < 0.5$ . En el aceite de pimienta, la reducción del tamaño de partícula  $< 100$  nm se observó después del tercer ciclo, en el cuarto ciclo se presentó una mayor homogeneidad en la distribución del tamaño de las gotas con  $PDI < 0.3$  y tamaño de partícula de 86 nm. El comportamiento del tamaño de partícula de la mezcla de los aceites fue semejante al obtenido en aceite de canela, y de acuerdo a la reducción de PDI durante el procesamiento, posiblemente se presentó una mayor homogeneidad en el tamaño de partícula en el cuarto ciclo. El mismo comportamiento que se presentó en las tres emulsiones ha sido reportado por otros estudios como el de Salvia y colaboradores (2013), quienes emplearon alta presión para la elaboración de sus nanoemulsiones y a partir del tercer ciclo a 150 MPa, no se obtuvo una disminución significativa en el  $D_z$ , esto posiblemente a la “saturación del tamaño de gota”, que es el límite correspondiente cuando la fuerza de cizalla no influye en la ruptura de la gota o en un cambio adicional en la distribución del tamaño (Meleson *et al.*, 2004), por lo tanto procesar el sistema por más tiempo resulta ineficiente (McClements, 1999). En diferentes términos, la reducción drástica en un ciclo se debió a que las gotas más próximas a la válvula del homogeneizador, experimentan un esfuerzo de cizalla mayor que las más lejanas, éstas últimas pueden dar lugar a una distribución de tamaño de gota más grande, como es el caso de la emulsión elaborada con aceite de canela durante el primer ciclo, procesando la emulsión por más ciclos se logró mejor homogeneización de las partículas, al reducir aquellas con tamaños mayores que pudieran no experimentar la fuerza de cizalla en ciclos anteriores (Qian y McClements, 2011).

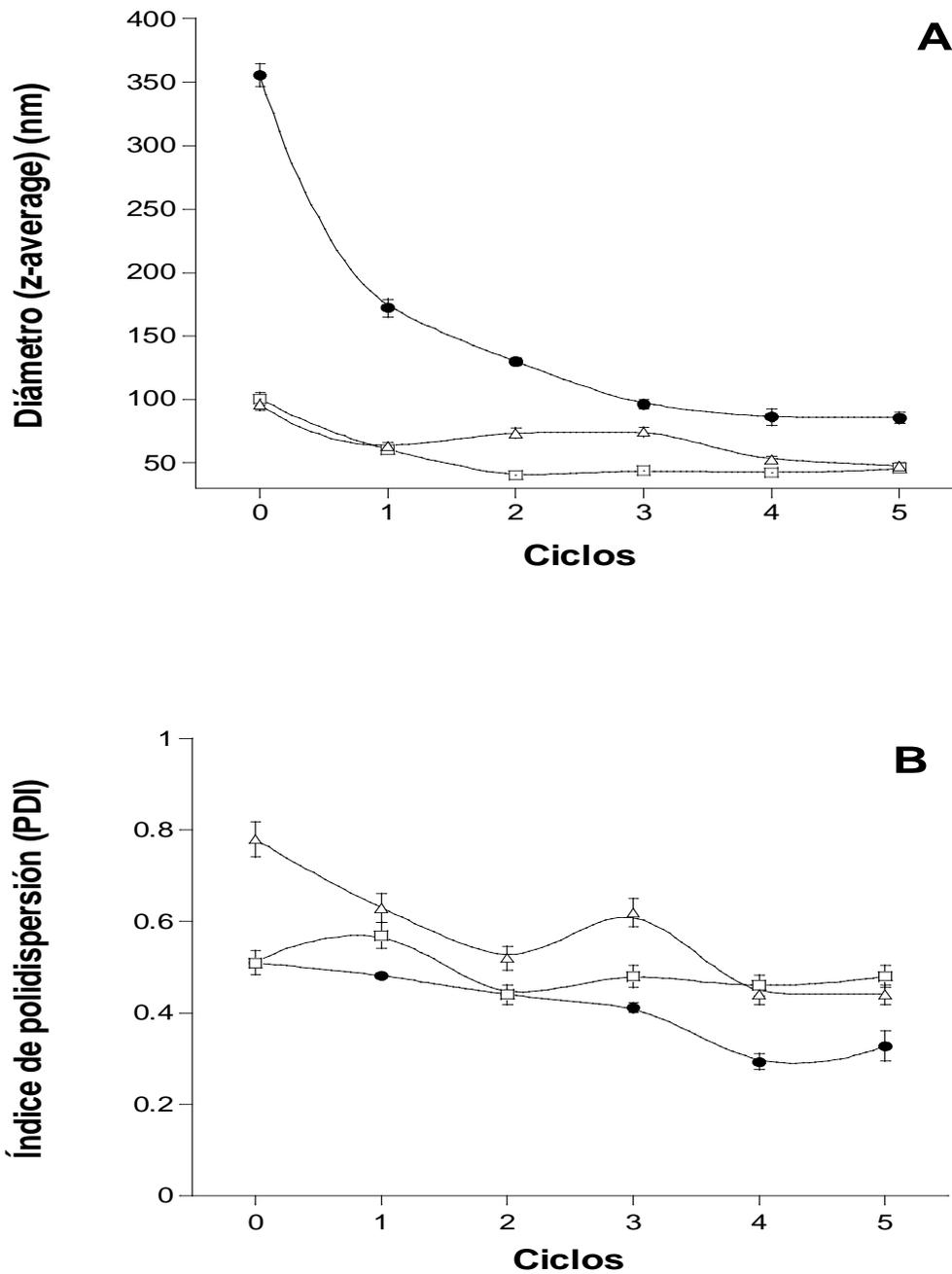


Figura 9. Procesamiento en homogeneizador de alta presión 150 MPa, 5 ciclos. (A) Tamaño del diámetro promedio  $D_z$  en nm registrado en cada ciclo. (B) Índice de polidispersión (PDI) registrado en cada ciclo. (□) Aceite esencial de canela:HLB 14 (1:5) (●) Aceite esencial de pimienta: HLB 12 (1:3). (Δ) Mezcla canela:pimienta:HLB 14 (1:3).

Comparando el PDI de las tres nanoemulsiones, la mejor homogeneidad en el tamaño de partícula se observó en las elaboradas con aceite de pimienta con  $PDI < 0.3$ . Este valor en el índice de polidispersión se relacionó con la distribución unimodal que presentó el tamaño de partícula, que es mostrado en la Figura 10, misma que muestra una distribución multimodal en las nanoemulsiones de canela y canela-pimienta, y por lo cual pudiera deberse el índice de polidispersión mayor a 0.4 en ambos casos. Acevedo *et al.* (2015), reportaron una distribución de tamaño semejante a la de canela y canela-pimienta en nanoemulsiones de aceite esencial de *Thymus vulgaris*, observando una curva de frecuencia en intensidad similar cuya máxima elevación se encuentra sobre 10 nm, señalando la formación de micelas de surfactante no adsorbido por las gotas de aceite esencial dentro de la matriz de fase acuosa; con base en lo obtenido por Rao y McClements (2012), quienes afirman que dichas micelas obtienen tamaños de partícula alrededor de 10 a 20 nm; la curva con mayor área en el porcentaje de intensidad lo relacionan con las micelas producidas por la alta adsorción de surfactante en la reducción de tamaño del aceite; así mismo reportan en sus nanoemulsiones la curva de intensidad de área menor registrada sobre 6000 nm, justificado como el pico correspondiente a las gotas de aceite que no fueron reducidas durante la homogeneización.

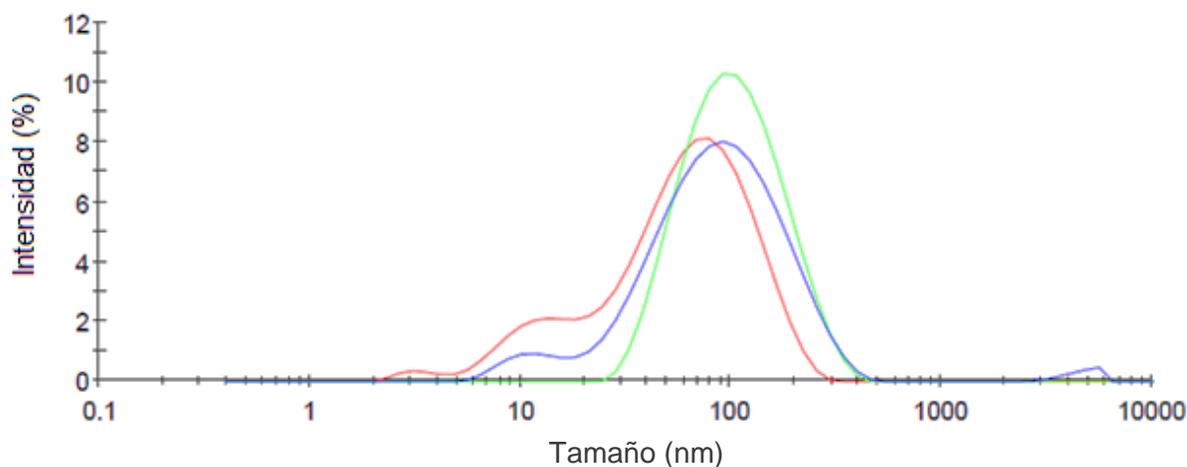


Figura 10. Distribución del tamaño de partícula por intensidad de nanoemulsiones elaboradas por homogeneizador de alta presión (4 ciclos 150 MPa). (---) Nanoemulsión de aceite esencial de canela (HLB 14); (---) Nanoemulsión de aceite esencial de pimienta negra (HLB 12); (---) Nanoemulsión de aceite esencial de la mezcla de los aceites esenciales canela: pimienta negra (1:1 v/v).

### 8.3 Propiedades de las nanoemulsiones producidas por el método de ultrasonido

#### 8.3.1 *Proceso continuo*

El comportamiento registrado en el tamaño de partícula y PDI empleando ultrasonido en 5 min continuos, se muestra en las superficies de respuesta, Figura 11 y Figura 12, respectivamente. Los resultados indicaron que las formulaciones elaboradas con HLB 14 en ambos aceites llegaron a reducir su tamaño de diámetro promedio ( $< 70$  nm). Sin embargo, este proceso continuo resultó en  $PDI > 0.6$ , indicando que hay una gran variabilidad en la distribución del tamaño (Wu *et al.*, 2011), este comportamiento de polidispersidad en el tamaño puede ser explicado como un fenómeno de inestabilidad después de la homogeneización debido a la recoalescencia de las gotas de aceite (Atarés *et al.*, 2010), el aplicar ultrasonido de manera continua podría afectar la velocidad de adsorción del surfactante en las gotas de aceite recién creadas, produciendo micelas no estables que al final del proceso tendieran a la coalescencia, motivo por el cual un tiempo entre la sonicación permitiría crear un mejor revestimiento por parte de los monómeros de los surfactante sobre la gota. Ante esto, las formulaciones de canela:HLB 14 (1:5 v/v) y pimienta:HLB 14 (1:3 v/v) fueron procesadas bajo la técnica de pulsos.

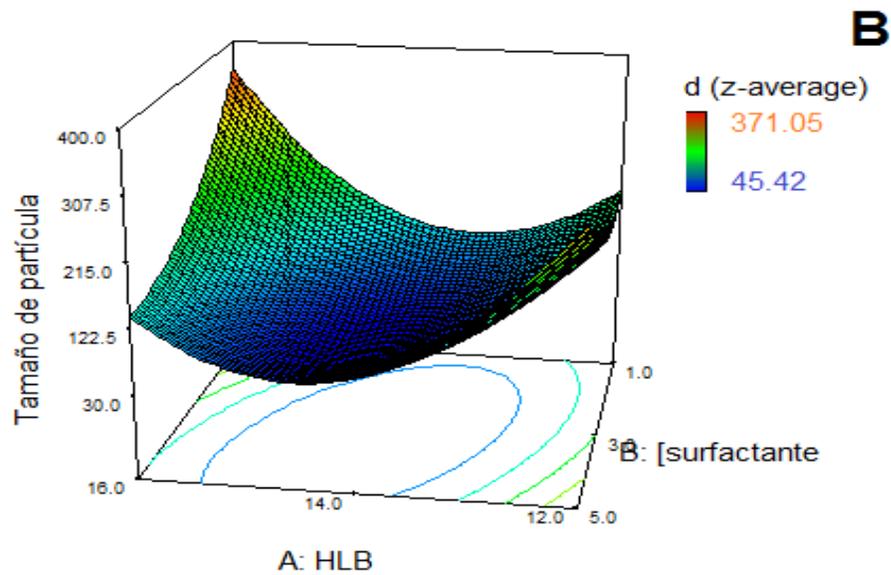
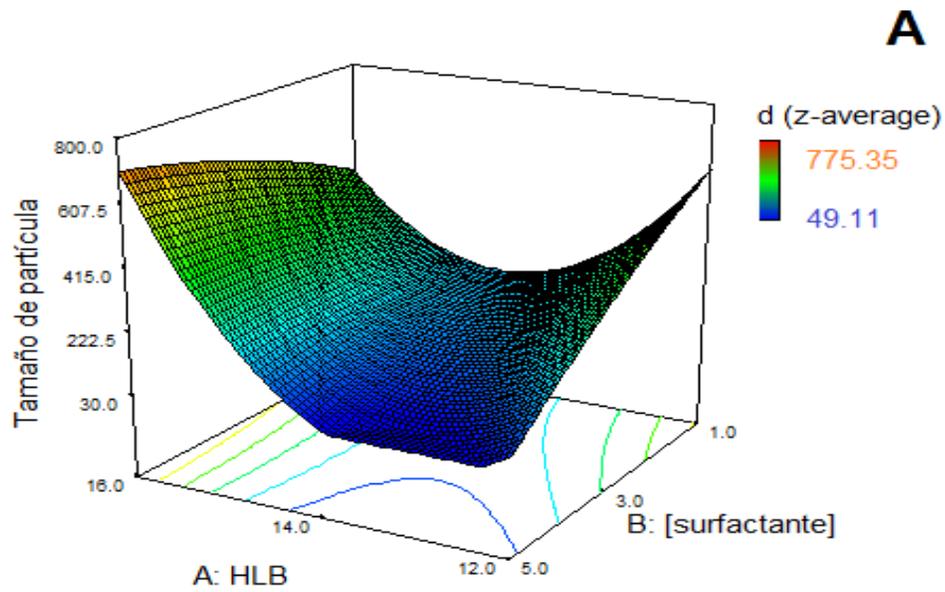


Figura 11. Comportamiento del tamaño de partícula de emulsiones procesadas con ultrasonido (5 min, 30% de amplitud) con HLB 12, 14 y 16 a diferentes concentraciones (1:1, 1:3, 1:5 v/v). (A) Aceite esencial de canela ( $R^2 = 0.88$ ). (B) Aceite esencial de pimienta negra ( $R^2 = 0.98$ ).

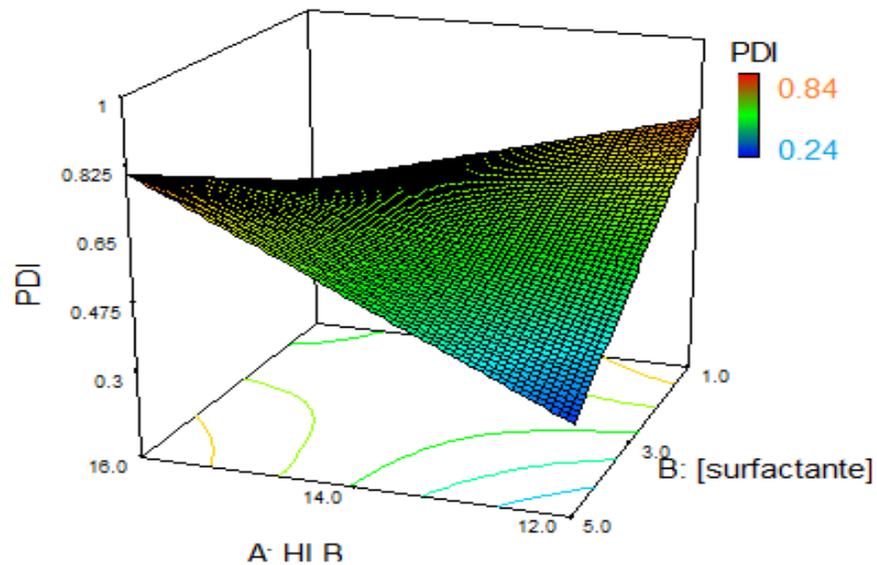
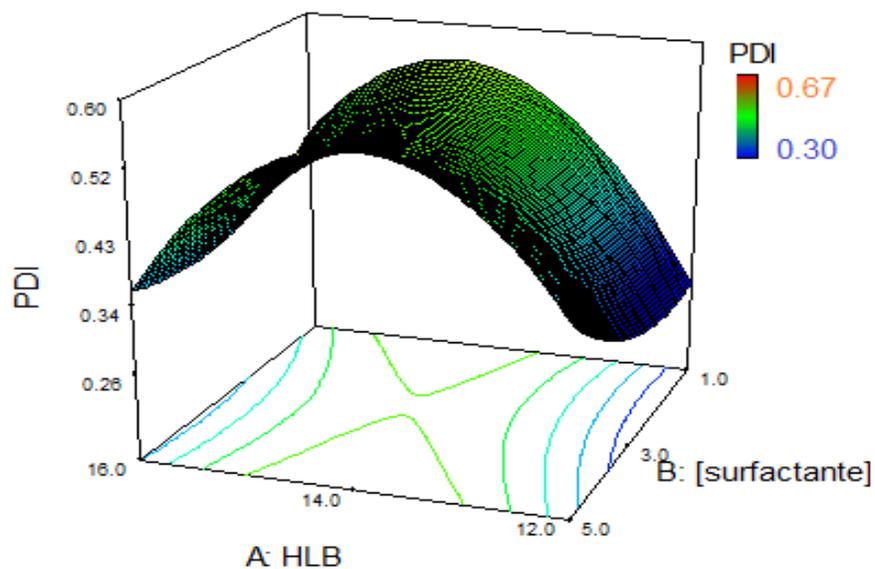
**A****B**

Figura 12. Comportamiento del índice de polidispersión de emulsiones procesadas con ultrasonido (5 min, 30% de amplitud) con HLB 12, 14 y 16 a diferentes concentraciones (1:1, 1:3, 1:5 v/v). (A) Aceite esencial de canela ( $R^2 = 0.88$ ). (B) Aceite esencial de pimienta negra ( $R^2 = 0.98$ ).

### 8.3.2 *Proceso con pulsos*

El comportamiento observado en el tamaño de partícula e índice de polidispersión por la aplicación de ultrasonidos a través de pulsos se encuentra representado en la Figura 13; una disminución drástica en el tamaño de partícula tuvo lugar desde el primer pulso, semejante al comportamiento en homogeneizador de alta presión. Diez minutos de ultrasonido se observaron necesarios para la disminución tanto de tamaño de partícula como de PDI en los sistemas de nanoemulsiones de aceite esencial de pimienta y mezcla de aceite de pimienta y canela; mientras que para las nanoemulsiones de aceite de canela se requirieron 12 min, obteniendo tamaños de partícula  $< 50$  nm y PDI  $< 0.4$ . Como se aprecia en el comportamiento de la nanoemulsión de pimienta, una elevación drástica en el tamaño de partícula tuvo lugar a los doce minutos, este incremento podría atribuirse al “sobre-procesamiento” de la emulsión, el cual conduce a la coalescencia de las gotas (Lin y Chen, 2006, Jafari *et al.*, 2008). Por su parte, es posible que el comportamiento del sistema con base en aceite de canela, se debió a la cantidad mayor de surfactante requerido para la reducción de partícula con respecto a los otros dos sistemas, y a medida de la formación de nanopartículas por el principio de cavitación es necesario mayor tiempo de procesamiento para que el surfactante sea adsorbido eficazmente (McClements, 1999). En 2013, Ghosh y colaboradores recurrieron a una técnica de pulsos de ultrasonido (30 s de ultrasonido con 30 s de descanso) para la elaboración de las nanoemulsiones de aceite esencial de hojas de canela, siendo necesaria la concentración aceite:surfactante de 1:3 (v/v) para la reducción del diámetro promedio de partícula a  $65 \pm 0.12$  nm y PDI de  $0.136 \pm 0.020$ , en 30 min de ultrasonido, sin embargo el tiempo estimado para la producción de sus sistemas de nanoemulsiones es más elevado y por lo tanto conlleva a un mayor requerimiento de energía.

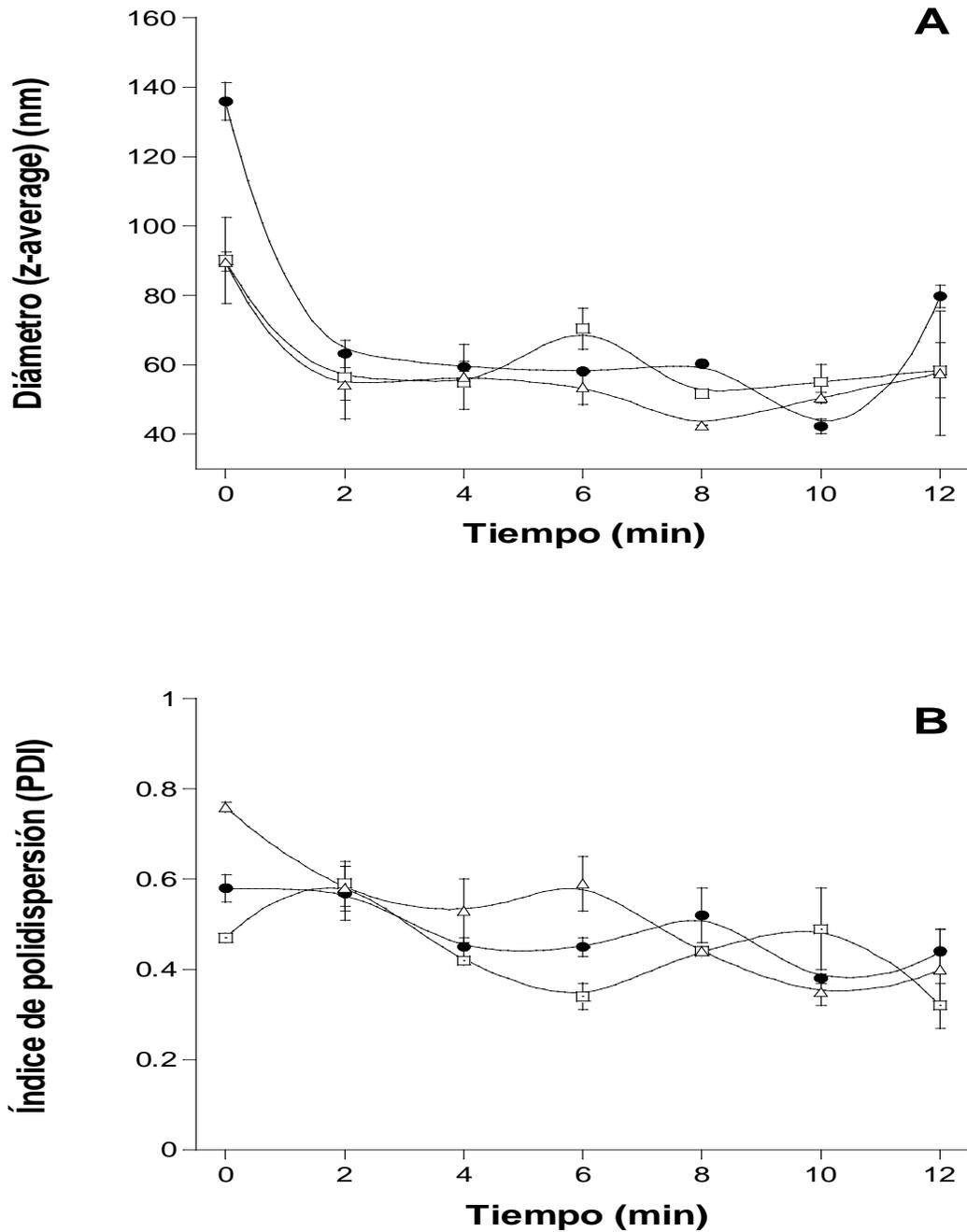


Figura 13. Procesamiento en Ultrasonido por pulsos, 30% amplitud. (A) Tamaño del diámetro promedio ( $D_z$ ) en nm registrado en cada pulso. (B) Índice de polidispersión (PDI) registrado en cada pulso. (□) Aceite esencial de canela:HLB 14 (1:5) (●) Aceite esencial de pimienta: HLB 14 (1:3). (△) Mezcla canela:pimienta:HLB 14 (1:3).

La distribución de tamaño de partícula en los sistemas producidos por ultrasonido en pulsos, fue distinto al comportamiento de los elaborados por homogeneización de alta presión (Figura 14), se observó una distribución bimodal para aceite esencial de pimienta y canela-pimienta, y multimodal para canela; así mismo se presentó una curva con área menor en 6000 nm en los tres sistemas, teniendo mayor área bajo la curva en las nanoemulsiones de pimienta y canela-pimienta, y que de acuerdo con Acevedo y colaboradores (2015), representa las partículas de aceite que no fueron minimizadas por el tratamiento al cual se somete la emulsión primaria, en este caso ultrasonido.

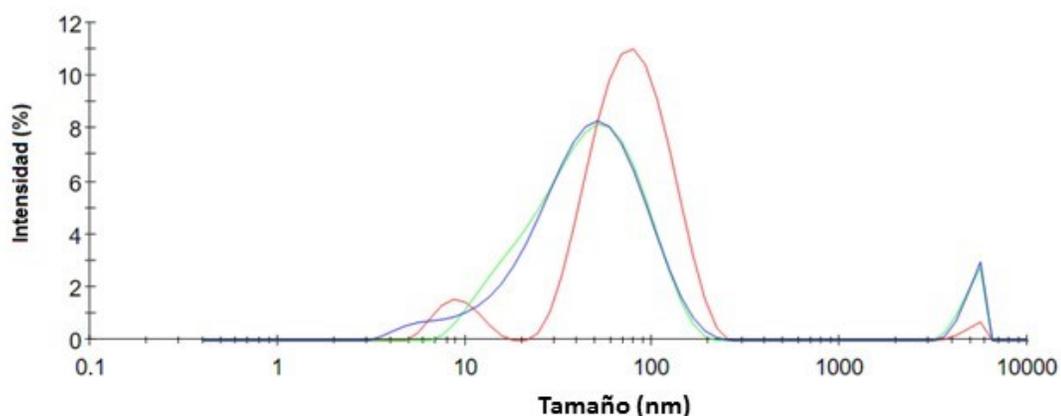


Figura 14. Distribución del tamaño de partícula por intensidad en nanoemulsiones producidas por ultrasonido (30% amplitud). (---) Nanoemulsión de aceite esencial de canela (HLB 14); (---) Nanoemulsión de aceite esencial de pimienta negra (HLB 14); (---) Nanoemulsión de aceite esencial de la mezcla de los aceites esenciales canela: pimienta negra (1:1 v/v) (HLB 14).

#### 8.4 Selección de los parámetros finales de preparación de las nanoemulsiones

Para la definición de parámetros en ambos procesamientos, se consideró el comportamiento del diámetro promedio y del índice de polidispersión durante los ciclos en homogeneizador de alta presión y en los minutos para ultrasonido. En general, las nanoemulsiones producidas por homogeneizador de alta presión no requirieron ser procesadas durante cinco ciclos, en aquellas elaboradas con base en pimienta y

pimienta-canela se estimó que cuatro ciclos son necesarios para obtener  $D_z < 100$  nm; mientras que las emulsiones de canela a partir de 2 ciclos no se observó reducción ni disminución en el PDI. Sin embargo, para una homogeneidad en el proceso se establecieron 4 ciclos a 150 MPa en los tres sistemas de nanoemulsiones. Mientras que en ultrasonido, los parámetros finales fueron 10 min, con amplitud de 30%, para pimienta y canela-pimienta, 12 min para canela procesadas con pulsos.

## 8.5 Caracterización de las emulsiones y nanoemulsiones

### 8.5.1 Potencial $\zeta$ y pH

El potencial  $\zeta$  de las emulsiones convencionales y las nanoemulsiones se muestra en la Tabla 1. Este indicador de la carga de superficie de partícula es utilizado para el control de la estabilidad de una suspensión coloidal o emulsión (Sjoblom, 2005). Entre mayor sea su valor absoluto es más probable que la emulsión sea estable dado que las partículas cargadas se repelen entre sí y por lo tanto no tienden a agregarse. El valor óptimo para la estabilización electrostática del sistema coloidal se encuentra en  $|30|$  mV y  $|60|$  mV; potenciales entre  $|5|$  y  $|15|$  mV tienden a una floculación limitada; y entre  $|5|$  y  $|3|$  mV se encuentra la máxima floculación (Heurtault *et al.*, 2003). De acuerdo con lo anterior, tanto emulsiones como nanoemulsiones se encuentran en el rango de estabilización electrostática, reportando un valor sin diferencia significativa entre la emulsión primaria y la nanoemulsión, a excepción de canela-pimienta elaborada en ultrasonido, quien presentó un valor más negativo y significativamente diferente con respecto a su emulsión primaria y a la elaborada por el otro método mecánico. Comparando entre sistemas de emulsiones, la mezcla canela-pimienta obtuvo el potencial  $\zeta$  mayor (-44.40 mV), que al ser procesada mediante ultrasonido consiguió un valor estadísticamente igual al presentado por las nanoemulsiones de canela y pimienta. El origen de la carga en un sistema coloidal se encuentra relacionado con la composición de la fase continua, factores tales como pH y fuerza iónica guardan estrecha relación con el valor del potencial  $\zeta$  (Wypych, 2004, Sjoblom, 2005, McClements, 2009). Un rango de pH de 5.55 a 6.13 fue registrado entre los diferentes sistemas de emulsiones y nanoemulsiones, como se muestra en la Tabla 1. Los valores de pH mayores

correspondieron al sistema de pimienta de HLB 14 tanto para la emulsión como la nanoemulsión (6.32 y 6.13 respectivamente), así mismo presentaron de los valores de potencial  $\zeta$  más electronegativo (-49.90 y -51.40 mV respectivamente). El pH no varió de la emulsión primaria a las procesadas por ultrasonido y/o alta presión. Según lo reportado por Salvia *et al.* (2013), la fuerza negativa del potencial en las emulsiones y nanoemulsiones se debe a la presencia de alginato de sodio, el cual es un biopolímero aniónico, por lo que su presencia dentro del sistema conlleva a la creación de una matriz de nanopartículas previniendo de los fenómenos de agregación y floculación. El potencial  $\zeta$  reportado por Salvia *et al.* (2013) para su emulsión convencional fue de  $-17.6 \pm 2.9$  mV, valor menos negativo que todas las emulsiones primarias; mientras que el valor más negativo para la nanoemulsión producida por ultrasonido y microfluidización de potencial  $\zeta$  fue  $-55.8 \pm 6.4$  mV y  $-51.9 \pm 5.3$  mV respectivamente y que se asimilan a los obtenidos en este trabajo.

**Tabla 1.** Potencial  $\zeta$  y pH de emulsiones y nanoemulsiones por homogeneizador de alta presión y ultrasonido.

Aceite esencial	Procesamiento	Potencial $\zeta$ (mV)	pH
Pimienta (HLB 14)	Emulsión convencional	$-49.90 \pm 0.85^c$	$6.32 \pm 0.18^d$
	Ultrasonido	$-51.40 \pm 0.99^c$	$6.13 \pm 0.08^d$
Pimienta (HLB 12)	Emulsión convencional	$-48.10 \pm 0.76^{bc}$	$5.69 \pm 0.03^{ab}$
	Alta presión	$-46.80 \pm 0.59^{bc}$	$5.80 \pm 0.05^{bc}$
Canela	Emulsión convencional	$-49.15 \pm 0.21^c$	$5.59 \pm 0.09^a$
	Ultrasonido	$-48.15 \pm 3.89^{bc}$	$5.55 \pm 0.07^a$
	Alta presión	$-48.10 \pm 3.16^{bc}$	$5.67 \pm 0.01^{ab}$
Canela-Pimienta	Emulsión convencional	$-44.40 \pm 1.56^{ab}$	$5.80 \pm 0.11^{bc}$
	Ultrasonido	$-48.70 \pm 0.85^c$	$5.95 \pm 0.13^{cd}$
	Alta presión	$-42.30 \pm 1.27^a$	$5.79 \pm 0.04^{bc}$

\*Las columnas con letra diferente indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### 8.5.2 Índice de blancura

Una de las características deseables en un sistema de nanoemulsión además de su estabilidad es la transparencia, por lo que se deben evaluar los parámetros de color en los sistemas elaborados. Para cumplir con dicho propósito, los resultados de estos parámetros son reportados como el índice de blancura, el cual da información acerca de la transparencia de la emulsión de aceites esenciales que se caracterizan por un cambio en su apariencia de blanca a transparente una vez reducido su tamaño de partícula, valores más cercanos a cero indican una mayor transparencia y valores más cercanos a 100 un sistema blanquecino (Salvia *et al.*, 2013). Los resultados de índice de blancura son reportados en la Tabla 2, el valor presentado para este parámetro por las emulsiones convencionales de canela son similares a los obtenidos por Salvia *et al.* (2013) en emulsiones de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* ( $54.83 \pm 0.18$ ), el índice obtenido en las emulsiones de pimienta:HLB 12 está por arriba de este valor, mientras que para aceite de pimienta:HLB 14 y la mezcla canela-pimienta:HLB 14 su valor está por debajo, esto se debe a la apariencia blanquecina por parte del sistema de pimienta, mientras que los otros obtuvieron una apariencia translúcida, permitiendo la relación con el tamaño de partícula cercano a 100 nm. Al comparar las dos emulsiones primarias de pimienta (HLB 12 y 14) se observa que la transparencia del sistema está relacionado con el valor de HLB y es independiente de la concentración, brindando sistemas más transparentes a HLB mayores, esto pudiera relacionarse a su estructura química, ya que entre mayor es su número obtiene más afinidad por lo hidrofílico (McClements, 1999), brindando así sistemas translúcidos, lo que concuerda con los descrito por Souza *et al.* (2011), en un estudio de nanoemulsiones de aceite esencial de naranja, donde obtuvieron los sistemas más transparente en aquellos donde emplearon un valor de HLB > 12. Por su parte las nanoemulsiones, por los dos métodos mecánicos, reducen su índice de blancura con respecto a la emulsión convencional, esto porque las partículas grandes dispersan la luz con mayor intensidad que las pequeñas provocando falta de claridad en el sistema y por lo tanto al reducirlas disminuye su índice de blancura, así el sistema se torna transparente (Acevedo *et al.*, 2015).

**Tabla 2.** Índice de blancura de emulsiones y nanoemulsiones por homogeneizador de alta presión y ultrasonido.

Aceite esencial: Surfactante	Emulsión convencional	Nanoemulsión homogeneizador alta presión	Nanoemulsión ultrasonido
Aceite pimienta: HLB 12 1:3 (v:v)	64.64 ± 6.21 <sup>b,C</sup>	47.57 ± 0.88 <sup>a,B</sup>	N/A <sup>1</sup>
Aceite pimienta: HLB 14 1:3 (v:v)	38.95 ± 0.75 <sup>b,A</sup>	N/A <sup>1</sup>	19.93 ± 2.91 <sup>a,A</sup>
Aceite canela: HLB 14 1:5 (v:v)	58.35 ± 1.09 <sup>b,B</sup>	45.38 ± 0.35 <sup>a,B</sup>	40.37 ± 4.51 <sup>a,C</sup>
Canela-pimienta: HLB 14 1:3 (v:v)	40.69 ± 1.07 <sup>b,A</sup>	29.89 ± 0.05 <sup>a,A</sup>	29.90 ± 1.71 <sup>a,B</sup>

\*Las filas con letra minúscula diferente indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

\*Las columnas con letra mayúscula diferente indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> No aplica en homogeneizador de alta presión y ultrasonido respectivamente.

### 8.5.3 Actividad antioxidante

La composición química tanto del aceite esencial de canela como de pimienta, contienen compuestos con una actividad además de antimicrobiana, antioxidante (Abdulazeez *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2016). Sin embargo, los procesos mecánicos como el ultrasonido y homogeneizador de alta presión están relacionados con los daños a las propiedades funcionales de algunas sustancias (Fathi *et al.*, 2012). Por lo que la medición de actividad antioxidante es un parámetro que indica la estabilidad química de la emulsión una vez procesada. De acuerdo con los resultados obtenidos bajo la técnica de inhibición del radical DPPH•, que se muestran en la Tabla 3, únicamente la nanoemulsión de pimienta producida por ultrasonido disminuyó el porcentaje de inhibición para ser significativamente más bajo que su emulsión primaria; comparando con respecto a los demás sistemas de emulsiones y nanoemulsiones. Por su parte el aceite esencial de canela al estar constituido mayormente por cinamaldehído y eugenol, compuesto fenólico con mayor actividad antioxidante dentro de los componentes principales de los aceites esenciales (Ghosh *et al.*, 2013; Amerah *et al.*, 2016), posee una actividad antioxidante mayor y esto se reflejó en su alto porcentaje de inhibición del radical DPPH•.

Mientras que la mezcla obtuvo un porcentaje de inhibición intermedio, no obstante en ultrasonido no obtuvo diferencia significativa con la elaborada con canela. El potencial óxido-reducción (Tabla 3) mostró en todos los casos una disminución significativa en su valor al ser procesadas por ambos métodos mecánicos, siendo más drástica en las procesadas por ultrasonido; de tal modo que al comparar los valores obtenidos por procesamiento, los sistemas de aceite esencial de canela obtienen los valores más altos, cuya similitud se reflejó únicamente en ultrasonido para canela-pimienta. Scrivanti *et al.* (2003), describen a los aceites esenciales como agentes oxidantes, lo que explica el valor positivo en el valor de potencial óxido-reductor de las emulsiones y nanoemulsiones; por lo que el mecanismo de acción de los aceites esenciales en las células bacterianas podría atribuirse a la oxidación de los ácidos grasos en sus membranas lipídicas o al estrés oxidativo.

**Tabla 3.** Propiedades antioxidantes de emulsiones y nanoemulsiones

Aceite esencial	Procesamiento	DPPH● (% de captura)	Potencial óxido-reducción (mV)
Pimienta (HLB 12)	Emulsión convencional	20.75 ± 4.89 <sup>ab</sup>	255.67 ± 6.11 <sup>ce</sup>
	Alta presión	20.33 ± 3.51 <sup>ab</sup>	239.67 ± 1.53 <sup>c</sup>
Pimienta (HLB 14)	Emulsión convencional	22.24 ± 1.12 <sup>b</sup>	251.33 ± 5.13 <sup>cd</sup>
	Ultrasonido	13.57 ± 3.40 <sup>a</sup>	146.33 ± 5.51 <sup>a</sup>
Canela	Emulsión convencional	83.88 ± 3.48 <sup>e</sup>	410.00 ± 3.61 <sup>g</sup>
	Alta presión	84.21 ± 3.91 <sup>e</sup>	264.67 ± 23.76 <sup>de</sup>
	Ultrasonido	82.62 ± 1.32 <sup>e</sup>	173.33 ± 15.28 <sup>b</sup>
Canela-Pimienta	Emulsión convencional	69.43 ± 1.86 <sup>c</sup>	306.67 ± 1.53 <sup>f</sup>
	Alta presión	71.16 ± 4.86 <sup>cd</sup>	239.67 ± 15.04 <sup>c</sup>
	Ultrasonido	78.55 ± 9.02 <sup>de</sup>	157.00 ± 17.69 <sup>ab</sup>

\*Las filas con letras minúsculas diferentes indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

## 8.6 Propiedades de las emulsiones durante el almacenamiento en condiciones controladas

### 8.6.1 *Tamaño de partícula*

El tamaño de partícula de las emulsiones convencionales durante el almacenamiento a 4 °C fue descrito por una cinética de primer orden, la cual mostró dos fases: la primera se caracterizó por la disminución en el tamaño de partícula y la segunda por su incremento. Dicho comportamiento puede ser observado en la Figura 15, la primera fase para los aceites de pimienta y canela-pimienta se mantuvo durante 14 días, mientras que la del aceite de canela tuvo duración de 7 días; la fase de crecimiento se mantuvo hasta los 44 días en los tres casos. La velocidad de disminución e incremento de estas fases puede observarse en la Tabla 4, en los tres aceites la disminución fue más rápida que el incremento de partícula, el aceite de canela tuvo las más altas tasas de disminución e incremento. La reducción de tamaño en la primera fase fue también observada por Rao y McClements (2012), en sus emulsiones elaboradas con aceite de limón y Tween 80 como surfactante, disminuyendo su diámetro medio durante los primeros tres días de almacenamiento. Este fenómeno ha sido explicado por Patist y colaboradores (2002), quienes exponen que existe un equilibrio dinámico entre las micelas formadas por la homogeneización y las moléculas individuales del surfactante, las cuales están en constante intercambio entre la fase continua y las micelas, por lo que éstas están desintegrándose y reformándose continuamente; así las micelas más estables causan menos flujo de monómero, conduciendo a una mayor tensión interfacial. En otros términos, las micelas de las emulsiones convencionales tienden al intercambio de monómeros de surfactante y por consecuencia a la formación de nuevas micelas que en tamaño son menores a las iniciales; esta alteración en sus micelas indica inestabilidad en el sistema, y su heterogeneidad en la distribución de tamaño se observa en el alto índice de polidispersión al final del almacenamiento ( $PDI > 0.9$ ).

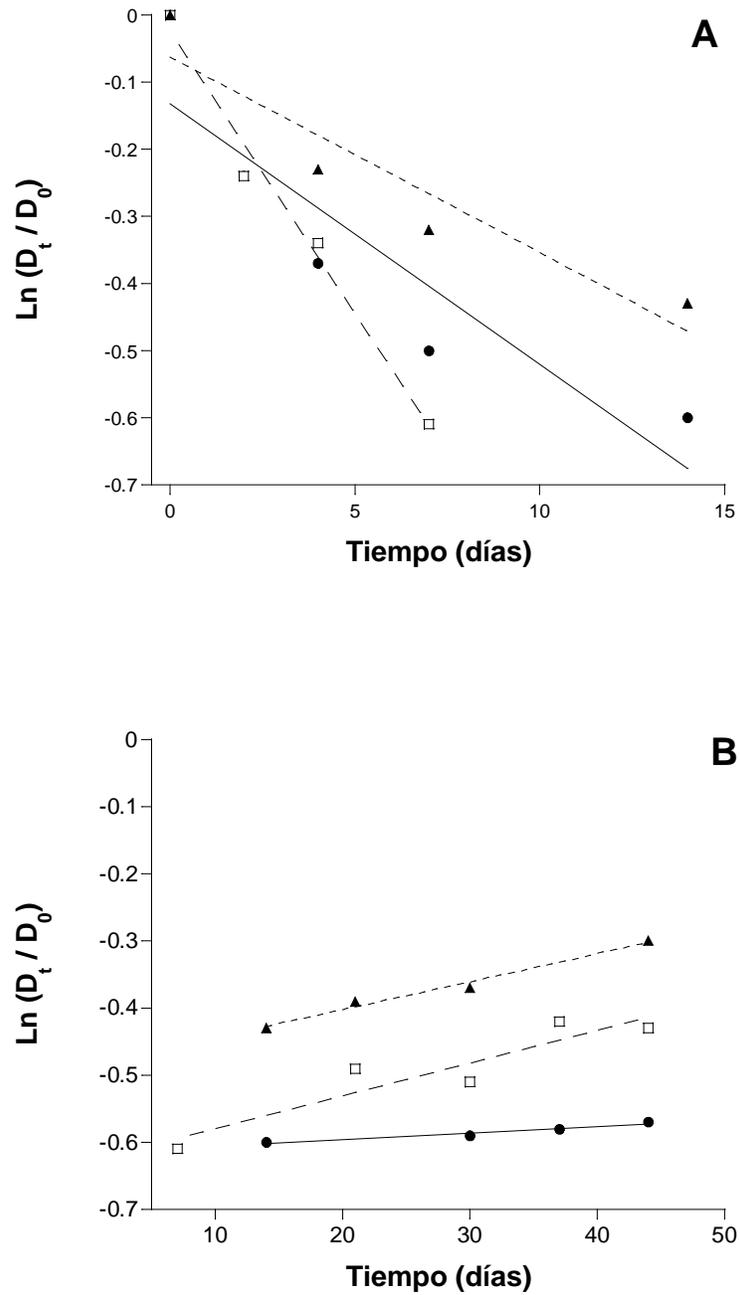


Figura 15. Cinética del tamaño de partícula durante el almacenamiento de emulsiones convencionales (T=4 °C). (A) Cinética de la primera fase. (B) Cinética de la segunda fase. (□) Aceite esencial de canela:HLB 14 (1:5 v/v) (●) Aceite esencial de pimienta:HLB 14 (1:3 v/v). (▲) Mezcla canela:pimienta:HLB 14 (1:3 v/v).

**Tabla 4.** Velocidad de disminución del tamaño de partícula (primera fase) y velocidad de incremento del tamaño de partícula (segunda fase) en emulsiones convencionales

Aceite	Primera fase		Segunda fase	
	$K$ (nm día <sup>-1</sup> )	$R^2$	$K$ (nm día <sup>-1</sup> )	$R^2$
Pimienta	-0.039	0.904	0.001	0.951
Canela	-0.084	0.983	0.005	0.856
Canela-Pimienta	-0.029	0.890	0.004	0.981

#### 8.6.1.1 *Maduración de Ostwald*

Comparadas con las emulsiones convencionales, las nanoemulsiones poseen una buena estabilidad contra cremado, sedimentación, floculación y coalescencia dado su tamaño de partícula. Sin embargo, la maduración de Ostwald es el mecanismo principal en la inestabilidad de las nanoemulsiones (Wooster, 2008), sobre todo aquellas elaboradas con aceites esenciales por su composición química (McClements, 2011; Li y Chiang, 2012). En este mecanismo las gotas más grandes crecen a expensas de las más pequeñas debido a la difusión molecular a través de la fase acuosa, la velocidad de la maduración de Ostwald puede ser obtenida por la teoría de LSW (Lifshitz-Slezov-Wagner) descrita en la Ecuación 9; de acuerdo con esta teoría existe una relación lineal entre el radio al cubo de la gota y el tiempo de almacenamiento. Por tal motivo, se graficó el  $r^3$  correspondiente del Diámetro Volumétrico Medio ( $D_{(3,0)}$ ); únicamente las partículas de las nanoemulsiones de canela describieron un crecimiento lineal, que es mostrado en la Figura 16. La pendiente de la línea indicó una tasa de maduración similar en ambos sistemas de  $3.30 \times 10^{-31} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  en nanoemulsiones por homogeneizador de alta presión y  $3.21 \times 10^{-31} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  por ultrasonido. Estos resultados fueron menores a la obtenida por Li y Chiang en el 2012, en sus nanoemulsiones producidas con *D*-limoneno a través de ultrasonido, quienes reportan la maduración de Ostwald como el principal mecanismo de desestabilización, con una tasa de velocidad de  $1.44 \times 10^{-29} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  a 4 °C; esta diferencia sugiere que el *D*-limoneno presenta mayor solubilidad en la fase continua que el aceite

esencial de canela y menor volumen molar, haciéndolo más susceptible a la maduración de Ostwald (Wooster *et al.*, 2008).

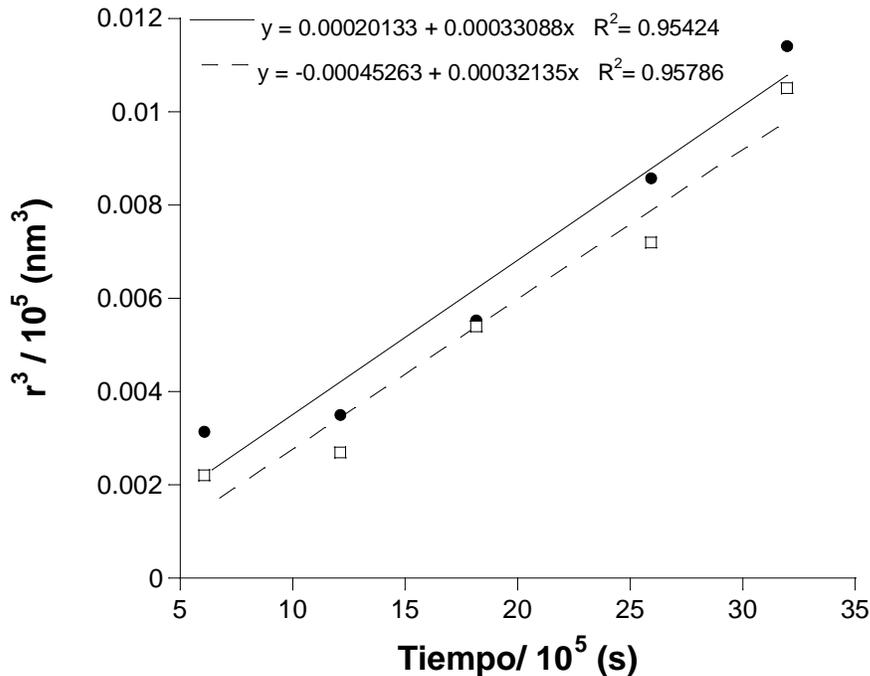


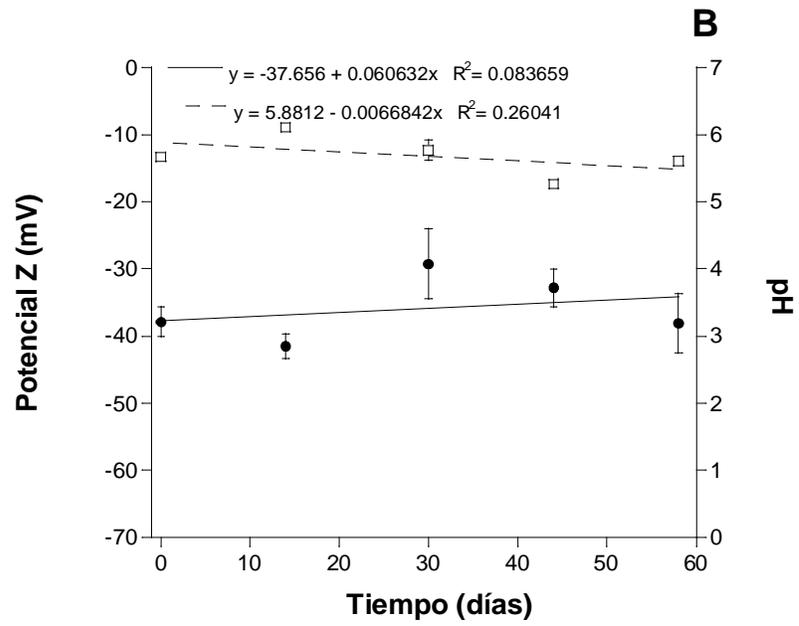
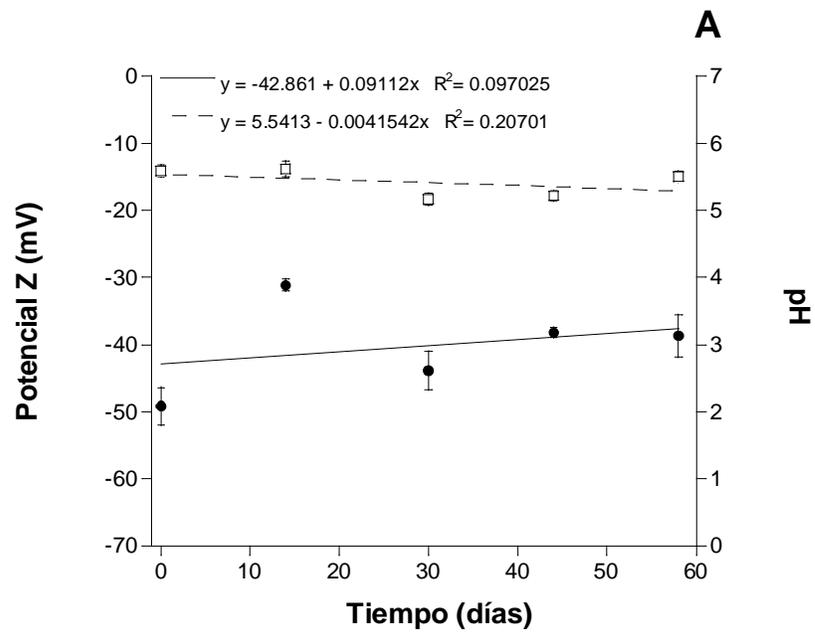
Figura 16. El radio medio de partícula al cubo en función del tiempo de almacenamiento de las nanoemulsiones de aceite esencial de canela. (●) Homogeneización de alta presión. (□) Ultrasonido.

Por otra parte, el sistema de la mezcla de los aceites canela y pimienta obtuvo resistencia a la maduración, debido a que ésta se retarda cuando dos aceites relativamente solubles en agua están presentes, y por consecuencia tiende a ser más estable el sistema (Suriyarak y Weiss, 2014). Esto se basa en la premisa de que la entropía generada por la mezcla proporciona un potencial químico que se opone a la maduración de Ostwald. Wooster y colaboradores (2008) explican que el aceite más soluble (canela) tiene mayor movilidad entre las gotas, con el tiempo las gotas más grandes se enriquecen con el aceite soluble y las gotas más pequeñas con el aceite

insoluble, creando un desequilibrio en la composición que es de mayor entropía que un sistema perfectamente mezclado.

### 8.6.2 Potencial $\zeta$ y pH

Una disminución moderada en el valor absoluto del potencial  $\zeta$  se observó durante el almacenamiento, mostrando un comportamiento similar en todos los sistemas, dicho cambio se manifestó principalmente en las emulsiones con base en canela durante el almacenamiento a 4 °C, tal y como se muestra en las cinéticas de la Figura 17; los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), sugirieron que fue el procesamiento por ultrasonido el más susceptible a la pérdida en cargas ( $R^2 = 0.81$ ). Sin embargo, el valor final de las cargas en almacenamiento se encontró dentro de los límites establecidos por Heurtault *et al.* (2003), para no ser sensibles a los fenómenos de inestabilidad como la coalescencia de las gotas. Con respecto al pH, no se mostraron cambios al final del almacenamiento que representen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (ver Apéndice A). En contraste con Li y Lu (2016), quienes reportaron un potencial  $\zeta$  inicial de -35 mV y pH de 6.4 en nanoemulsiones de limoneno producidas por ultrasonido, y que durante su almacenamiento a 4 °C, observaron un cambio en su carga aproximándose más a cero; siendo que su formulación no contaba con biopolímeros en la fase acuosa, se le atribuyó a la presencia de alginato de sodio, el valor de las cargas que contribuyeron a la estabilidad física.



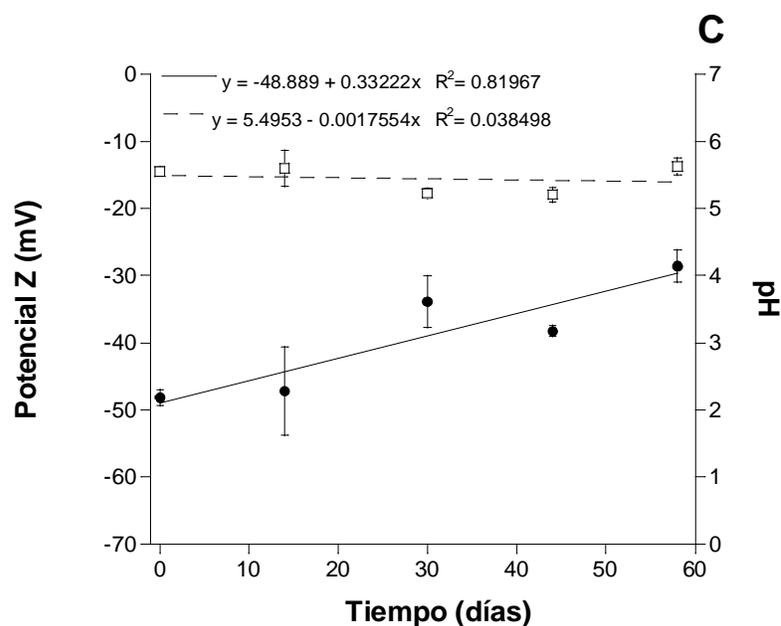
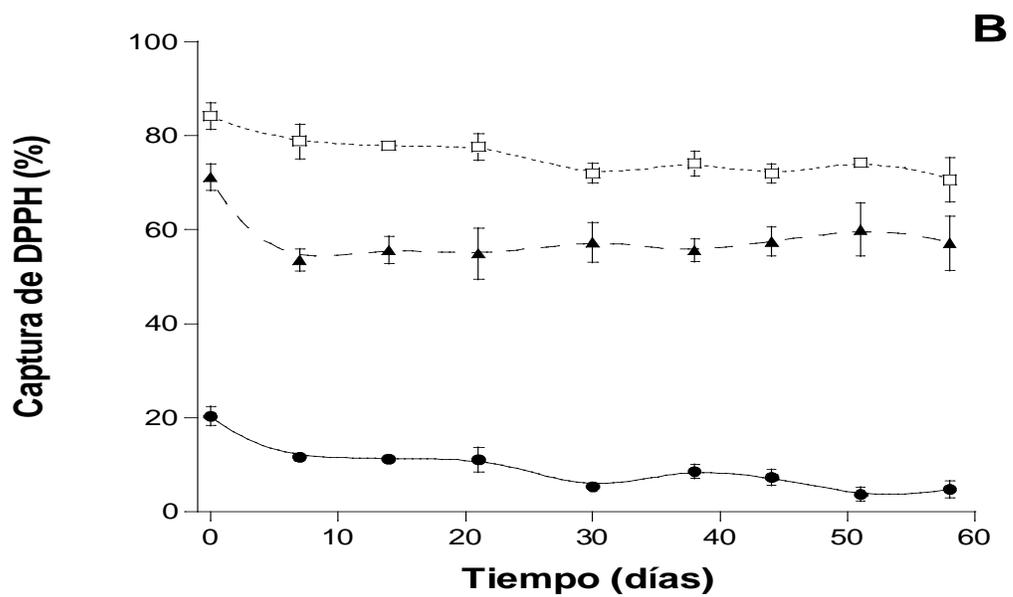
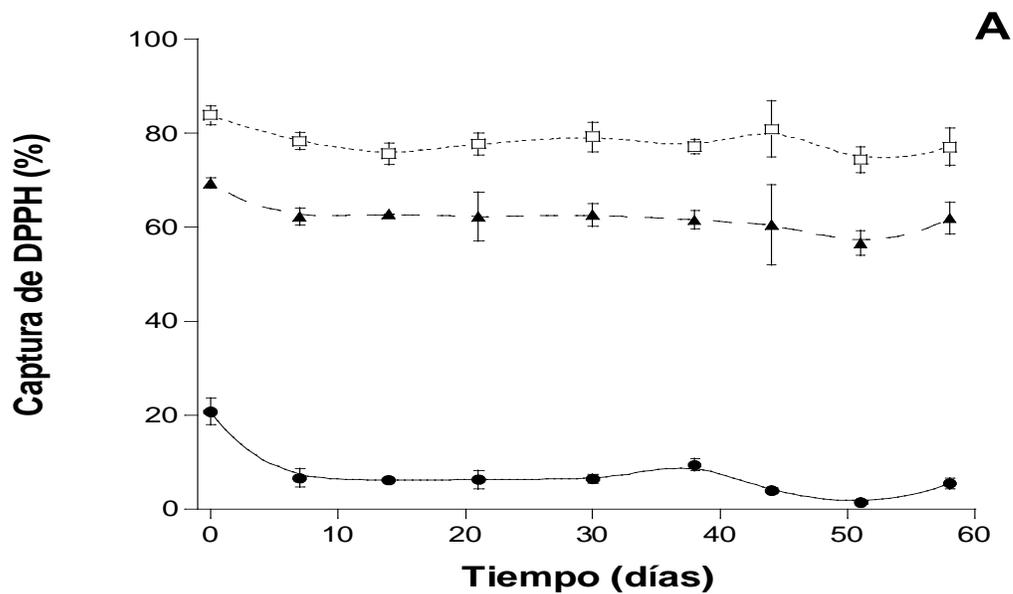


Figura 17. Comportamiento de Potencial  $\zeta$  y pH de los sistemas de aceite de canela durante almacenamiento a 4 °C. (A) Emulsiones convencionales (B) Nanoemulsiones por homogeneización de alta presión (C) Nanoemulsiones por ultrasonido. (●) Potencial  $\zeta$  (mV); (□) pH.

### 8.6.3 Actividad antioxidante

En la Figura 18 se observa el comportamiento que tuvieron las emulsiones y nanoemulsiones en la actividad de captura del radical DPPH• durante su almacenamiento. Una ligera disminución en los primeros siete días en la actividad de captura, se observó en todos los sistemas de emulsiones. Sin embargo, las emulsiones y nanoemulsiones de aceite de canela, mantuvieron su actividad de captura por arriba del 70% al final del almacenamiento; la nanoemulsión de la mezcla de los dos aceites esenciales elaborada por ultrasonido mantuvo durante dos semanas similitud en el porcentaje de inhibición con la nanoemulsión de canela. Mientras que las emulsiones y nanoemulsiones elaboradas a partir de aceite esencial de pimienta exhibieron la disminución más drástica en esta propiedad, llegando a ser casi imperceptible el porcentaje de inhibición. McClements (1999) menciona que para conservar su actividad

biológica los constituyentes de los aceites esenciales, necesitan ser protegidos de las tensiones ambientales experimentadas durante el procesamiento y almacenamiento.



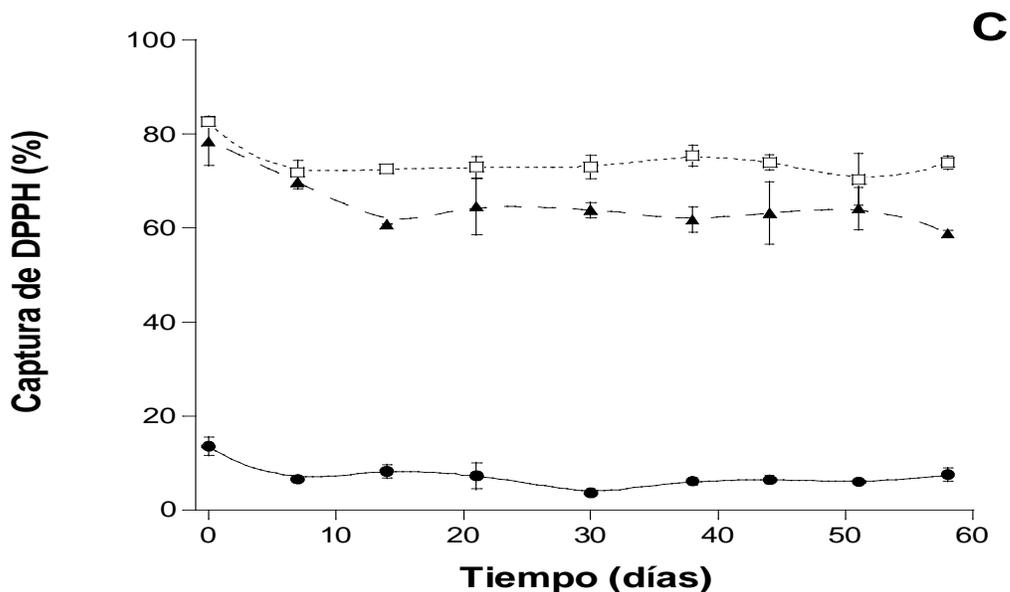


Figura 18. Porcentaje de inhibición del radical DPPH• durante su almacenamiento a 4 °C. (A) Emulsiones primarias (3400 rpm/2 min). (B) Nanomulsiones elaboradas por homogeneización de alta presión (150 MPa, 4 ciclos). (C) Nanoemulsiones elaboradas por ultrasonido (Amplitud 30%). (□) Aceite esencial de canela. (●) Aceite esencial de pimienta negra. (▲) Mezcla de los aceites esenciales canela y pimienta negra (1:1 v/v).

En la Tabla 5, se indica el coeficiente de correlación de la actividad de captura y el tiempo de almacenamiento, en todos los casos hubo una relación inversa que resultó evidente por su disminución en el almacenamiento. Sin embargo, los valores indicaron una mediana relación, la cual presentó un valor absoluto mayor en la nanoemulsión de canela-pimienta.

**Tabla 5.** Coeficiente de correlación de la actividad de captura del radical DPPH• y el tiempo de almacenamiento

Aceite	Procesamiento	R
Pimienta	Emulsión convencional	-0.62
	Ultrasonido	-0.53
	Alta presión	-0.58
Canela	Emulsión convencional	-0.46
	Ultrasonido	-0.43
	Alta presión	-0.52
Canela-Pimienta	Emulsión convencional	-0.31
	Ultrasonido	-0.72
	Alta presión	-0.35

La velocidad de degradación ( $k$ ) del porcentaje de captura del radical DPPH• durante los dos meses de almacenamiento a 4 °C de la emulsión y nanoemulsiones, obtenidas de una cinética de primer orden, se muestra en la Tabla 6; la menor velocidad de degradación se presentó en los aceites de canela y canela-pimienta, los valores obtenidos indican que existe una mínima degradación de actividad de captura del radical, lo que sugirió la conservación adecuada en sus propiedades antioxidantes durante su almacenamiento.

**Tabla 6.** Velocidad de degradación de actividad de captura de DPPH• de emulsión y nanoemulsiones durante el almacenamiento

Aceite	Procesamiento	$k$ (día <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Canela	Emulsión convencional	-0.002	0.833
	Ultrasonido	-0.002	0.833
	Alta presión	-0.002	0.888
Canela-Pimienta	Emulsión convencional	-0.003	0.898
	Ultrasonido	-0.004	0.843
	Alta presión	-0.004	0.923
Pimienta	Emulsión convencional	-0.045	0.891
	Ultrasonido	-0.014	0.824
	Alta presión	-0.026	0.891

#### 8.6.4 Actividad antimicrobiana

##### 8.6.4.1 Difusión en pozo

Los datos obtenidos a través de la técnica de difusión en pozos indican la sensibilidad de las cuatro bacterias seleccionadas (Gram positivas: *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*; Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*) a la acción de los diferentes sistemas de emulsiones y nanoemulsiones, dando un panorama general de la actividad antimicrobiana que posee o no el sistema. Los sistemas elaborados a partir del aceite esencial de pimienta negra no registraron halos de inhibición en el rango de volumen empleado (80-160 µL) en los microorganismos estudiados (ver Apéndice B), sin embargo la mezcla de los aceites mostró actividad antimicrobiana, permitiendo ser comparada con los sistemas elaborados con aceite esencial de canela. De acuerdo a los datos obtenidos por ésta técnica, generalmente los sistemas coloidales elaborados por aceite esencial de canela, independiente a su procesamiento, mostraron mejor actividad antimicrobiana, puesto que sus halos registraron un mayor diámetro en las cuatro cepas, la Tabla 7 muestra el diámetro máximo que obtuvo el halo de inhibición

en cada cepa. Cabe mencionar, el caso particular registrado en la sensibilidad de la cepa de *S. aureus*, ante la nanoemulsión de canela-pimienta (ultrasonido) que fue estadísticamente similar a las elaboradas por canela (convencional y homogeneizador de alta presión). Con respecto a estos resultados, Almadiy *et al.* (2016), indicaron que los aceites esenciales con mayor inhibición bacteriana son aquellos que contengan aldehídos y fenoles, tal como el aceite de canela, y pueden fungir como antimicrobianos ya sea solos o en combinación con otros, por lo que se le atribuyó a la presencia de aceite esencial de canela la actividad antimicrobiana presentada por las emulsiones y nanoemulsiones elaboradas de la mezcla de los aceites.

**Tabla 7.** Halos de inhibición por difusión en pozos (mm)

Aceite esencial	Procesamiento	Gram (+)		Gram (-)	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. entérica</i>	<i>E. coli</i>
Canela	Emulsión convencional	16.00±1.41 <sup>b</sup>	14.00±1.41 <sup>b</sup>	16.50±3.54 <sup>c</sup>	17.50±3.54 <sup>b</sup>
	Alta presión	14.50±0.71 <sup>b</sup>	13.50±0.71 <sup>b</sup>	14.00±0.00 <sup>b</sup>	13.50±0.71 <sup>a</sup>
	Ultrasonido	14.00±1.41 <sup>b</sup>	7.50±2.12 <sup>a</sup>	13.50±0.71 <sup>b</sup>	18.50±0.71 <sup>b</sup>
<b>Canela-Pimienta (1:1 v/v)</b>	Emulsión convencional	NP*	9.50±4.95 <sup>ab</sup>	10.50±0.71 <sup>a</sup>	13.50±2.12 <sup>a</sup>
	Alta presión	10.50±2.12 <sup>a</sup>	8.50±0.71 <sup>a</sup>	10.50±0.71 <sup>a</sup>	12.00±0.00 <sup>a</sup>
	Ultrasonido	10.50±0.71 <sup>a</sup>	12.50±0.71 <sup>b</sup>	11.00±1.41 <sup>ab</sup>	11.50±0.71 <sup>a</sup>

Las columnas con letras diferentes indican que hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).  
NP-No presentó halo de inhibición

#### 8.6.4.2 Concentración mínima inhibitoria

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra microorganismos involucra diferentes modos de acción dependiendo de la mayoría de los componentes bioactivos presentes, que interactúan con la bicapa lipídica de las membranas celulares causando fuga del material celular, inactivación de enzimas metabólicas o daños en el ADN (Burt, 2004; Ceylan y Fung, 2004, Calo *et al.*, 2015; Almadiy *et al.*, 2016). Un grupo aldehído conjugado a un doble enlace carbono-carbono (-C=C-) posee un arreglo altamente electronegativo, que interfiere con el proceso de transferencia de electrones y reaccionan con las proteínas y el ácido nucleico que causa la inhibición del crecimiento microbiano, además es más efectivo comparado con un grupo carbonilo, puesto que puede ser fácilmente enlazado al sitio activo de las enzimas y alterar su metabolismo (Ceylan y Fung, 2004). La constitución de la molécula de cinamaldehído, compuesto principal del aceite esencial de canela (Tisserand y Young, 2013) cumple con la característica antes mencionada, razón por la cual los sistemas de emulsiones y nanoemulsiones que contenían aceite esencial de canela en su fase dispersa (100% y 50%) mostraron ser eficientes en el control de crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Por su parte las emulsiones convencionales y nanoemulsiones elaboradas con aceite esencial de pimienta negra, cuyos principales componentes son terpenos (Tisserand y Young), no exhibieron control suficiente para evitar el crecimiento visual de los cuatro microorganismos seleccionados, resultados que concuerdan con lo estudiado por Sahadeo y Vilas (2011), quienes demostraron que el aceite esencial de dicha especie no inhibía el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Las emulsiones y nanoemulsiones de canela, mostraron inhibir el crecimiento en los dos tipos de microorganismos (Gram positivas y Gram negativas), reportando su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en la Tabla 8, donde se observa que las cepas Gram positivas fueron las más resistentes a la acción antimicrobiana de emulsiones primarias, con CMI de 140 y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de emulsión para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* respectivamente y  $< 100 \mu\text{L}/\text{mL}$  para las cepas Gram negativas, contrario a lo que se ha reportado por la mayoría de los investigadores, quienes afirman que generalmente las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la acción de los aceites esenciales dada su estructura celular (Burt, 2004; Ceylan y Fung, 2004;), sin

embargo, también se ha reportado que tanto Gram positivas como negativas muestran ser inhibidas por la acción de aceites esenciales, y depende más de la composición de éstos (Burt, 2004; Calo *et al.*, 2015). Por otra parte, el efecto de tamaño de partícula se vio reflejado en aquellas cepas (independientes de la constitución de su pared celular) que necesitaron menor concentración de emulsión ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) para la inhibición del microorganismo, siendo el caso de *L. monocytogenes* en las nanoemulsiones de canela para ambos métodos y en ultrasonido para la nanoemulsión de canela-pimienta quien necesitó una concentración por debajo de la mitad con respecto a la emulsión convencional. Un efecto sinérgico de la mezcla de los aceites esenciales pudo observarse en las cepas Gram positivas, donde la concentración mínima inhibitoria de la emulsión con base en aceite esencial de canela fue mayor de la cantidad necesaria para inhibir su crecimiento en los sistemas de la mezcla de los aceites, caso particular fue nuevamente *L. monocytogenes*, donde la concentración mínima inhibitoria fue de  $40 \mu\text{L}/\text{mL}$  para la nanoemulsión por ultrasonido, cantidad menor que las nanoemulsiones de canela. Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en este trabajo, son similares a las nanoemulsiones de *Achillea biebersteinii* (Almadiy *et al.*, 2016) que registraron para *L. monocytogenes* y *S. aureus*:  $90$  y  $60 \mu\text{L}/\text{mL}$  respectivamente, y para *E. coli* y *S. enterica*  $60 \mu\text{L}/\text{mL}$ ; sus resultados sugieren mayor resistencia a la acción de las nanoemulsiones de los aceites esenciales en *L. monocytogenes*, concertando con las emulsiones convencionales de canela y canela-pimienta.

**Tabla 8.** Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) de los sistemas de emulsión y nanoemulsión por ultrasonido y alta presión

Aceite esencial	Proceso de elaboración	Gram (+)		Gram (-)	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. entérica</i>
Canela	Emulsión convencional	140	100	60	60
	Ultrasonido	60	60	70	50
	Alta presión	60	90	70	70
Canela-pimienta	Emulsión convencional	100	90	90	80
	Ultrasonido	40	70	70	70
	Alta presión	100	80	60	60

#### 8.6.4.3 Tiempo de reducción logarítmica

De acuerdo con la ecuación de distribución de Weibull (Apéndice C), se obtuvo el tiempo necesario para reducir un ciclo logarítmico en cada microorganismo en ambos métodos mecánicos y en los sistemas de canela y canela-pimienta. La Tabla 9 muestra el valor de éste parámetro, generalmente por lo menos en un método de reducción de partícula se observó una disminución en los minutos requeridos para la reducción del ciclo logarítmico en la población bacteriana; así mismo la mezcla de los aceites es comparable con los sistemas de canela, encontrando semejanzas estadísticas, y en caso particular en *S. enterica*, donde la nanoemulsión de canela-pimienta (ultrasonido) requirió el menor tiempo para lograr el objetivo. Por su parte, el tiempo obtenido para la inhibición de *E. coli* puede ser comparado con el reportado por Salvia *et al.* (2015) en nanoemulsiones de *Cymbopogon citratus*, modelado con el mismo sistema de distribución, y quienes obtuvieron un tiempo de 23.30 min y 6.97 min para la emulsión convencional y nanoemulsión respectivamente, tiempo similar en canela-pimienta. Resultados que indican la efectividad de la reducción del tamaño de partícula para lograr la penetración de los componentes activos del aceite a través de la membrana bacteriana en un tiempo menor con respecto a la emulsión convencional.

**Tabla 9.** Tiempo requerido para la reducción de un ciclo logarítmico (min)

Aceite esencial	Procesamiento	Gram (+)		Gram (-)	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. entérica</i>	<i>E. coli</i>
Canela	Emulsión convencional	16.91±0.91 <sup>b</sup>	18.95±4.91 <sup>c</sup>	9.49±1.26 <sup>b</sup>	15.08±3.99 <sup>bc</sup>
	Alta presión	0.44±0.37 <sup>a</sup>	3.29±0.07 <sup>a</sup>	8.58±0.89 <sup>b</sup>	4.09±1.79 <sup>a</sup>
	Ultrasonido	5.99±1.84 <sup>a</sup>	10.73±0.21 <sup>abc</sup>	21.80±4.31 <sup>c</sup>	10.94±0.00 <sup>ab</sup>
Canela: Pimienta (1:1 v/v)	Emulsión convencional	6.07±5.74 <sup>a</sup>	13.20±3.08 <sup>b</sup>	6.66±0.52 <sup>ab</sup>	20.67±6.17 <sup>c</sup>
	Alta presión	2.48±1.60 <sup>a</sup>	2.04±1.72 <sup>a</sup>	10.40±1.24 <sup>b</sup>	9.93±2.72 <sup>ab</sup>
	Ultrasonido	1.85±1.57 <sup>a</sup>	6.52±5.74 <sup>ab</sup>	2.84±1.24 <sup>a</sup>	7.07±1.55 <sup>ab</sup>

Las columnas con letras iguales indican que no hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

#### 8.6.5 Análisis de correlación entre las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones y la actividad antimicrobiana

La Tabla 10 muestra los coeficientes de correlación entre la actividad antimicrobiana y las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones y nanoemulsiones, en las cepas Gram positivas y Gram negativas.

El tamaño de partícula mostró ser el factor más relevante en las propiedades antimicrobianas, reflejando una relación entre media y fuerte para los tiempos de reducción logarítmica, mientras que en la concentración mínima inhibitoria se refleja mayor susceptibilidad en las cepas Gram positivas con respecto a Gram negativas.

La sensibilidad de las bacterias por los sistemas de emulsión representada por la técnica de halos de inhibición, estuvo relacionada más con la actividad de captura de DPPH• y pH; donde las propiedades antioxidantes y antimicrobianas en las emulsiones, mostraron coeficiente de correlación positivos, indicando una relación directa, es decir que se presenta mayor sensibilidad ante las emulsiones en cuanto mayor sea la actividad

antioxidante, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*, fueron los microorganismos más afectados por esta correlación. Cada microorganismo presenta diferente tolerancia a los cambios de pH, el análisis mostró que *Salmonella enterica* es quien presenta menor tolerancia a dicho cambio obteniendo un coeficiente de correlación fuerte, lo que indica que a un pH más alcalino menor sensibilidad, puesto que su pH óptimo de crecimiento oscila entre 6.5-7.5 (Batt y Tortorello, 2014).

Para la delimitación de la concentración mínima inhibitoria en bacterias Gram positivas, el factor más relevante de acuerdo al análisis realizado, además del tamaño de partícula ( $r > 0.70$ ), fue el potencial óxido-reducción ( $r > 0.90$ ), lo cual se debe a la presencia de componentes activos óxido-reductores, como el cinamaldehído y eugenol presentes en el aceite de canela, que causan estrés oxidativo en la célula bacteriana (Kim *et al.*, 2011). En el caso de Gram negativas, las propiedades antioxidantes (actividad de captura de DPPH•) mostraron una relación mediana ( $r < -0.60$ ), cuyo coeficiente indicó que las menores concentraciones se encuentran en aquellos sistemas que presentan las mayores actividades antioxidantes, al respecto Adrar *et al.*, (2015) mencionan que la actividad antimicrobiana está relacionada con la constitución química de los aceites esenciales, por lo que esta correlación podría explicarse por la presencia de compuestos antioxidantes en el aceite que son los responsables de la actividad antimicrobiana.

El tiempo de reducción logarítmica, con excepción de *Salmonella*, es afectado directamente por el potencial óxido-reducción, principalmente en bacterias Gram positivas donde obtuvo  $r > 0.90$ . Esta propiedad podría explicarse en el hecho de que con el tiempo los compuestos del aceite comienzan a penetrar en las membranas, oxidando los ácidos grasos que la conforman y ocasionando muerte celular (Scrivanti *et al.*, 2003).

**Tabla 10.** Coeficiente de correlación entre las propiedades Fisicoquímicas de las emulsiones y la actividad antimicrobiana.

Microorganismo	Actividad antimicrobiana	Propiedades Fisicoquímicas de las emulsiones			
		Tamaño de partícula	Actividad de captura DPPH•	Potencial óxido-reducción	pH
<i>Listeria monocytogenes</i>	Halos de inhibición	0.77	0.85	0.02	-0.54
	Concentración mínima inhibitoria	0.76	0.20	0.90	-0.35
	Tiempo de reducción logarítmica	0.74	0.26	0.92	-0.35
<i>Staphylococcus aureus</i>	Halos de inhibición	0.13	0.53	0.29	-0.59
	Concentración mínima inhibitoria	0.78	0.04	0.92	-0.11
	Tiempo de reducción logarítmica	0.89	0.20	0.99	-0.38
<i>Salmonella enterica</i>	Halos de inhibición	0.26	0.85	0.55	-0.86
	Concentración mínima inhibitoria	0.41	-0.66	-0.07	0.27
	Tiempo de reducción logarítmica	-0.10	0.31	0.02	-0.20
<i>Escherichia coli</i>	Halos de inhibición	0.40	0.57	0.61	-0.59
	Concentración mínima inhibitoria	0.43	-0.77	0.18	0.63
	Tiempo de reducción logarítmica	0.89	-0.50	0.68	0.20

## 9. CONCLUSIONES

Los parámetros seleccionados para el desarrollo de emulsiones convencionales y nanoemulsiones de los aceites esenciales empleados y su mezcla, indicaron que el emulsionante que proporcionó las mejores características en tamaño y su distribución, fue la mezcla de surfactantes que proporcionaron un número de HLB 14, requiriéndose mayores cantidades que las del aceite para la formación de partículas menores a 100 nm. Las mejores características fisicoquímicas se observaron en las nanoemulsiones de canela elaboradas por ultrasonido, obteniendo el menor tamaño de partícula, que proporcionó un sistema traslúcido con índice de blancura inferior al de su emulsión convencional, su distribución en el tamaño de partículas fue el índice de polidispersión más bajo con respecto a las demás emulsiones, su potencial  $\zeta$  la hizo resistente a la coalescencia de las gotas y presentó la mejor actividad de captura del radical DPPH•

La evaluación de la estabilidad fisicoquímica de las emulsiones a 4 °C durante 2 meses, reveló la inestabilidad de las micelas en las emulsiones convencionales y maduración de Ostwald en las nanoemulsiones de canela. Las propiedades antioxidantes evaluadas mediante la actividad de captura de DPPH• mostraron mínima velocidad de degradación, con excepción de pimienta, conservándose esta propiedad al final del almacenamiento. Basándose en su tamaño de partícula y actividad antioxidante, las nanoemulsiones de canela-pimienta fueron quienes mostraron la mayor estabilidad fisicoquímica.

Con respecto a las propiedades antimicrobianas, las nanoemulsiones que presentaron los mejores efectos fueron las elaboradas con ultrasonido usando aceite de canela y la mezcla de los aceites. En lo general se requirió una menor concentración de nanoemulsión que de emulsión convencional para inhibir el crecimiento de las cepas seleccionadas, por lo que la reducción del tamaño de partícula, tuvo mayor efecto en la inhibición de microorganismos.

Finalmente, la nanoemulsión de la mezcla de los aceites elaborada mediante ultrasonido fue quien obtuvo las mejores características fisicoquímicas y antimicrobianas, conservando la estabilidad física del aceite de pimienta durante el almacenamiento y las propiedades antimicrobianas de la canela.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

**Abdulazeez, M. A., Sani, I., James, B. D. y Abdullahi, A. S. 2016.** Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Oils. En: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Preedy, V. R. (ed.). Ed. Academic Press. San Diego. pp. 277-285.

**Adrar, N., Oukil, N. and Bedjou, F. 2016.** Antioxidant y antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88:112-119.

**Acevedo-Fani, A., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A. y Martín-Belloso, O. 2015.** Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47:168-177.

**Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B. H., Farooq, S., Ali, M. and Khan, M. A. 2012.** Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2:1945-1953.

**Allerberger, F. 2003.** *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35:183-189.

**Almadiy, A. A., Nenaah, G. E., Al Assiuty, B. A., Moussa, E. A., y Mira, N. M. 2016.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea* species and their nanoemulsions against foodborne bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 69: 529-537.

**Amerah, A. M., y Ouwehand, A. C. 2016.** Use of Essential Oils in Poultry Production. En: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Preedy, V.R. (ed.). Ed. Academic Press. San Diego. pp. 101-110.

**Atarés, L., Bonilla, J., y Chiralt, A. 2010.** Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100: 678–687

**Barbosa-Cánovas, G., Mortimer, A., Lineback, D., Spiess, W., Buckle, K., y Colonna, P. 2009.** *Global Issues in Food Science and Technology*. Ed. Academic Press, San Diego. 520 p.

**Barceloux, D. G. 2009.** Cinnamon (*Cinnamomum* Species). *Disease a Month*, 55:327-335.

**Batt, C. A. y Tortorello, M.L. 2014.** *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Ed. Academic Press, Oxford. 3248 p.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C.1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28:25-30.

**Burt, S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223–253.

**Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A. y Ricke, S. C. 2015.** Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54:111-119.

**Cardoso-Ugarte, G. A., López-Malo, A. y Sosa-Morales, M. E. 2016.** Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Essential Oils. En: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Preedy, V.R (ed.) Ed. Academic Press. San Diego. pp. 339-347.

**Ceylan, E. y Fung, D.Y.C. 2004.** Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 12:1–55.

**Chanamai, R. y McClements, D. J. 2000.** Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172: 79-86.

**Chang, Y., McLandsborough, L. y McClements, D. J. 2012.** Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:12056-12063.

**Chang, Y., McLandsborough, L. y McClements, D. J. 2015.** Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food Chemistry*, 172:298-304

**Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. y Mauriello, G. 2007.** Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:4863–4870.

**Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M. y Ferrari, G. 2011.** Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44:1908–1914.

**Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M. y Ferrari, G. 2012.** Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, 159:342-350.

**Fathi, M., Mozafari, M. R. y Mohebbi, M. 2012.** Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science y Technology*, 23:13-27.

**Fleming-Jones, M. y Smith, R. 2003.** Volatile organic compounds in foods: a five year study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:8120–8127

**Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. 2013.** Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13:114-122.

**Goñi, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R. y Nerin, C. 2009.** Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116:982–989.

**Gopalakrishnan, N. 1994.** Studies on the storage quality of CO<sub>2</sub> extracted cardamom and clove bud oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42: 796–798.

**Hamidpour, R., Hamidpour, M., Hamidpour, S. y Shahlari, M. 2015.** Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematicidal, acaracidal, and repellent activities. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5:66-70.

**Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E. y Benoit, J.P. 2003.** Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24:4283-4300.

**Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. y Bhandari, B. 2008.** Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22:1191-1202.

**Jo, Y.J., Chun, J.Y., Kwon, Y.J., Min, S.G., Hong, G.P. y Choi, M.J. 2015.** Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 60:444-451.

**Kim, J. H., Chan, K. L., Mahoney, N. y Campbell, B. C. 2011.** Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10:1-16.

**Kushwaha, K., Babu, D. y Juneja, V. K. 2014.** Proteus. En: Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Tortorello C. A. B. L. (ed.), Ed. Academic Press. Oxford. pp. 238-243.

**Lee, K. M., Runyon M., Herrman T.J.; Philips, R. y Hsieh, J. 2015.** Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control, 47:264-276.

**León, J. 2000.** Botánica de los cultivos tropicales (Tercera Edición). Ed. Agroamérica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 522 p.

**Li, P.H. y Chiang, B.H. 2012.** Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry, 19:192-197.

**Li, P.H. y Lu, W.C. 2016.** Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. Food Hydrocolloids, 53: 218-224.

**Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F. y Huang, Q. 2012.** Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60:7548-7555.

**Lin, C. Y. y Chen, L. W. 2006.** Emulsification characteristics of three and two phase emulsions prepared by the ultrasonic emulsification method. Fuel Processing Technology, 87:309-317.

**Martin, E., Lina, G. y Dumitrescu, O. 2014.** Staphylococcus aureus. En: Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Tortorello C.A.B.L (ed.), Academic Press, Oxford. pp. 501-507.

**Mastroeni, P. y Maskell, D. 2006.** Salmonella Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects. Ed. Cambridge University Press. 381 p.

**Manzocco L, Anese M, Nicoli MC.1998.** Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. LWT 31:694-698.

**Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone, D. y Serio, A. 2015.** Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. Food Control, 50:794-803.

**McClements, D. J.** Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques. 1999; Ed. CRC Press. Boca Raton, FL. 632 p.

**McClements, D. J. 2009.** Biopolymers in Food Emulsions. En: Modern Biopolymer Science, Ubbink, S.K.T.N.B (ed.), Ed. Academic Press, San Diego. pp 129-166.

**McClements, D. J. 2011.** Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. Soft Matter, 7: 2297-2316

**Meleson, K., Graves, S., y Mason, T. G. 2004.** Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. Soft Materials, 2:109-123.

**Misharina, T.A. y Polshkov, A.N., 2005.** Antioxidant properties of essential oils: autoxidation of essential oils from laurel and fennel and effects of mixing with essential oil from coriander. Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologija, 41: 693–702.

**Norton I.T.; Spyropoulos F. y Cox P. 2011.** Practical Food Rheology: An Interpretive Approach. Ed. Wiley-Blackwell. 280 p.

**Organización Mundial de la Salud. 2015.** Inocuidad de los Alimentos. 20 de Mayo de 2015. Recuperado de: <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs399/es/>.

**Patist, A., Kanicky, J.R., Shukla, P.K. y Shah, D.O. 2002.** Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. *Journal Colloid Interface Science*, 245:1–15.

**Parthasarathy, V. A., Sasikumar, B., Nair, R. R. y George, K. J. 2007.** Black Pepper: Botany and Horticulture. *In: Horticultural Reviews*. Ed. John Wiley and Sons. pp. 173-266.

**Qian, C. y McClements, D. J. 2011.** Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25: 1000-1008.

**Quintanilla-Carvajal, M., Camacho-Díaz, B., Meraz-Torres, L., Chanona-Pérez, J., Alamilla-Beltrán, L. y Jiménez-Aparicio, A. 2010.** Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*, 2:39-50.

**Rao, J. y McClements, D. J. 2012.** Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion and nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26: 268-276.

**Ravindran, P. N. y Kallapurackal, J. A. 2012.** Black pepper. *In: Handbook of Herbs and Spices (Second edition)*, Peter K.V. (ed.), Ed. Woodhead Publishing. pp. 86-115.

**Sahadeo, D.P. y Vilas, A.K. 2011.** Antibacterial activity of some essential oils against food borne pathogen and food spoilage bacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2:143–150.

**Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2013.** Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30:401-407.

**Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2014.** Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37: 292-297.

**Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2015.** Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43:547-556.

**Scrivanti, L. R., Zunino, M. P. y Zygadlo, J. A. 2003.** *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 563-572.

**Sjoblom, J. 2005.** *Emulsions y Emulsion Stability: Surfactant Science Series (Second Edition)*. Ed. CRC Press. 688 p.

**Souza, V. B., Almeida, S. M., Spinelli, L. S. y Mansur, C. R. 2011.** Stability of orange oil/water nanoemulsions prepared by the PIT method. *Journal of Nanoscience Nanotechnology*, 11:2237-2243.

**Sozer, N. y Kokini, J. L. 2012.** The Applications of Nanotechnology. En: *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Picó, Y. (ed.). Ed. Academic Press, Boston. pp. 145-176.

**Suriyarak, S. y Weiss, J. 2014.** Cutoff Ostwald ripening stability of alkane-in-water emulsion loaded with eugenol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 446:71-79.

**Tisserand, R. y Young, R. 2013.** Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals (Second Edition). Ed. Elsevier. 784 p.

**Thomas, J. y Kuruvilla, K. M. 2012.** Cinnamon. En: Handbook of Herbs and Spices (Second edition), Peter, K.V. (ed.). Ed. Woodhead Publishing. pp. 182-196.

**Weiss, J., Takhistov, P. y McClements, D. J. 2006.** Functional Materials in Food Nanotechnology. Journal of Food Science, 71:107-116.

**Wooster, T. J., Golding, M. y Sanguansri, P. 2008.** Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. Langmuir, 24:12758-12765.

**Wu, L., Zhang, J., y Watanabe, W. 2011.** Physical and chemical stability of drug nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews, 63:456-469.

**Wypych, F. 2004.** Chemical modification of clay surfaces. En: Interface Science and Technology. Fernando, W. and Kestur-Gundappa, S. (eds.). Ed. Elsevier. Vol. 1, pp. 1-56.

**Yang, X. y Wang, H. 2014.** Escherichia coli. En: Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Tortorello, C.A.B.L (ed.). Ed. Academic Press, Oxford. pp. 695-701.

**Ziegler, M., Brandauer, H. y Ziegler, E. 1991.** A different aging model for orange oil: deterioration products. Journal Essential Oil Research, 3:209–220.

## APÉNDICE A

### Comportamiento de pH y potencial $\zeta$ durante el almacenamiento

Emulsiones convencionales						
Tiempo (Días)	Canela		Canela-Pimienta		Pimienta	
	pH	Potencial $\zeta$	pH	Potencial $\zeta$	pH	Potencial $\zeta$
0	5.59±0.09 <sup>b</sup>	-49.15±0.21 <sup>a</sup>	5.80±0.11 <sup>d</sup>	-44.40±1.56 <sup>cd</sup>	6.32±0.18 <sup>b</sup>	-49.90±0.85 <sup>ad</sup>
7	5.50±0.10 <sup>ab</sup>	-38.20±1.91 <sup>d</sup>	5.61±0.01 <sup>bcd</sup>	-44.98±3.93 <sup>cd</sup>	5.75±0.01 <sup>a</sup>	-51.93±3.30 <sup>a</sup>
14	5.62±0.12 <sup>b</sup>	-31.12±1.48 <sup>e</sup>	5.56±0.03 <sup>bc</sup>	-43.02±3.86 <sup>d</sup>	5.89±0.06 <sup>a</sup>	-52.12±1.79 <sup>a</sup>
21	5.29±0.28 <sup>ab</sup>	-43.83±4.92 <sup>ac</sup>	5.64±0.15 <sup>bcd</sup>	-51.38±5.06 <sup>ac</sup>	5.77±0.03 <sup>a</sup>	-51.47±2.68 <sup>ac</sup>
30	5.17±0.09 <sup>a</sup>	-43.88±3.66 <sup>ac</sup>	5.46±0.13 <sup>ab</sup>	-52.32±1.90 <sup>ab</sup>	5.86±0.03 <sup>a</sup>	-49.57±2.12 <sup>ad</sup>
37	5.21±0.23 <sup>a</sup>	-46.13±4.63 <sup>ab</sup>	5.28±0.08 <sup>a</sup>	-56.42±8.60 <sup>a</sup>	5.88±0.02 <sup>a</sup>	-52.53±1.20 <sup>a</sup>
44	5.22±0.08 <sup>a</sup>	-38.18±1.34 <sup>de</sup>	5.47±0.06 <sup>b</sup>	-46.37±2.84 <sup>bcd</sup>	6.29±0.02 <sup>b</sup>	-46.97±2.57 <sup>bd</sup>
51	5.57±0.13 <sup>b</sup>	-42.02±5.17 <sup>bcd</sup>	5.69±0.02 <sup>cd</sup>	-44.58±1.64 <sup>cd</sup>	6.39±0.10 <sup>b</sup>	-48.32±2.40 <sup>bcd</sup>
58	5.50±0.08 <sup>ab</sup>	-38.67±5.48 <sup>cd</sup>	5.62±0.04 <sup>bcd</sup>	-40.80±1.34 <sup>d</sup>	6.34±0.07 <sup>b</sup>	-44.98±1.53 <sup>b</sup>

Nanoemulsiones por ultrasonido						
Tiempo (días)	Canela		Canela-Pimienta		Pimienta	
	pH	Potencial $\zeta$	pH	Potencial $\zeta$	pH	Potencial $\zeta$
0	5.55±0.07 <sup>ab</sup>	-48.15±3.89 <sup>b</sup>	5.95±0.13 <sup>b</sup>	-48.70±0.85 <sup>c</sup>	6.13±0.08 <sup>bc</sup>	-51.40±0.99 <sup>d</sup>
7	5.54±0.14 <sup>ab</sup>	-39.55±5.69 <sup>ab</sup>	5.64±0.06 <sup>ab</sup>	-41.97±4.36 <sup>ac</sup>	5.79±0.05 <sup>ab</sup>	-49.93±1.57 <sup>cd</sup>
14	5.60±0.26 <sup>ab</sup>	-47.18±6.57 <sup>b</sup>	5.79±0.23 <sup>b</sup>	-37.32±1.25 <sup>ab</sup>	5.82±0.11 <sup>ab</sup>	-47.82±3.58 <sup>bcd</sup>
21	5.18±0.06 <sup>ab</sup>	-38.73±1.05 <sup>ab</sup>	5.45±0.13 <sup>a</sup>	-45.52±2.81 <sup>bc</sup>	5.89±0.13 <sup>ab</sup>	-52.75±5.24 <sup>d</sup>
30	5.23±0.08 <sup>ab</sup>	-33.85±3.82 <sup>a</sup>	5.28±0.04 <sup>a</sup>	-42.93±3.33 <sup>ac</sup>	5.55±0.16 <sup>a</sup>	-41.80±2.49 <sup>ac</sup>
37	5.14±0.06 <sup>a</sup>	-42.10±2.70 <sup>b</sup>	5.52±0.10 <sup>ab</sup>	-44.60±6.76 <sup>bc</sup>	5.76±0.10 <sup>ab</sup>	-40.27±2.49 <sup>ab</sup>
44	5.21±0.11 <sup>ab</sup>	-38.23±0.81 <sup>ab</sup>	5.73±0.11 <sup>b</sup>	-45.88±5.26 <sup>bc</sup>	5.90±0.02 <sup>ab</sup>	-48.40±2.10 <sup>bcd</sup>
51	5.48±0.04 <sup>ab</sup>	-33.97±6.25 <sup>a</sup>	5.67±0.02 <sup>ab</sup>	-33.48±0.43 <sup>a</sup>	5.86±0.05 <sup>ab</sup>	-35.98±2.36 <sup>a</sup>
58	5.63±0.13 <sup>b</sup>	-28.53±2.40 <sup>a</sup>	5.92±0.01 <sup>b</sup>	-40.43±4.14 <sup>ac</sup>	6.26±0.10 <sup>c</sup>	-44.23±3.52 <sup>abd</sup>

### Nanoemulsiones por homogeneizador de alta presión

Tiempo (días)	Canela		Canela-Pimienta		Pimienta	
	pH	Potencial $\zeta$	pH	Potencial $\zeta$	pH	Potencial $\zeta$
0	5.67±0.01 <sup>bc</sup>	-48.10±3.16 <sup>c</sup>	5.79±0.04 <sup>ab</sup>	-42.30±1.27 <sup>b</sup>	5.80±0.05 <sup>bcd</sup>	-46.80±0.59 <sup>c</sup>
7	6.11±0.03 <sup>d</sup>	-38.10±5.27 <sup>ac</sup>	6.26±0.05 <sup>b</sup>	-37.57±2.56 <sup>ab</sup>	5.35±0.02 <sup>a</sup>	-41.77±3.92 <sup>ac</sup>
14	6.11±0.05 <sup>d</sup>	-41.48±1.85 <sup>bc</sup>	6.22±0.08 <sup>b</sup>	-38.92±5.24 <sup>ab</sup>	5.44±0.08 <sup>a</sup>	-42.93±1.45 <sup>ac</sup>
21	5.88±0.04 <sup>cd</sup>	-36.47±5.51 <sup>ac</sup>	6.05±0.08 <sup>b</sup>	-36.07±1.07 <sup>ab</sup>	5.42±0.01 <sup>a</sup>	-45.43±2.31 <sup>bc</sup>
30	5.77±0.15 <sup>bc</sup>	-29.22±5.22 <sup>a</sup>	5.84±0.08 <sup>ab</sup>	-31.70±1.15 <sup>ab</sup>	5.67±0.12 <sup>b</sup>	-42.58±1.14 <sup>ac</sup>
37	5.32±0.06 <sup>a</sup>	-31.58±0.93 <sup>ab</sup>	5.48±0.04 <sup>a</sup>	-28.58±0.75 <sup>a</sup>	5.75±0.09 <sup>bc</sup>	-41.07±1.23 <sup>ab</sup>
44	5.27±0.01 <sup>a</sup>	-32.82±2.81 <sup>ab</sup>	5.56±0.20 <sup>a</sup>	-35.48±6.57 <sup>ab</sup>	5.73±0.04 <sup>bc</sup>	-45.38±0.69 <sup>bc</sup>
51	5.22±0.03 <sup>a</sup>	-37.73±4.83 <sup>ab</sup>	5.67±0.33 <sup>a</sup>	-36.67±5.12 <sup>ab</sup>	5.95±0.06 <sup>cd</sup>	-39.67±1.94 <sup>ac</sup>
58	5.61±0.03 <sup>b</sup>	-38.08±4.38 <sup>ac</sup>	5.92±0.01 <sup>ab</sup>	-34.93±4.09 <sup>ab</sup>	6.05±0.01 <sup>d</sup>	-38.92±1.65 <sup>a</sup>

Columnas con letras iguales indican que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ).

## APÉNDICE B

### Halo de inhibición de los sistemas de emulsiones y nanoemulsiones (mm)

#### *Listeria monocytogenes*

Aceite	Método	Volumen de emulsión (μl)				
		80	100	120	140	160
Canela	Emulsión	8.00±0.00 <sup>a,A</sup>	13.00±1.41 <sup>b,B</sup>	15.00±1.41 <sup>bc,B</sup>	16.00±1.41 <sup>c,B</sup>	16.00±1.41 <sup>c,B</sup>
	Alta presión	9.00±0.00 <sup>a,A</sup>	11.50±0.71 <sup>b,B</sup>	14.50±0.71 <sup>c,B</sup>	14.50±0.71 <sup>c,B</sup>	14.50±0.71 <sup>c,B</sup>
	Ultrasonido	7.00±0.00 <sup>a,A</sup>	11.00±5.66 <sup>b,B</sup>	13.50±2.12 <sup>c,B</sup>	14.00±1.41 <sup>c,B</sup>	14.00±1.41 <sup>c,B</sup>
Canela-pimienta	Emulsión	NP	NP	NP	NP	NP
	Alta presión	NP	7.00±0.00 <sup>a,A</sup>	8.00±1.41 <sup>a,A</sup>	9.00±1.41 <sup>ab,A</sup>	10.50±2.12 <sup>b,A</sup>
	Ultrasonido	NP	NP	NP	NP	10.50±0.71 <sup>a,A</sup>
Pimienta	Emulsión	NP	NP	NP	NP	NP
	Alta presión	NP	NP	NP	NP	NP
	Ultrasonido	NP	NP	NP	NP	NP

Filas con letra minúscula igual y columnas con letra mayúscula igual indica que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). (NP- no presentó halo de inhibición)

#### *Staphylococcus aureus*

Aceite	Método	Volumen de emulsión (μl)				
		80	100	120	140	160
Canela	Emulsión	9.50±2.12 <sup>a,AB</sup>	10.50±2.12 <sup>ab,AB</sup>	11.50±0.71 <sup>ab,B</sup>	14.00±1.41 <sup>bc,B</sup>	16.50±2.12 <sup>c,D</sup>
	Alta presión	11.00±1.41 <sup>a,B</sup>	11.00±1.41 <sup>a,AB</sup>	12.50±0.71 <sup>a,B</sup>	13.50±0.71 <sup>a,B</sup>	13.50±0.71 <sup>a,CD</sup>
	Ultrasonido	6.50±0.71 <sup>a,A</sup>	7.50±2.12 <sup>a,A</sup>	7.50±2.12 <sup>a,A</sup>	7.50±2.12 <sup>a,A</sup>	8.00±2.83 <sup>a,B</sup>
Canela-pimienta	Emulsión	NP	9.50±4.95 <sup>a,AB</sup>	9.50±4.95 <sup>a,AB</sup>	9.50±4.95 <sup>a,AB</sup>	9.50±4.95 <sup>a,AB</sup>
	Alta presión	6.50±0.71 <sup>a,A</sup>	8.50±0.71 <sup>a,A</sup>	8.50±0.71 <sup>a,A</sup>	8.50±0.71 <sup>a,A</sup>	9.50±0.71 <sup>a,AB</sup>
	Ultrasonido	NP	12.50±0.71 <sup>a,B</sup>	12.50±0.71 <sup>a,B</sup>	12.50±0.71 <sup>a,B</sup>	12.50±0.71 <sup>a,B</sup>
Pimienta	Emulsión	NP	NP	NP	NP	NP
	Alta presión	NP	NP	NP	NP	NP
	Ultrasonido	NP	NP	NP	NP	NP

Filas con letra minúscula igual y columnas con letra mayúscula igual indica que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). (NP- no presentó halo de inhibición)

*Escherichia coli*

Aceite	Método	Volumen de emulsión (µl)				
		80	100	120	140	160
Canela	Emulsión	NP	15.50±6.36 <sup>a,C</sup>	17.50±3.54 <sup>a,C</sup>	17.50±3.54 <sup>a,B</sup>	17.50±3.54 <sup>a,BC</sup>
	Alta presión	9.00±0.00 <sup>a,A</sup>	13.00±0.00 <sup>b,BC</sup>	13.50±0.71 <sup>b,B</sup>	13.50±0.71 <sup>b,A</sup>	14.50±0.71 <sup>b,AB</sup>
	Ultrasonido	NP	14.50±0.71 <sup>a,C</sup>	14.50±0.71 <sup>a,BC</sup>	18.50±0.71 <sup>b,B</sup>	19.00±1.41 <sup>b,C</sup>
Canela-pimienta	Emulsión	NP	10.50±3.54 <sup>a,AB</sup>	13.50±2.12 <sup>a,B</sup>	13.50±2.12 <sup>a,A</sup>	13.50±2.12 <sup>a,A</sup>
	Alta presión	NP	NP	NP	12.00±0.00 <sup>a,A</sup>	14.00±0.00 <sup>a,A</sup>
	Ultrasonido	7.50±0.71 <sup>a,A</sup>	8.00±1.41 <sup>a,A</sup>	9.00±1.41 <sup>ab,A</sup>	11.50±0.71 <sup>bc,A</sup>	12.50±0.71 <sup>c,A</sup>
Pimienta	Emulsión	NP	NP	NP	NP	NP
	Alta presión	NP	NP	NP	NP	NP
	Ultrasonido	NP	NP	NP	NP	NP

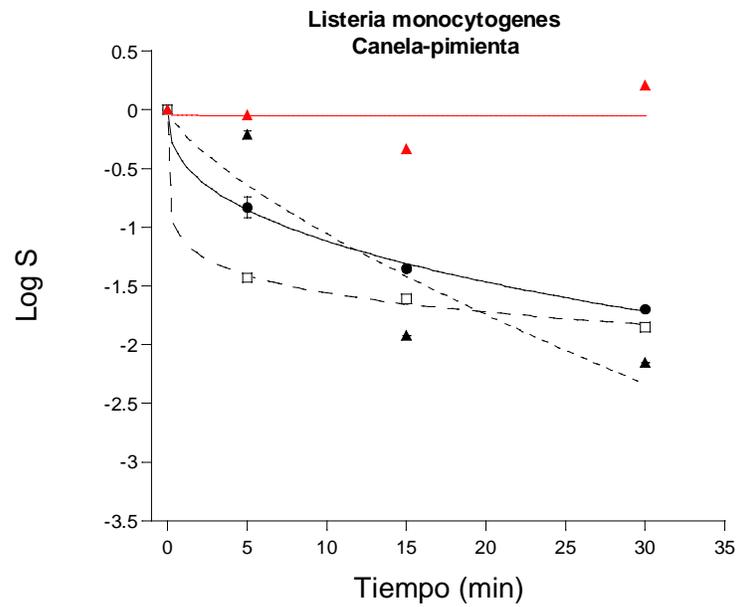
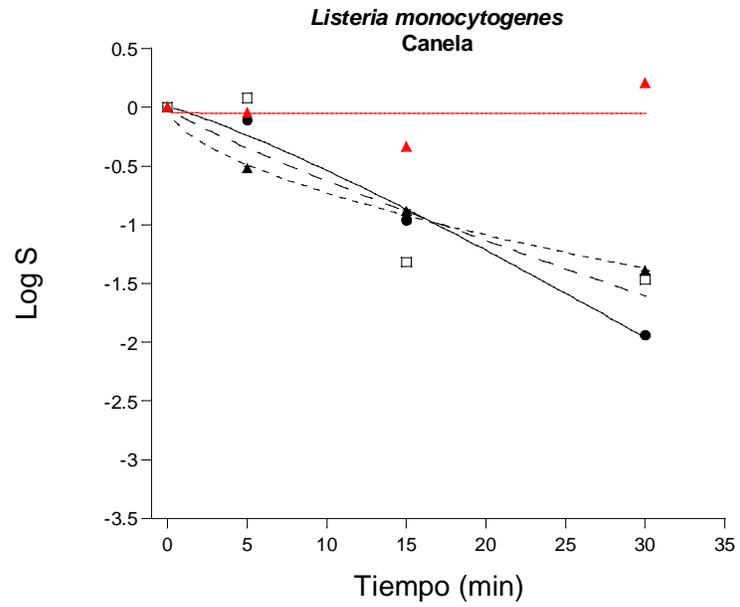
Filas con letra minúscula igual y columnas con letra mayúscula igual indica que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). (NP- no presentó halo de inhibición)

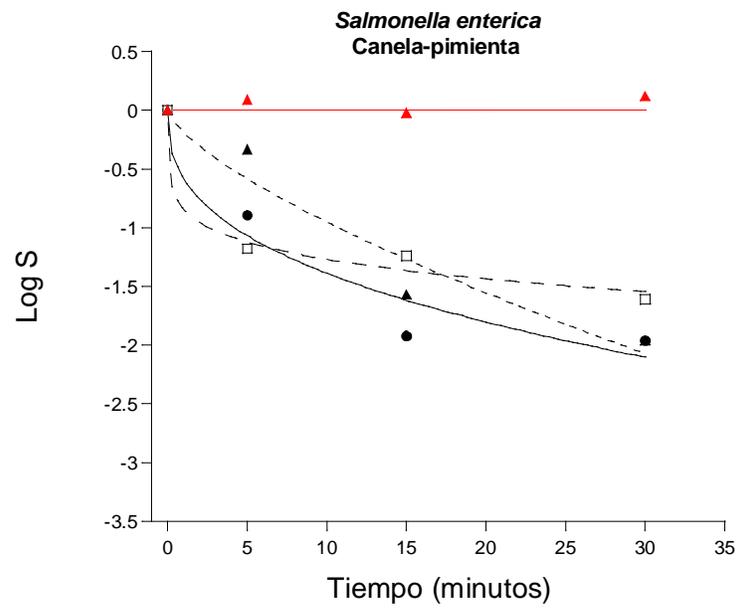
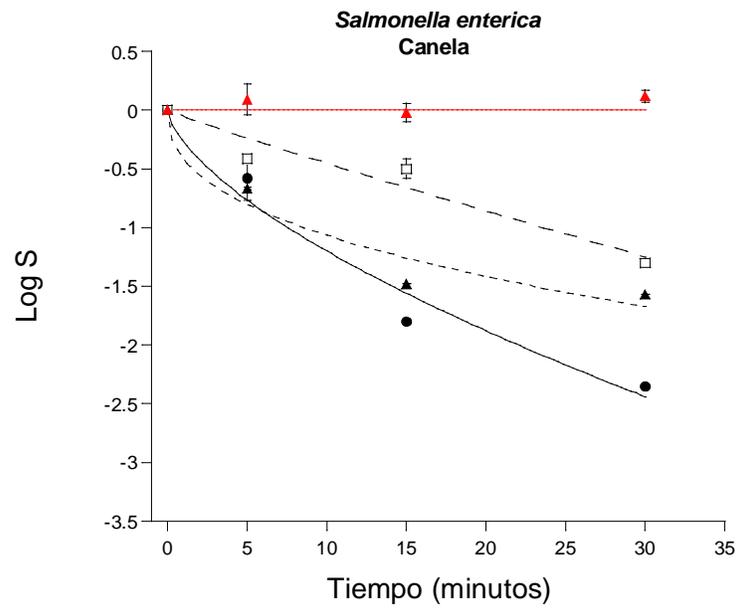
*Salmonella enterica*

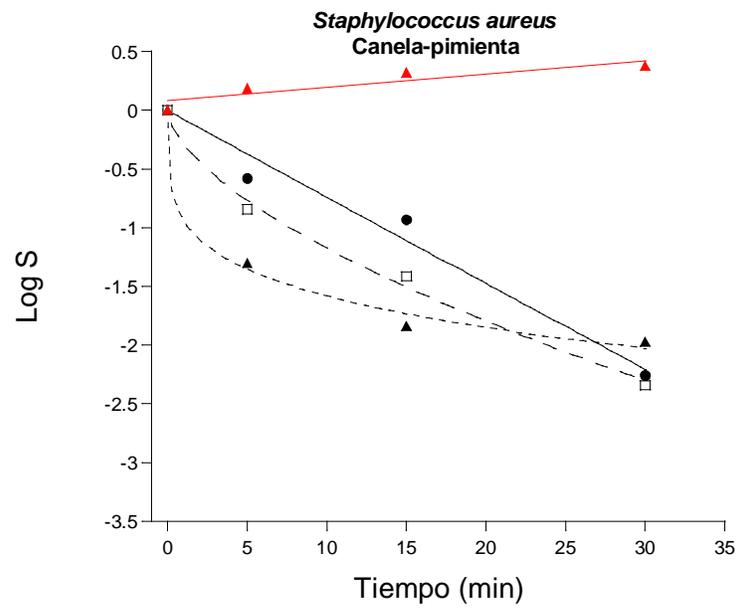
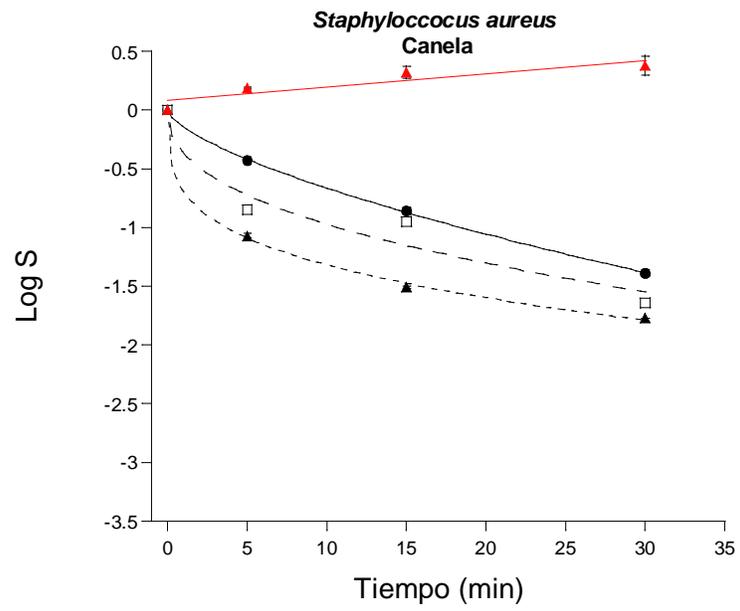
Aceite	Método	Volumen de emulsión (µl)				
		80	100	120	140	160
Canela	Emulsión	11.00±2.83 <sup>a,B</sup>	15.00±1.41 <sup>b,C</sup>	16.50±2.12 <sup>b,D</sup>	16.50±3.54 <sup>b,C</sup>	17.00±2.83 <sup>b,C</sup>
	Alta presión	6.50±0.71 <sup>a,A</sup>	10.00±4.24 <sup>b,A</sup>	14.00±0.00 <sup>c,CD</sup>	14.00±0.00 <sup>c,B</sup>	16.00±0.71 <sup>c,C</sup>
	Ultrasonido	8.50±0.71 <sup>a,AB</sup>	13.00±1.41 <sup>b,BC</sup>	12.00±0.00 <sup>b,AC</sup>	13.50±0.71 <sup>b,B</sup>	13.50±0.71 <sup>b,B</sup>
Canela-pimienta	Emulsión	9.50±2.12 <sup>a,B</sup>	10.50±2.12 <sup>a,AB</sup>	12.50±0.71 <sup>b,BC</sup>	10.50±0.71 <sup>a,A</sup>	12.50±0.71 <sup>b,AB</sup>
	Alta presión	8.50±0.71 <sup>a,AB</sup>	10.00±1.41 <sup>a,A</sup>	10.50±0.71 <sup>a,AB</sup>	10.50±0.71 <sup>a,A</sup>	10.50±0.71 <sup>a,A</sup>
	Ultrasonido	7.50±0.71 <sup>a,AB</sup>	9.50±0.71 <sup>ab,A</sup>	9.50±0.71 <sup>ab,A</sup>	11.00±1.41 <sup>bc,AB</sup>	12.50±0.71 <sup>c,AB</sup>
Pimienta	Emulsión	NP	NP	NP	NP	NP
	Alta presión	NP	NP	NP	NP	NP
	Ultrasonido	NP	NP	NP	NP	NP

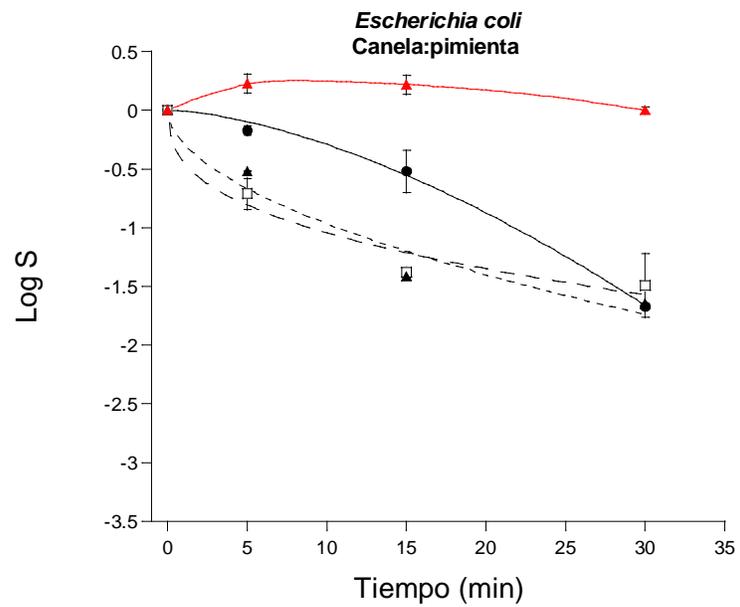
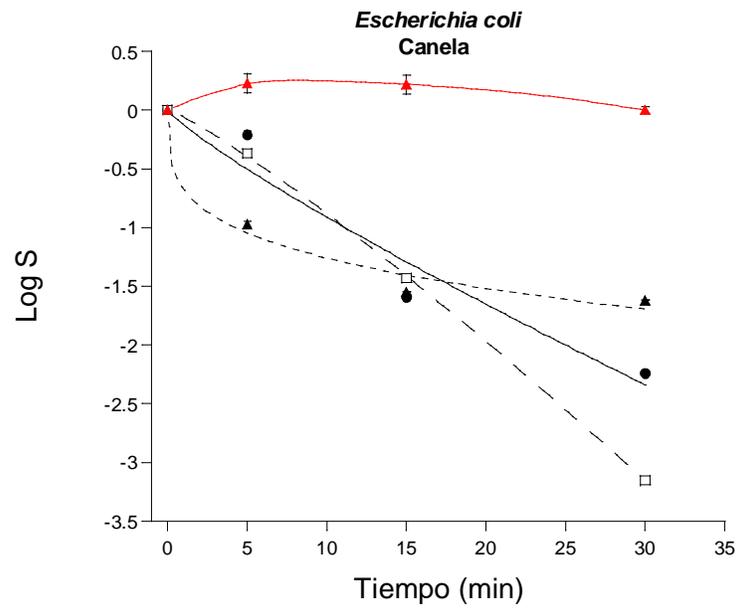
Filas con letra minúscula igual y columnas con letra mayúscula igual indica que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). (NP- no presentó halo de inhibición)

APÉNDICE C  
Gráficos de tiempo de reducción logarítmica con modelo de Weibull









- (●) Emulsión convencional      (□) Nanoemulsión por homogeneizador de alta presión  
 (▲) Nanoemulsión por ultrasonido      (▲) Control