

- ▶ Antimicrobial activity of nanoencapsulated oregano essential oil against *Staphylococcus aureus* in tomato juice and green juice

14

# Actividad antimicrobiana del ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO NANOENCAPSULADO CONTRA *Staphylococcus aureus* en jugo de jitomate y jugo verde

UDLAP®

Por:  Nancy Ruiz-González • Aurelio López-Malo • Enrique Palou •  
Nelly Ramírez-Corona • María Teresa Jiménez-Munguía<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Los autores agradecen el soporte financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México (números de adjudicación CB-2016-01-283636 y SRE-CONACYT-278363) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP). Además, Nancy Ruiz-González agradece al CONACYT y a la UDLAP por el financiamiento para sus estudios de Doctorado en Ciencia de Alimentos.



## RESUMEN

Las propiedades funcionales de los aceites esenciales (AE) son atribuidas a sus componentes, muchos de los cuales tienen propiedades antimicrobianas. Sin embargo, los AE son inestables, por lo que la encapsulación es una alternativa para protegerlos. En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (AEO) nanoencapsulado por la técnica de emulsión contra *Staphylococcus aureus* en jugo de jitomate y jugo verde. Los jugos fueron caracterizados de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas. La nanoemulsión fue preparada al 5% (p/p) de AEO y caracterizada mediante la distribución granulométrica de las gotas de AEO, dispersas en la nanoemulsión. Se evaluó la actividad antimicrobiana de la nanoemulsión de AEO, mediante curvas de inhibición microbiana, las cuales fueron ajustadas aplicando el modelo de Weibull. La nanoemulsión de AEO disminuyó efectivamente la población bacteriana de *S. aureus* en los jugos después de 10 a 20 minutos de ser aplicada. Se observó que la inhibición total de *S. aureus* (6-log), fue más rápida en el jugo verde, con respecto al jugo de jitomate. El modelo de Weibull se adaptó adecuadamente a las curvas de inhibición de *S. aureus*.

## PALABRAS CLAVE

Antimicrobiano · Aceite esencial · Nanoemulsión · Nanoencapsulación · Patógenos

## LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS aceites esenciales

(AE) SON ATRIBUIDAS A SUS COMPONENTES, MUCHOS DE LOS CUALES TIENEN PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS.





**LOS AE SON  
INESTABLES  
BAJO CIERTAS  
CONDICIONES  
AMBIENTALES  
(MISHARINA, 2003).**

### ◆◆ ABSTRACT

The functional properties of essential oils are attributed to their components, many of which have antimicrobial properties. Essential oils are unstable compounds, therefore, encapsulation is an alternative to protect them. In this study, the antimicrobial activity of oregano essential oil nanoencapsulated by emulsification, against *Staphylococcus aureus*, in tomato juice and green juice was evaluated. Juices were characterized by their physicochemical properties. The nanoemulsion was prepared at 5% (w/w) of oregano essential oil, and characterized by the particle size distribution of the oregano essential oil droplets, dispersed in the nanoemulsion. The antimicrobial activity of oregano essential oil nanoemulsion was evaluated by microbial inhibition curves, which were fitted with Weibull model. The nanoemulsion of oregano essential oil effectively decreased the bacterial population of *S. aureus* in juices after 10 to 20 min of being applied. It was observed that the total inhibition of *S. aureus* (6-log) was faster in green juice than in tomato juice. The Weibull model was adequately adapted to the inhibition curves of *S. aureus*.

### ◆◆ KEYWORDS

**Antimicrobial · Essential oil · Nanoemulsion  
· Nanoencapsulation · Pathogens**

### ◆◆ INTRODUCCIÓN

Los jugos son productos que tienen una corta vida útil debido a que son susceptibles al

deterioro microbiano y enzimático (Winniczuk and Parish, 1997). Además, estos alimentos pueden ser vehículos de microorganismos patógenos causantes de enfermedades (Dewanti-Hariyadi, 2013). El método más utilizado para el control microbiano en jugos es el procesamiento térmico, sin embargo, puede causar pérdida de nutrientes, así como un cambio en las propiedades sensoriales del alimento (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso, 2006). Actualmente los consumidores buscan productos inocuos, frescos y menos procesados, lo que sugiere la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de conservación de alimentos. Los aceites esenciales (AE) y sus componentes han demostrado tener actividad antimicrobiana contra los patógenos comunes en los alimentos (Burt, 2004), sin embargo, los AE son inestables bajo ciertas condiciones ambientales (Misharina, 2003), por lo que una alternativa para protegerlos es la encapsulación. Se han llevado a cabo estudios sobre la actividad antimicrobiana de los AE en sistemas modelo, los cuales tienen una mayor efectividad antimicrobiana al ser encapsulados (Hernández, Hernández et al., 2014; Ayala-Zavala et al., 2007), sin embargo, en alimentos los estudios aún son escasos. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (AEO) nanoencapsulado por la técnica de emulsión contra *Staphylococcus aureus* en jugo de jitomate y jugo verde.

## ◆◆ METODOLOGÍA

### • Caracterización fisicoquímica de los jugos

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

### • Preparación y caracterización de la nanoemulsión

La nanoemulsión al 5% (p/p) de AEO (fase dispersa) fue preparada utilizando 10% (p/p) de inulina como agente encapsulante. Se utilizó 3% (p/p) de polisorbato 80 (Tween 80) como agente emulgente en la fase continua. La nanoemulsión fue homogeneizada utilizando un equipo ultrasónico (Ultrasonic Processor CP 505, Cole Parmer, USA) a 84  $\mu\text{m}$  de amplitud, durante 15 minutos (Ruiz González *et al.*, 2019).

La distribución granulométrica de las gotas del AEO dispersas en la nanoemulsión, se determinó por triplicado usando un analizador de partícula de dispersión dinámica de luz láser (Nanotrak Wave II, Microtrac, EE. UU.).

## ◆◆ EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA NANOEMULSIÓN EN JUGOS

### • Preparación del cultivo microbiano y de la suspensión bacteriana

Para la preparación del cultivo microbiano se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 25923, la cual fue provista por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, México. La preparación del cultivo microbiano y de la suspensión bacteriana ( $10^8$  CFU/mL) se llevó a cabo de acuerdo con Ruiz-González *et al.*, (2019).

### • Cálculo de la concentración mínima inhibitoria en jugos

Se prepararon diluciones de la nanoemulsión de AEO en jugo de jitomate o jugo verde, en tubos de 10 mL, añadiendo la cantidad de nanoemulsión necesaria para obtener concentraciones de 0.1-2  $\mu\text{L/mL}$  de AEO. Por otro lado, se añadió a cada uno de los tubos la cantidad necesaria de la suspensión bacteriana, para obtener una concentración de  $10^8$  CFU/mL. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas, para después evaluar el crecimiento microbiano, utilizando la técnica de vertido en placa en agar de soya tripticaseína (STC). El valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) corresponde a la menor concentración de nanoemulsión que resultó negativa a crecimiento después de la incubación de las placas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Este análisis se llevó a cabo por duplicado.





**LA NANOEMULSIÓN AL 5% (P/P) DE AEO (FASE DISPERSA) FUE PREPARADA UTILIZANDO 10% (P/P) DE INULINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE. SE UTILIZÓ 3% (P/P) DE POLISORBATO 80 (TWEEN 80) COMO AGENTE EMULGENTE EN LA FASE CONTINUA.**

#### • Curvas de inhibición microbiana

Se preparó una dilución de la nanoemulsión de AEO en jugo de jitomate o jugo verde, de acuerdo al valor de la CMI detectada para el AEO nanoencapsulado, en un vaso de precipitados de 50 mL. La dilución de la nanoemulsión se inoculó añadiendo la cantidad necesaria de la suspensión bacteriana, para lograr una concentración de  $10^6$  CFU/mL. El vaso de precipitados conteniendo la dilución inoculada, se mantuvo en agitación a 120 rpm durante 2 horas y se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes periodos de tiempo, para evaluar la carga microbiana. El conteo microbiano se llevó a cabo utilizando el método de recuento total de placas en agar STC. Las placas se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Este análisis se llevó a cabo por duplicado.

#### • Modelación de curvas de inhibición microbiana

Para describir el efecto de la nanoemulsión de AEO en la cinética de inhibición de *S. aureus* inoculada en jugos, se utilizó el modelo de Weibull (eq. 1).

$$\log N/N_0 = -b/t^n$$

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

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

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

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

## ◆◆ RESULTADOS

### • Caracterización fisicoquímica de los jugos

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los jugos se muestran en la tabla 1.

Los sólidos solubles ( $^\circ\text{Bx}$ ) en frutas enlatadas, jugos de frutas y productos similares, se usan comúnmente como un término conveniente para expresar el porcentaje en peso de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido. Se han reportado valores de  $^\circ\text{Bx}$  para distintos tipos de jugos de frutas y verduras comerciales (3.1 a  $22^\circ\text{Bx}$ ) (USDA, 2013). Estos valores concuerdan con los valores reportados en este estudio para jugo de jitomate ( $5.47 \pm 0.06^\circ\text{Bx}$ ) y para jugo verde ( $11.43 \pm 0.06^\circ\text{Bx}$ ). Por otro lado, el valor de pH en jugos de frutas y verduras es un parámetro muy importante ya que está relacionado con su estabilidad microbológica, dado que dichos alimentos pueden ser vehículos de microorganismos patógenos y causantes de deterioro. En general, las frutas y jugos de frutas tienen un pH bajo (2.0-4.5), dado a su alto contenido de ácidos orgánicos (Dewanti-Hariyadi, 2013). En este estudio, se obtuvieron valores similares para jugo de jitomate ( $3.51 \pm 0.01$ ) y jugo verde ( $3.71 \pm 0.01$ ). Otro parámetro importante de la caracterización de jugos es la  $a_w$ , la cual hace referencia a la cantidad de agua libre que está disponible en los alimentos para el crecimiento microbiano. Se han reportado algunos valores de  $a_w$  para jugos de frutas (0.984) (Mathlouthi, 2001), que son cercanos a los obtenidos en este estudio para jugo de jitomate ( $0.992 \pm 0.003$ ) y jugo verde ( $0.988 \pm 0.001$ ). La viscosidad de un fluido es una medida de su resistencia a las deformaciones graduales. En algunos alimentos como los jugos, este atributo es importante ya que define la aceptación por parte del consumidor. Algunos autores han reportado valores de viscosidad para jugos de fruta en el rango de 51-350 mPa (Kim, Yoo and Yoo, 2014), lo cual concuerda con los datos reportados en este estudio para jugo de jitomate ( $200.00 \pm 0.01$  mPa) y jugo verde ( $80 \pm 0.00$  mPa).

# RESULTADOS DEL ESTUDIO

## 1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS JUGOS

- ▶ Las frutas y jugos de frutas tienen un pH bajo (2.0-4.5), dado a su alto contenido de ácidos orgánicos (Dewanti-Hariyadi, 2013). En este estudio, se obtuvieron valores similares para jugo de jitomate ( $3.51 \pm 0.01$ ) y jugo verde ( $3.71 \pm 0.01$ ).

En algunos alimentos como los jugos, este atributo es importante ya que define la aceptación por parte del consumidor.

## 2 CARACTERIZACIÓN DE LA NANOEMULSIÓN


- ▶ La mejor descripción de una emulsión es a través de su distribución de tamaño de partícula, lo cual provee estadísticamente una idea de la fragmentación de la fase dispersa (Salager, 2000).

La nanoemulsión fue aplicada en jugo de jitomate y jugo verde para evaluar su efectividad antimicrobiana.

## 3 EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LA NANOEMULSIÓN EN JUGOS

- ▶ En un estudio previo (Ruíz-González *et al.*, 2019), se obtuvo la CMI del AEO nanoencapsulado en sistemas modelo de caldo STC con un valor de  $0.546 \mu\text{L/mL}$ , la cual se tomó como referencia para la aplicación de la nanoemulsión de AEO en jugos. La CMI del AEO nanoencapsulado en jugo verde y jugo de jitomate fue de  $0.450 \mu\text{L/mL}$ .

Se observó una pequeña diferencia entre los valores de la CMI del AEO nanoencapsulado en alimentos y en sistemas modelo, lo cual se puede deber a que la aplicación de la nanoemulsión pudo actuar de forma sinérgica con el pH bajo, propio de los jugos (3.51-3.71).



**LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE  
LOS AE EN ALIMENTOS  
PUEDE SER MENOR  
A LA OBTENIDA EN  
SISTEMAS MODELO,  
DEBIDO A LA  
INTERACCIÓN DE  
LOS COMPONENTES  
DE LOS ALIMENTOS  
(BURT, 2004).**

• **Caracterización de la nanoemulsión**

Un pequeño tamaño de partícula de 232.5 nm ( $D_{50}$ ), con una distribución unimodal, fue determinado para la nanoemulsión de AEO en el presente estudio. La mejor descripción de una emulsión es a través de su distribución de tamaño de partícula, lo cual provee estadísticamente una idea de la fragmentación de la fase dispersa (Salager, 2000). La nanoemulsión fue aplicada en jugo de jitomate y jugo verde para evaluar su efectividad antimicrobiana.

• **Evaluación antimicrobiana de la nanoemulsión en jugos**

En un estudio previo (Ruíz-González *et al.*, 2019), se obtuvo la CMI del AEO nanoencapsulado en sistemas modelo de caldo STC con un valor de 0.546  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , la cual se tomó como referencia para la aplicación de la nanoemulsión de AEO en jugos. La CMI del AEO nanoencapsulado en jugo verde y jugo de jitomate fue de 0.450  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Algunos autores han mencionado que la actividad antimicrobiana de los AE en alimentos puede ser menor a la obtenida en sistemas modelo, debido a la interacción de los componentes de los alimentos (Burt, 2004). En este estudio, se observó una pequeña diferencia entre los valores de la CMI del AEO nanoencapsulado en alimentos y en sistemas modelo, lo cual se puede deber a que la aplicación de la nanoemulsión pudo actuar de forma sinérgica con el pH bajo propio de los jugos (3.51-3.71). De acuerdo con otros autores, los jugos de fruta tienen un pH en el rango ácido, lo que

funciona como una barrera para el crecimiento microbiano. Sin embargo, los patógenos de los alimentos algunas veces pueden sobrevivir a estos ambientes (Aneja *et al.*, 2014). El control microbiano mostró que *S. aureus* no se inhibió con el pH ácido de los jugos. Por lo que se sugiere un efecto sinérgico con la nanoemulsión. La nanoemulsión de AEO disminuye efectivamente la población bacteriana de *S. aureus* en los jugos, después de 10 a 20 minutos de ser aplicada (figura 1). Este efecto fue más notorio cuando el tiempo de exposición se incrementó. Algunos autores han reportado que el AEO es uno de los AE más efectivos para el control antimicrobiano; ya que sus compuestos fenólicos tienen la habilidad para alterar la membrana celular, causando la inhibición de los microorganismos (Fisher y Phillips, 2008). En este estudio se observó que la inhibición total de *S. aureus* (6-log), fue más rápida en el jugo verde (50 minutos) que en el jugo de jitomate (80 minutos). Algunos autores han reportado que la inhibición microbiana producida por los desinfectantes puede variar de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de los alimentos (De Medeiros-Barbosa *et al.*, 2016). Se puede observar en la caracterización de los jugos que sus propiedades fisicoquímicas son diferentes (tabla 1). La viscosidad del jugo de jitomate ( $200.00 \pm 0.00$  mPa) es mayor que la viscosidad del jugo verde ( $80.00 \pm 0.00$  mPa), lo cual puede tener un impacto sobre la difusión de la nanoemulsión, resultados similares fueron reportados por otros autores (Mothershaw y Jaffer, 2004). Por otro lado, se ob-

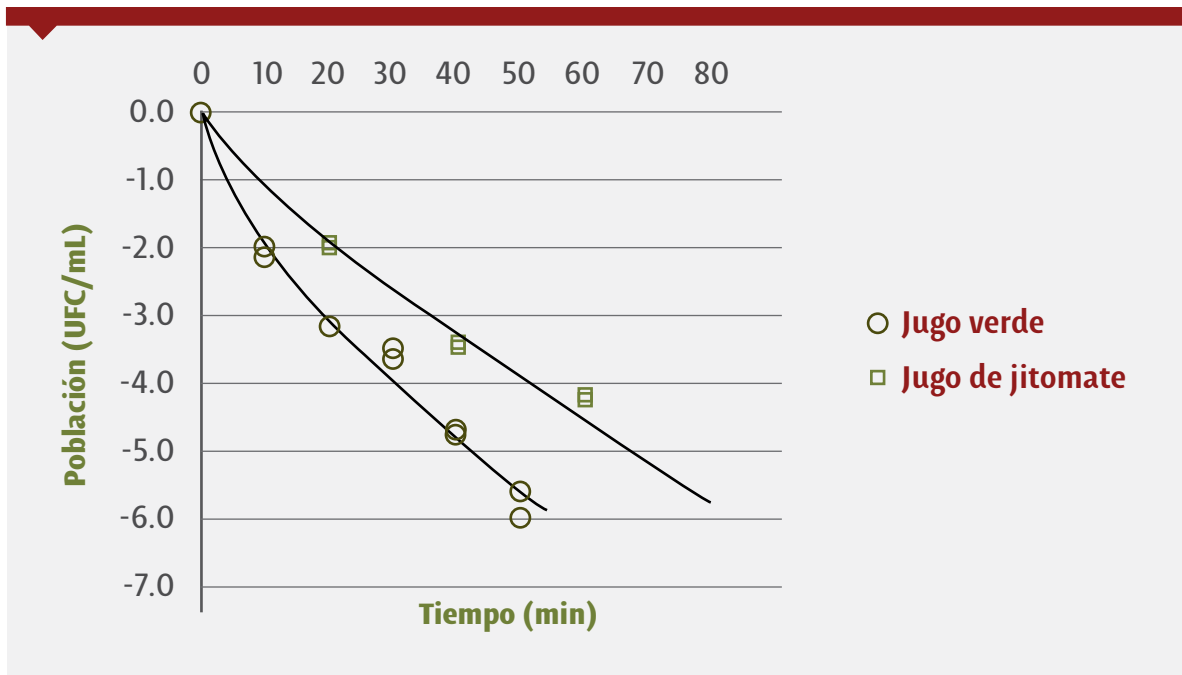


Figura 1. Actividad antimicrobiana de la nanoemulsión de aceite esencial de orégano contra *S. aureus*, aplicado en jugo de jitomate y jugo verde.

Propiedad	Jugo de jitomate	Jugo verde
°Bx	5.47±0.06 <sup>a</sup>	11.43±0.06 <sup>b</sup>
pH	3.51±0.01 <sup>a</sup>	3.71±0.01 <sup>b</sup>
a <sub>w</sub>	0.992±0.003 <sup>a</sup>	0.988±0.01 <sup>b</sup>
<b>Viscosidad (mPa)</b>	200.00±0.01 <sup>a</sup>	80.00±0.00 <sup>b</sup>

**Las mediciones se hicieron por triplicado. Diferentes letras en la misma fila, representan diferencias significativas (p<0.05).**

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de jugo de jitomate y jugo verde.



serva que en general la inhibición de *S. aureus* para ambos jugos fue rápida (menor a 80 minutos), lo cual se puede deber a que en un estudio anterior se observó que la nanoemulsión de AEO es inestable, (Ruíz-González *et al.*, 2019), lo cual podría explicar su rápida difusión en el medio. También en un estudio anterior se observó que el AEO tuvo el porcentaje de eficiencia de encapsulación más bajo ( $76.243 \pm 0.001\%$ ) (Ruíz-González *et al.*, 2019), lo cual infiere que el aceite libre en la nanoemulsión podría provocar una inhibición más rápida. El modelo de Weibull se adapta adecuadamente a las curvas de supervivencia de *S. aureus* inoculadas en jugos, a los cuales se les agregó la nanoemulsión de AEO. Las curvas experimentales se correlacionaron adecuadamente con los datos pronosticados, con  $R^2$  significativo y valores bajos de ECM ( $R^2=0.98$ ,  $ECM=0.377$  y  $R^2=0.98$ ,  $ECM=0.496$ , para jugo de jitomate y jugo verde, respectivamente).

## ◆◆ CONCLUSIONES

Se observó que el AEO nanoencapsulado por la técnica de emulsión fue efectivo para inhibir el crecimiento de *S. aureus* (6-log) en jugo verde y jugo de jitomate en cortos periodos de tiempo. Se evaluó la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los jugos en el mecanismo de acción de la nanoemulsión de AEO. Los resultados de este estudio demostraron el uso potencial de la nanoemulsión de AEO para reducir los recuentos bacterianos de *S. aureus* en jugos. El modelo de Weibull ayuda a explicar los efectos observados de la nanoemulsión de AEO en la inhibición bacteriana. Sin embargo, es necesario establecer las cantidades de uso máximas de los AES para asegurar la inocuidad de los alimentos, sin los efectos desfavorables en las características sensoriales.



### 🔗 Nancy Ruiz-González

Licenciada en Ingeniería en Alimentos por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP, 2018). Finalizó sus estudios en el programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos en la UDLAP en junio de 2020. Su tema de investigación se enfocó en la evaluación de la efectividad antimicrobiana de aceites esenciales encapsulados. [nancy.ruizgz@udlap.mx](mailto:nancy.ruizgz@udlap.mx)



### 🔗 Aurelio López-Malo

Doctor en Química (Alimentos) por la Universidad de Buenos Aires (Argentina) y profesor del Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental de la UDLAP desde 1987. Ha publicado más de 250 artículos científicos en revistas indizadas de prestigio internacional en el área de ciencia, tecnología e ingeniería de alimentos. Desde 1998 es investigador nacional (CONACYT), actualmente SNI nivel 3, y es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias. [aurelio.lopezm@udlap.mx](mailto:aurelio.lopezm@udlap.mx)



### 🔗 Enrique Palou

Doctor en Ingeniería por la Universidad Estatal del Estado de Washington (EE. UU.) y catedrático del Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental en la UDLAP desde 1992. Tiene más de 300 publicaciones científicas en el área de ciencia, tecnología e ingeniería de alimentos. Es investigador nacional (SNI) nivel 3, *Fellow* del Institute of Food Technologists, miembro de la Academia Mexicana de Ciencias y de la Academia de Ingeniería. [enrique.palou@udlap.mx](mailto:enrique.palou@udlap.mx)



### 🔗 Nelly Ramírez-Corona

Doctora en Ingeniería Química por el Instituto Tecnológico de Celaya y profesora titular del Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental en la UDLAP desde 2007. Tiene más de 30 publicaciones científicas en el área de ingeniería química y de alimentos. Es investigadora nacional (SNI) nivel 1, miembro del Consejo Directivo de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. [nelly.ramirez@udlap.mx](mailto:nelly.ramirez@udlap.mx)



### 🔗 María Teresa Jiménez-Munguía

Doctora en Ingeniería de Procesos por la ENSIA, actualmente Agro-Paris-Tech, en Francia. Profesora y directora académica del Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental en la UDLAP. Cuenta con más de 20 publicaciones en revistas indizadas de reconocimiento internacional en el área de ciencia y tecnología de alimentos. Forma parte de la Mesa Directiva de la Asociación Mexicana para la Protección de Alimentos (México) y es representante nacional en México de ISEKI-Food Association (Europa). [mariat.jimenez@udlap.mx](mailto:mariat.jimenez@udlap.mx)

## REFERENCIAS

- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V. y Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science*, (14), 1-7. doi:10.1155/2014/408085
- A.O.A.C. (1995). Official Method 981.12 - pH of acidified foods. En: Official Methods of Analysis A.O.A.C international. Association of Official Analytical Chemists.
- A.O.A.C. (1995). Official Method 932.14 - Solids in sirups. En: Official Methods of Analysis A.O.A.C international. Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- A.O.A.C. (1995). Official Method 978.18 - Water activity of canned vegetables. In: Official Methods of Analysis A.O.A.C international. Association of Official Analytical Chemists.
- Ayala-Zavala, J. F., Soto-Valdez, H., Gonzalez-Leon, A., Alvarez-Parrilla, E., Martín-Belloso, O. y Gonzalez-Aguilar, G. A. (2007). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 60(3-4), 359-368. doi: 10.1007/s10847-007-9385-1
- Bozdogan, A. (2015). Viscosity behavior of bitter orange (*Citrus aurantium*) juice as affected by temperature and concentration. *CyTA Journal of Food*, 13(4), 535-540. doi:10.1080/19476337.2015.1012120
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Coronel, C. P., Jiménez, M. T., López-Malo, A. y Palou, E. (2011). Modelling thermosonication inactivation of *Aspergillus flavus* combining natural antimicrobial at different pH. *Procedia Food Science*, (1), 1007-1014. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.151
- De Medeiros-Barbosa, I., Da Costa-Medeiros, J. A., De Oliveira, K. Á. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M. y De Souza, E. L. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. *Food Control*, (59), 468-477. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.017.
- Dewanti-Hariyadi, R. (2013). Microbiological quality and safety of fruit juices. *Foodreview international*, 1(1), 53-57.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156-164. doi: 10.1016/j.tifs.2007.11.006
- Hernandez-Hernandez, E., Regalado-Gonzalez, C., Vazquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I. y García-Almendarez, B. E. (2014) Microencapsulation, chemical characterization and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *Scientific World Journal*, (14), 1-12. doi: 10.1155/2014/641814
- Kim, S.G., Yoo, W. y Yoo, B. (2014). Relationship between apparent viscosity and line-spread test measurement of thickened fruit juices prepared with a xanthan gum-based thickener. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(3), 242-245. doi:10.3746/pnf.2014.19.3.242
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12, 409-417.
- Misharina, T. A. (2003). Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(3), 311-316. doi: 10.1023/a:1023592030874
- Mothershaw, A. S. y Jaffer, T. (2004). Antimicrobial activity of foods with different physio-chemical characteristics. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 629-638. doi:10.1081/jfp-200033062
- Peleg, M. y Cole, M. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38(5), 353-380. doi:10.1080/10408699891274246
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J. y Martín-Belloso, O. (2006). Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1579-1586. doi:10.4315/0362-028x-69.7.1579
- Ruiz-González, N., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez, N. y Jiménez-Munguía, M.T. (2019). Antimicrobial activity and physicochemical characterization of oregano, thyme and clove leave essential oils, nonencapsulated and nanoencapsulated, using emulsification. *Applied Food Biotechnology*, 6(4), 237-246. doi:10.22037/afb.v6i4.25541
- Salager, J. L. (2000). «Emulsion Properties and Related know-how to attain them». En Nielloud, F. y Marti-Mestres, G. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions* (pp. 72-125). Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- USDA (2013). Fruit and Vegetable Program. Technical Procedures Manual (pp. 1-174).
- Winniczuk, P. y Parish, M. (1997). Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against microorganisms related to citrus juice. *Food Microbiology*, 14(4), 373-381. doi:10.1006/fmic.1997.0103

