



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República
(PROPAC)

**MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO MEXICANO
(*Lippia graveolens* KUNTH), DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE Y SU APLICACIÓN EN CARNE CRUDA
DE CERDO**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

L.N. César Yedaíel Lira Moreno

Dirigido por:

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Santiago de Querétaro, Qro, Diciembre 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Microencapsulación de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), determinación de su actividad antimicrobiana y antioxidante y su aplicación en carne cruda de cerdo”

PROTOCOLO DE TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.N. César Yedaiel Lira Moreno

Dirigido por:

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Presidente

Firma

Dr. Carlos Regalado González
Secretario

Firma

Dra. Elvia Hernández Hernández
Vocal

Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
Suplente

Firma

Dra. María Alejandra Rojas Molina
Suplente

Alejandra Rojas M.
Firma

MSP. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

En la actualidad hay una gran variedad de agentes antimicrobianos que se utilizan para la conservación de alimentos, tomando en cuenta la demanda de los consumidores por obtener productos alimenticios lo más natural posible. Esto ha llevado a la investigación de sustancias naturales que posean actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés en los alimentos. La principal característica es poder lograr la inhibición de microorganismos deterioradores y patógenos en productos que llegan al consumidor, para garantizar su calidad e inocuidad y posiblemente lograr una mayor vida de anaquel. Las especias tales como el orégano cuentan con un gran poder antimicrobiano ya que contiene compuestos como el timol y el carvacrol, que pueden ser utilizado de manera segura y confiable en los alimentos. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite de orégano Mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) libre y microencapsulado y su aplicación en carne cruda de cerdo. El aceite se obtuvo de hojas y flores por un proceso de hidrodestilación. Para mantener estas características, se utilizó el método de microencapsulación mediante secado por aspersion, usando almidón modificado como material de pared, con el propósito principal de atrapar los ingredientes sensibles, que presentan volatilidad y sabores lábiles, en un vehículo sólido para incrementar su protección, reducir la evaporación, promover un manejo más fácil, controlar su liberación durante incorporación en carne de cerdo empacada al vacío. El aceite esencial de orégano nanoemulsionado y microencapsulado inhibió el crecimiento de *Salmonella* sp., *B. thermosphacta* y bacterias ácido lácticas en carne de cerdo, haciendo del aceite esencial una alternativa para asegurar la inocuidad antimicrobiana. La actividad antioxidante del aceite de orégano muestra una efectividad alta en carne de cerdo fresca envasada al vacío, logrando así una mayor vida de anaquel.

Palabras clave: aceite esencial de orégano, nanoemulsión, microencapsulación, antimicrobiano, antioxidante

SUMMARY

Nowadays several antimicrobials agents are used for food preservation, in order to cope with consumers' worldwide changes preferences for healthier food products. Satisfy this consumer demand had led to research on natural substances with antimicrobial activity against microorganisms of interest in food. The main purpose of the antimicrobial agent is to achieve the inhibition of foodborne pathogens and spoilage microorganisms that can ensure quality, safety and possibly increase shelf life in food products reaching consumers. Oregano is a spice that contains compounds such as thymol and carvacrol, which have been proven to have antimicrobial activity and are also safe and to use in food. The aim of this study was to determine the antimicrobial and antioxidant activity of Mexican Oregano essential oil (*Lippia graveolens Kunth*) free and microencapsulated, its application to pork raw meat was also evaluated. The essential oil (EO) was obtained from leaves and flowers through the hydrodistillation process. To maintain stability (activity) the EO was microencapsulated by spray drying, using modified starch as wall material, to trap volatile and flavor labile compounds. This solid vehicle improves EO protection, reduces evaporation, promotes easier handling and controls compounds release during incorporation into food matrices. The oregano EO microencapsulated and nanoemulsified inhibited the growth of *Salmonella* sp., *B. thermosphacta* and lactic acid bacteria in pork meat. Our results showed that the oregano EO is an alternative to ensure food safety and increase shelf life in food systems such as pork meat.

Keywords: oregano essential oil, nanoemulsion, microencapsulation, antimicrobial, antioxidant.

DEDICATORIA

A mi Madre María Araceli Lira Moreno, que siempre ha fungido los dos papeles, la fortaleza como mamá y el carácter como papá, que siempre puedo confiar y contar con ella, que constantemente me ha dado los ánimos para crecer como persona y de ser el mejor hijo. Eternamente le estaré agradecida por todos los sacrificios que ha hecho para verme feliz. Y sobre todo por amarme y estar al pendiente de mis necesidades. En cada etapa de mi vida siempre ha sido mi amiga y sus consejos sacan lo mejor de mí. ¡Te amo!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de maestría durante mis estudios.

Al Departamento de Investigación y posgrado de Alimentos y todo su personal administrativo.

A la Dra. Blanca García Almendárez, por todo su apoyo, confianza, conocimientos, sus regaños y sobre todo su paciencia, la que siempre la mantuvo cabal de no darme las gracias.

Al Dr. Carlos Regalado González, por la oportunidad de continuar mis estudios y siempre aprender algo nuevo, por el aguante que tuvo en sus clases y no caer en la desesperación en temas que eran incomprensibles para mí.

A la Dra. Elvia Hernández Hernández por su entereza, sabiduría, mostrarme lo que realmente es apasionarse por la investigación, porque con ella aprendí lo que significa biotecnología y lo que es tener una segunda mamá en la escuela, muchas gracias.

Al Dr. Aldo Amaro, que formo parte de mi comité y sé que cualquier duda, él podría haberla resuelto, solo que nos faltó tiempo.

A la Dra. Alejandra Rojas y al Dr. Francisco Javier Luna Vázquez, que siempre nos permitieron el uso de los equipos en su laboratorio.

A la Dra. Isabel Guerrero Legareta, parte importante en la parte técnica de este trabajo, que sin conocerme me concedió el gusto de trabajar en su laboratorio, y usar un equipo desconocido para mí.

Al Dr. Jaime Vernon Carter por permitirnos trabajar en su laboratorio y hacer uso de todo el equipo de nanotecnología y al Mtro. Daniel Gómez Luria y al gran apoyo para manipular los equipos.

A la Dra. Susana Vargas, gracias por otorgarnos su tiempo, ayuda y paciencia en el laboratorio.

Al Dr. Juan Carlos Gómez Carranza, que siempre ha sido y será mi fuente de inspiración, sin él no estaría donde estoy ahora, gracias totales.

A mi mejor compañero de viaje y de vida, que siempre me ayudo en el laboratorio a acomodar puntas y llenar eppendorf, todo su apoyo y paciencia de no pasar más momentos juntos, mi hijo que tanto amo, Michel Emiliano Lira López.

A Martha María Arevalos que me ayudo y me apoyo en cada momento para que no claudicara, sobre todo por ser parte de mi vida, estar a mi lado en los mejores y

peores momentos de esta etapa, eres un pan de dios para celíacos. Solo me dejó un mal hábito, procrastinar.

A Teresita e Iraís que sin ellas las técnicas, cálculos, despejes y las tazas de café no sabrían igual, de verdad las admiro y las estimo mucho, son un ejemplo a seguir.

A mis amigos de laboratorio, Rodrigo, Víctor, Ángel sin ustedes esta aventura no hubiese sido tan divertida, sobre todo por aguantar mi humor y el que no estuviera callado ni un solo momento del día.

A mis amigos Carlos Díaz y Said Santiago Garduño que siempre recibí un abrazo una sonrisa, admiración y sobre todo un “Que bien eh”.

GRACIAS

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| RESUMEN..... | i |
| SUMMARY | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| ÍNDICE..... | vi |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 2 |
| 2.1. Inocuidad en los alimentos..... | 2 |
| 2.2. Extracción de aceites esenciales | 2 |
| 2.2.1. Hidrodestilación..... | 3 |
| 2.3. Composición aceites esenciales | 3 |
| 2.3.1. Orégano Mexicano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth) | 4 |
| 2.3.2. Composición del aceite esencial de orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth). | 4 |
| 2.4. Agentes antimicrobianos | 5 |
| 2.4.1. Mecanismos generales de acción de los agentes antimicrobianos naturales. | 6 |
| 2.4.2. Métodos para determinar la acción antimicrobiana. | 7 |
| 2.4.3. Propiedades antimicrobianas del aceite esencial de orégano Mexicano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth). | 8 |
| 2.5. Antioxidantes..... | 8 |
| 2.5.1. Clasificación de antioxidantes | 9 |
| 2.5.1.1. Antioxidantes naturales | 9 |
| 2.5.1.2. Antioxidantes sintéticos..... | 9 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2. Proceso de oxidación | 9 |
| 2.5.2.1. Oxidación de los lípidos | 10 |
| 2.5.2.2. Sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 10 |
| 2.6. Almidones | 11 |
| 2.6.1. Almidones modificados | 11 |
| 2.7. Emulsiones..... | 12 |
| 2.7.1. Métodos de emulsificación | 13 |
| 2.7.1.1. Homogeneización..... | 13 |
| 2.7.1.2. Ultrasonido | 14 |
| 2.7.1.3. Microfluidización..... | 14 |
| 2.7.2. Nanoemulsiones..... | 15 |
| 2.7.3. Mecanismo de inestabilidad de emulsiones | 16 |
| 2.8. Tamaño de partícula | 17 |
| 2.9. Proceso de microencapsulación | 18 |
| 2.10. Composición de la carne..... | 19 |
| 2.10.1. Proceso de oxidación de la carne | 20 |
| 2.10.2. Microbiología de la carne | 20 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 22 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 23 |
| 5. OBJETIVOS..... | 24 |
| 5.1. General | 24 |
| 5.2. Específicos..... | 24 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| 6.1. MATERIALES | 25 |
| 6.1.1. Materiales biológicos..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 6.1.2. Medios de cultivo..... | 25 |
| 6.2. METODOS | 26 |
| 6.2.1. Extracción de aceite esencial por hidrodestilación | 26 |
| 6.2.2. Preparación de dispersión de almidón | 28 |
| 6.2.3. Emulsiones formadas por aceite esencial, dispersión de almidón y agua. | 28 |
| 6.2.4. Emulsiones formadas por aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 20. | 29 |
| 6.2.5. Emulsiones de aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80. | 29 |
| 6.2.5. Emulsiones obtenidas por homogeneizado y ultrasonicado a base de aceite esencial y una dispersión de almidón | 34 |
| 6.2.6. Emulsiones obtenidas por homogeneizado, ultrasonicado y microfluidizado a base de aceite esencial y una dispersión de almidón | 36 |
| 6.2.6. Análisis de tamaño de partícula | 38 |
| 6.2.7. Microencapsulación mediante secado por aspersion de la emulsion y nanoemulsion del aceite esencial. | 39 |
| 6.2.8. Determinación de la actividad antimicrobiana del AE microencapsulado y nanoemulsionado en medio liquido | 39 |
| 6.2.9. Uso de lomo de cerdo (<i>Longissimus thoracis et lumborum</i>) (LTL) como alimento modelo..... | 40 |
| 6.2.10. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial libre y microencapsulado por medio de TBARS en un alimento modelo. | 40 |
| 6.2.11. Análisis estadístico..... | 41 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 42 |
| 7.1. Extracción de Aceite esencial por hidrodestilación | 42 |
| 7.2. Condiciones para obtener emulsiones a base de aceite esencial de orégano con distintos métodos y surfactantes. | 43 |

| | |
|---|----|
| 7.2.1. Emulsiones de aceite esencial, dispersión de almidón y agua..... | 43 |
| 7.2.2. Emulsiones de aceite esencial, almidón modificado y Tween 20..... | 44 |
| 7.2.3. Emulsiones de aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80. | 45 |
| 7.2.4. Emulsiones obtenidas por homogeneización a base de aceite esencial y una dispersión de almidón | 51 |
| 7.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial contra <i>Salmonella sp</i> y <i>L. monocytogenes</i> | 54 |
| 7.4. Determinación de la concentración mínima bactericida del aceite esencial contra <i>B. thermosphacta</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>M. luteus</i> y <i>P. fragi</i> | 57 |
| 7.5. Determinación de la actividad antimicrobiana del AE microencapsulado y nanoemulsionado por difusión en agar en medio semisólido..... | 61 |
| 7.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana del recubrimiento a base de almidón modificado y aceite esencial de orégano en carne de cerdo fresca. | 63 |
| 7.7. Evaluación de la actividad antioxidante (TBARS) del recubrimiento a base de almidón modificado y aceite esencial de orégano en carne de cerdo fresca. | 67 |
| Se muestran las diferencias de los tratamientos (Figura 17) en los miligramos por kilogramo de malonaldehído, la menor cantidad de este compuesto expresa una actividad antioxidante sobre la carne, mostrando una efectividad en los tratamientos en los cuales se encuentra el aceite esencial de orégano. | 67 |
| CONCLUSIONES | 69 |
| REFERENCIAS | 70 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|---|--------|
| 1. Los componentes principales en aceites esenciales que presentan propiedades antibacterianas | 4 |
| 2. Sistemas o métodos para formación de emulsiones | 12 |
| 3. Composición media de carnes magras por 28 g de porción comestible | 19 |
| 4. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y agua | 29 |
| 5. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 20 | 29 |
| 6. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80, tiempo de ultrasonificado variable | 30 |
| 7. Formulación de aceite esencial (10 % p/p), dispersión de almidón y Tween 80 | 31 |
| 8. Formulación aceite esencial (20 % p/p), dispersión de almidón y Tween 80 | 31 |
| 9. Formulación aceite esencial (10 % p/p), dispersión de almidón, Tween 80 y homogeneizado (6,500 rpm/1min) | 32 |
| 10. Formulación aceite esencial (10% p/p), dispersión de almidón, Tween 80 y homogeneizado (13,500 rpm/1min) | 32 |
| 11. Formulación aceite esencial (20% p/p), dispersión de almidón, Tween 80 y homogeneizado (6,500 rpm/1min) | 33 |
| 12. Formulación aceite esencial (20% v/v), dispersión de almidón, Tween 80 y homogeneizado (13,500 rpm/1min) | 33 |
| 13. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón, Tween 80 homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonificado (150 s) | 33 |
| 14. Formulación aceite esencial, una dispersión de almidón y homogeneizado | 35 |
| 15. Formulación aceite, dispersión de almidón homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonificado (150-600 s) | 36 |

| | |
|--|----|
| 16. Formulaci3n aceite (5-16 % p/p) y una dispersi3n de almid3n modificado (84-95% v/v) y homogeneizado y ultrasonicado | 36 |
| 17. Formulaci3n aceite y una dispersi3n de almid3n modificado homogeneizado, ultrasonicado y microfluidizaci3n | 39 |
| 18. Concentraci3n m3nima bactericida del aceite esencial de or3gano sobre los microorganismos de estudio | 40 |
| 19. Rendimientos de la extracci3n del aceite esencial de or3gano | 42 |
| 20. Tama1o de part3cula, emulsi3n aceite esencial, una dispersi3n de almid3n modificado y agua | 44 |
| 21. Tama1o de part3cula, emulsi3n aceite esencial, dispersi3n de almid3n y Tween 20 | 44 |
| 22. Tama1o de part3cula, emulsi3n de aceite esencial, dispersi3n de almid3n, Tween 80, sometidos a homogeneizado y sonicado | 46 |
| 23. Tama1o de part3cula, emulsi3n aceite esencial (10 % p/p) , dispersi3n de almid3n y Tween 80 | 46 |
| 24. Tama1o de part3cula, emulsi3n aceite esencial (20 % p/p), dispersi3n de almid3n y Tween 80 | 47 |
| 25. Tama1o de part3cula, emulsi3n aceite esencial, una dispersi3n de almid3n modificado, Tween 80 y homogeneizado a 6,500 rpm/1min | 48 |
| 26. Tama1o de part3cula, emulsi3n aceite esencial, una dispersi3n de almid3n modificado, Tween 80 y homogeneizaci3n a 13,500 rpm/1min | 49 |
| 27. Tama1o de part3cula a base de 20% aceite esencial, una dispersi3n de almid3n modificado, Tween 80 y homogeneizado a 6,500 rpm/1min | 49 |
| 28. Tama1o de part3cula a base de 20% aceite esencial, una dispersi3n de almid3n modificado, Tween 80 y homogeneizado a 13,500 rpm/1min | 50 |
| 29. Tama1o de part3cula a base de aceite esencial, dispersi3n de almid3n modificado, Tween 80 homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonido (150 s) | 50 |

| | |
|---|----|
| 30. Tamaño de partícula a base de aceite, dispersión de almidón modificado y homogeneizado | 51 |
| 31. Tamaño de partícula a base de aceite (16% p/p), dispersión de almidón modificado (84% v/v), sometido a homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonido (150-600 s) | 52 |
| 32. Tamaño de partícula a base de aceite (5-16% p/p) y una dispersión de almidón modificado (84-95% v/v), sometido a homogeneización (6,500 rpm/1min) y ultrasonido (150 s) | 52 |
| 33. Tamaño de partícula a base de aceite y una dispersión de almidón modificado homogeneización, ultrasonido y microfluidización | 53 |
| 34. Diámetros de la zona de inhibición obtenidos con el aceite esencial por difusión en agar probado contra los microorganismos. | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Mecanismo de acción de aceites esenciales sobre microorganismos | 6 |
| 2. Formación de complejo de Ácido tiobarbitúrico y malonaldehído (TBA-MA) | 11 |
| 3. Efecto de ruptura de emulsiones | 16 |
| 4. Hidrodestilador y enfriador por recirculación | 27 |
| 5. Formación de nanoemulsiones con ultrasonificación del aceite esencial, almidón modificado y Tween 80 | 30 |
| 6. Formación de emulsiones a base de aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth), una dispersión de almidón y el uso de ultrasonido. | 35 |
| 7. Formación de emulsiones del aceite esencial de orégano (<i>Lippia graveolens</i> Kunth), almidón modificado sometidos a homogeneización, ultrasonido y microfluidizado. | 37 |
| 8. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra <i>Salmonella</i> sp. | 55 |
| 9. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra <i>L. monocytogenes</i> . | 56 |
| 10. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra <i>B. thermosphacta</i> . | 57 |
| 11. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra <i>L. plantarum</i> | 58 |
| 12. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra <i>M. luteus</i> . | 59 |
| 13. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra <i>P. fragi</i> . | 60 |
| 14. Efectividad del aceite esencial de orégano contra <i>Salmonella</i> sp. | 64 |
| 15. Efectividad del aceite esencial de orégano contra bacterias ácido lácticas. | 65 |

- 16.Efectividad del aceite esencial de orégano contra *B. thermosphacta*. 66
- 17.Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano nanoemulsionado y microencapsulado. 68

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los consumidores acerca de la relación entre la alimentación y la salud, está cambiando las prioridades y preocupaciones de la industria alimentaria. El uso de tecnologías emergentes, como las altas presiones, la nanotecnología y la irradiación se utilizan cada vez más para maximizar las propiedades nutricionales de los alimentos, mientras se garantiza su inocuidad. Además, la eliminación de aditivos y conservadores químicos, que son utilizados en una amplia variedad de alimentos es cada vez más demandada, mientras que los aditivos naturales son vistos como un beneficio tanto para la calidad y la salud. Hoy en día, los consumidores demandan un menor uso de productos químicos en los alimentos, pero aún esperan que los alimentos sean de alta calidad, conservando la frescura del producto y un buen nivel sensorial (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Los aceites esenciales se obtienen de hierbas y plantas comestibles, medicinales, minimizando así las preguntas con respecto a su uso seguro en productos alimenticios. Estos componentes han sido ampliamente utilizados como aromatizantes en los alimentos desde la primera historia escrita y es bien establecido que muchos tienen gran espectro de acción antimicrobiana. La composición, estructura, así como grupos funcionales en los aceites juegan un papel importante en la determinación de su actividad antimicrobiana. Por lo general, los compuestos con grupos fenólicos son más eficaces (Burt, 2004).

Se encontró que los aceites de clavo de olor, orégano, romero, tomillo y salvia poseen actividad contra los microorganismos. Generalmente la inhibición más efectiva es frente a bacterias Gram positivas (+) contrastado con Gram negativas. Si bien esto es cierto, hay algunos que son eficaces contra ambos grupos (orégano, clavo de olor, canela y citral). También hay algunos componentes no fenólicos de los aceites que son más eficaces (Alil isotiocianato, AIT) contra las bacterias Gram negativas (Holley y Patel, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1. Inocuidad en los alimentos

Muchos productos alimenticios son perecederos por naturaleza, requiriendo protección contra el deterioro durante el almacenamiento y distribución para darles el tiempo de conservación deseado antes de su consumo.

Dado que los productos alimenticios a menudo se venden en zonas alejadas de los centros de producción, la necesidad de ampliar la vida útil de estos productos, requiere de nuevas alternativas. Las mejoras en la cadena de distribución integrando sistemas de refrigeración, han hecho que el comercio internacional de alimentos perecederos sea posible, pero la refrigeración por sí sola no puede asegurar la calidad e inocuidad de todos los alimentos por este proceso, teniendo que optar por nuevas tecnologías.

Los compuestos antimicrobianos presentes en los alimentos pueden extender la vida útil de estos, debido a la reducción en la tasa de crecimiento o viabilidad microbiana. Estos se añaden para cambiar o mejorar el sabor. Especies y hierbas también pueden mejorar la vida útil debido a su naturaleza antimicrobiana. Estas mismas sustancias contribuyen al auto-defensa de las plantas frente a organismos infecciosos (Holley y Patel, 2005).

2.2. Extracción de aceites esenciales

Es bien conocido que el procedimiento de extracción de aceites esenciales tiene un gran impacto en la calidad del producto, una alta eficiencia de extracción provoca la retención de compuestos volátiles, y bioactivos. Los aceites esenciales son producidos en su mayoría por métodos de arrastre de vapor o hidrodestilación. Métodos ecológicos, tales como la extracción por fluidos supercrítico y la extracción con el uso de microondas entre otros procesos se han

desarrollado recientemente con el fin de proteger tanto los componentes activos, así como el medio ambiente (Karakaya *et al.*, 2012).

2.2.1. Hidrodestilación

Este método es utilizado para obtener aceites esenciales de plantas, siendo un proceso económico. Se deposita el material vegetal en un destilador, añadiendo una cantidad suficiente de agua hasta su ebullición. Debido a la influencia de agua caliente y vapor, el aceite esencial se libera del tejido vegetal. La mezcla de vapor de agua y aceite se condensa por enfriamiento indirecto con agua. Desde el condensador, el destilado se concentra en un recipiente donde el aceite se separa del agua por diferencia en sus densidades (Golmakani y Rezaei, 2007).

2.3. Composición aceites esenciales

Los extractos naturales, así como los aceites esenciales de los vegetales, son mezclas de varias sustancias químicas sintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles y semillas. Son una mezcla de compuestos fenólicos como terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (Viuda-Martos *et al.* 2010).

Considerando el gran número de distintos grupos de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales (Tabla 1), es importante decir que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo específico (Hernández *et al.*, 2014)

La capacidad de los compuestos fenólicos para interferir con el metabolismo celular a través de una serie de mecanismos (complejo sustrato, disrupción de la membrana, la inactivación de las enzimas y la quelación de metal) es bien conocida (Burt, 2004).

Cuadro 1. Componentes principales en aceites esenciales que presentan propiedades antibacterianas

| Nombre común del aceite esencial | Nombre científico | Compuestos principales | Composición aproximada % |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Orégano ^a | <i>Lippia graveolens</i> (Kunth) | Timol | 66.3 |
| | | Carvacrol | 0.10 |
| | | α- Pineno | 4.85 |
| | | β-tujeno | 2.08 |
| Romero ^b | <i>Rosmarinus officinalis</i> | α-pineno | 2-25 |
| | | Acetato de bornilo | 0-17 |
| | | Canfor | 6-15 |
| | | 1,8 cineolo | 6-14 |
| Tomillo ^b | <i>Thymus vulgaris</i> | Timol | 10-64 |
| | | Carvacrol | 2-11 |
| | | γ-Terpineno | 2-31 |
| | | p-Cimeno | 10-56 |

^a Porcentajes de compuestos volátiles (Hernández, *et al.*, 2014)

^b Porcentaje de volátiles totales (Burt, 2004).

2.3.1. Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

Orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth, familia Verbenaceae) es una hierba común que crece en climas semiáridos desde Texas hasta Centroamérica. En contraste con el orégano europeo (*Origanum* spp.), que ha sido ampliamente estudiado, la investigación sobre orégano mexicano se relaciona principalmente con la descripción de la composición química del aceite esencial con unos pocos informes adicionales, como la identificación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana o antioxidante (Calvo-Irabien *et al.*, 2013).

2.3.2. Composición del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth).

En estudios realizados por Hernández y col (2014) sobre la composición química del aceite esencial de orégano mexicano utilizado en este trabajo de tesis, se encontró que el compuesto principal fue timol (66.3%), seguido por su

precursor biosintético, γ -terpineno (9.59%), α -pineno (4.85%), β -tujeno (2,08%). Carvacrol estuvo presente en baja concentración (0.1%)

2.4. Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son compuestos químicos presentes o añadidos en los alimentos que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos. Muchos de estos se encuentran en forma natural o se producen de forma sintética. Además se pueden clasificar como aditivos tradicionales con acción directa o indirecta.

Entre los aditivos tradicionales con acción directa, aprobados en alimentos, se incluyen nitratos y nitritos, sorbatos, benzoatos así como ésteres de fenoles, ácidos orgánicos y sus derivados, mientras que los de acción indirecta son sustancias químicas añadidas con otros objetivos diferentes a la acción antimicrobiana, por ejemplo, fosfatos y antioxidantes fenólicos. Algunos antimicrobianos químicamente sintetizados, reconocidos por la FDA (Food and Drug Administration) como GRAS (Generally Recognized as Safe), son: ácido propiónico, propionatos, ácido benzoico, benzoatos, parabenos, sulfitos, óxido de etileno, propileno, diacetato de sodio, nisina y nitrito de sodio, entre otros (García *et al.* 2008).

Entre los antimicrobianos más estudiados se encuentran los presentes en plantas, hierbas y especias. Estos son utilizados en alimentos, como alternativa a los antimicrobianos sintéticos, debido a la demanda de los consumidores por adquirir productos los más naturales posibles. Se reconoce que los compuestos activos mayoritarios de los antimicrobianos, presentes en los aceites esenciales y extraídos de hierbas y especias, son los compuestos fenólicos (Holley y Patel, 2005).

2.4.1. Mecanismos generales de acción de los agentes antimicrobianos naturales.

Aunque las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales y sus componentes han sido revisados en el pasado, el mecanismo de acción no ha sido estudiado en gran detalle.

Teniendo en cuenta el gran número de diferentes grupos de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, lo más probable es que su actividad antibacteriana no es atribuible a un mecanismo específico, sino que hay varios objetivos en la célula.

Las ubicaciones o mecanismos en la célula bacteriana tentativos para ser sitios de acción para los componentes de aceites esenciales se indican en la figura. 1. Los compuestos no actúan de manera específica e independiente sobre la membrana de la célula, necesita de otros compuestos para un efecto sinérgico sobre el microorganismo. (Burt, 2004).

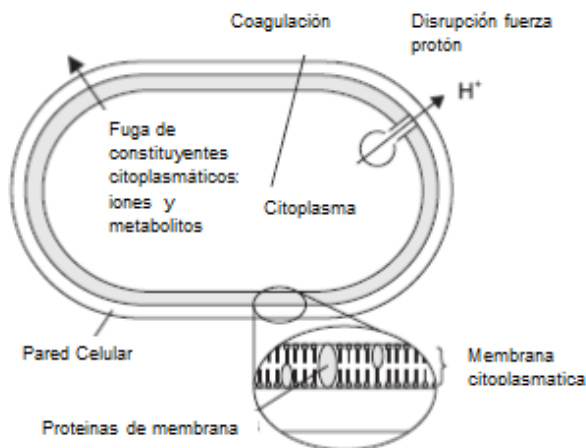


Figura 1: Mecanismos de acción de aceites esenciales sobre microorganismos

Una característica importante de los componentes de los aceites esenciales es su hidrofobicidad. Permite la separación de los lípidos de la membrana celular, desordenando la estructura y haciéndola más permeable, lo

que permite la salida de iones y material citoplasmático. (Ultee *et al.*, 2002., Holley y Patel, 2005., Viuda-Martos, 2010).

La pérdida de la permeabilidad de la membrana es identificada como causa de la muerte celular y depende de la hidrofobicidad de los solutos que cruzan esta, y de la composición de la misma. Esto se considera crucial para su efectividad, por lo que se esperan variaciones cuantitativas en la actividad de los agentes microbianos contra diferentes bacterias.

Los componentes de los aceites esenciales, básicamente timol, carvacrol y eugenol, los cuales son compuestos fenólicos, poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos de interés en alimentos y es razonable pensar que su mecanismo de acción es similar al de otros compuestos fenólicos. Además a diferencia de muchos antibióticos, los constituyentes hidrofóbicos de los aceites esenciales son capaces de entrar en el periplasma de las bacterias Gram negativas a través de las proteínas de la membrana externa. (Lambert *et al.*, 2001).

2.4.2. Métodos para determinar la acción antimicrobiana.

Actualmente la mayoría de los investigadores utilizan la técnica de difusión agar o caldo, con fines comparativos debido a que el rendimiento antimicrobiano en los dos sistemas puede variar. Aunque la técnica de macrodilución en tubo y difusión de discos de papel impregnados con inhibidor sobre superficies de agar se siguen utilizando, existe gran dependencia de los sistemas de microplacas que contienen inhibidores y los organismos objetivo en caldo.

La solubilidad de muchos compuestos fenólicos en ambientes acuosos es pobre. En estudios previos se han utilizado dimetilsulfóxido, etanol, Tween 20 ó 80 y monolaurato, incluso sorbitán para facilitar la dispersión de los antimicrobianos en los medios de prueba.

La hidrofobicidad de los compuestos fenólicos limita el valor de las pruebas de disco de agar/difusión para la estimación precisa de la potencia antimicrobiana. Debido a que los aceites esenciales se caracterizan por ser volátiles, se han diseñado y modificado métodos que ponen a prueba la actividad antimicrobiana de tales agentes en su fase de vapor (Lambert *et al.*, 2001).

2.4.3. Propiedades antimicrobianas del aceite esencial de orégano Mexicano (*Lippia graveolens* Kunth).

El aceite esencial de orégano contiene alto contenido de compuestos fenólicos, los flavonoides se encuentran en mayor cantidad. Timol y carvacrol, y sus precursores p-cimeno y γ -terpineno son considerados algunos de los compuestos antimicrobianos. Estos compuestos afectan la estructura y la funcionabilidad de la membrana en la bacteria, provocando cambios en el pH intracelular, y alteraciones en el potencial de membrana y las síntesis de ATP (Celestino *et al.*, 2014).

2.5. Antioxidantes

La oxidación conduce a una pérdida significativa de valor nutritivo de un alimento, ya que implica una pérdida de vitaminas y ácidos grasos esenciales. También afecta calidad sensorial de los alimentos, cambios en el color, textura y sabor, que acorta su vida útil y puede resultar en el rechazo por parte de los consumidores (Viuda-Martos *et al.*, 2006). Los antioxidantes son sustancias que pueden proteger a las células y otras moléculas de daños causados por radicales libres. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones desde una molécula a un agente oxidante produciendo radicales libres, los cuales inician la reacción en cadena. Los antioxidantes terminan esta reacción en cadena inactivando a los radicales libres (Hamid *et al.*, 2010).

2.5.1. Clasificación de antioxidantes

2.5.1.1. Antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales son capaces de donar un átomo de hidrógeno rápidamente a un radical proveniente de radicales, formando un nuevo radical que es más estable. Los antioxidantes de este grupo son principalmente: vitaminas, minerales y fitoquímicos, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos (Hamid *et al.*, 2010). Dentro de estos se consideran también algunos compuestos presentes naturalmente en la carne como fosfolípidos, la vitamina E, enzimas como super oxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, entre otras (Deshpande *et al.*, 1996)

2.5.1.2. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son lo que comúnmente se adicionan a los alimentos, algunos de ellos son: Hidroxil anisol butilado (BHT), hidroxil tolueno butilado (BHT), propil galato (PG), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). (Hamid *et al.*, 2010). La toxicología de estos antioxidantes ha sido controversial, especialmente después de estudios a largo plazo que indican que el BHA y el BHT en dosis altas pueden producir tumores en animales (Madhavi *et al.*, 1996).

2.5.2. Proceso de oxidación

Este proceso se inicia con la exposición de los lípidos, al calor, la radiación ionizante, la luz, los iones metálicos y catalizadores tales como las metaloproteínas. En la industria alimentaria, la tasa de auto-oxidación se reduce mediante la refrigeración, envasado bajo gas inerte en ausencia de oxígeno y el envasado al vacío (Daker *et al.*, 2008).

2.5.2.1. Oxidación de los lípidos

La degradación oxidativa de los lípidos es uno de los principales factores que limitan la vida útil de los productos alimenticios (Viuda-Martos *et al.*, 2010).

La oxidación de lípidos, que se produce durante el almacenamiento de materias primas, procesamiento, tratamiento térmico y el posterior almacenamiento de los productos finales, es una de las principales causas de la rancidez en productos alimenticios (Tepe *et al.*, 2005).

Además de su uso como aditivos para dar aroma a los alimentos, los aceites esenciales de plantas aromáticas han mostrado potencial para el uso en pequeñas cantidades en los alimentos que contienen grasa para prevenir o retrasar algunos tipos de deterioro químico que se producen durante el almacenamiento (Viuda-Martos *et al.*, 2009).

2.5.2.2. Sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El estrés oxidativo se produce cuando se genera un desbalance desfavorable entre las especies reactivas del oxígeno y las defensas antioxidantes, provocando daño oxidativo a macromoléculas. El cuantificar los parámetros de estrés oxidativo ha permitido el uso de los mismos como herramienta de diagnóstico (biomarcadores), con capacidad predictiva del impacto de los contaminantes sobre los organismos.

Uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS). El método del ácido tiobarbitúrico (TBA), es utilizado para determinar la peroxidación de lípidos utilizados en los ensayos de antioxidantes. Este procedimiento se basa en la reacción del malonaldehído (MDA), producto secundario de la oxidación de lípidos, con el TBA para formar un producto de color

rosa que puede ser medido espectrofotométricamente a 532-535 nm. (Figura 2) (Moon y Shibamoto, 2009).

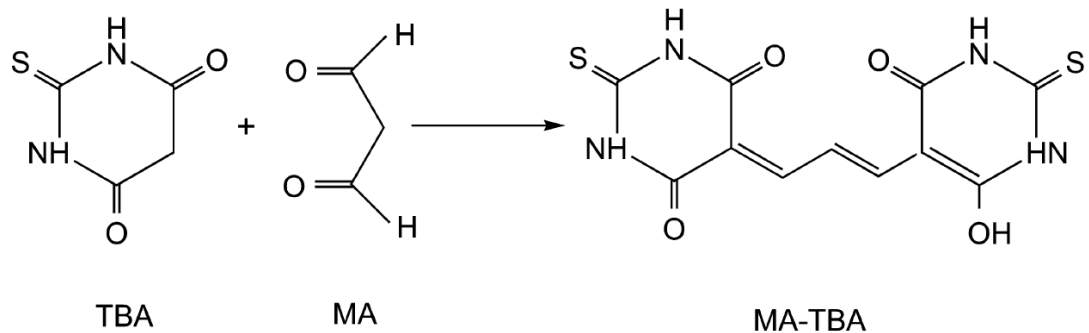


Figura 2. Formación de complejo de TBA-MA

2.6. Almidones

El almidón se acumula en las plantas en forma de gránulos en los cloroplastos de los órganos de origen, como las hojas (almidón transitorio) o en amiloplastos de órganos de demanda, tales como semillas, tubérculos y raíces (almidón de almacenamiento). El almidón se compone de dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa el polímero esencialmente lineal y amilopectina altamente ramificada (Fasahat *et al.*, 2014).

2.6.1. Almidones modificados

Los almidones modificados se han desarrollado por largo tiempo y aplicados en la industria alimentaria con usos significativos hoy en día. En la forma no modificada, los almidones tienen un uso limitado en la industria alimentaria.

En general, los almidones nativos, producen, pastas gomosas cohesivas débiles dando a geles indeseables cuando las pastas se enfrían. Por eso, los fabricantes de alimentos, prefieren los almidones con mejores características de comportamiento de los previstos por los almidones nativos. Las propiedades de

los almidones se pueden mejorar mediante diversas modificaciones tales como acetilación, hidroxilación y fosfatación.

Sustituyentes hidrófilos incluyendo acetilo, hidroxipropilo, y grupos fosfato generalmente provocan una disminución en la temperatura de gelatinización y aumento de la viscosidad para adhesión.

Especialmente los almidones modificados por anhídrido de ácido dicarboxílico, que contienen grupos tanto hidrófilos e hidrófobos, son bien conocidos debido a que mejoran las propiedades de emulsificación y también se puede utilizar como el emulsionante para la encapsulación (Abas *et al.*, 2010).

2.7. Emulsiones

Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa uniformemente dentro de la otra forma de pequeñas gotas (es decir un diámetro de gota en el rango de 0,1-100 μm (McClements y Rao, 2011).

Las emulsiones son termodinámicamente inestables y tienden, después de un tiempo, a la separación de fases. Una alternativa a este hecho es la formación de una nanoemulsión que aunque termodinámicamente son inestables dada la alta energía libre de Gibbs superficial, tienden a la separación de fases, esto se lleva en mucho más tiempo. Lo anterior debido a que a menor tamaño de la nanopartícula se tiene un sistema más estable

Varias tecnologías se usan para la reducción de tamaño de partícula en las emulsiones; los más comunes son homogeneizadores de válvulas de alta presión. Otros dispositivos, incluyendo ultrasonido de alta intensidad, homogeneizadores de membrana, y dispositivos de microfluídos, también son capaces de generar partículas muy finas con una distribución uniforme en el tamaño de partícula como se muestra en el Cuadro 2 (Tadros *et al.*, 2004).

Cuadro 2. Sistemas o métodos para formación de emulsiones (Tadros, 2004)

| Método | Energía necesaria |
|--|--------------------------|
| Agitación baja (manual) | Baja |
| Mezcladores estáticos y agitadores | Baja-Mediana |
| Mezcladores de alta velocidad (ultraturrax) | Mediana |
| Ultrasonidos | Mediana-Alta |
| Homogenizador de alta presión | Alta |

2.7.1. Métodos de emulsificación

2.7.1.1. Homogeneización

Las emulsiones se forman utilizando métodos de baja energía ocurre una formación espontánea de gotitas aceite-agua, esto ocurre cuando se altera su composición o el entorno que lo rodea. Se genera al someter a homogeneización, usando una sonda (rotor/estator) para generar una disrupción.

Los métodos de bajo consumo energético (ultrasonido) suelen ser más eficaces en la producción de tamaños de partícula pequeños que los de alta energía, pero a menudo son más limitados en los tipos de aceites y emulsionantes que se pueden utilizar. Por ejemplo, no es posible utilizar las proteínas o polisacáridos como emulsionantes en la mayoría de los métodos de baja energía que se utilizan para formar nanoemulsiones. En lugar de ello, a menudo es necesario utilizar concentraciones relativamente altas de tensioactivos sintéticos para formar nanoemulsiones, limitando su uso para muchas aplicaciones alimentarias (McClements, 2011).

2.7.1.2. Ultrasonido

La emulsificación con ultrasonido se produce por dos mecanismos. En primer lugar, la aplicación de un campo acústico produciendo ondas interfaciales logrando una inestabilidad en las gotas. Dando como resultado una alta interacción entre el aceite y el medio acuoso formando emulsiones con un tamaño de partícula en específico. En segundo lugar, la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia provoca una cavitación acústica y fuerzas de cizallamiento que rompe las micelas hasta formar nanopartículas.

La cavitación es la formación millones de burbujas microscópicas y un colapso subsecuente de ellas por la presión indeterminada de la onda sónica que se produce, se generan niveles extremos de turbulencia y así existe una reducción del tamaño de las gotas (Kentish *et al.*, 2008).

En este método las altas intensidades localizadas en el seno de la emulsión, pueden provocar varias reacciones indeseables como: desnaturalización de proteínas, despolimerización de polisacáridos y la oxidación de lípidos (McClements, 2011).

2.7.1.3. Microfluidización

Un microfluidizador es algo similar en diseño a un homogeneizador de alta presión, implica el uso de altas presiones para forzar el paso de una emulsión pre-mezclada a través de un orificio estrecho para facilitar la disrupción de las gotas.

El microfluidizador funciona sobre el principio de dividir una emulsión que fluye a través de un canal en dos corrientes, pasando cada flujo a través de un

canal fino separado, y monodireccionando las dos corrientes. Intensas fuerzas disruptivas se generan dentro de la cámara de interacción generando un rápido movimiento para la emulsificación, produciendo una alta eficiencia.

Microfluidizadores se han utilizado en las industrias de alimentos y bebidas para producir emulsiones de sabor, emulsiones nutraceúticas, y leche homogeneizada (McClements y Rao, 2011).

2.7.2. Nanoemulsiones

Las microemulsiones típicamente contienen partículas con diámetro entre 0.1 y 100 μm , mientras que en las nanoemulsiones el diámetro promedio está por debajo de 200nm y se pueden clasificar según la matriz en la que está inmersa la fase dispersa. Si se tienen micelas de una sustancia hidrófoba suspendidas en agua, se denominan como de aceite en agua (O/W por sus siglas en inglés), e inversamente, si las micelas de agua se encuentran en matriz hidrofóbica, se denominan W/O (McClements, 2011; Sole *et al.*, 2012; Koroleva y Yurtov, 2012).

La formación de nanoemulsiones es a partir de una microemulsión, posteriormente se reduce el tamaño de las micelas hasta el tamaño deseado utilizando el método adecuado.

Un método por el cual podemos obtener nanoemulsiones es mediante equipos de homogenización donde se usan altas presiones, en las cuales, un premezclado es forzado a atravesar micro canales creados para generar un flujo extremadamente forzado. El tamaño de las micelas depende de la presión aplicada, del número de recirculaciones y de la viscosidad del fluido a tratar. Las presiones con las que se procesan las emulsiones por este método pueden alcanzarse, mediante el uso de pistones operados de forma pulsada, presiones de hasta 10^4 MPa. Otro método para generar nanoemulsiones es con el uso de ultrasonido donde una macroemulsión, se somete a vibraciones con frecuencias

≥ 20 kHz y potencias > 500 W, lo que causa cavitación y fuerzas extremas de cizallamiento, rompiendo las micelas hasta formar nano partículas (Tadros, 2004).

2.7.3. Mecanismo de inestabilidad de emulsiones

Como en el caso de las emulsiones convencionales las nanoemulsiones son sistemas meta-estables los cuales tienden a romperse a través del tiempo por diferentes mecanismos como separación gravitacional, floculación, coalescencia, “maduración de Ostwald” y degradación química, los cuales están relacionados con la carga electrostática y el tamaño de las partículas en suspensión (Figura 3). El conocimiento del comportamiento interfacial y de la partícula en una nanoemulsion es fundamental para poder controlar, predecir su estabilidad y el posible campo de aplicación (McClements, 2011).

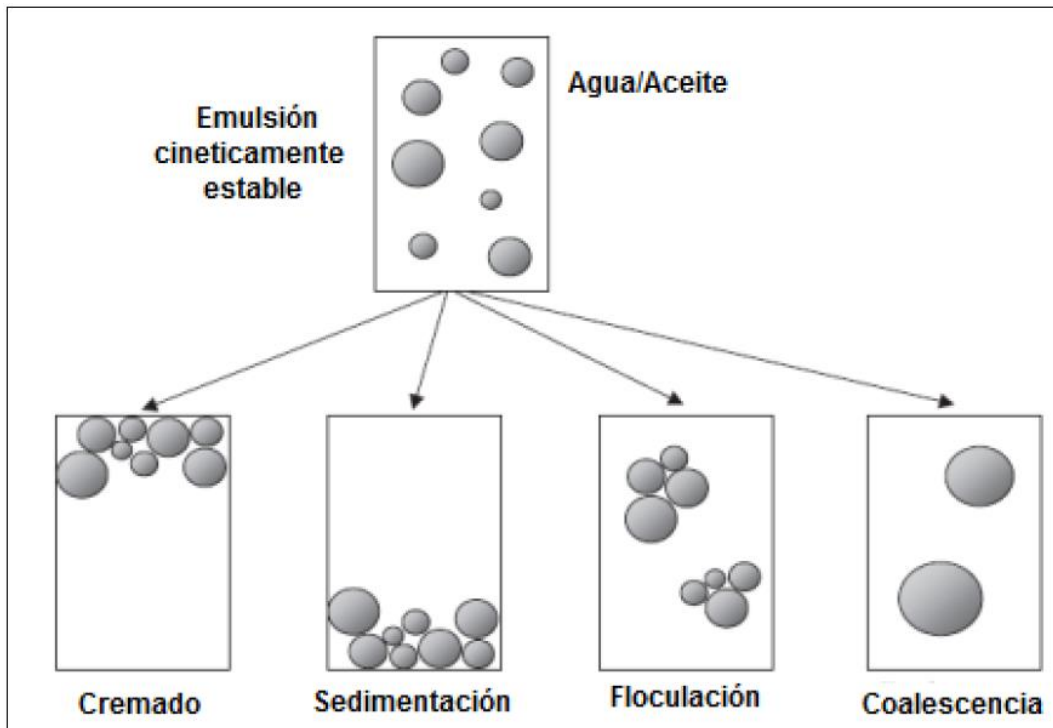


Figura 3. Efecto de ruptura de emulsiones (McClements, 2009).

Para formar microemulsiones y emulsiones, las mezclas de surfactantes generalmente pueden proporcionar un mejor rendimiento que los surfactantes por si solos, ampliando el campo de aplicación (Porras *et al.*, 2008).

El termino surfactante normalmente se utiliza para designar en forma simple los compuestos con cierta propiedad o actividad superficial. Cuando los surfactantes están presentes a bajas concentraciones en un sistema se adsorben en las superficies o interfases, modificando la energía superficial de tales sistemas. Dos surfactantes no-iónicos utilizados ampliamente en la industria, son el Tween 80 y Tween 20, son moléculas anfipáticas compuestas por ésteres de ácidos grasos y sorbitan polioxietileno.

El Tween 20 es químicamente conocido como monolaurato de sorbitan polioxietileno y el Tween 80 como monooleato de sorbitan polioxietileno. Ambos tipos de surfactantes tienen el mismo grupo polar y sólo difieren en las estructuras de los ácidos grasos de las cadenas laterales (Kerwin, 2008).

2.8. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es importante en las nanoemulsiones ya que influye en las características ópticas, reológicas y estabilidad potencial. El tamaño de partícula en una suspensión se obtiene como una distribución de un rango de tamaño en la muestra, en la que debe de existir un tamaño uniforme (McClements y Rao, 2011).

Cuando las nanoemulsiones se obtienen por métodos de baja energía, presentan tamaño de partícula con rangos de 20 a 200 nm y baja polidispersión en el tamaño. Debido a este diámetro tienen una apariencia transparente/translúcida. (Sole *et al.*, 2012).

2.9. Proceso de microencapsulación

El desarrollo de la innovación radica en el concepto de micro y nanoencapsulación en el cuál existe una liberación controlada de componentes bioactivos, otorgando una mayor vida de anaquel, o nanocomponentes en los sistemas de empaque biodegradable y/o comestible.

En su forma más simple, una microcápsula es una pequeña esfera con una pared uniforme alrededor de ella. El material dentro de la microcápsula se conoce como el núcleo, fase interna, o de relleno, mientras que la pared es a veces llamado revestimiento y/o material de pared o de la membrana. Prácticamente, el núcleo puede ser un material cristalino, una partícula absorbente, una emulsión, o una suspensión de microcápsulas más pequeñas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Se pueden utilizar varios materiales de recubrimiento tales como la proteína: caseinato de sodio, proteína de soja, proteína de suero, gelatina; celulosa: hidroxilo propilmetil celulosa (HPMC), carboximetil celulosa (CMC); lípidos: ácidos grasos, colesterol, la cera; hidratos de carbono: quitosano, almidones modificados entre otros (Imran *et al.*, 2010).

Es una operación de un solo paso, por la que un producto líquido se atomiza en una corriente de gas caliente para obtener instantáneamente un polvo. El gas utilizado generalmente es aire, algunas veces se utiliza un gas inerte como el nitrógeno, el líquido inicial a pulverizar puede ser una solución, una emulsión o una suspensión.

Las condiciones dependen del producto todo esto determina el tamaño del polvo, puede ser fino (10-50 μm) o partículas de gran tamaño (2-3 mm). Al disminuir la actividad de agua se garantiza una estabilidad microbiológica, evita el riesgo de la degradación química y biológica de los productos, reduce costos de

almacenamiento, transporte y finalmente se obtiene un producto con propiedades específicas, como una solubilidad instantánea (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

2.10. Composición de la carne

La carne es el tejido animal que puede emplearse como alimento, la mayoría proviene de animales domésticos y acuáticos; algunos de los tejidos que la componen son músculo estriado y liso, grasa y vasos sanguíneos (Alarcón-Rojo, 1992). Sin embargo, el principal componente de la carne como alimento, son los músculos estriados. La transformación del músculo en carne ocurre una vez que en el primero se llevan a cabo una serie de cambios físicos y bioquímicos después del sacrificio (Alarcón-Rojo, 1992; Hultin, 1993).

La composición del músculo magro obtenido de diferentes especies es relativamente constante en términos de proteína y minerales (Schweigert, 1994), el contenido graso es el que presenta mayor variabilidad, siendo la carne de cerdo la que acumula mayor cantidad de grasa (Tabla 3).

La composición de lípidos en carne de cerdo de acuerdo al total, es del 5 % de ácidos grasos monoinsaturados, 4 % de ácidos grasos saturados y del 1 % de poliinsaturados (SAGARPA, 2003).

Cuadro 3. Composición media de carnes magras por 28 g de porción comestible

| Especie | Proteína (g) | Grasa (g) | Calcio (mg) | Hierro (mg) |
|---------|--------------|-----------|-------------|-------------|
| Res | 5 | 3.6 | 3 | 0.8 |
| Cordero | 4 | 2.5 | 3 | 0.7 |
| Aves | 5 | 2 | 4 | 0.4 |
| Cerdo | 4 | 9 | 3 | 0.5 |

Fuente: Fisher y Bender, 1972.

2.10.1. Proceso de oxidación de la carne

La peroxidación lipídica es una de las causas principales de deterioro en cuanto a calidad en la carne y productos cárnicos. La reacción se compone de tres pasos: iniciación, propagación y terminación. La iniciación se lleva a cabo por el ataque de cualquier especie que tiene suficiente reactividad para disociar un átomo de hidrógeno lábil de un grupo metileno en las moléculas de lípidos, para formar los radicales.

La propagación se facilita debido a que el ácido graso radical no es una molécula muy estable, de modo que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando de este modo un ácido graso peroxil radical. El mismo también es una especie muy inestable por lo cual reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente. Este ciclo continúa ya que el nuevo ácido graso radical se comporta de la misma manera.

La reacción radical se detendrá cuando dos radicales reaccionen y produzcan una especie no radical, llamada terminación. Esto ocurre solamente cuando la concentración de especies radicales es lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales.

El hierro también puede ser un catalizador primario de la peroxidación lipídica, especialmente las proteínas hemo tales como la mioglobina, la hemoglobina y el hierro libre. Se podría considerar que éstos son los principales catalizadores para la iniciación del proceso hierro-oxígeno siendo este el proceso de peroxidación de lípidos en carne y productos cárnicos (Min y Ahn, 2005).

2.10.2. Microbiología de la carne

La influencia de los factores (composición del producto y las condiciones de almacenamiento) afecta la tasa de crecimiento y la actividad metabólica de la

flora bacteriana que se encuentra en la carne (cerdo) cruda, cocida y productos cárnicos curados. Las bacterias predominantes asociadas con el deterioro de carne refrigerada son *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudomonas* spp., y *Shewanella putrefaciens* causando olores y sabores desagradables, así como la decoloración y producción de gas. Además de patógenos como *Salmonella* sp. en una contaminación postmortem (exógena).

El conteo inicial de bacterias mesofílicas sobre la carne y productos cocinados de la carne es cercano a 10^2 - 10^3 UFC/cm² o gramo, consistiendo en una amplia variedad de especies. Solo el 10 % de las bacterias iniciales presentan crecimiento en temperaturas de refrigeración, y tan solo una pequeña fracción de bacterias deterioradoras. La contaminación de la superficie de la carne cortada y los productos cárnicos determinará el potencial de vida de anaquel. (Borch *et al.*, 2006)

3. JUSTIFICACIÓN

La carne de cerdo fresca por su composición es un producto alimenticio perecedero y requiere protección contra reacciones de oxidación, contra la penetración y crecimiento tanto de bacterias patógenas como de descomposición.

Actualmente existe una gran variedad de agentes antimicrobianos que se utilizan para la conservación de alimentos. Sin embargo, la demanda de los consumidores por adquirir productos con los ingredientes lo más naturales posibles, ha llevado a la investigación de sustancias naturales que poseen actividad antimicrobiana contra microorganismos de interés en alimentos.

Existe la necesidad de contribuir con más información y conocimientos sobre el comportamiento y las características de las formulaciones de recubrimientos comestibles hechos a partir de almidón modificado con la incorporación de agentes hidrofóbicos en forma de nanoemulsión, que desempeñen actividad antimicrobiana y antioxidante. Además de un proceso de microencapsulación que proporcione estabilidad a través del tiempo, protección frente a microorganismos deterioradores y patógenos para asegurar la inocuidad de la carne de cerdo al ser recubierta.

4. HIPÓTESIS

La microencapsulación de una nanoemulsión del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) promoverá la actividad antimicrobiana y antioxidante en carne de cerdo aplicados a modo de recubrimiento.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) libre y microencapsulado y su aplicación en carne cruda de cerdo

5.2. Específicos

- Obtener el aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) mediante hidrodestilación.
- Seleccionar las condiciones para obtener una emulsión y nanoemulsión (O/W) incorporando el aceite esencial de orégano, almidón y emulsificantes.
- Determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano libre y microencapsulado tanto en medio líquido como semisólido.
- Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de un recubrimiento a base de almidón modificado y aceite esencial de orégano sobre carne de cerdo fresca.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES

En este trabajo se utilizaron hojas secas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), de Tolimán, Querétaro. Un ejemplar fue autenticado por los Mtros. Valentina Serrano Cárdenas y Alejandro Cabrera Luna del Herbario Metropolitano de Querétaro “Dr. Jerzy Rzedowski”, localizado en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y depositado en la Colección Etno-botánica del Herbario.

6.1.1. Materiales biológicos

- *Brochothrix thermosphacta*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Listeria monocytogenes*
- *Micrococcus luteus* NCBI 8166
- *Pseudomonas fragi*
- *Salmonella sp.*
- Lomo de cerdo (*Longissimus thoracis et lumborum*)(LTL)
- Aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

6.1.2. Medios de cultivo

- Agar de sulfito bismuto (ASB) BD Bioxon (Edo. México, México), cuya composición en (g/L): peptona de caseína 17; peptona de carne 5; extracto de carne 5; dextrosa 5; fosfato disódico 4; sulfato ferroso 0.3; indicador sulfito bismuto 8; verde brillante 0.25; agar 20.
- Agar *B. thermosphacta* cuya composición en (g/L): peptona de caseína 20; glicerol 15; agar bacteriológico 13; extracto levadura 2; fosfato de

potasio dibásico 1, (K_2HPO_4); sulfato de magnesio heptahidratado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. el cual fue preparado en el laboratorio.

- Medio assay, cuya composición en (g/L): peptona de caseína 10; extracto de carne 3; extracto de levadura 1.5; NaCl 3; azúcar mascabado 1; agar 1.5/0.8. preparado en el laboratorio.
- Agar nutritivo, BD Bioxon, cuya composición en (g/L): Peptona de gelatina 5; extracto de carne 3; agar 15.
- Caldo nutritivo, BD Bioxon, cuya composición en (g/L): Peptona de gelatina 5; extracto de carne 3.
- Agar soya tripticaseína, BD Bioxon, cuya composición en (g/L): Peptona de caseína 15; peptona de soya 5; cloruro de sodio 5; agar 15.
- Caldo soya tripticaseína, BD Bioxon, cuya composición en (g/L): peptona de caseína 17; peptona de soya 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2.5.

6.2. METODOS

6.2.1. Extracción de aceite esencial por hidrodestilación

El aceite esencial se obtuvo de acuerdo con la metodología reportada por Hernández-Hernández (2014). Se utilizaron 300 g de hojas y flores secas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth).

Reduciendo el tamaño de las hojas y flores de forma manual, evitando pulverizar para que no existiera una pérdida de compuestos volátiles, se realizó dentro de un recipiente cubierto con plástico debido a que genera polvo al realizar el proceso.

Se introdujeron hojas y flores en el matraz del equipo de extracción tipo Clevenger (Cristalab, México) utilizando de agua destilada. Colocando el matraz

de bola dentro de la mantilla de calentamiento, posteriormente se acopló el refrigerante, realizando un buen ajuste para que existiera un buen sellado.

Después se acoplaron dos codos de 90° para poder conectarlos al matraz de bola de 500 mL donde se recibió el condensado, el matraz se sumergió en un baño de hielo con agua para evitar la pérdida de compuestos volátiles.

Se utilizó un enfriador de recirculación (SD07R, PolyScience, EUA) conectado por medio de mangueras al refrigerante.

Para obtener los mejores rendimientos del aceite esencial de orégano, la temperatura de enfriamiento fue de $5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, siendo esta una condición importante para evitar el sobrecalentamiento del condensado agua/aceite y evitar la pérdida de compuestos volátiles (Figura 4).



Figura 4. Hidrodestilador y enfriador de recirculación.

Se separó el aceite esencial del agua floral por diferencia en las densidades depositándolo en un vaso de precipitado. Se eliminó el agua la humedad con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Posteriormente se midió el volumen obtenido en probeta graduada (10 mL) para determinar el rendimiento.

Se guardó en frascos ámbar llenados al máximo para evitar el contacto con la luz y la presencia de oxígeno, se mantuvieron en refrigeración, son factores que promueven la oxidación del aceite.

6.2.2. Preparación de dispersión de almidón

En un matraz de 250 mL Se mezclaron 12g de almidón y 30 g de agua destilada. Para facilitar la completa disolución, la mezcla se agitó a 50 °C y 150 rpm durante 12 horas (LabNet, México). Pasado este lapso se almacenó en condiciones de refrigeración a 4 °C para su conservación hasta su uso. Esta dispersión se utilizó en todas las formulaciones que se realizaron durante toda la parte experimental de las emulsiones.

6.2.3. Emulsiones formadas por aceite esencial, dispersión de almidón y agua.

Para obtener una nanoemulsión estable es necesario partir de una microemulsión o emulsión primaria, la cual se obtuvo mezclando la dispersión de almidón con el aceite esencial de orégano en una relación 1:6.25 p/p.

La mezcla se homogenizó a 6,500 rpm con un equipo Ultra Turrax T25 (IKA, Wilmington, USA). La emulsión primaria se sometió a sonicado (150-300 s) utilizando una amplitud del 40% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y agua

| Tratamiento | AEO (% p/p) | DA (%p/p) | Agua (% p/p) | Sonicación (s) |
|-------------|----------------|--------------|-----------------|-------------------|
| 1 | 5 | 90 | 5 | 300 |
| 2 | 5 | 85 | 10 | 300 |
| 3 | 10 | 85 | 5 | 150 |
| 4 | 5 | 90 | 5 | 150 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

6.2.4. Emulsiones formadas por aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 20.

Se prepararon emulsiones con las mismas concentraciones y condiciones mencionadas anteriormente, a excepción del agua que fue sustituido por el surfactante Tween 20 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 20

| Tratamiento | AEO (% p/p) | DA (%p/p) | Tween 20 (% p/p) | Sonicación (s) |
|-------------|----------------|--------------|---------------------|-------------------|
| 1 | 5 | 90 | 5 | 300 |
| 2 | 5 | 85 | 10 | 300 |
| 3 | 10 | 85 | 5 | 150 |
| 4 | 5 | 90 | 5 | 150 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

6.2.5. Emulsiones de aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80.

Para la obtención de las emulsiones (Figura 5) se variaron los factores: concentración de aceite, Tween 80 y tiempo de ultrasonicado, con dos niveles cada uno, como se muestra en el cuadro 6.

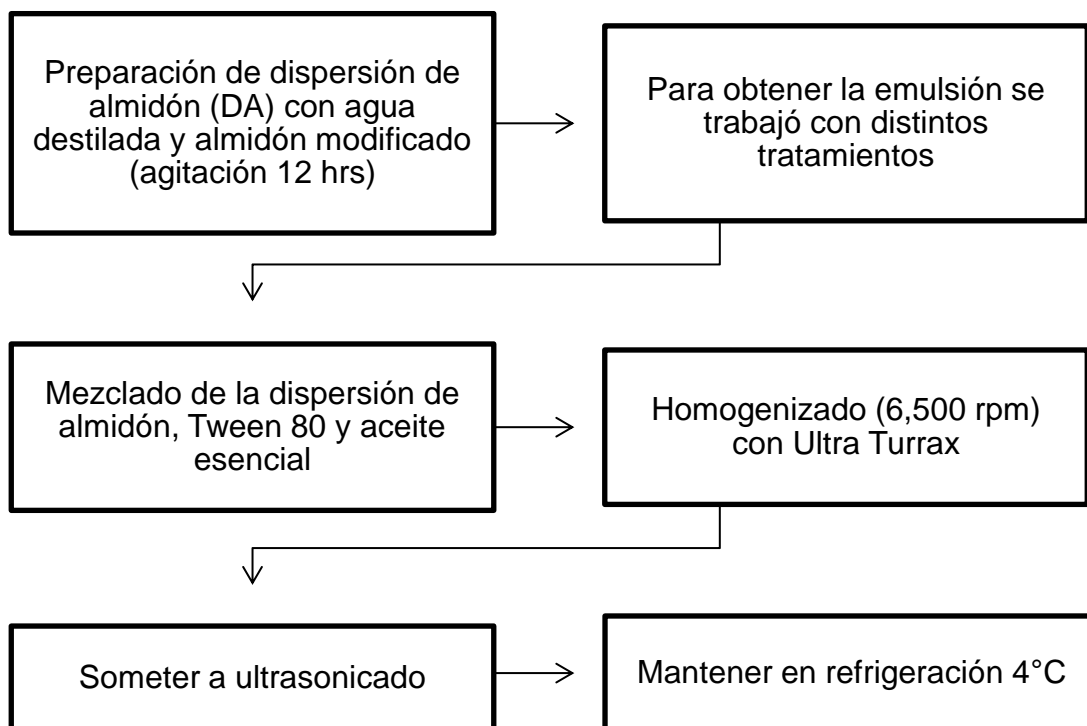


Figura 5. Formación de emulsiones con ultrasonico con aceite esencial, almidón y Tween 80.

En el cuadro 6 se muestra la formulación para obtener una emulsión con el aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80 con tiempos de sonicación variables (150-300 s).

Cuadro 6. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80, tiempo de ultrasonico variable

| Tratamiento | AEO (% p/p) | DA (%p/p) | Tween 80 (% p/p) | Sonicación (s) |
|-------------|-------------|-----------|------------------|----------------|
| 1 | 5 | 90 | 5 | 300 |
| 2 | 5 | 85 | 10 | 300 |
| 3 | 10 | 85 | 5 | 150 |
| 4 | 5 | 90 | 5 | 150 |
| 5 | 10 | 80 | 10 | 150 |
| 6 | 10 | 85 | 5 | 300 |
| 7 | 5 | 85 | 10 | 150 |
| 8 | 10 | 80 | 10 | 300 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA) Homogeneizado (6,500 rpm)

Se obtuvo una emulsión de aceite esencial a una concentración del 10% p/p por homogeneizado (6,500 rpm) y ultrasonicado (150 s), los parámetros variables fueron dispersión de almidón y el Tween 80 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Formulación de aceite esencial (10 % p/p), dispersión de almidón y Tween 80

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) |
|-------------|------------------|-----------|
| 1 | 1 | 89 |
| 2 | 1.5 | 88.5 |
| 3 | 1.75 | 88.25 |
| 4 | 2 | 88 |
| 5 | 2.5 | 87.5 |
| 6 | 3 | 87 |
| 7 | 3.5 | 86.5 |
| 8 | 4 | 86 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA),

Se obtuvo una emulsión de aceite esencial a una concentración del 20% p/p por homogeneizado (6,500 rpm) y ultrasonicado (150 s) parámetros variables fueron Tween 80 y la dispersión de almidón (Cuadro 8)

Cuadro 8. Formulación aceite esencial (20% p/p), dispersión de almidón y Tween 80

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) |
|-------------|------------------|-----------|
| 1 | 2 | 78 |
| 2 | 3 | 77 |
| 3 | 3.5 | 76.5 |
| 4 | 4 | 76 |
| 5 | 5 | 75 |
| 6 | 6 | 74 |
| 7 | 7 | 73 |
| 8 | 8 | 72 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA),

Se preparo una emulsión de aceite esencial a una concentración del 10% p/p por homogeneizado (6,500 rpm) y ultrasonificado (150 s) parámetros variables fueron Tween 80 y la dispersión de almidón (Cuadro 9)

Cuadro 9. Formulación aceite esencial (10% p/p), dispersión de almidón, Tween 80 y homogeneizado (6,500 rpm/1min)

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) |
|-------------|---------------------|--------------|
| 1 | 1 | 89 |
| 2 | 2 | 88 |
| 3 | 3 | 87 |
| 4 | 4 | 86 |
| 5 | 5 | 85 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

En el cuadro 10 se muestra la formulación para obtener una emulsión de aceite esencial con una concentración del 10% p/p, dispersión de almidón y Tween 80, homogeneizado a 13,500 rpm/1 min y tiempo de ultrasonificado de 150 segundos.

Cuadro 10. Formulación aceite esencial (10% p/p), dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneizado (13,500 rpm/1min)

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (% p/p) |
|-------------|---------------------|---------------|
| 1 | 1 | 89 |
| 2 | 2 | 88 |
| 3 | 3 | 87 |
| 4 | 4 | 86 |
| 5 | 5 | 85 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
Sonicación (150 s)

Se preparó una emulsión de aceite esencial a una concentración del 20 % p/p por homogeneizado (6,500 rpm) y ultrasonificado (150 s) parámetros variables fueron Tween 80 y la dispersión de almidón (Cuadro 11)

Cuadro 11. Formulación aceite esencial (20% p/p), dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneizado (6,500 rpm/1min)

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) |
|-------------|------------------|-----------|
| 1 | 1 | 79 |
| 2 | 2 | 78 |
| 3 | 3 | 77 |
| 4 | 4 | 76 |
| 5 | 5 | 75 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
Sonicación (150 s)

Se preparó una emulsión de aceite esencial a una concentración del 20 % p/p por homogeneizado (13,500 rpm) y ultrasonificado (150 s) parámetros variables fueron Tween 80 y la dispersión de almidón (Cuadro 12)

Cuadro 12. Formulación aceite esencial (20% p/p), dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneizado (13,500 rpm/1min)

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) |
|-------------|------------------|-----------|
| 1 | 1 | 79 |
| 2 | 2 | 78 |
| 3 | 3 | 77 |
| 4 | 4 | 76 |
| 5 | 5 | 75 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
Sonicación (150 s)

En el cuadro 13 se muestra la formulación para obtener una emulsión con el aceite esencial con una (10-16 % p/p), dispersión de almidón y Tween 80, homogeneizado a 13,500 rpm/1 min y tiempo de ultrasonificado de 150 segundos.

Cuadro 13. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón modificado, Tween 80, homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonificado (150 s)

| Tratamiento | AEO (%v/v) | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) |
|-------------|---------------|---------------------|--------------|
| 1 | 10 | 5 | 85 |
| 2 | 10 | 2.5 | 87.5 |
| 3 | 10 | 1 | 89 |
| 4 | 10 | 0.75 | 89.25 |
| 5 | 10 | 0.5 | 89.5 |
| 6 | 10 | 0.25 | 89.75 |
| 7 | 10 | 0.1 | 89.9 |
| 8 | 16 | - | 84 |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
Sonicación (150 s)

6.2.5. Emulsiones obtenidas por homogeneizado y ultrasonicado a base de aceite esencial y una dispersión de almidón

Se utilizó una emulsión primaria, la relación de aceite y almidón fue 1:6.25, con un homogeneizado de 6.500 rpm/1min (se describe equipo y relación en el punto 6.2.3).

Se prepararon 4 emulsiones y cada una de ellas se sometió a un tiempo de 2.5 a 10 min de ultrasonicación (Sonics & Materials, Vibra-Cell VCX500, Connecticut, EUA).

Sumergidos en baño de hielo para evitar elevación de temperatura por el proceso de sonicación, el diagrama muestra los pasos a seguir (Figura 6).

En el cuadro 14 se muestra la formulación para obtener una emulsión de aceite esencial con una concentración de 16% p/p, dispersión de almidón y homogeneizado.

Cuadro 14. Formulación aceite esencial, dispersión de almidón y homogeneizado

| Tratamiento | AEO (p/p) | Tiempo (s) | Velocidad (rpm) |
|-------------|-----------|------------|-----------------|
| 1 | 16% | 300 | 9,500 |
| | | 120 | 9,500 |
| 2 | | 120 | 13,500 |
| | | 120 | 17,500 |

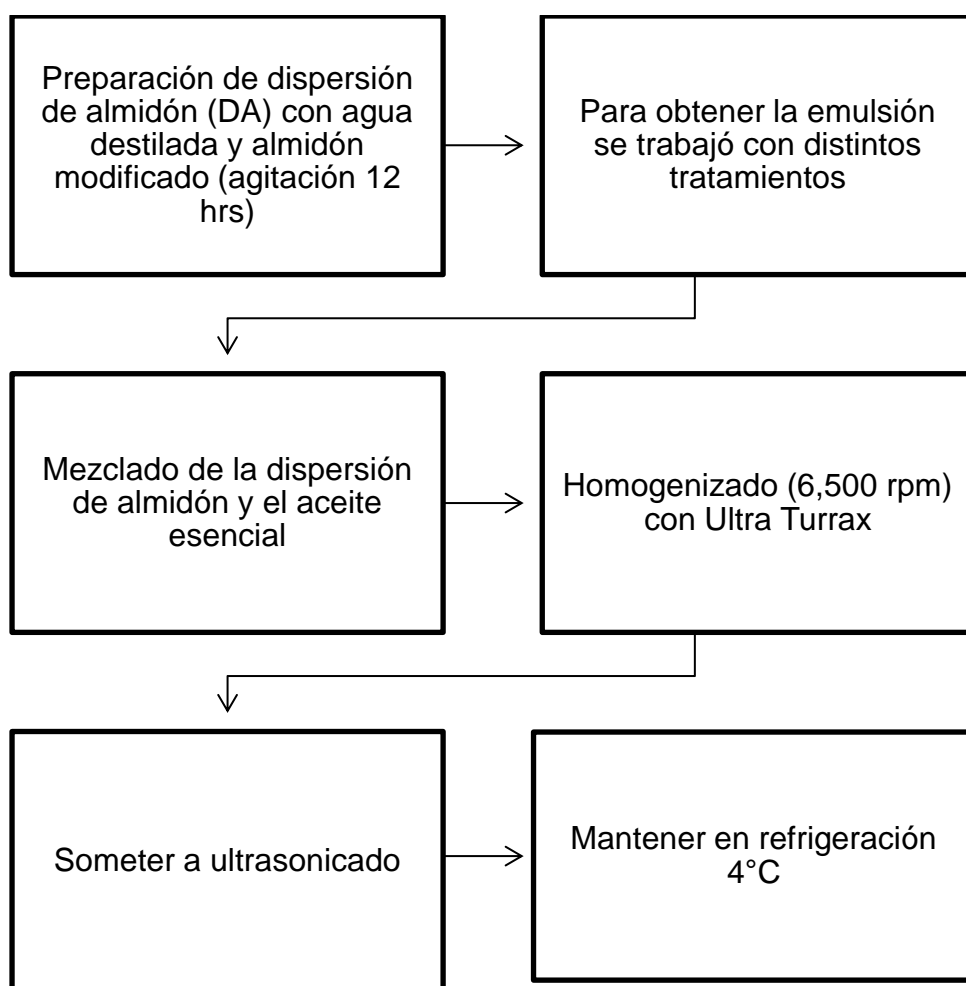


Figura 6. Formación de emulsiones a base de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth), una dispersión de almidón y el uso de ultrasonido.

Se preparó una emulsión de aceite esencial a una concentración del 16% p/p por homogeneizado (6,500 rpm) y ultrasonificado (Cuadro 15)

Cuadro 15. Formulación a base de aceite y una dispersión de almidón modificado (Homogeneización 6,500 rpm/1min)

| Tratamiento | AEO (%v/v) | Tiempo sonicación (s) |
|-------------|------------|-----------------------|
| 1 | 16% | 150 |
| 2 | | 300 |
| 3 | | 450 |
| 4 | | 600 |

Se preparó una emulsión por homogeneizado (6,500 rpm) y ultrasonificado (150 s) parámetros variables fueron aceite esencial y la dispersión de almidón (Cuadro 16)

Cuadro 16. Formulación a base de aceite (5-16 % v/v) y una dispersión de almidón modificado (84-95% v/v) y homogeneización y ultrasonido

| Tratamiento | Concentración AEO (% v/v) | DA (% v/v) |
|-------------|---------------------------|------------|
| 1 | 16 | 84 |
| 2 | 10 | 90 |
| 3 | 7.5 | 92.5 |
| 4 | 5 | 95 |

Aceite esencial de orégano (AEO) Dispersión de almidón (DA)

6.2.6. Emulsiones obtenidas por homogeneizado, ultrasonificado y microfluidizado a base de aceite esencial y una dispersión de almidón

En el cuadro 13 se muestra la formulación de una emulsión de aceite esencial y dispersión de almidón, obtenida por tres métodos de reducción de tamaño de partícula.

Cuadro 17. Formulación a base de aceite y una dispersión de almidón modificado homogeneización, ultrasonido y microfluidización

| Tratamiento | AEO (%p/p) | DA (%p/p) |
|--|------------|-----------|
| Homogeneizado, ultrasonido y microfluidizado | | |
| Homogeneizado y ultrasonido | 16 | 84 |
| Homogeneizado | | |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

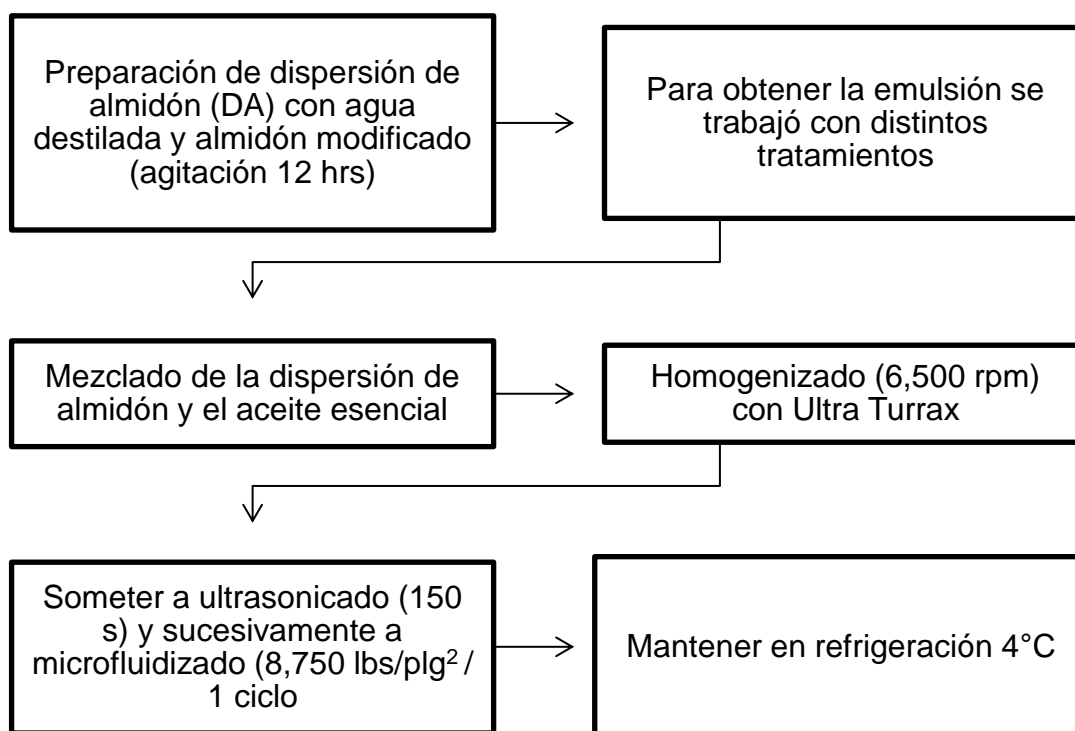


Figura 7. Formación de emulsiones del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y almidón modificado con Ultrasonido y microfluidizado.

6.2.6. Análisis de tamaño de partícula

Se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz (Brookhaven Instruments modelo BI200SM, EUA) equipado con un correlador digital de alta velocidad PCI-BI9000AT, un detector de fotones de estado sólido y un láser Melles Griot 9176EB-1 de He-Ne de 35 mW con longitud de onda (λ) =632.8 nm como fuente de luz. La determinación del tamaño de partícula se basa en el cambio de frecuencia de la luz dispersada (efecto Doppler) por las partículas suspendidas. Las muestras fueron diluidas con agua destilada ultra filtrada en una relación de 1:5000.

Los datos fueron analizados usando dos diferentes programas: NNLS (non negative least square) y regularización de CONTIN; ambos programas de análisis esencialmente evalúan el inverso de la corrección de Laplace, determinando la distribución de tamaño de partícula y, consecuentemente, su valor promedio. El tiempo de integración que se aplicó fue de 10 s para cada medición y solamente se tomaron mediciones con distribuciones unimodales. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se presentan como promedios \pm desviación estándar (DE). Se realizaron las medidas en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM Campus Juriquilla, Querétaro.

Se utilizó un equipo Mastersizer modelo MAF 5000 y 2000, para iniciar las mediciones con respecto al diámetro de partícula se determinó la velocidad adecuada de agitación de la mezcla. Se midió el tamaño de partícula de cada una de las emulsiones las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se presentan como promedios \pm desviación estándar (DE). Se realizaron las medidas en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Campus Iztapalapa, México, DF.

6.2.7. Microencapsulación mediante secado por aspersión de la emulsión y nanoemulsión del aceite esencial.

Las emulsiones se introdujeron en un minisecador por aspersión marca Buchi (Mod. B-191, Flawil, Suiza). Las condiciones de secado fueron: Temperatura de entrada de 180-200 °C, Temperatura de salida 100-120 °C, aspirador al 94 %, Bomba de vacío al 25 % (Hernández *et al.*, 2014).

6.2.8. Determinación de la actividad antimicrobiana del AE microencapsulado y nanoemulsionado en medio líquido

Para evaluar la inhibición de las bacteria patógenas *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*, se utilizaron como base distintas concentraciones que se muestran en el Cuadro 18, modificando las concentraciones propuesta por Orue (2013).

Cuadro 18. Concentración mínima bactericida del aceite esencial de orégano sobre los microorganismos de estudio

| | Concentración (mg/mL) |
|-------------------------|-----------------------|
| <i>Salmonella sp.</i> | 0.5-5 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 5-10 |
| <i>B. thermosphacta</i> | 0.5-5 |
| <i>L. plantarum</i> | 0.5-5 |
| <i>M. luteus</i> | 0.015-0.1 |
| <i>P. fragi</i> | 0.5-5 |

El reto antimicrobiano se llevó a cabo en tubos de ensaye con caldo nutritivo (CN) junto con el antimicrobiano a la concentración deseada, además de un inóculo de alrededor de 10^5 UFC/mL del microorganismo y se incubó a 37 °C por 24 h.

Se modificó la metodología propuesta por Mith (2014) en los microorganismos, *B. termosphacta*, *L. plantarum*, *M. luteus* NCBI 8166 y *P. fragi*

bajo condiciones de incubación de 30 °C por 24 horas y para *L. plantarum* por 48 horas, se utilizaron las concentraciones que se muestran en el cuadro 18.

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) se realizaron diluciones sucesivas para poder determinar el número de células viables usando el método de conteo variable en superficie (Miles y Misra, 1938) en placas de agar nutritivo (AN).

6.2.9. Uso de lomo de cerdo (*Longissimus thoracis et lumborum*) (LTL) como alimento modelo

Se utilizó lomo de cerdo para poder realizar las pruebas antimicrobianas y antioxidantes. El tejido magro con relación al tejido adiposo es homogéneo, se trabajó con trozos de carne con un área de 9 cm² y un espesor no mayor a 1 cm, se estudió el efecto de diferentes factores: grupo control, almidón, exposición con el aceite nanoemulsionado y microencapsulado con una concentración de 0.06 mL/cm², distintos tiempos de exposición (0, 5, 10 y 15 días), almacenados al vacío en temperaturas de 4°C.

Se trabajó con un reto antimicrobiano inoculando los trozos de carne con *Salmonella* sp (1.8x10⁵ UFC/cm²) previo a la aplicación del recubrimiento. En ambos estudios se utilizaron los cuatro tratamientos: control; recubrimiento de almidón modificado; aceite microencapsulado y nanoemulsionado.

6.2.10. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial libre y microencapsulado por medio de TBARS en un alimento modelo.

Se determinó el grado de oxidación de lípidos en carne de cerdo de acuerdo con la metodología establecida por American Meat Science Association (2012).

Esta técnica se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) con el malonaldehído y otros aldehídos producto de la oxidación de lípidos (sustancias reactivas con TBA; TBARS, por sus siglas en inglés) formándose cromógenos de color rosa, con una longitud de onda de máxima absorción de 538 nm.

Se utilizó una solución stock de TBA: 0.375% ácido tiobarbitúrico, 15% ácido tricloroacético, y ácido clorhídrico 0.25 N.

El procedimiento se inició con una porción de carne de cerdo molida o picada finamente. Se utilizaron muestras por duplicado de 0.5 g, se agregó 2.5 mL. del stock de TBA a cada muestra. También se preparó un blanco que contenía únicamente 2.5 mL de la solución stock. Las muestras y el blanco se dejaron en baño maría por 10 minutos. Las muestras desarrollaron un color rosado durante el calentamiento. A continuación se sometieron a enfriamiento en baño de agua y hielo para alcanzar temperatura ambiente y se centrifugaron.

Se centrifugó a 5000 x g por 10 minutos a 4°C del sobrenadante se depositó en una celda y se leyó 532 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Mod Genesys 10UV, Wisconsin, EUA)

Calcular el TBARS con los valores expresados en ppm de malonaldehído, siguiente: $TBARS \text{ (mg MDA/kg)} = \text{muestra } A_{532} \times 2.77$.

6.2.11. Análisis estadístico

Los tratamientos se realizaron totalmente aleatorizados, realizando réplicas por duplicado y triplicado según la disponibilidad de equipos, las variables de respuesta para cada análisis fueron expresadas como el promedio \pm desviación estándar, haciendo comparación de medias por la prueba de Tukey, con una $\alpha=0.05$ utilizando el paquete estadístico JMP 10.0

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Extracción de Aceite esencial por hidrodestilación

Se utilizaron 300 g de hojas de distintas cosechas para cada obtención de aceite esencial de orégano mexicano, en el cuadro 19, se muestran los mililitros y rendimientos.

Cuadro 19. Rendimientos de la extracción del aceite esencial de orégano.

| Fecha de cosecha | Hidrodestilación | Aceite obtenido (mL) | Rendimiento ($\mu\text{L/g}$) |
|------------------|------------------|----------------------|---------------------------------|
| Julio 2014 | Octubre 2014 | 8.2 | 27.3 |
| | Noviembre 2014 | 7.8 | 26.0 |
| | | 8.1 | 27.0 |
| | | 7.7 | 25.6 |
| | | 8.2 | 27.3 |
| | Media | 8.0 ± 0.23^a | 26.6 ± 0.7^a |
| Noviembre 2014 | Diciembre 2014 | 8.1 | 27.0 |
| | Enero 2015 | 8.0 | 26.6 |
| | | 7.7 | 25.6 |
| | Febrero 2015 | 7.9 | 26.3 |
| | | 8.1 | 27.0 |
| | Marzo 2015 | 8.2 | 27.3 |
| | | 8.3 | 27.6 |
| | | 8.3 | 27.6 |
| | Abril 2015 | 8.0 | 26.6 |
| | | 8.1 | 27.0 |
| | Media | 8.07 ± 0.18^a | 26.8 ± 0.6^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Se utilizó una prueba de Tukey-Kramer para comparar las medias de los valores obtenidos de las cosechas de Julio y Noviembre del 2014. Los resultados

muestran que no existe diferencia significativa independientemente de la época de cosecha.

Recientemente se ha incrementado el interés, en relación a los métodos de extracción alternativos para la obtención aceites esenciales en plantas. Entre estos se encuentra el método que utiliza energía por microondas en el cual no incluye solventes (SFME por sus siglas en inglés) y muestra rendimientos elevados, y con tiempos más cortos. En la industria de saborizantes el SFME, puede ser viable debido a sus rendimientos, sin embargo, durante el proceso existe una reducción en su actividad antimicrobiana (Richter, 2007). Sozmen (2012) reporta y compara la composición de los compuestos volátiles extraídos de *Origanum bilgeri* por estos dos métodos y concluye que hay una menor cantidad de compuestos en el método de SFME, en comparación con la extracción por hidrodestilación (HD).

7.2. Condiciones para obtener emulsiones a base de aceite esencial de orégano con distintos métodos y surfactantes.

7.2.1. Emulsiones de aceite esencial, dispersión de almidón y agua.

Se prepararon emulsiones con aceite esencial de orégano, agua y dispersión de almidón, sometidos a 6,500 rpm/1min por el método de homogeneizado y seguido de ultrasonificado. En el cuadro 20, se muestran los tamaños de partícula en base a los distintos tratamientos.

Los resultados muestran que existe diferencia significativa, se puede observar que la formulación con mayor contenido de dispersión de almidón, tiende a un tamaño de partícula elevado, no importando el tiempo que se someten a sonificado.

Cuadro 20. Tamaño de partícula, emulsión aceite esencial, dispersión de almidón modificado y agua

| Tratamiento | AEO (% p/p) | DA (% p/p) | Agua (% p/p) | Sonicación (s) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|----------------|---------------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| 1 | 5 | 90 | 5 | 300 | 1,292.5 ± 5.0 ^a |
| 2 | 5 | 85 | 10 | 300 | 517.5 ± 9.5 ^b |
| 3 | 10 | 85 | 5 | 150 | 542.5 ± 5.0 ^c |
| 4 | 5 | 90 | 5 | 150 | 682.5 ± 5.0 ^d |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

El tamaño de partículas de las emulsiones se rige principalmente por la estructura de la microemulsión durante el proceso de emulsificación, y el exceso de agua presente actúa sólo como un medio de dilución, evitando la coalescencia (Yu *et al.*, 2015). Con respecto al tratamiento 1 el tamaño de partícula es mayor en comparación al 4, las variables en las concentraciones son constantes, lo reportado por Kentish y col (2008) el tiempo de ultrasonido elevado puede generar un “sobreprocesamiento” esto causa el incremento en el tamaño de la emulsión y coalescencia.

7.2.2. Emulsiones de aceite esencial, almidón modificado y Tween 20.

Se prepararon emulsiones con las mismas concentraciones y condiciones mencionadas anteriormente, a excepción del agua que fue sustituido por un surfactante Tween 20 En el cuadro 21 podemos observar los tamaños de partícula.

Cuadro 21. Tamaño de partícula, emulsión aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 20

| Tratamiento | AEO (% p/p) | DA (% p/p) | Tween 20 (% p/p) | Sonicación (s) | Tamaño de partícula (nm) |
|-------------|----------------|---------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | 5 | 90 | 5 | 300 | 3,570.0 ± 11.5 ^a |
| 2 | 5 | 85 | 10 | 300 | 2,355.0 ± 5.7 ^b |
| 3 | 10 | 85 | 5 | 150 | 712.5 ± 5.0 ^c |
| 4 | 5 | 90 | 5 | 150 | 2,842.5 ± 5.0 ^d |

Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

En ninguno de los tratamientos se observó una disminución comparada con el uso de agua. Se ha reportado que el uso de un surfactante puedan obtenerse mejores resultados y tener mayor afinidad para formar una emulsión de menor tamaño y estable (Kuroleva y Yurtov, 2012).

El surfactante desempeña un papel importante en la emulsión debido a que su presencia afecta dos mecanismos opuestos durante el proceso: el mecanismo de rompimiento y el de re-coalescencia durante la emulsificación.

Al utilizar un surfactante se logra estabilizar la fase dispersa y continúa, evitando la coalescencia, logrando una emulsión más estable debido a la reducción de la tensión superficial. (Forgiarini *et al.*, 2006).

Sin embargo el uso de dos emulsificantes con distintos valores en el Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB) Tween 20 y almidón genera una inestabilidad y el aumento del tamaño de partícula de las emulsiones.

7.2.3. Emulsiones de aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80.

Emulsiones sometidas a 6,500 rpm/1min por el método de homogeneizado y seguido de ultrasonido. Se utilizaron distintas concentraciones de aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80.

Tamaños de partícula (Cuadro 22) en base a los distintos tratamientos, las emulsiones de forma directa (O/W) son a menudo estabilizadas usando emulsificantes etoxilados no iónicos (Tween 20 y 80), evitando la floculación por el equilibrio electrostático y estérico (Kuroleva y Yurtov, 2012).

Cuadro 22. Tamaño de partícula, emulsión de aceite esencial, dispersión de almidón, Tween 80, sometidos a homogeneizado y ultrasonificado

| Tratamiento | AEO (% p/p) | DA (%p/p) | Tween 80 (% p/p) | Sonicación (s) | Tamaño de partícula (nm) |
|-------------|-------------|-----------|------------------|----------------|----------------------------|
| 1 | 5 | 90 | 5 | 300 | 1,337.5 ± 5.0 ^d |
| 2 | 5 | 85 | 10 | 300 | 1,770.0 ± 8.1 ^a |
| 3 | 10 | 85 | 5 | 150 | 475.0 ± 5.7 ^h |
| 4 | 5 | 90 | 5 | 150 | 1,180.0 ± 0.0 ^e |
| 5 | 10 | 80 | 10 | 150 | 1,390.0 ± 8.1 ^c |
| 6 | 10 | 85 | 5 | 300 | 715.0 ± 5.7 ^g |
| 7 | 5 | 85 | 10 | 150 | 1,692.0 ± 5.0 ^b |
| 8 | 10 | 80 | 10 | 300 | 1,110.0 ± 0.0 ^f |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

Con respecto al estudio realizado el HLB que corresponde al máximo de estabilidad fue superado por las concentraciones de almidón y Tween 80 generando tamaños de partícula elevados, otro factor que influyó es el tiempo de ultrasonificado al que fueron sometidos los tratamientos. En estudios posteriores se puede modificar las concentraciones de Tween 80 con respecto al almidón.

El cuadro 23 muestra los distintos parámetros en el aceite esencial, dispersión de almidón y Tween 80 como emulsificante no iónico, lo que permitirá no disociarse en el agua, para proporcionar una mejor respuesta a la coalescencia. Se sometieron a homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonificado (150 s).

Cuadro 23. Tamaño de partícula, emulsión aceite esencial (10 % p/p), dispersión de almidón y Tween 80

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|------------------|-----------|------------------------------|
| 1 | 1 | 89 | 1,170.0 ± 10.0 ^b |
| 2 | 1.5 | 88.5 | 800.0 ± 0.0 ^f |
| 3 | 1.75 | 88.25 | 1,140.0 ± 10.0 ^{bc} |

| | | | |
|---|-----|------|-----------------------------|
| 4 | 2 | 88 | 1,276.6 ± 15.2 ^a |
| 5 | 2.5 | 87.5 | 1,010.0 ± 10.0 ^e |
| 6 | 3 | 87 | 1,123.0 ± 5.7 ^{cd} |
| 7 | 3.5 | 86.5 | 1,286.6 ± 11.5 ^a |
| 8 | 4 | 86 | 1,090.0 ± 26.4 ^d |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)

Se obtuvieron emulsiones (Cuadro 24), aceite esencial, dispersión de almidón, Tween 80, se modificaron los parámetros con respecto al estudio anterior, con un homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonificado (150 s). Contrario a lo reportado por Maindarkar y col (2015), aumentar la cantidad de emulsificante genera un tamaño de partícula menor. Se muestra en los resultados de la presente investigación, que al aumentar el surfactante, es directamente proporcional el aumento del tamaño de partícula. Esto se puede ocurrir por el HLB que sigue siendo elevado con respecto al uso de almidón y Tween 80, los valores muestran una falta de afinidad entre los emulsificantes.

Cuadro 24. Tamaño de partícula, emulsión aceite esencial (20% p/p), dispersión de almidón y Tween 80

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (% p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|------------------|------------|------------------------------|
| 1 | 2 | 78 | 1,213.3 ± 5.7 ^f |
| 2 | 3 | 77 | 1,400.0 ± 20.0 ^{ef} |
| 3 | 3.5 | 76.5 | 1,546.6 ± 30.5 ^{de} |
| 4 | 4 | 76 | 1,676.6 ± 30.5 ^d |
| 5 | 5 | 75 | 2,066.6 ± 83.2 ^c |
| 6 | 6 | 74 | 2,966.6 ± 15.2 ^{bc} |
| 7 | 7 | 73 | 2,176.6 ± 45.0 ^b |
| 8 | 8 | 72 | 2,216.6 ± 83.2 ^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)

Los resultados (Cuadros 23 y 24) muestran que el tamaño de partícula no disminuyó, no importando las concentraciones de Tween 80 y aceite esencial, en

comparación con el sistema agua, aceite esencial y dispersión de almidón $<517.5 \pm 9$. (Cuadro 20). Las concentraciones de almidón y Tween 80 se volvieron a ajustar con respecto a las concentraciones de aceite esencial para lograr una mejor coalescencia pero se mostraron resultados similares a los tratamientos anteriores, debido a que el HLB de los emulsificantes es insuficiente.

Otra variable importante a considerar fue el tiempo y velocidades de homogeneizado, con una concentración constante de aceite esencial, con parámetros variables en dispersión de almidón y Tween 80 podemos observar el comportamiento de las emulsiones con respecto al tamaño de partícula en los cuadros 20 y 21.

Se obtuvieron emulsiones (Cuadro 25), aceite esencial (10% p/p), dispersión de almidón, Tween 80, con un homogeneizado y ultrasonificado.

Cuadro 25. Tamaño de partícula, emulsión aceite esencial, una dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneizado a 6,500 rpm/1min

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (%p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|------------------|-----------|---------------------------------|
| 1 | 1 | 89 | 793.3 \pm 15.2 ^{bc} |
| 2 | 2 | 88 | 743.3 \pm 40.4 ^c |
| 3 | 3 | 87 | 920.0 \pm 100.0 ^{ab} |
| 4 | 4 | 86 | 706.6 \pm 15.2 ^c |
| 5 | 5 | 85 | 1,026.6 \pm 35.1 ^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)
 Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
 Ultrasonificado (150 s)

Se obtuvieron emulsiones (Cuadro 26), aceite esencial (10% p/p), dispersión de almidón, Tween 80, con un homogeneizado (13,500 rpm) y ultrasonificado.

Cuadro 26. Tamaño de partícula, emulsión aceite esencial, una dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneizado a 13,500 rpm/1min

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (% p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|------------------|------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 89 | 733.3 ± 5.7 ^e |
| 2 | 2 | 88 | 753.3 ± 5.7 ^d |
| 3 | 3 | 87 | 783.3 ± 5.7 ^c |
| 4 | 4 | 86 | 1,126.6 ± 5.7 ^b |
| 5 | 5 | 85 | 1,030.0 ± 10.0 ^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
 Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
 Ultrasonificado (150 s)

Los resultados mostrados en los cuadros 25 y 26, la diferencia del balance hidrofílico-lipofílico entre los emulsificantes con respecto a los valores de afinidad muestran que existe coalescencia entre las emulsiones generando tamaños de partícula mayores a los esperados para obtener una nanoemulsión.

Posteriormente se obtuvieron emulsiones 27 con una concentración constante de aceite esencial (20 % p/p) y condiciones de homogeneizado (6,500 rpm/1min) y por ultrasonificado, modificando los parámetros en la dispersión de almidón y Tween 80.

Cuadro 27. Tamaño de partícula a base de 20% aceite esencial, una dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneización a 6,500 rpm/1min.

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (% p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|------------------|------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 79 | 753.3 ± 5.77 ^c |
| 2 | 2 | 78 | 756.6 ± 5.77 ^c |
| 3 | 3 | 77 | 750.0 ± 10.0 ^c |
| 4 | 4 | 76 | 1566.6 ± 28.86 ^b |
| 5 | 5 | 75 | 1433.3 ± 57.73 ^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
 Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
 Ultrasonificado (150 s)

Posteriormente se obtuvieron emulsiones 27 con una concentración constante de aceite esencial (20 % p/p) y condiciones de homogeneizado (6,500 rpm/1min) y por ultrasonificado, modificando los parámetros en la dispersión de almidón y Tween 80.

Cuadro 28. Tamaño de partícula a base de 20% aceite esencial, una dispersión de almidón modificado, Tween 80 y homogeneización a 13,500 rpm/1min

| Tratamiento | Tween 80 (% p/p) | DA (% p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|------------------|------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 79 | 760.0 ± 5.0 ^c |
| 2 | 2 | 78 | 746.6 ± 7.6 ^c |
| 3 | 3 | 77 | 760.0 ± 0.0 ^c |
| 4 | 4 | 76 | 1,316.6 ± 28.8 ^b |
| 5 | 5 | 75 | 1,600.0 ± 50.0 ^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
 Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
 Sonicación (150 s)

Como se muestra en el cuadro 29, se obtuvieron emulsiones con distintas concentraciones de aceite esencial, dispersión de almidón, y utilizando menores concentraciones de Tween 80, respecto a los tratamientos anteriores, se utilizó el método de homogeneizado y ultrasonificado (150 s) de manera constante.

Cuadro 29. Tamaño de partícula a base de aceite esencial, dispersión de almidón modificado, Tween 80, homogeneizado (6,500 rpm/1min) y ultrasonido (150 s)

| Tratamiento | AEO (% p/p) | Tween 80 (% p/p) | DA (% p/p) | Tamaño de partícula(nm) |
|-------------|-------------|------------------|------------|---------------------------|
| 1 | 10 | 5 | 85 | 736.6 ±15.8 ^c |
| 2 | 10 | 2.5 | 87.5 | 730.0 ± 0.0 ^c |
| 3 | 10 | 1 | 89 | 696.6 ±11.5 ^{cd} |
| 4 | 10 | 0.75 | 89.25 | 1,006.6 ±125 ^b |
| 5 | 10 | 0.5 | 89.5 | 666.6 ±5.7 ^{cd} |
| 6 | 10 | 0.25 | 89.75 | 573.3 ±15.2 ^{de} |
| 7 | 10 | 0.1 | 89.9 | 693.3 ±5.7 ^{cd} |
| 8 | 16 | - | 84 | 513.3 ±35.1 ^e |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
 Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
 Sonicación (150 s)

Se puede observar que las formulaciones que contenían Tween 80 y sin importar el tiempo y velocidad de homogeneización, presentan un tamaño de

partícula elevado. En caso contrario ocurre cuando el Tween 80 no está presente en la emulsión. El menor tamaño de partícula fue de $513.3 \pm 35.1\text{nm}$ (Cuadro 23), se obtuvo utilizando únicamente dos componentes en el sistema, la dispersión de almidón y el aceite esencial.

Contrario a lo reportado por Salvia-Trujillo y col (2014), quienes obtuvieron una nanoemulsión de aceite de limón (1 % p/p) y Tween 80 (1 % p/p) con un diámetro promedio de 6.9 nm, aplicando 2 min de ultrasonido con una amplitud de 30 μm .

7.2.4. Emulsiones obtenidas por homogeneización a base de aceite esencial y una dispersión de almidón

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta ahora, se simplificó el sistema y se utilizaron concentraciones constantes de aceite esencial (16% v/v) y de la dispersión de almidón (84% v/v), con el uso del método de homogeneización.

Cuadro 30. Tamaño de partícula a base de aceite, dispersión de almidón y homogeneizado

| Tratamiento | Tiempo (s) | Velocidad (rpm) | Tamaño de partícula (nm) |
|-------------|------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | 300 | 9,500 | $1,920.0 \pm 0.0^a$ |
| | 120 | 9,500 | |
| 2* | 120 | 13,500 | $1,643.0 \pm 57.7^b$ |
| | 120 | 17,500 | |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

*Los tiempos y velocidades de homogeneización fueron subsecuentes.

Se observa que en una relación 1:6.25 del aceite esencial de orégano y la dispersión de almidón y con el uso de un homogeneizador, los tamaños de partícula son de dimensiones micrométricas (Cuadro 30). Mostrando un sistema monofásico debido a que el tamaño muestra que el aceite se solubilizo dentro del

almidón con actividad surfactante, pero no significa que se haya formado una emulsión, solo una estructura micelar que contiene al aceite esencial de orégano. Se ha observado que con el uso de homogeneizador, no existe una adecuada emulsificación debido a la falta de energía para lograr una emulsión (Maindarkar *et al.*, 2015).

Posteriormente se realizó una emulsión (Cuadro 31) en concentraciones constantes de aceite esencial (16 % p/p) y la dispersión de almidón (84 % p/p) con respecto al experimento anterior, se mantuvo el método de homogeneización (6,500 rpm/1min) y se utilizaron distintos tiempos de sonicación (150-600s).

Cuadro 31. Tamaño de partícula a base de aceite y una dispersión de almidón modificado sometido a homogeneización (6,500 rpm/1min)

| Tratamiento | Tiempo sonicación (s) | Tamaño de partícula (nm) |
|-------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 150 | 573.3 ± 5.7 ^a |
| 2 | 300 | 610.0 ± 0.0 ^b |
| 3 | 450 | 640.0 ± 0.0 ^c |
| 4 | 600 | 623.3 ± 5.7 ^d |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)

Cuadro 32. Tamaño de partícula a base de aceite (5-16 % p/p) y una dispersión de almidón modificado (84-95 % p/p) sometido a homogeneización (6,500 rpm/1min) y sonificado (150 s)

| Tratamiento | Concentración AEO (% v/v) | DA (% v/v) | Tamaño de partícula (nm) |
|-------------|---------------------------|------------|---------------------------|
| 1 | 16 | 84 | 237.3 ± 6.8 ^a |
| 2 | 10 | 90 | 205.6 ± 6.8 ^b |
| 3 | 7.5 | 92.5 | 231.3 ± 6.8 ^{ab} |
| 4 | 5 | 95 | 231.3 ± 6.8 ^{ab} |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
Aceite esencial de orégano (AEO)

Se realizó una emulsión con tiempos y velocidad de homogeneización y sonificado constante, los parámetros variables fueron el aceite esencial (5-16 % v/v) y la dispersión de almidón (84-95% v/v) (Cuadro 32).

Cuadro 33. Tamaño de partícula a base de aceite y una dispersión de almidón modificado homogeneización, ultrasonido y microfluidización

| Tratamiento | AEO (%v/v) | DA (%v/v) | Tamaño de partícula(nm) |
|--|------------|-----------|--------------------------|
| Homogeneizado, ultrasonido y microfluidizado | | | 115.0 ± 0.0 ^b |
| Homogeneizado y ultrasonido | 16 | 84 | 116.0 ± 0.0 ^b |
| Homogeneizado | | | 652.0 ± 0.0 ^a |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)
 Aceite esencial de orégano (AEO), dispersión de almidón (DA)
 Sonicación (150 s) Microfluidización (8,750 lbs/plg2/1 ciclo)

Con la finalidad de asegurar una verdadera nanoemulsión se sometió al método de microfluidizado, con una previa homogeneización y ultrasonificado. Se puede observar (Cuadro 33), el mayor tamaño de partícula se obtuvo con homogeneización, y los tamaños cercanos a 100nm se obtuvieron por los métodos de homogeneizado/sonificado y homogeneizado/sonificado/microfluidizado. Sin embargo no muestran diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre cada tratamiento, independiente a los métodos. Consideramos que el uso del microfluidización, no resultaría en futuras aplicaciones, debido al tamaño de partícula que se obtuvo.

Jafari y col. (2007) prepararon una emulsión de aceite de limón y almidón modificado con diámetro promedio de 680 nm, aplicando 60 segundos de ultrasonido con una amplitud de 100 μ m. Posteriormente usaron el método de microfluidización logrando una reducción de tamaño de partícula promedio de 570 nm, con una presión de 120 MPa en un ciclo.

El tamaño de partícula de las emulsiones es una característica importante, ya que ejerce influencia en las propiedades ópticas, reológicas estabilidad y liberación de compuestos. Las emulsiones tienen que ser estabilizadas cinéticamente mediante algún efecto que retarde e inhiba la coalescencia de la emulsión (Tadros *et al.* 2004; McClements, 2011).

Koroleva y Yurtov (2015), mencionan la maduración de Ostwald como el principal mecanismo que genera el aumento del tamaño de partículas en las nanoemulsiones (O/W), y una manera de asegurar la estabilidad cinética de las nanoemulsiones es añadir un segundo componente. Sin embargo contrario a lo reportado anteriormente, la cantidad de surfactante (DA), no mostro un efecto positivo en los tratamientos con parámetros constantes, velocidad, tiempo de homogeneización y concentraciones de aceite esencial (Cuadro 29, 30 y 31).

7.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial contra *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la CMB del aceite esencial de orégano libre contra *Salmonella sp*. Donde podemos observar que a partir de una concentración de 1.87 mg/mL y 2.5 mg/mL se logra una completa inhibición de *Salmonella sp*. a las 6 y 4 horas respectivamente, sin presentar crecimiento durante su monitoreo en 24 horas.

Las concentraciones de 1.25 y 0.625 mg/mL también mostraron un efecto bacteriostático pero se presentaron hasta las horas de su aplicación.

Con respecto a la concentración de 0.25 mg/mL mostro un efecto bacteriostático hasta las 12 horas, perdiendo su capacidad a las 24 horas.

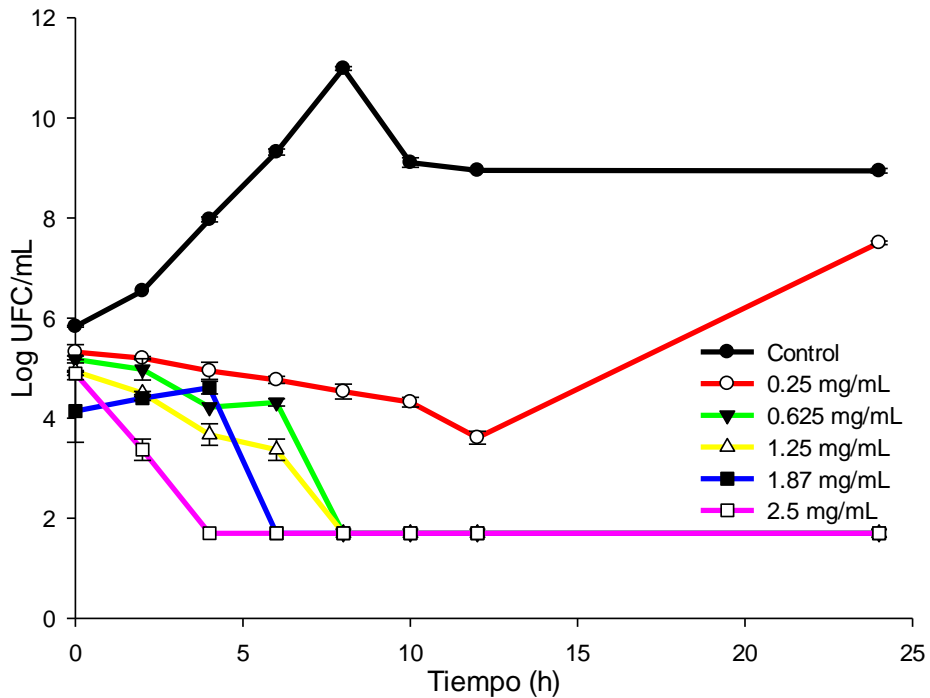


Figura 8. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra *Salmonella sp*

Posteriormente se realizó el estudio para determinar la concentración mínima bactericida del aceite esencial de orégano contra *L. monocytogenes*. En la figura 9, se observa que a partir de una concentración de 7.5 mg/mL a 10 mg/mL se logra una completa inhibición las 10 horas, sin presentar crecimiento durante su monitoreo en 24 horas. La concentración de 6.25 mg/mL mostro un efecto bacteriostático las primeras 12 horas esta concentración podría utilizarse como una barrera antimicrobiana, en productos de venta inmediata, así como la concentración de 5 mg/mL.

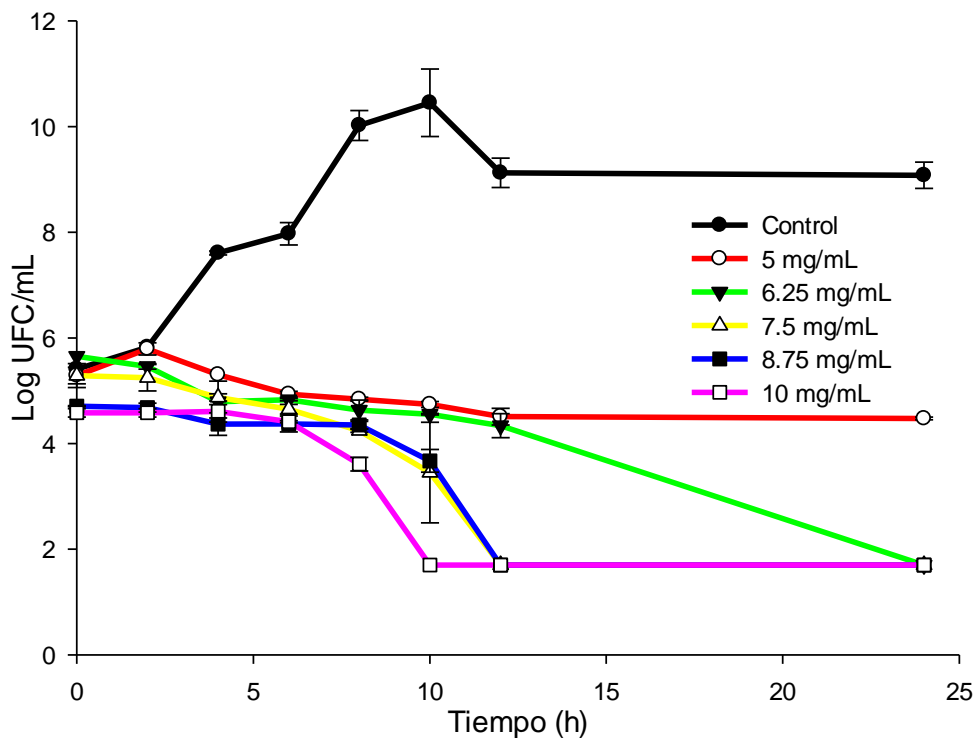


Figura 9. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra *L. monocytogenes*

Celestino y col (2014) probaron la actividad antimicrobiana de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) a concentraciones en un rango de 1.5 a 2 mg/mL contra las bacterias *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, y *Salmonella Typhi* ATCC 19430 partiendo de un inóculo de 10^5 UFC/mL. Reportando un efecto bactericida a 2 mg/mL de aceite esencial de orégano, cuya concentración es similar a la encontrada en la presente investigación, sin embargo se manejó una cepa diferente (*Salmonella sp*) con un inóculo (10^5 UFC/mL).

Con respecto a *L. monocytogenes*, Ghalfi y col. (2006) probaron la actividad de aceite esencial comercial *Origanum vulgare* (Pranarom®), a concentraciones en un rango de 0.4 a 4 mg/mL contra *L. monocytogenes* partiendo de un inóculo 10^2 UFC/mL. reportando un efecto bactericida a 4 mg/mL de aceite esencial comercial, cuya concentración es 2.5 veces menor que la

reportada en la presente investigación, sin embargo se maneja una densidad de población menor (10^5 UFC/mL).

7.4. Determinación de la concentración mínima bactericida del aceite esencial contra *B. thermosphacta*, *L. plantarum*, *M. luteus* y *P. fragi*.

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos de la CMB del aceite esencial de orégano libre contra *B. thermosphacta*, donde podemos observar que a partir de una concentración de 2.5 y 5 mg/mL se logra una completa inhibición de *B. thermosphacta*. a las 12 y 8 horas respectivamente, sin presentar crecimiento durante su monitoreo en 24 horas. Las concentraciones de 0.5 y 1.25 mg/mL mostraron un efecto bacteriostático las primeras 12 horas generando una barrera antimicrobiana para su uso en alimentos de consumo rápido.

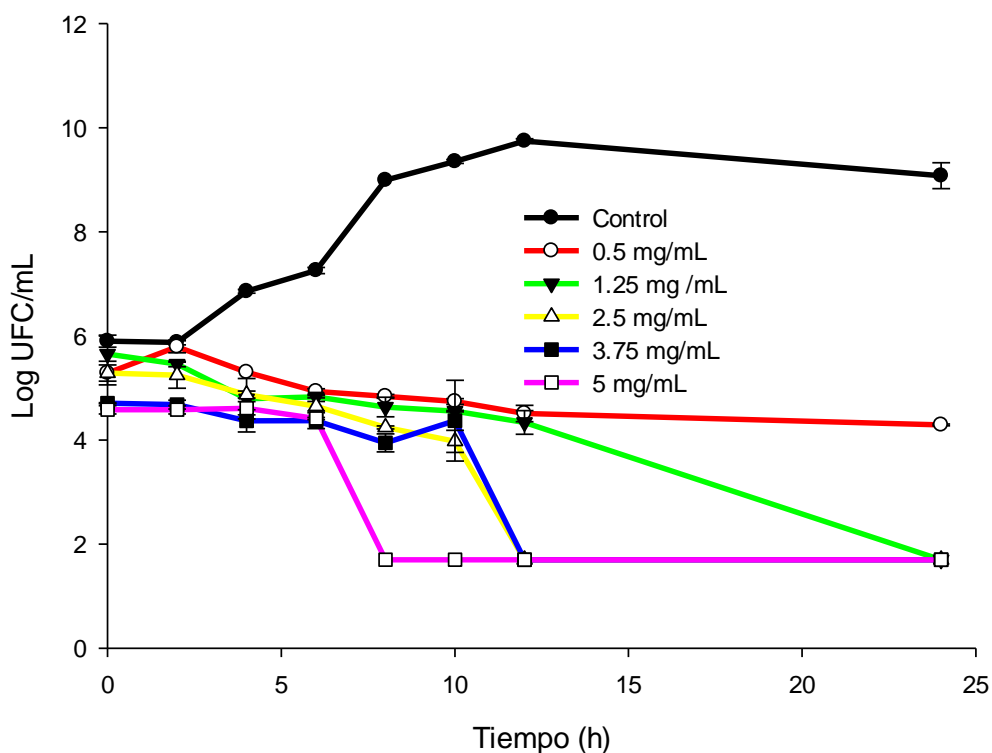


Figura 10. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra *B.thermosphacta*

Posteriormente se realizó el estudio para determinar la concentración mínima bactericida del aceite esencial de orégano contra *L. plantarum*, en la figura 11 se observa que entre una concentración de 3.75 mg/mL a 5 mg/mL se logra una completa inhibición a las 12 y 8 horas respectivamente, sin presentar crecimiento durante su monitoreo en 24 horas. La concentración de 1.25 mg/mL mostro un efecto bacteriostático a diferencia de de la concentración menos la cuál tuvo un comportamiento similar al control.

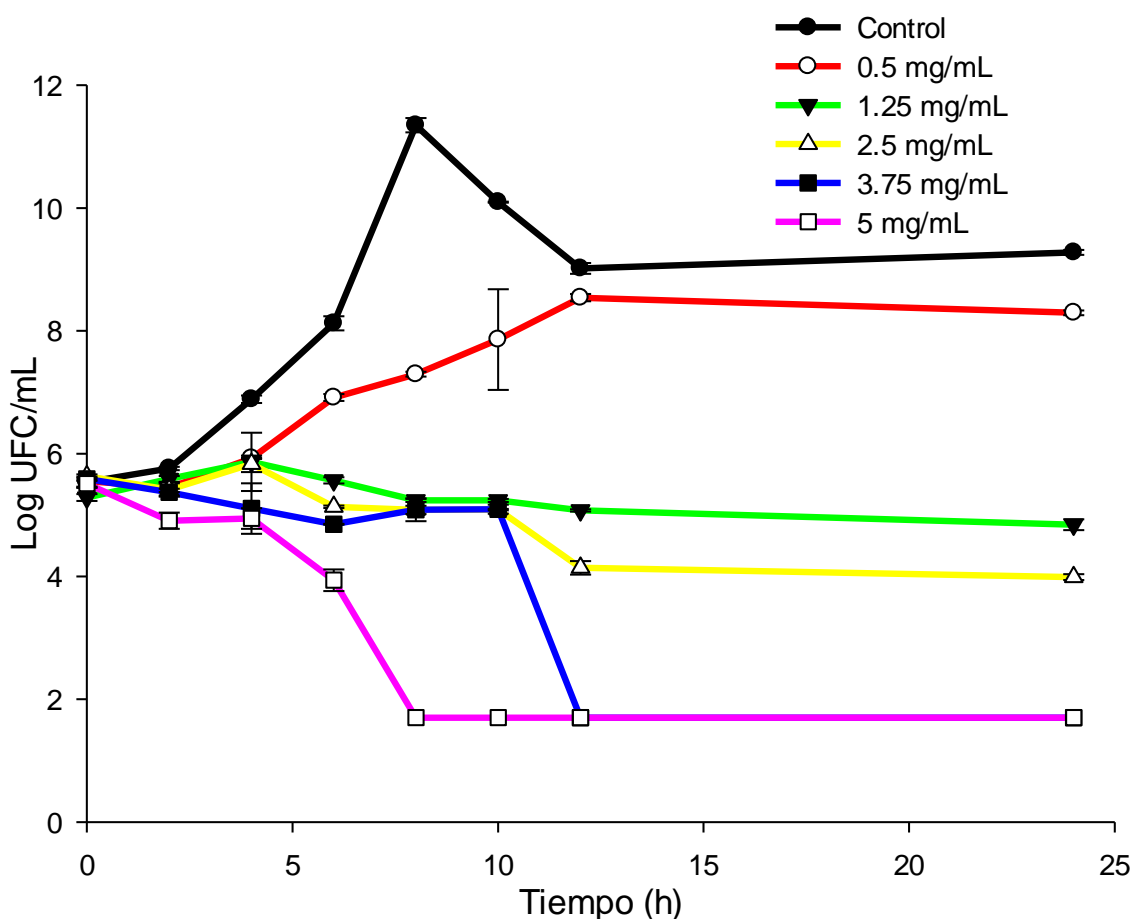


Figura 11. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra *L. plantarum*

Por su parte, el aceite esencial de orégano tuvo una actividad antimicrobiana contra *M. luteus* en concentraciones de 0.075 a 0.1 mg/mL (Figura 12), logrando una completa inhibición sin presentar crecimiento en el monitoreo de

24 horas. Con respecto a los experimentos anteriores las concentraciones son bajas, pudiendo concluir su alta sensibilidad al aceite esencial. Las concentraciones inferiores muestran un umbral de sensibilidad muy bajo, debido a que el mínimo cambio en las concentraciones varía el efecto bacteriostático.

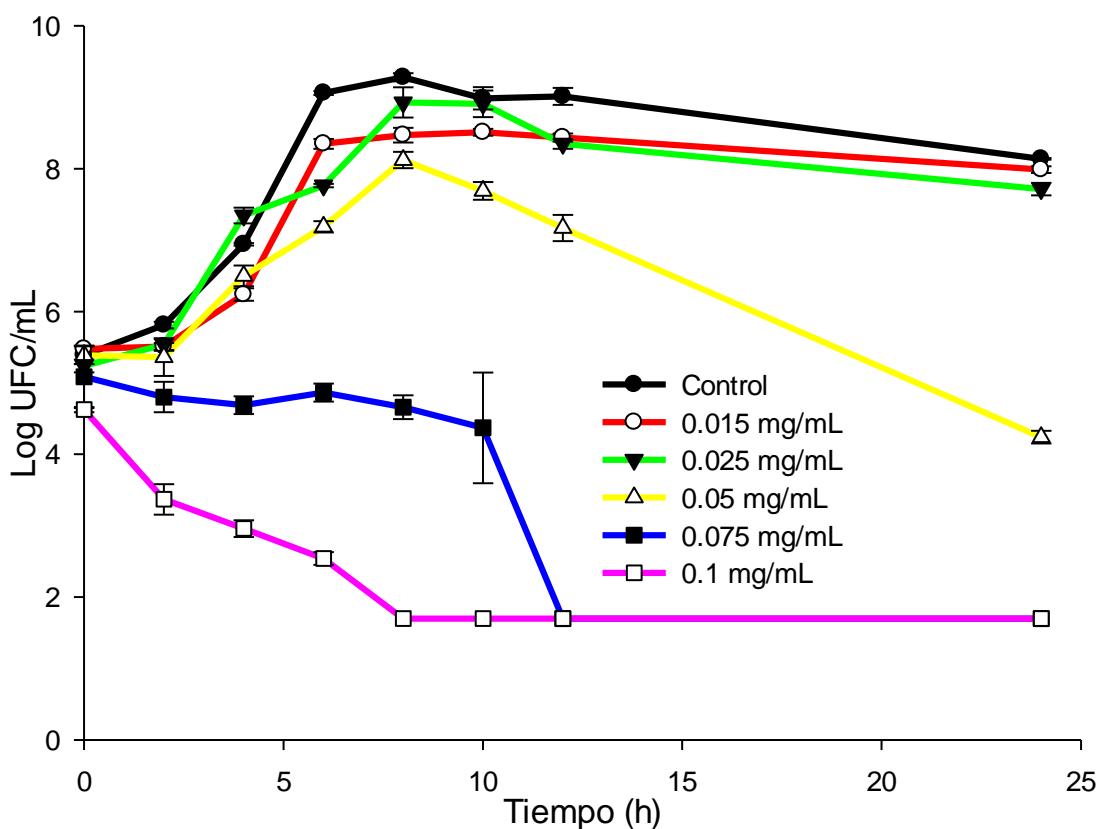


Figura 12. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra *M. luteus*.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos de la CMB del aceite esencial de orégano libre contra *Pseudomonas fragi*.

Donde podemos observar que a partir de una concentración de 3.75 y 5 mg/mL se logra una completa inhibición de *P. fragi* a las 8 y 6 horas respectivamente, sin presentar crecimiento durante su monitoreo en 24 horas.

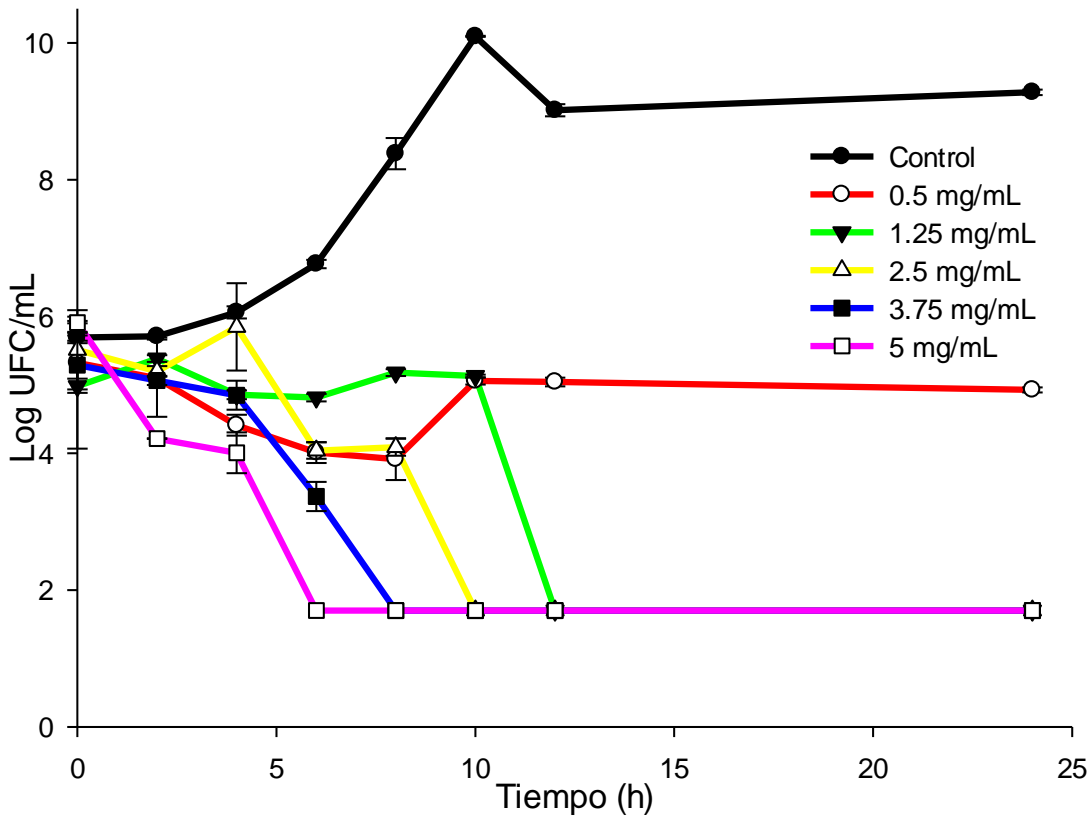


Figura 13. Concentración mínima bactericida de aceite esencial de orégano contra *P. fragi*.

Mith y col (2014) probaron la actividad antimicrobiana de aceite esencial de orégano (*Origanum heracleoticum*) a concentraciones en un rango de 0.1 a 4.16 mg/mL contra *B. thermosphacta* ATCC 11509 y *Pseudomonas fluorescens*, partiendo de un inóculo de 10^4 UFC/mL.

Reportando un efecto bactericida a 0.42 mg/mL, cuya concentración es 12 veces menor y 0.83 mg/mL concentración 6 veces menor respectivamente, que la encontrada en la presente investigación.

Sin embargo la composición del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) es de 66.3% timol y 0.1 % carvacrol reportado por Hernández y col (2014), y la composición del aceite esencial de orégano (*Origanum*

heracleoticum), timol del 7.47% y 68.14% de carvacrol (Mith *et al.*, 2014), es un factor que podría estar influyendo en la actividad antimicrobiana, el uso de otra cepa (*B. thermosphacta* y *P. fragi*) y el inóculo mayor (10^5 UFC/mL) son otras variables.

Con respecto a *L. plantarum*, Kivanç y col (1991), probaron la actividad antimicrobiana de aceite esencial de orégano (*Origanum onites* L) a concentraciones en un rango de 1.25 a 5 mg/mL contra *L. plantarum* NRRL B-4496, partiendo de un inóculo de 10^6 UFC/mL. El reto antimicrobiano se llevó a cabo bajo condiciones de 35°C durante 24 h, reportando un efecto inhibitorio a 1.25 mg/mL cuya concentración es 3 veces menor que la encontrada en los experimentos realizados.

7.5. Determinación de la actividad antimicrobiana del AE microencapsulado y nanoemulsionado por difusión en agar en medio semisólido

No se presentó diferencia significativa entre el aceite esencial nanoemulsionado y microencapsulado para todos los microorganismos estudiados (Cuadro 32). El método utilizado difusión en disco para el análisis microbiológico.

El más sensible de los microorganismos que se utilizaron para realizar la actividad antibacteriana, fue *M. luteus*, mostrando una zona de inhibición mayor con diferencia a los demás microorganismos.

Con respecto al aceite esencial nanoemulsionado y microencapsulado contra *M. luteus* no muestra diferencia significativa como se muestra en el Cuadro 34.

Gram-positivas muestran una sensibilidad mayor a compuestos fitoquímicos en plantas. Estos microorganismos ha mostrado sensibilidad al timol, carvacrol, eugenol, α -pineno, β -pineno, linalool, terpineno-4-ol, y terpineol, siendo todos estos compuestos del aceite esencial de orégano *L. graveolens* Kunth (Hernández *et al.*, 2014).

Cuadro 34. Diámetros de la zona de inhibición obtenidos con el aceite esencial por difusión en agar contra los microorganismos en estudio

| Microorganismo | AE Nanoemulsionado diámetro de inhibición (cm) | AE Microencapsulado diámetro de inhibición (cm) |
|-------------------------|--|---|
| <i>L. monocytogenes</i> | 2.81± 0.09 ^{Ba} | 2.60± 0.09 ^{Ba} |
| <i>L. innocua</i> | 2.55± 0.06 ^{Ca} | 2.59± 0.09 ^{Ba} |
| <i>Salmonella sp.</i> | 2.51± 0.03 ^{Ca} | 2.46± 0.03 ^{Ba} |
| <i>B. thermosphacta</i> | 2.48± 0.01 ^{Ca} | 2.46± 0.02 ^{Ba} |
| <i>L. plantarum</i> | 2.54± 0.07 ^{Ca} | 2.43± 0.02 ^{Ba} |
| <i>P. fragi</i> | 2.58± 0.10 ^{Ca} | 2.45± 0.01 ^{Ba} |
| <i>M. luteus</i> | 3.44± 0.07 ^{Aa} | 3.60± 0.16 ^{Aa} |

Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey (p<0.05)

L. monocytogenes fue el segundo más sensible, de acuerdo con Ghalfi y col. (2006), las bacterias Gram positivas son más sensibles a los compuestos presentes en el aceite esencial.

Con respecto a *Salmonella sp.*, fue sensible a los dos tratamientos mostrando un diámetro de inhibición sin diferencia significativa. Se puede destacar lo reportado por Burt y col. (2004), bacterias Gram negativas como *S. typhimurium* son más sensibles al timol que al carvacrol.

De acuerdo a lo reportado por Hernández y col. (2014), compuestos como el eugenol, geranilo de acetato, β-pineno, terpineno-4-ol, terpineol y α-terpinoleno muestran actividad antibacteriana contra en *P. fragi* y *Salmonella sp.* Teniendo un comportamiento similar entre ambos microorganismos Gram negativos (Cuadro 34).

B. thermosphacta tuvo la misma sensibilidad en los dos tratamientos, probablemente a que no existe una pérdida, en la proporción de los compuestos

fenólicos, en el proceso de microencapsulación en comparación a la nanoemulsión. Hernández y col. (2014) reportan que compuestos presentes en el aceite esencial, inhiben el crecimiento de *B. thermosphacta*, como, eugenol, geranil acetato, timol, linalol, β -pineno, carvacrol, terpineno-4-ol, y terpineol, siendo los más efectivos timol y carvacrol.

L. plantarum mostro el mismo comportamiento que los otros microorganismos deterioradores que se utilizaron en la presente investigación, la actividad antibacterial pudo deberse a la presencia de timol el cual ha sido reportado por Dorman y col. (2000) como altamente efectivo contra este microorganismo.

A causa del alto costo de los compuestos individuales, el uso del aceite esencial es una buena opción para ser usado como un antimicrobiano de barrera para la inocuidad de la carne de cerdo.

7.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana del recubrimiento a base de almidón modificado y aceite esencial de orégano en carne de cerdo fresca.

Las emulsiones de AEO y almidón modificado se obtuvieron por homogeneización y sonicado y posteriormente se microencapsularon. Se utilizó carne de cerdo (músculo Longissimus dorsi) como sistema modelo para ver el efecto inhibitorio de la nanoemulsión y el microencapsulado. Se cuantificó la microbiota de la carne (*B. thermosphacta* y bacterias ácido lácticas).

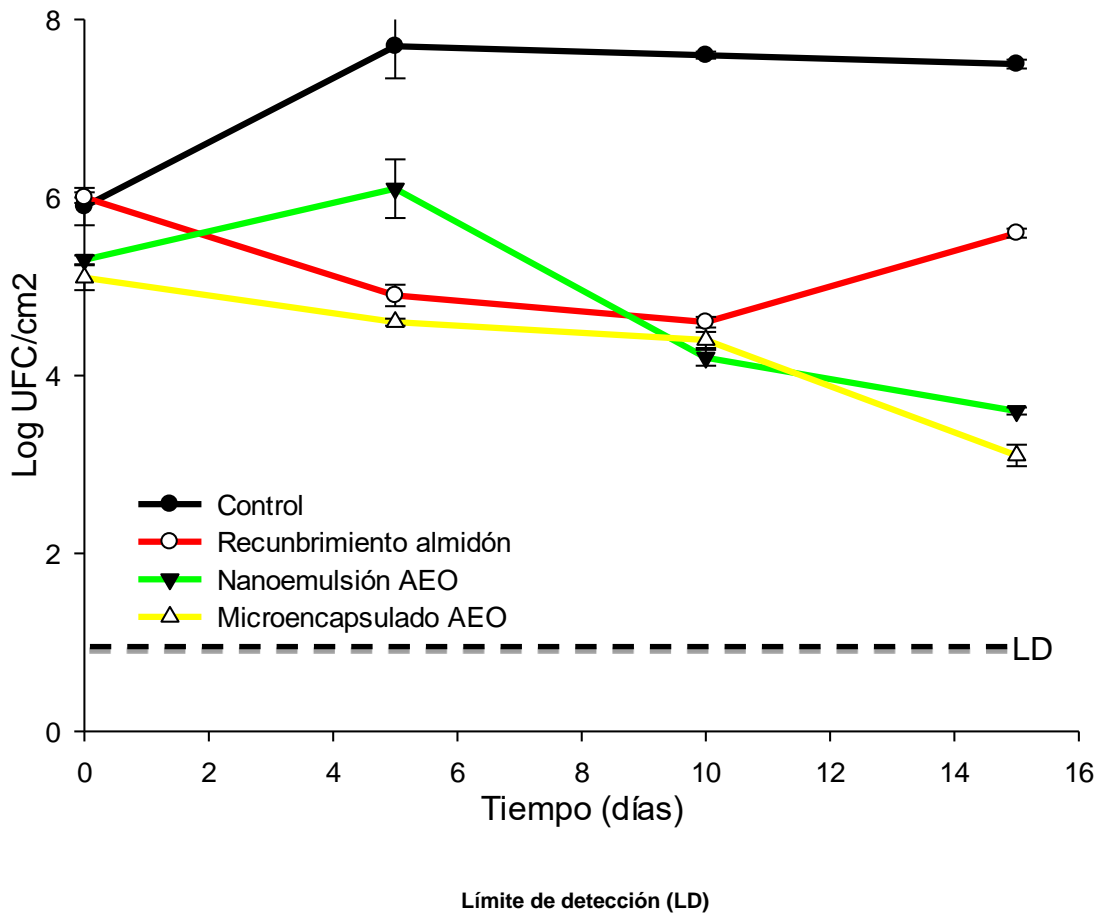


Figura 14. Efectividad del aceite esencial de orégano contra *Salmonella* sp.

En la Figura 14 se muestra el control reto utilizando *Salmonella* sp. sobre la carne con un inóculo de 1.8×10^5 UFC, se muestra una reducción de 4.4 Log UFC/cm² contra el control, teniendo la misma tendencia entre los tratamientos de nanoemulsión y microencapsulado, mostrando a las cero horas una disminución inmediata de 1 Log, lo que nos indica que la actividad antimicrobiana es efectiva al contacto con la carne de cerdo. Los compuestos activos del aceite esencial y que le otorgan las características de agente antimicrobiano son timol y carvacrol de acuerdo a lo reportado por Hernández y col. (2014). Con respecto a estos dos compuestos Yu y col. (2010) realizaron un reto antimicrobiano contra *Salmonella Typhimurium*, en la superficie inoculada de tomates cherry y obteniendo una

reducción logarítmica similar de 4.3 Log. Esto indica que el aceite esencial de orégano es efectivo contra agentes patógenos en carne de cerdo.

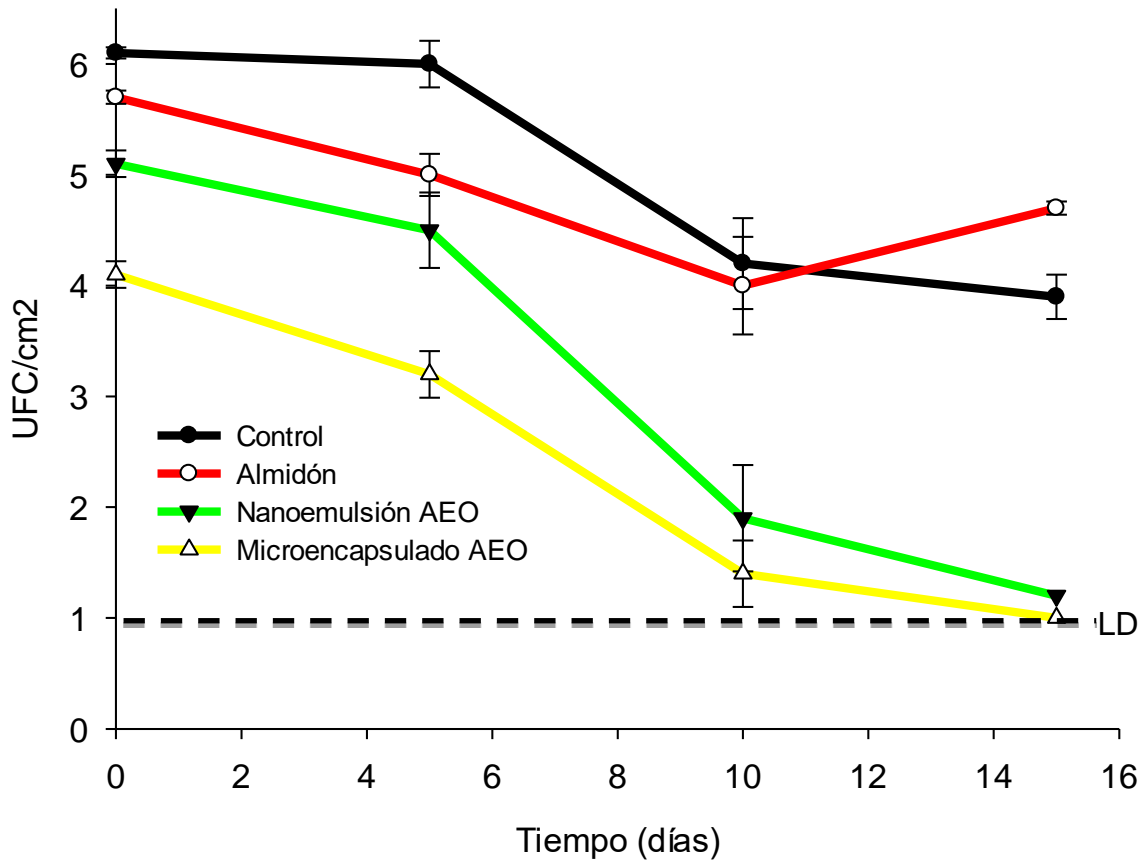


Figura 15. Efectividad del aceite esencial de orégano contra Bacterias ácido lácticas.

La actividad antimicrobiana contra deterioradores como Bacterias ácido lácticas en la carne de cerdo muestra una efectividad bactericida, se puede observar (Figura 15) una disminución de 2.1 Log contra el control y el aceite microencapsulado esto nos indica que el primer contacto inicia un efecto bacteriostático en el alimento. La nanoemulsión con una reducción de 1 Log en contra del control de igual manera en la hora cero. Con respecto al final del experimento se observa un efecto bactericida lo que nos muestra la efectividad del aceite esencial. Lo reportado con Veras y col. (2012) existe un efecto

bactericida en bacterias Gram positivas es mucho mayor que en Gram negativas al usar *Lippia sidoides* el cual tiene un contenido de Timol (11.8%) y carvacrol (12.9%), el resultado obtenido en este estudio sugiere que los compuestos volátiles suprimen el crecimiento de bacterias deterioradoras.

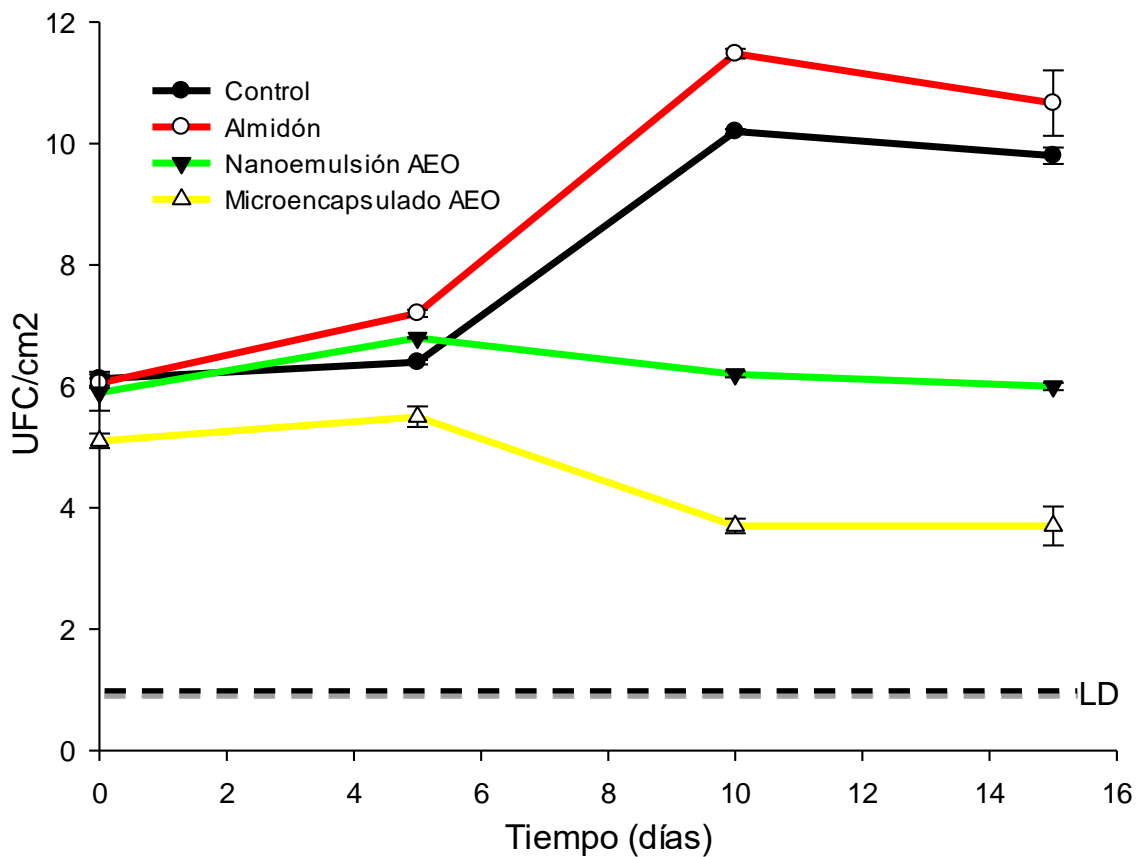


Figura 16. Efectividad del aceite esencial de orégano contra *B. thermosphacta*.

Con respecto a *B. thermosphacta* tiene una efectividad menor al primer contacto con respecto al experimento anterior contra BAL, mostrando una disminución de 2.4 Log en el aceite microencapsulado comparado con el control, sin embargo en los demás tratamientos no existió una disminución notoria. Mostrando en el control y el almidón elevación de 4 Log aproximadamente, lo reportado por Gutierrez y col (2009), podría deberse al proceso adaptativo y uso

de nutrientes existentes en la carne. Caso contrario con el aceite nanoemulsionado.

Lo reportado con Doulgeraki y col. (2012) existe un crecimiento de *B thermosphacta* aun encontrándose en condiciones de refrigeración y empaçado al vacío, este estudio sugiere que la resistencia del microorganismo no se ve afectada por las condiciones a las que se someta la carne.

7.7. Evaluación de la actividad antioxidante (TBARS) del recubrimiento a base de almidón modificado y aceite esencial de orégano en carne de cerdo fresca.

Se muestran las diferencias de los tratamientos (Figura 17) en los miligramos por kilogramo de malonaldehído, la menor cantidad de este compuesto expresa una actividad antioxidante sobre la carne, mostrando una efectividad en los tratamientos en los cuales se encuentra el aceite esencial de orégano.

Lo reportado por Hernández-Hernández y col. (2009) existe una actividad antioxidante mayor en el Orégano europeo (*Origanum vulgare*) comparado contra Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) debido a la alta concentración de fenoles totales, siendo un antioxidante eficaz.

Esto muestra que el Aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), tiene mayor actividad debido a la alta concentración de fenoles que reporta Hernández-Hernández y col. (2014), tal como el timol que es el compuesto mayoritario en el aceite esencial. La disminución de las especies reactivas de ácido tiobarbitúrico que se presenta en el grupo control y almidón, puede deberse a lo reportado por Gutierrez y col (2009), quien habla de un efecto sinérgico entre los componentes de los alimentos con los radicales libres que son generados.

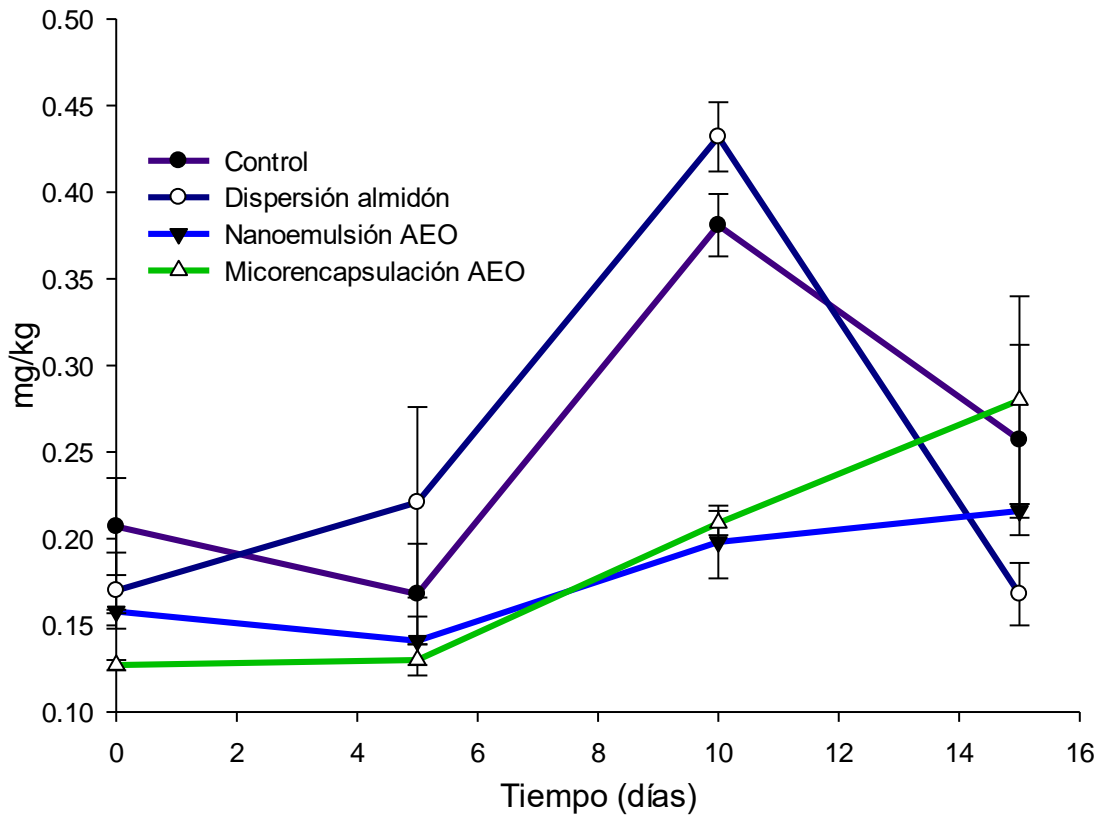


Figura 17. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano nanoemulsionado y microencapsulado.

CONCLUSIONES

Se obtuvo el aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) con rendimientos de 0.026 mL por gramo de hojas y flores secas de orégano, no mostro una diferencia de rendimientos con respecto a la cosecha.

Se obtuvieron nanoemulsiones con aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y una dispersión de almidón, utilizando los métodos de homogeneización y ultrasonido, obteniendo un tamaño de partícula nanométrico de 116 nm.

Se determinaron las concentraciones mínimas bactericidas en medios líquido, semisólido y difusión en disco, contra bacterias patógenas (*L. monocytogenes* y *Salmonella* sp) y deterioradoras (*B. thermosphacta*, *L. plantarum*, *M. luteus* y *P. fragi*.)

El aceite esencial de orégano nanoemulsionado y microencapsulado es capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* sp. cómo patógeno y deterioradores como *B. thermosphacta* y bacterias ácido lácticas en carne de cerdo, haciendo del aceite esencial una alternativa para asegurar la inocuidad antimicrobiana.

La actividad antioxidante del aceite de orégano muestra una efectividad alta en carne de cerdo fresca envasada al vacío, logrando así una mayor vida de anaquel.

REFERENCIAS

- Abas A**, Singh P, Shah M, Schweiggert U, Gul K, Wani I. **2012**. Rice starch diversity: effects on structural morphological, thermal, and physicochemical properties. *Compr Rev Food Sci F*. 11: 417-436.
- Alarcón-Rojo**, A. D. **1992**. Constitución química y bioquímica del músculo y calidad de la carne. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia, División de Posgrado e Investigación.
- Albado E**, Saez G, Gabriel S. **2001**. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered*. 12: 16-19.
- Arana-Sanchez A**, Estarron-Espinosa M, Obledo-Vázquez E.N, Padilla-Camberos E, Silva-Vázquez R, Lugo-Cervantes E. **2009**. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in b-cyclodextrin. *Lett Appl Microbiol*. 50: 585-590.
- Carmo E**, Lima E y Souza E. **2008**. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian J Microbiol*. 39: 362-367.
- Celestino A**, Jaime B, Luevano R, Solís L, García S, Heredia N. **2014**. Reducton of foodborne pathogens in parsley by an improved formulation containing lime and oregano extracts. *J Food Agric Environ*. 12: 6-12.
- Daker M**, Abdulla, N. Vikineswary S, Goh, P. Kuppusamy, U. **2008**. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabilizer of lipid-rich foods. *Food Chem*. 107: 1092-1098.
- Fasahat P**, Rahman S, Ratnam W. **2014**. Genetic controls on starch amylose content in wheat and rice grains. *J Genet*. 93: 279-292.
- Garcia R.M**, Palou-Garcia E. **2008**, Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*. Pp. 41-51.

- Ghalfi H, Benkerroum N, Doguiet D, Bensaid M, Thonart P. 2006.** Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWDI-B28 and selected essential oil to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage. *Lett Appl Microbiol.* 44: 268-273.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Cahmbin O, Voilley A, Saurel R. 2007.** Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Inter.* 40: 1107-1121.
- Golmakani MT, Rezaei K. 2007.** Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* 109: 925-930.
- Gutierrez L. Batle, R. Sanchez, C. and Nerin, C. 2010.** New approach to study the mechanism of antimicrobial protection of an active packaging. *Foodborne Pathog Dis.* 9: 1063-1069.
- Hamid A, Aiyelaagbe O, Usman L, Ameen O, Lawal A. 2010.** Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *Afri J Appl Chem.* 4(8): 142-151.
- Hernández-Hernández E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo Flores ME, Guerrero-Legarreta. 2009.** Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci.* 81: 410-417.
- Hernández-Hernández E, Regalado-González C, Vázquez-Landaverde P, Guerrero-Legarreta I, García-Almendárez B. 2014.** Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *Sci World J.* ID 641814, pp 1-12.
- Holley RA, Patel D. 2005.** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22: 273-292.
- Hultin, H. O. 1993.** Características del tejido muscular en Química de los Alimentos. Fennema, O. R. (Ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 815-888.
- Jafari SM, He Y, Bhandari B. 2007.** Production of submicron emulsion by ultrasound and microfluiztion techniques. *J Food Eng.* 82: 478-488.

- Karakaya S, Nehir S, Karagözlü N, Şahin S. 2011.** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) by using different extraction methods. *J Med Food*. 14: 645-652.
- Kentish S, Wooster, T.J., Ashokkumar, M, Balachandran S, Mawson, R, Simons L. 2008.** The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innov. Food Sci. Emerg.* 9:170-175.
- Kerwin BA. 2008.** Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *J Pharm Sci.* 97: 2924 - 2935.
- Kivanc M, Akgül A, Dogan A. 1991.** Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Lueconostoc mesenteroides*. *Int J Food Microbiol.* 13: 81-86.
- Koroleva M y Yurtov E.V. 2012.** Nanoemulsions: the properties, method of preparation and promising applications. *Russ Chem Rev.* 81: 21-43.
- Lambert R, Skandamis P, Coote P, Nychas G. 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Applied Microbiol.* 91:453-462.
- Lu Y, Wu C. 2010.** Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. *J Food Prot.* 73: 2270-75.
- Maindarkar S, Hoogland H, Henson M. 2015.** Predicting the combined effects of oil and surfactant concentrations on the drop size distributions of homogenized emulsions. *Colloids Surf. A.* 467: 18-30.
- McClements D.J. y Rao, J. 2011.** Food grade nanoemulsiones: Formulations, fabrication, properties, performance, biological fate and potencial toxicity. *Crit Rev Food Sci.* 51: 285-330.
- Miles AA y Misra SS. 1938.** The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.* 38: 732-748.
- Min B y Ahn DU. 2005.** Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products. *Food Sci Biotechnol.* 14(1): 152-163.

- Mith H, Dure R, Delcenserie V, Zhiri A, Daube G, Clinquart A. 2014.** Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr.* 2(4): 403-416.
- Moon JK, Shibamoto T. 2009.** Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem.* 57: 1655-1666.
- Porras M, Solans C, González C, Gutiérrez J.M. 2008.** Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method. *Physicochem Eng Aspects.* 324: 181-188.
- Rojas-Graü MA, Salvia-Trujillo L, Soliva-Fortuny R, Martín Belloso O. 2012.** Edible films and coatings. In: Decontamination of fresh and minimal processed produce. Ed. Gómez-López, V. M. John Wiley & Sons. Chapter 14. Pp. 247-275.
- Schweigert, B. S. 1994.** Contenido en nutrientes y valor nutritivo de la carne y los productos cárnicos. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acirbia, Zaragoza, España. 249-277.
- Sole I, Solans C, Maestro A, González C, Gutiérrez JM. 2012.** Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J Colloid Interf Sci.* 376: 133-39.
- Sozmen F, Uysal B, Köse EO, Aktas Ö, Cinbilgel I, Oksal B. 2012.** Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* P.H. Davis with two different methods: comparison of the oil composition and antibacterial activity. *Chem Bio J.* 9: 1356-1363.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. 2004.** Formations and stability of nano-emulsions. *Ad Colloids Interf Sci.* 108: 303-318.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M 2004.** In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi*. *Food Chem.* 90: 1132-1137.
- Ultee A, Bennik, M. y Moezelaar R. 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 68: 1561-1568.

- Veras** H, Rodrigues F, Colares A, Menezes I, Countinho H, Botelho M, Costa J. **2012**. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *J Fitot.* 83: 508-512.
- Viuda-Martos** M, El-Nasser A, Gendy E, Sendra E, Fernandez-Lopez J, Omer E, Pérez-Alvarez J. **2010**. Chemical composition and antioxidant and anti-Listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *J Agric Food Chem.* 58: 9063-9070.
- Viuda-Martos** M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J Perez-Alvarez J. **2006**. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J Food Safety.* 27: 91-101.
- Yu** L, Li C, Xu J, Hao J, Sun D. **2015**. Highly stable concentrated nanoemulsions by the phase inversion composition method at elevated temperature. *J. Am. Chem. Soc.* 28: 14547-14552.